



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO FISCOQUÍMICO DE SISTEMAS LIPOSOMALES DE
DIMIRISTOILFOSFATIDILCOLINA (DMPC) Y UN TENSOACTIVO NO
IÓNICO.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO**

**PRESENTA:
JOSÉ ARMANDO MORA NAVARRETE**

**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. SILVIA DEL SOCORRO PÉREZ CASAS**



Ciudad Universitaria, CD. MX., 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DOMÍNGUEZ DANACHE RAMIRO EUGENIO

VOCAL: PÉREZ CASAS SILVIA DEL SOCORRO

SECRETARIO: LEMUS BARAJAS MA GUADALUPE

1ER SUPLENTE: GONZÁLEZ CHIMEO EMMA

2DO SUPLENTE: CARLOS JUAREZ OSORNIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EDIFICIO F, LABORATORIO 301 DE BIO-FISICOQUÍMICA

DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA

FACULTAD DE QUÍMICA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Abreviaturas, símbolos y constantes físicas.

DMPC	L- α -dimiristoíl fosfatidilcolina
CHOL	Colesterol
IBU	Ibuprofeno
OGP	Octil- β -D-glucopiranosido
HLB	Hydrophilic Lipophilic Balance (Balance Lipofílico-Hidrofílico)
CMC	Concentración micelar crítica
COX-1	Ciclooxigenasa -1
COX-2	Ciclooxigenasa -2
pKa	Logaritmo negativo de la constante de acidez ó disociación ácida.
W^s	Trabajo superficial
γ	Tensión superficial
G^s	Energía libre de superficie
A	Área de superficie
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas
MUV	Vesículas unilamelares medianas
LUV	Vesículas unilamelares grandes
ΔH	Diferencia de Entalpía
Q_p	Calor a Presión constante
ΔS	Diferencia de entropía

T	Temperatura
ΔG	Diferencia de energía libre de Gibbs
ITC	Calorimetría de titulación isotérmica
h_i	Calor de interacción liposoma-tensoactivo en una inyección "i"
n_i	Cantidad molar de tensioactivo unido en la etapa de inyección "i"
ΔH_D	Entalpía de reparto
ΔS_D	Entropía de reparto
ΔG_D	Energía libre de reparto
H_i	Calor de reacción
H_{dil}	Calor de dilución
$C_{D,b}$	Concentración de tensioactivo unido
V_{cell}	Volumen de celda
n_D^0	Cantidad molar total de tensioactivo
$n_{D,b}$	Cantidad molar de tensioactivo unido a membranas lipídicas
n_f	Cantidad molar de tensioactivo en fase acuosa
n_L^0	Cantidad molar de lípido
K	Constante de reparto
$C_{D,f}$	Concentración de tensioactivo libre en solución
R_b	Relación molar de tensioactivo unido a la membrana.
DSC	Calorimetría Diferencial de barrido
C_p	Capacidad calorífica

T_0	Temperatura inicial
T_f	Temperatura Final
T_m	Temperatura de transición principal
L_c	Fase sub-gel
L_β	Fase gel
P_β	Fase ondulada
L_α	Fase cristal líquido
k	Constante de equilibrio
ΔH_{VH}	Entalpía de Van't Hoff
$C_{p_{max}}$	Capacidad calorífica
$C.U.$	Relación de unidades cooperativas
$\Delta T_{1/2}$	Cooperatividad de transición
$\Delta\mu_D$	Potencial químico tensoactivo
DLS	Dispersión dinámica de luz
$d(H)$	Diámetro hidrodinámico
κ	Constante de Boltzmann
D	Coeficiente de difusión traslacional
η	Viscosidad
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión

ÍNDICE

Resumen	6
Objetivos	7
Hipótesis	8
Introducción	9

Capítulo 1. Fosfolípidos, Tensoactivos y Fármacos

1.1	Lípidos	11
1.2	L- α - dimiristoíl fosfatidilcolina	16
1.3	Colesterol	17
1.4	Tensoactivos	18
1.5	Tensoactivos glucopiranósidos	20
1.6	Octil- β -D-glucopiranósido	20
1.7	Fármacos antiinflamatorios no esteroideos	22
1.8	Ibuprofeno	23

Capítulo 2. Interfases, sistemas dispersos y liposomas

2.1	Interfases: zonas de alta energía	25
2.2	Tensión interfacial	26
2.3	Tensoactivos y sustancias anfífilas en interfases	28
2.4	Sistemas Dispersos	30

2.5	Generalidades sobre liposomas	31
2.6	Clasificación de liposomas	32
2.7	Composición de liposomas y relevancia farmacéutica de la tecnología liposomal	33

Capítulo 3. Técnicas utilizadas en la elaboración y caracterización de suspensiones liposomales

3.1	Método convencional de fabricación de liposomas – Método de Bangham	36
3.2	Técnicas de homogeneización auxiliares en la elaboración de sistemas liposomales	38
3.3	Fundamento de las técnicas calorimétricas	40
3.4	Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)	41
3.5	Interacciones Tensoactivo-Liposoma	43
3.6	Ecuación y modelo de reparto de tensoactivos en sistemas liposomales	45
3.7	Calorimetría Diferencial de Barido (DSC)	50
3.8	Mesofases liotrópicas en bicapas lipídicas	52
3.9	Efecto de la adición de colesterol y tensoactivos a sistemas liposomales	58
3.10	Dispersión dinámica de luz	61
3.11	Microscopía electrónica SEM y TEM	63

Capítulo 4. Metodología Experimental

4.1	Esquema general	67
4.2	Elaboración de sistemas liposomales	68
4.3	Calorimetría de Titulación Isotérmica	69
4.4	Calorimetría Diferencial de Barrido	70
4.5	Dispersión Dinámica de Luz	70

Capítulo 5. Resultados y Discusión

5.1.0	Calorimetría de Titulación Isotérmica	72
5.1.1	Sistema DMPC	73
5.1.2	Sistema DMPC:CHOL	75
5.1.3	Sistema DMPC:IBU	77
5.1.4	Sistema DMPC:IBU:CHOL	79
5.1.5	Análisis de tendencias Calorimetría de Titulación Isotérmica	80
5.2.0	Calorimetría Diferencial de Barrido	88
5.2.1	Sistema DMPC y DMPC:OGP	89
5.2.2	Sistema DMPC:CHOL y DMPC:CHOL:OGP	92
5.2.3	Sistema DMPC:IBU y DMPC:IBU:OGP	94
5.2.4	Sistema DMPC:IBU:CHOL y DMPC:IBU:CHOL:OGP	96
5.2.5	Análisis de tendencias DSC	98
5.3.0	Dispersión Dinámica de Luz y Microscopía Electrónica	104

SEM y TEM

5.3.1	Sistema DMPC y DMPC:OGP	104
5.3.2	Sistema DMPC:CHOL y DMPC:CHOL:OGP	107
5.3.3	Sistema DMPC:IBU y DMPC:IBU:OGP	111
5.3.4	Sistema DMPC:IBU:CHOL y DMPC:IBU:CHOL:OGP	114

Capítulo 6. Conclusiones y perspectivas

6.1	Conclusiones	117
6.2	Perspectivas	119
	Referencias	120

Resumen

Los primeros sistemas de fosfolípidos ensamblados en bicapas cerradas, llamados liposomas, fueron estudiados en 1965 y pronto fueron propuestos como sistemas liberadores de fármacos y como modelos en el estudio en procesos de membranas celulares. Luego de cinco décadas de investigación en el área y de que algunas formulaciones liposomales salieran a la venta, aún existen numerosos retos que involucran aspectos como la estabilidad de los sistemas, su interacción con diversas sustancias y los estudios de liberación y transporte de fármacos. En este trabajo se estudian las propiedades fisicoquímicas de ocho sistemas liposomales con el fin de analizar el efecto de la adición de un tensoactivo no iónico, colesterol y un fármaco hidrófobo sobre las propiedades fisicoquímicas de liposomas de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC). El tensoactivo no iónico empleado es el octil- β -D-glucopiranosido (OGP) y el modelo de fármaco hidrófobo es el ibuprofeno. Las técnicas experimentales empleadas son calorimetría de titulación isotérmica (ITC), calorimetría diferencial de barrido (DSC), dispersión de luz dinámica (DLS), microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Mediante el conjunto de técnicas seleccionadas se caracteriza a los sistemas y se presenta un análisis de la interacción entre liposomas de DMPC y tensoactivo OGP, así como el cambio en sus propiedades termotrópicas y morfológicas al adicionar cada uno de los componentes del estudio. La información y análisis que se presenta en este trabajo puede contribuir en la formulación de sistemas liberadores de fármacos basados en tecnología liposomal.

Objetivos

Objetivo general.

Presentar un estudio de sistemas de vesículas mixtas constituidas por DMPC y OGP para ser probados como nanoencapsuladores de un modelo de fármaco hidrófobo mediante técnicas calorimétricas: calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y calorimetría diferencial de barrido (DSC); así como técnicas para el estudio de morfología y tamaño: dispersión dinámica de luz (DLS), microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Objetivos particulares.

- Estudiar los efectos de la adición de OGP, colesterol e ibuprofeno sobre las propiedades fisicoquímicas de los sistemas liposomales formados por DMPC.
- Determinar la entalpía de reparto y la constante de reparto del tensoactivo OGP en vesículas de DMPC mediante el ajuste de un modelo termodinámico sobre la respuesta instrumental de un estudio en ITC.
- Analizar los efectos de la adición de componentes sobre las propiedades termotrópicas de los sistemas liposomales de DMPC (ΔH de transición, T_m y $T_{1/2}$) por medio de DSC.
- Determinar el tamaño de partícula de cada uno de los sistemas estudiados mediante DLS en un lapso de diez días.

- Estudiar la morfología de los sistemas liposomales mediante SEM y TEM.
- Correlacionar el tamaño de partícula y morfología de los sistemas liposomales con la estabilidad coloidal y los estudios calorimétricos.

Hipótesis

La mayoría de las moléculas de interés farmacológico son compuestos de baja solubilidad que por sí solos poseen una baja biodisponibilidad. En general, uno de los objetivos de la tecnología farmacéutica es favorecer la biodisponibilidad de los fármacos por medio de formas farmacéuticas; una de estas formas farmacéuticas son los sistemas liposomales.

Se propone el estudio de propiedades fisicoquímicas y transiciones de fase de sistemas liposomales de DMPC capaces de encapsular ibuprofeno. El ibuprofeno es empleado como un modelo de fármaco hidrofóbico y en el desarrollo de fórmula, se propone el uso de colesterol y tensoactivo no iónico (OGP), con el fin de caracterizar la respuesta fisicoquímica de la adición de componentes al sistema liposomal e identificar el sistema más estable que encapsule al fármaco.

Introducción

La importancia de la nanotecnología farmacéutica reside en la posibilidad de suministrar tanto fármacos de baja masa molar, así como macromoléculas, tales como los péptidos, las proteínas o genes. El suministro de estas sustancias puede llevarse a cabo de manera localizada o dirigida hacia algún tejido de interés y tener un mecanismo de liberación prolongada, con lo cual se reduzcan los efectos toxicológicos y se favorezca la acción terapéutica. La nanotecnología farmacéutica se enfoca en el desarrollo de formulaciones de agentes terapéuticos en nano complejos biocompatibles, como son las nano-cápsulas, los sistemas micelares, los dendrímeros, los fullerenos, etc [1-3].

En 1995 se da a conocer la aprobación de Doxil®, una formulación farmacéutica para el suministro de doxorubicina en el tratamiento de cáncer de mama, siendo ésta la primer formulación liposomal aprobada [4], la cual fue capaz de disminuir esclarecidamente los efectos de toxicidad del fármaco y favorecer a la distribución y metabolismo del mismo. A partir de entonces se ha desarrollado una nueva generación de formulaciones farmacéuticas basadas en tecnología liposomal, generando así una plausible área de investigación [5].

Existe una gran cantidad de fármacos cuyas propiedades terapéuticas y farmacológicas se ven limitadas de forma intrínseca por su baja solubilidad en medios acuosos, baja estabilidad, una farmacocinética desfavorable o la cantidad de efectos adversos que puedan generar. Todas estas circunstancias presentan una limitación para la dosis máxima tolerable, sin embargo, los métodos de suministro de fármacos a nanoescala, tales como la tecnología liposomal empleada en el desarrollo de Doxil® , presentan una

solución para estas limitaciones. Además de su uso en terapias contra el cáncer, las tecnologías liposomales se muestran a su vez como una opción en el desarrollo de vacunas, tratamientos antiparasitarios y tecnologías de alimentos. La composición y estructura de los sistemas liposomales es similar al de las membranas celulares, por lo que han sido utilizados para simular la interacción entre biomoléculas y otros compuestos con la membrana lipídica de las células [8]. Para profundizar en el tema, en los siguientes capítulos se abordarán diversos tópicos sobre las generalidades en las sustancias que conforman a los liposomas, su estructura, su interacción con componentes como tensoactivos y colesterol, además de la nanoencapsulación de fármacos liposolubles [5-7].

Capítulo 1.

Fosfolípidos, Tensoactivos y Fármacos.

En el desarrollo de sistemas liberadores de fármacos, actualmente se buscan formulaciones basadas en nanocomplejos biocompatibles, entre los cuales se destacan los sistemas liposomales; éstos serán el tema sobre el cual se desarrollen los siguientes capítulos, sobre todo en lo referente a los aspectos fisicoquímicos. Para iniciar este estudio, se dedica el primer capítulo a aquellas sustancias que conforman los liposomas, a las sustancias que se incorporan a ellos para mejorar su estabilidad coloidal y a los fármacos que encapsulan.

1.1 Lípidos

Los lípidos son un conjunto de moléculas biológicas conformadas por cadenas hidrocarbonadas, que debido a su estructura, presentan baja solubilidad en agua y alta solubilidad en disolventes no polares. Los lípidos tienen funciones estructurales, energéticas y reguladoras en los organismos vivos.

Los esteroides, prostaglandinas, grasas, aceites, ceras y carotenos son lípidos. En el contexto de la química orgánica, los lípidos pueden ser clasificados de acuerdo a su

solubilidad en lípidos complejos y lípidos simples. Los lípidos complejos son aquéllos fáciles de hidrolizar a sustituyentes más simples. La mayor parte de los lípidos complejos son ésteres de ácidos carboxílicos de cadena larga denominados *ácidos grasos*. Los dos principales grupos de los ésteres de ácidos grasos son las ceras y los glicéridos. Las ceras son ésteres de alcoholes de cadena larga y los glicéridos son ésteres de la glicerina.

Los lípidos simples son aquéllos que no se hidrolizan fácilmente en disolución acuosa ácida o básica. Se consideran tres importantes grupos dentro de los lípidos simples: esteroides, prostaglandinas y terpenos.

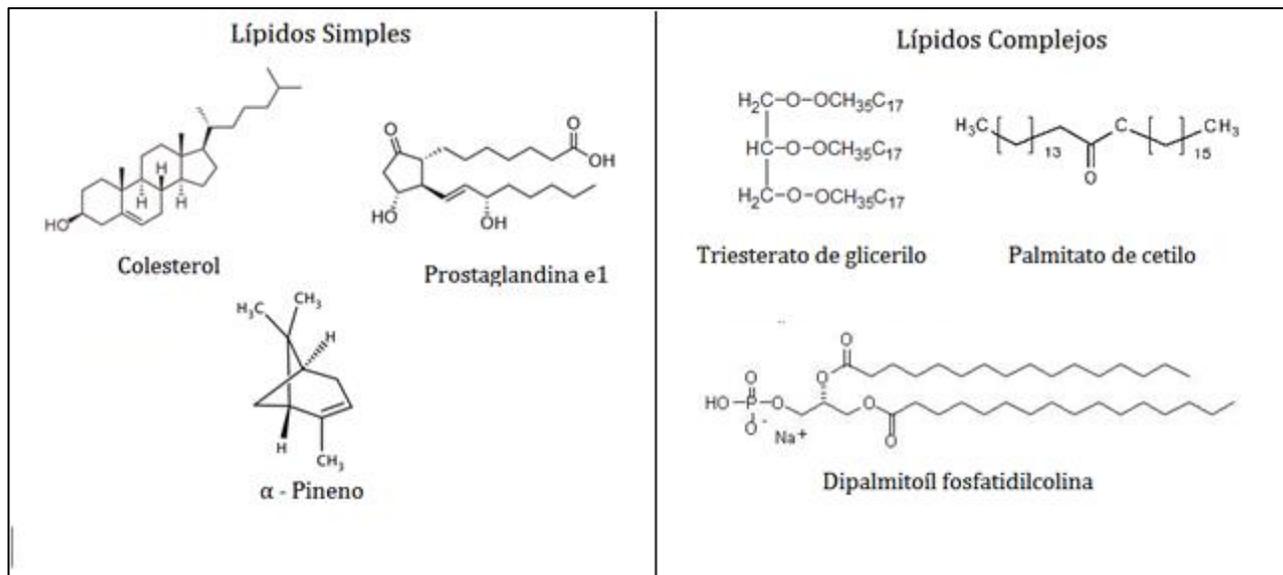


Figura 1. Lípidos simples y lípidos complejos.

En la Figura 1 se presentan ejemplos de lípidos simples como el colesterol, que pertenece al grupo de los esteroides, la prostaglandina e1, que es un tipo de hormona lipídica y el α -pineno que es un terpeno. Por otra parte, en los lípidos complejos se presenta al triestearato de glicerilo que es un triglicérido, el palmitato de cetilo que es una cera (éster derivado de ácidos grasos) y el dipalmitoil fosfatidilcolina que es un fosfolípido.

En este estudio se emplean dos lípidos, que son el colesterol y el L- α -dimiristoíl fosfatidilcolina, los cuales pertenecen a los grupos de esteroides y fosfolípidos respectivamente [9-10]. En las siguientes líneas se detallan las características estructurales y reactivas de estos dos grupos.

Los esteroides son moléculas policíclicas complejas que se encuentran en todas las plantas y animales y se clasifican como lípidos simples, ya que no experimentan hidrólisis como las grasas, aceites y ceras. Los esteroides son compuestos cuyas estructuras son derivadas de la estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno (androstano), representado en la *Figura 2*.

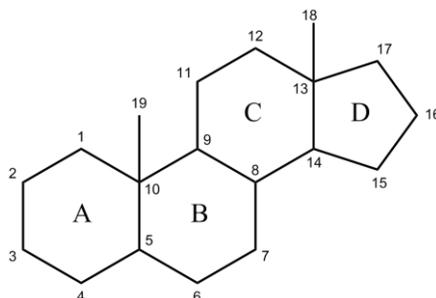


Figura 2. Ciclopentanoperhidrofenantreno, estructura general de los esteroides.

A los cuatro anillos se les designa como A, B, C y D, comenzando por el anillo inferior izquierdo. Los átomos de carbono se numeran a partir del anillo A y terminando por los dos grupos metilo angulares (axiales). Los anillos son generalmente alifáticos y en la mayoría de los casos, los esteroides poseen un grupo funcional carbonilo o hidroxilo en C3, el cual les confiere un débil carácter anfifílico. En la posición C17, los esteroides poseen una ramificación hidrocarbonada o un grupo funcional.

Respecto a la estereoquímica que presentan los esteroides, es relevante mencionar que en la mayoría de los casos, la unión de los anillos presenta la forma *trans*, la cual provee a la estructura de cierto grado de rigidez y planaridad. Los grupos metilo C18 y C19 se orientan de manera axial cuando se presenta la unión de los anillos en la forma *trans* [11-12]. En la figura 3 se ilustra la forma *trans* en la unión de los anillos que conforman a los esteroides.

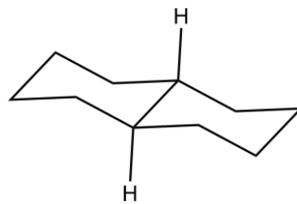


Figura 3. Isomería trans de la unión de dos anillos que conforman a un esteroide.

El siguiente grupo de lípidos por abordar, corresponde a los fosfolípidos, que son compuestos que contienen grupos derivados del ácido fosfórico y que poseen una considerable importancia biológica al ser uno de los principales constituyentes de las membranas celulares de plantas y animales. Los fosfolípidos más frecuentes son los fosfoglicéridos, que son compuestos que contienen una molécula de glicerina esterificada por dos ácidos grasos.

Algunos fosfolípidos contienen un alcohol o una amina adicional esterificada con el grupo ácido fosfórico, como ejemplo de ambos casos se encuentran las cefalinas y las colinas. Las cefalinas son ésteres de etanolamina y las lecitinas son ésteres de la colina [9-10]. En la *Figura 4* se presenta la estructura general de los fosfolípidos, la cual consta de un grupo

polar, un grupo fosfato, glicerol y un par de cadenas hidrocarbonadas. Los fosfolípidos presentan así una sección polar con características hidrófilas y una sección no polar con características hidrófobas. La sección polar de los fosfolípidos está constituida por el glicerol, el grupo fosfato y el grupo polar (etanolamina ó colina), mientras que la sección no polar de los fosfolípidos está constituida por cadenas hidrocarbonadas que pueden ser saturadas o insaturadas [13].

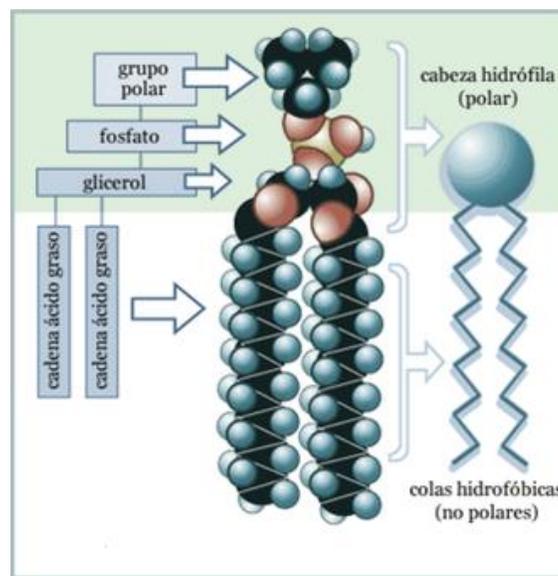


Figura 4. Estructura de un fosfolípido [13].

La naturaleza anfifílica de los fosfolípidos les confiere propiedades interfaciales de interés, ya que los fosfolípidos forman agregados moleculares con sus cabezas polares orientadas hacia la zona exterior y las cadenas no polares orientadas hacia el interior, tal como se presentan en las membranas celulares; éstas contienen fosfoglicéridos que forman una doble capa lipídica que constituye una barrera que restringe de forma selectiva el paso de agua y de diversas sustancias [9]. En el Capítulo 3 se abordarán más detalles acerca de las estructuras moleculares autoensambladas que pueden formar los fosfolípidos.

1.2 L- α - dimiristoíl fosfatidilcolina

La L- α -dimiristoíl fosfatidilcolina (DMPC) es un fosfolípido constituido por dos cadenas hidrocarbonadas saturadas de 14 carbonos, las cuales, constituyen la parte hidrófoba de este fosfolípido. La parte hidrofílica está constituida por el grupo fosfato y la colina, la cual posee una amina cuaternaria. La parte hidrófila del DMPC es de naturaleza zwitteriónica, esto es, la región hidrófila es eléctricamente neutra, pero posee cargas formales positivas y negativas sobre los átomos de nitrógeno y oxígeno respectivamente.

Las fosfatidilcolinas son los fosfolípidos más abundantes en las membranas celulares de los mamíferos y llegan a comprender un intervalo de 45% a 55% mol de su composición, debido a esto, los fosfolípidos se han presentado como sustancias inocuas y biocompatibles que han sido utilizadas en formulaciones farmacéuticas, cosméticas y nutracéuticas [14].

El DMPC ha sido utilizado en la fabricación de formas farmacéuticas basadas en tecnología liposomal como: Visudyne®, Aroplatin® y Atragen®, por mencionar algunos ejemplos [5].

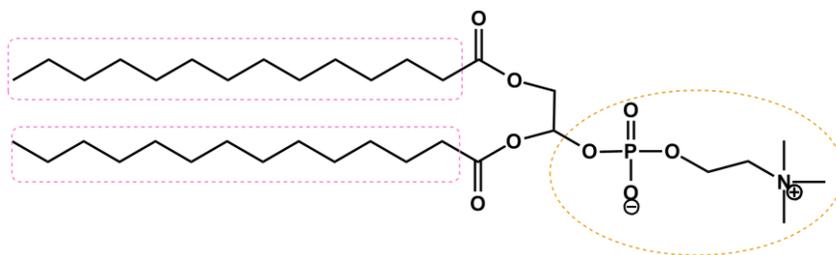


Figura 5. Estructura de L- α -dimiristoíl fosfatidilcolina (DMPC).

1.3 Colesterol

El colesterol es un importante esteroide que constituye el 10-20% mol en la composición de células animales y desempeña funciones estructurales y metabólicas en los organismos. Entre sus características químicas relevantes destacan el grupo –OH presente en C3, el cual le confiere un débil carácter anfifílico a la molécula; una ramificación de 8 carbonos en la posición de C17 y una insaturación entre C5 y C6 [11-12].

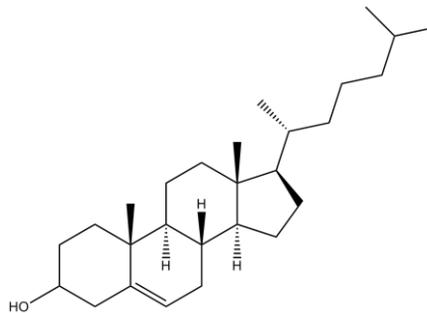


Figura 6. Estructura del Colesterol.

Considerando la estructura del colesterol, cabe mencionar que el grupo –OH está orientado hacia la parte externa de las membranas lipídicas. Su estructura planar y su carácter principalmente hidrófobo, hacen que interaccione fuertemente con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, por lo que la presencia de colesterol en las membranas lipídicas incrementa la rigidez de la membrana. El colesterol modula la fluidez de las membranas lipídicas, así como su espesor. El colesterol no se distribuye de manera aleatoria sobre las membranas, sino que tiende a formar microdominios ordenados [15].

1.4 Tensoactivos

Los tensoactivos son sustancias ampliamente empleadas en formulaciones cosméticas y farmacéuticas como agentes solubilizantes de sustancias liposolubles, como modificadores reológicos o como agentes activos para mejorar la elasticidad de sistemas de liberación en la administración de fármacos a través de membranas biológicas.

Se denominan tensoactivos a las sustancias que poseen actividad superficial en una interfase, adsorbiéndose en ella e influyendo sobre la tensión superficial. Esencialmente, una molécula considerada como tensoactivo, posee una naturaleza anfifílica, esto es, poseen una región hidrófila y una región hidrófoba, tal cual se ilustra en las diferentes estructuras de la *Figura 7*. Considerando la estructura de un tensoactivo, éstos pueden clasificarse según su HLB o su masa molar [16-17].

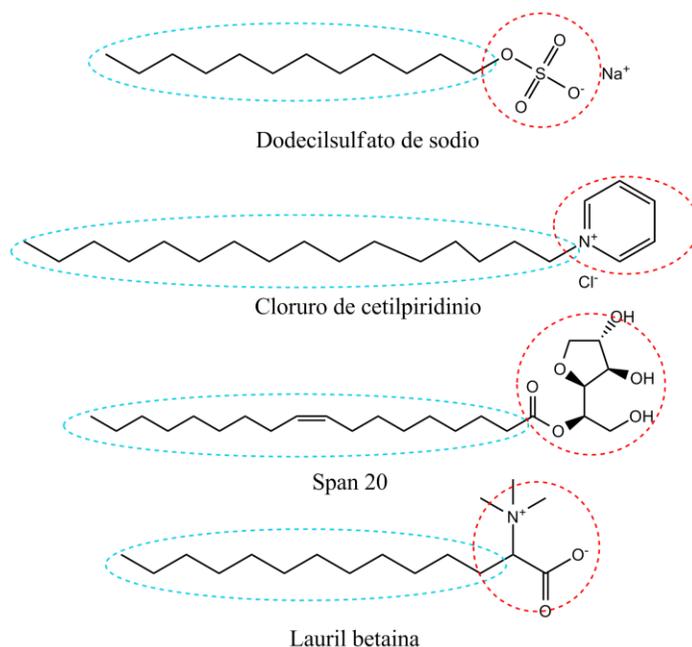


Figura 7. Estructuras de tensoactivos.

La relación entre el carácter hidrófilo e hidrófobo de un tensoactivo se conoce como Balance Lipofílico-Hidrofílico (HLB), el cual se describe mediante una escala que posee valores entre cero y veinte, donde los tensoactivos con carácter lipófilo se encuentran por debajo de 10 y los tensoactivos con carácter hidrófilo por encima de 10.

Existen cuatro clases de tensoactivos: catiónicos, aniónicos, no iónicos y zwitteriónicos. La clasificación de estas cuatro clases de tensoactivos consiste en el carácter que posee la región hidrofílica de estos. En la Figura 7 se presenta al dodecil sulfato de sodio como ejemplo de tensoactivo aniónico, al cloruro de cetil piridinio como tensoactivo catiónico, Span 80 como ejemplo de tensoactivo no iónico y lauril betaína como tensoactivo zwitteriónico.

Los tensoactivos poliméricos (de alta masa molar) son macromoléculas que poseen grupos hidrófilos e hidrófobos a lo largo de su estructura y su comportamiento y propiedades fisicoquímicas dependen de la distribución de sus grupos funcionales. Se dividen en tensoactivos poliméricos (como polisiloxanos) y macrosurfactantes (como las ciclodextrinas).

Los tensoactivos confinados en un sistema comprendido por una fase líquida compuesta por agua y una fase gaseosa comprendida por aire, migran hacia la interfase líquido-vapor, saturándola hasta su totalidad. Cuando la interfase se satura por completo, las moléculas de tensoactivo se orientan en una organización molecular denominada micela, cuya estructura se encuentra en equilibrio dinámico con las moléculas de tensoactivo en disolución y las adsorbidas en la interfase. En el siguiente capítulo se abordará este fenómeno con detalle [16-18].

1.5 Tensoactivos glucopiranósidos

Los tensoactivos no iónicos representan a uno de los grupos más ampliamente usados en formulaciones farmacéuticas y cosméticas, debido a que presentan un buen desempeño como solubilizantes, emulsificantes y estabilizadores de sistemas coloidales. Los tensoactivos no iónicos más frecuentes son aquéllos que presentan grupos de óxido de etileno (tensoactivos polietoxilados) tal como los tensoactivos derivados del sorbitol (Tween 80, Span 40, etc.). Como una alternativa al uso de tensoactivos polietoxilados, se han propuesto estructuras biodegradables, biocompatibles y de baja toxicidad basadas en carbohidratos.

Los tensoactivos glucopiranósidos se obtienen a partir de la esterificación de glucosa con ácidos grasos, dando origen a moléculas anfifílicas, cuya región hidrófila adquiere un carácter polar debido a los grupos hidroxilo de la glucosa; la región hidrófoba está constituida por la cadena hidrocarbonada del ácido graso.

Estudios recientes han mostrado que los tensoactivos glucopiranósidos poseen características fisicoquímicas favorables como una alta actividad superficial/interfacial, buen desempeño como emulsificantes y solubilizantes, bajas CMC's y alta biocompatibilidad en humanos y animales [19-20].

1.6 Octil- β -D-glucopiranósido

El Octil- β -D-glucopiranósido (OGP) es un tensoactivo glucopiranósido derivado de la β -D-glucopiranososa y del ácido octanoico. El OGP posee una cadena hidrocarbonada de ocho

unidades y una región polar constituida por una cabeza de glucosa; es uno de los tensoactivos glucopiranosidos más estudiados y se sabe que posee una CMC de 25mM un número de agregación de 27-65 moléculas por micela [12] y un HLB de 12.4, el cual es calculado mediante la Ecuación (1).

$$HLB = \frac{\text{Masa molar de la región hidrofílica}}{\text{Masa molar de OGP}} \times 20 \quad (1)$$

$$HLB = \frac{179.06 \text{ g/mol}}{292.37 \text{ g/mol}} \times 20 = 12.25$$

El OGP se ha convertido en uno de los tensoactivos más empleados en purificación y cristalización de proteínas de membrana, debido a que no desnaturaliza proteínas y puede eliminarse fácilmente de los extractos proteicos finales.

Una de las propiedades fisicoquímicas más relevantes del OGP es su insensibilidad a la temperatura cuando éste se encuentra en disolución. Esta insensibilidad es causada por los puentes de hidrógeno que pueden formar los grupos –OH de la región hidrofílica con las moléculas de agua, evitando así la deshidratación de la región polar del tensoactivo y las consecuencias que trae consigo (aumento de número de agregación y cambios morfológicos en micelas) [19-20].

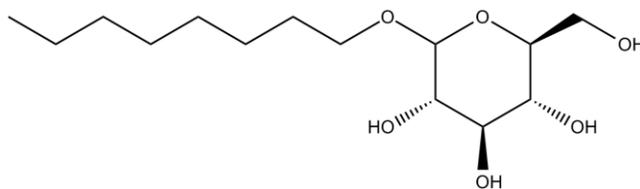


Figura 8. Octil-β-D-glucopiranosido (OGP)

1.7 Fármacos antiinflamatorios no esteroideos

Se define como fármaco a toda sustancia natural, sintética o biotecnológica que tenga alguna actividad farmacológica (efecto benéfico o adverso sobre la salud), que sea identificable por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas y cuya actividad y efectos varíen en función de la cantidad absorbida por el organismo; tal que estas características permitan a la sustancia ser empleada como ingrediente activo en una forma farmacéutica [21].

Los fármacos antiinflamatorios son un grupo de sustancias ampliamente usadas para tratar el dolor, la inflamación y la fiebre. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la actividad enzimática de COX-1 y COX-2, las cuales son ciclooxigenasas que producen la síntesis de prostaglandinas; dado que las prostaglandinas participan en las respuestas inflamatorias al estimular las terminales nerviosas del dolor, los fármacos antiinflamatorios actúan inhibiendo las ciclooxigenasas y así, la producción de prostaglandinas.

Los fármacos antiinflamatorios se clasifican en esteroideos y no esteroideos. Los antiinflamatorios esteroideos consisten en estructuras basadas en glucocorticoides y mineralocorticoides, mientras que los antiinflamatorios no esteroideos poseen estructuras moleculares clasificadas como: salicilatos, arilacéticos, arilpropiónicos, indolacéticos, pirazonas y fenamatos.

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos pueden clasificarse en tres grupos, atendiendo al grado de inhibición de ciclooxigenasa COX-1 y COX-2. El primer grupo corresponde a los inhibidores selectivos de la COX2, que se caracterizan principalmente por una menor toxicidad gástrica. En el segundo grupo se encuentran los inhibidores intermedios de la COX-2, cuya actividad farmacológica depende de la dosis de uso. En el tercer grupo se encuentran los antiinflamatorios clásicos o no selectivos de la COX-2, con inhibición de ambas enzimas [22-25].

1.8 Ibuprofeno

El ibuprofeno es un antiinflamatorio no esteroideo derivado del ácido arilpropiónico y clasificado como antiinflamatorio no selectivo de la COX-2. Debido a su actividad antipirética y antiinflamatoria, el ibuprofeno es uno de los antiinflamatorios más recetados; se comercializa en diferentes formas farmacéuticas como: tabletas, cápsulas, supositorios y granulados.

Actualmente, el ibuprofeno suele administrarse en dosis de 600 a 800 mg, con frecuencia de una dosis cada 8 horas. Presenta una buena absorción por vía oral y el punto máximo de liberación se alcanza entre una y dos horas después de su administración, ligando hasta el 99% de moléculas de ibuprofeno a proteínas plasmáticas.

El ibuprofeno presenta una baja solubilidad en agua (21 mg/L a 25°C), posee un carácter hidrófobo, un pKa de 5.3 y un área superficial de 37.3 Å. En su estructura molecular se

encuentra presente un anillo aromático y dos ramificaciones orientadas en posición *para*. En una de las ramificaciones se encuentra un ácido carboxílico [22-24].

El ibuprofeno ha sido utilizado como modelo de fármaco hidrófobo en numerosos estudios en el campo de la nanotecnología farmacéutica, los cuales incluyen la presencia de micelas, nanopartículas poliméricas, nanotubos de carbono, liposomas y nanosuspensiones [25].

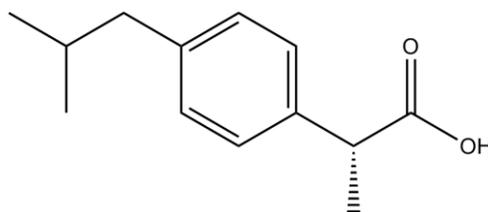


Figura 9. Estructura molecular del ibuprofeno.

Capítulo 2.

Interfases, sistemas dispersos y liposomas

En el capítulo anterior se mencionó que los fosfolípidos y tensoactivos tienden a agregarse en estructuras ordenadas bajo ciertas condiciones fisicoquímicas; en este capítulo se presenta una introducción a los fenómenos naturales involucrados en la formación de estas estructuras autoensambladas y su relación con las leyes de la termodinámica y los fenómenos de superficie.

2.1 Interfases: zonas de alta energía

En fisicoquímica, se denomina fase a una región homogénea de un sistema fisicoquímico que posee propiedades intensivas constantes. Un sistema puede estar constituido por más de una fase, y a la región comprendida entre dos fases se le denomina interfase.

Una interfase es aquella región a través de la cual las propiedades intensivas del sistema cambian desde las correspondientes a una fase hasta las correspondientes a otra. En una interfase existe un gran valor de energía libre de carácter positivo, lo que permite su existencia como una frontera estable entre dos fases. Mientras más grande sea la energía libre de una interfase, mayor será la energía necesaria para que las fuerzas intermoleculares, gravedad o movimiento browniano rompan esta barrera y se mezclen las fases.

Pese a que las interfases constituyen una pequeña fracción de un sistema, los efectos de las interfases se vuelven notables en sistemas que poseen gran área superficial, tal como los coloides, los sólidos porosos y los sistemas dispersos.

En la naturaleza, desde un punto de vista macroscópico, los sistemas dispersos tienden a minimizar su área superficial mediante la separación de fases, dado que esto reduce el valor de la energía libre del sistema e incrementa el valor de la entropía; esto como una consecuencia directa de la segunda ley de la termodinámica, de la cual se pueden citar dos enunciados representativos:

- Todo proceso espontáneo e irreversible conlleva a un incremento de la entropía del universo.
- En un sistema aislado se alcanza el equilibrio termodinámico en el valor máximo de la entropía [26-29].

2.2 Tensión interfacial

En el estudio de interfases, la tensión interfacial es una propiedad crítica, pues está directamente relacionada con la energía cohesiva que une a los átomos o moléculas de esta región. Para crear una interfase es necesario ejercer un trabajo sobre el sistema, tal que si esto se realiza a una temperatura y presión constante, el trabajo superficial reversible a temperatura y presión constante estará definido como:

$$\delta W_{T,P}^S = \gamma dA \quad (2)$$

Donde γ es el cociente de proporcionalidad entre el trabajo superficial y el cambio de área involucrado, tal que la tensión superficial puede definirse como una fuerza intrínseca,

perpendicular a una fase y dirigida hacia el seno de ésta, tal que es la fuerza responsable de la tendencia de la superficie a contraerse y hacer que asuma el estado de energía mínima. Para el caso de los líquidos como el agua, es esta propiedad la que hace que una gota posea una forma esférica.

En procesos reversibles, el trabajo superficial es igual a la variación de energía libre total de la superficie, la cual es igual a la energía libre superficial (G^s) multiplicada por el área superficial (A):

$$\delta W_{T,P}^S = d(G^s A) \quad (3)$$

La creación de una interfase va acompañada de un incremento de la energía libre del sistema, y es que una interfase se forma mediante un incremento de área superficial, tal que mediante la igualación de las ecuaciones (2) y (3), se define a la tensión superficial como la relación directa del cambio de la energía libre superficial con respecto al área a temperatura y presión constante:

$$\gamma = G^s = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{T,P} \quad (4)$$

La dependencia de la tensión superficial con la temperatura a presión constante está dada por:

$$\left(\frac{\partial G^s}{\partial T} \right)_P = \left(\frac{\partial \gamma}{\partial T} \right)_P = -S^s \quad (5)$$

Tal que la tensión superficial tiende a decrecer con el aumento de temperatura debido al incremento de energía cinética [26-29].

2.3 Tensoactivos y sustancias anfifílicas en interfases

En el capítulo anterior se mencionaron las características fisicoquímicas principales sobre los tensoactivos y su capacidad para formar estructuras autoensambladas, ahora bien, es importante resaltar el impacto de los tensoactivos en interfases.

Cuando se adiciona gradualmente un tensoactivo en agua, éste, en un principio tiende a migrar y concentrarse en la superficie o interfase, y a medida que la concentración de tensoactivo es mayor en el sistema, comienza establecerse un equilibrio dinámico entre las moléculas que se encuentran disueltas en el seno y aquellas que se encuentran adsorbidas en la en la interfase.

Cuando la concentración de monómeros de tensoactivo en el sistema es tal que la superficie se encuentra saturada, los monómeros de tensoactivo comienzan a agregarse en estructuras que reducen la energía libre del sistema, estas estructuras se denominan micelas y la geometría, disposición y tamaño que adopten es dependiente de la naturaleza de los tensoactivos y sustancias anfifílicas que los formen, así como de las condiciones fisicoquímicas como temperatura, concentración de componentes y fuerza iónica del medio.

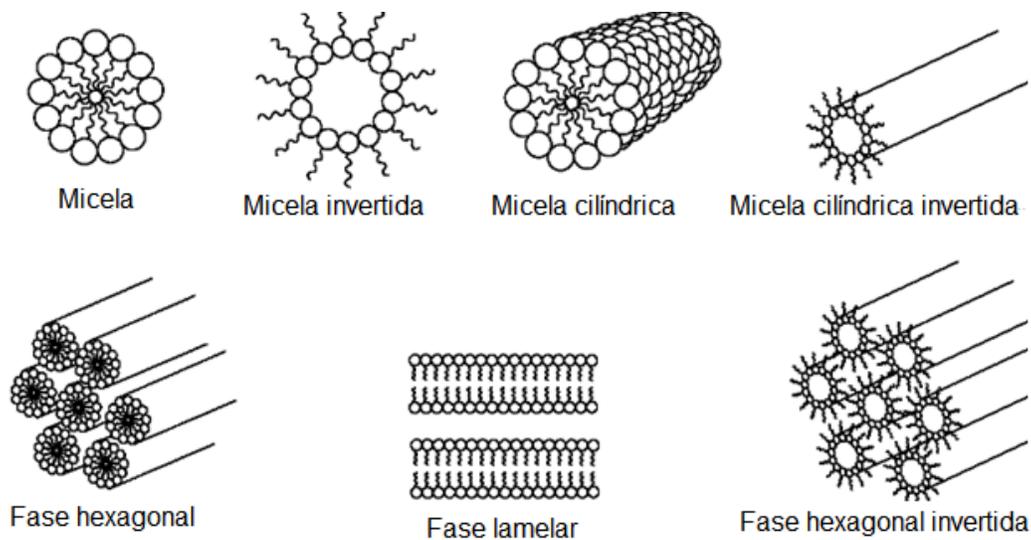


Figura 10. Diferentes estructuras de micelas [29]

Para el caso de tensoactivos, la concentración mínima a la cual se obtiene un cambio en las propiedades fisicoquímicas del sistema por la formación de estructuras autoensambladas se le conoce como Concentración Micelar Crítica (CMC), y este concepto puede ampliarse a la formación de agregados moleculares por sustancias anfifílicas, en este caso se denomina Concentración de Agregación Crítica (CAC).

El aumento en la longitud de una cadena hidrocarbonada en tensoactivos reduce el valor de la CMC, de igual manera, un descenso en la temperatura del sistema reduce el valor de la CMC [26-29].

2.4 Sistemas dispersos

Los sistemas dispersos están formados por una fase continua o fase dispersante, que normalmente se encuentra en mayor proporción y alberga a porciones separadas de la otra fase del sistema, denominada, fase dispersa.

La característica que diferencia a los sistemas dispersos de las disoluciones es el tamaño de partícula, el cual, para sistemas dispersos es mayor a 1 nm, tal que por el tamaño de partícula los sistemas de estudio son heterogéneos y las propiedades fisicoquímicas de los sistemas dispersos son dependientes del tamaño, forma y flexibilidad de sus partículas, así como de las propiedades superficiales de las partículas dispersas.

Todo sistema disperso es un sistema termodinámicamente inestable, que tiende a reducir su área superficial y segregarse en dos o más fases.

Los sistemas dispersos en los que el tamaño de partícula de la fase dispersa no es uniforme, se denominan: sistemas polidispersos. Los sistemas dispersos en los que el tamaño de partícula es uniforme, se denominan: monodispersos.

Un sistema liófilo es aquél cuya fase dispersa posee una afinidad con la fase dispersante, mientras que un sistema liófilo es aquél en el que las partículas de la fase dispersa poseen repulsión por la fase continua. En un sistema liófilo, los tamaños de partícula de la fase dispersa tienden a ser pequeños y la tensión interfacial entre la fase dispersa y dispersante es relativamente baja, esto le confiere a los sistemas dispersos liófilos la capacidad de resuspender la fase dispersa una vez que ésta se ha aglomerado. En un sistema liófilo, por el contrario, los sistemas tienden a tener tamaños de partícula grande,

una gran tensión interfacial entre la fase dispersa y dispersante y no son reversibles [26-30].

2.5 Generalidades sobre liposomas

Los liposomas son estructuras vesiculares constituidas por una o más bicapas lipídicas, que a su vez, están formadas por fosfolípidos que se encuentran en una disposición tal que la región hidrofílica (polar) de los fosfolípidos está orientada hacia la fase acuosa que los contiene, mientras que la región lipofílica (no polar) de los fosfolípidos conforma una doble capa.

Estas estructuras se forman tras la dispersión de fosfolípidos en un medio acuoso y bajo condiciones que le permitan al sistema adoptar un valor mínimo de energía libre.

La estructura de los liposomas permite la encapsulación de sustancias hidrofílicas en su región acuosa, así como la encapsulación de sustancias hidrofóbicas en la bicapa lipídica.

Los liposomas poseen la ventaja de ser estructuras de alta biocompatibilidad y de proteger a sustancias encapsuladas del ambiente externo, lo cual les confiere un alto potencial para su uso en tecnología farmacéutica, ya que reducen el impacto toxicológico de fármacos, reducen la exposición del fármaco a los tejidos e incrementa la actividad terapéutica del fármaco.

Pese a las múltiples ventajas del uso de liposomas en tecnología farmacéutica, aún existen retos por superar en los desarrollos de sistemas liposomales, tales como disminuir su alto

costo de producción e incrementar el tiempo de vida de anaquel de estas fórmulas, pues los liposomas son sistemas termodinámicamente inestables [2-4].

2.6 Clasificación de liposomas

Los liposomas pueden ser clasificados por el número de bicapas que contienen y por su tamaño, por la disposición de estas bicapas lipídicas y por su composición o aplicación.

Los liposomas constituidos por una sola bicapa de fosfolípidos son nombrados Liposomas Unilamelares, y éstos a su vez, pueden ser clasificados por su tamaño, tal que los liposomas más pequeños cuyo diámetro es de 20 a 40 nm reciben el nombre de vesículas unilamelares pequeñas, por sus siglas en inglés SUV (Small Unilamellar Vesicles). Los liposomas que poseen un diámetro de 40 a 80 nm reciben el nombre de vesículas unilamelares medianas MUV y los liposomas unilamelares grandes con diámetros de 100 a 1000 nm reciben el nombre de vesículas unilamelares grandes LUV [5-7].

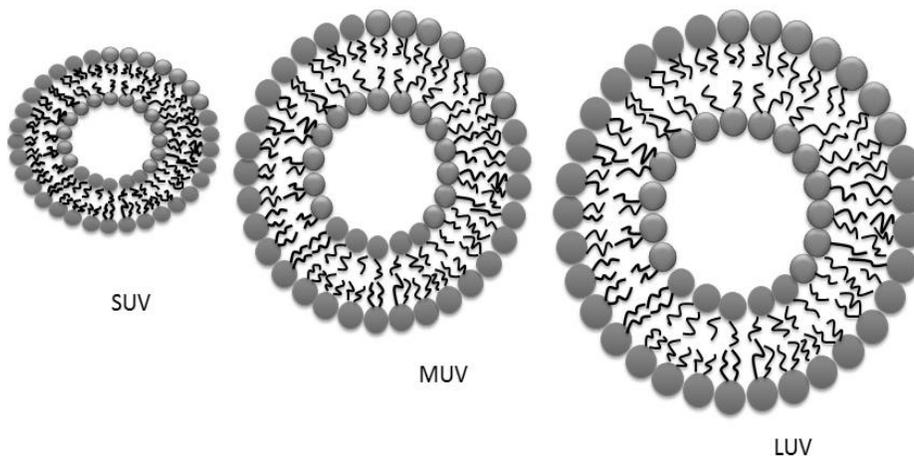


Figura 11. Clasificación de liposomas unilamelares por tamaño [30]

Los liposomas constituidos por más de una capa de fosfolípidos son liposomas multilamelares, de los cuales, los primeros por mencionar son los oligolamelares, que son aquéllos que están formados por 2 a 10 bicapas concéntricas de fosfolípidos.

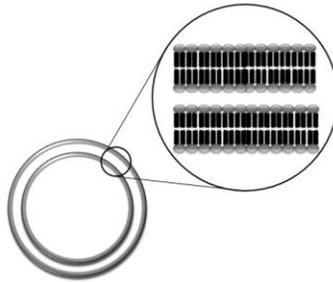


Figura 12. Liposomas oligolamelares [30]

La disposición de las bicapas lipídicas puede ser más compleja y un ejemplo de ello es la formación de liposomas multivesiculares, los cuales están constituidos por vesículas grandes que contienen dentro de sí a más de una estructura vesicular no concéntrica de menor tamaño [2-6].

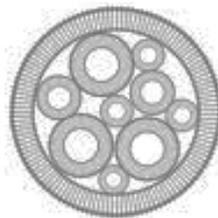


Figura 13. Liposomas multivesiculares [30].

2.7 Composición de liposomas y relevancia farmacéutica de la tecnología liposomal

Los fosfolípidos como las fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas o fosfatidilgliceroles son los materiales más empleados en la formulación de liposomas, debido a que la geometría

y propiedades fisicoquímicas de estas sustancias son ideales para la formación de bicapas lipídicas y es por ello que estos fosfolípidos, junto con los esfingolípidos, constituyen más del 50% en masa de los lípidos totales en las membranas biológicas.

Otros componentes típicos en la formulación de liposomas y que también se encuentran en las membranas celulares, son el colesterol y sus derivados, ya que estos componentes incrementan la rigidez de la bicapa lipídica, reducen la permeabilidad y brindan una mayor estabilidad al sistema liposomal.

La estructura de los liposomas permite encapsular moléculas de carácter hidrofílico en el interior acuoso de su estructura, como es el caso de la encapsulación de actinomicina en formulaciones con fines oncológicos, sin embargo, debido a las características de la mayoría de los fármacos, es mayor el número de desarrollos basados en la encapsulación de moléculas hidrofóbicas en la doble capa de fosfolípidos de los liposomas.

Además del uso de fosfolípidos saturados e insaturados y del colesterol, en la formulación de sistemas liposomales se incluyen componentes que mejoran la estabilidad y el desempeño, tal como es el caso de la adición de materiales poliméricos como el polietilenglicol (PEG), el óxido de polietileno, los metacrilatos o los tensoactivos. Los liposomas también son estructuras idóneas para el anclaje de sustancias biológicas como anticuerpos, antígenos o péptidos que permiten el transporte de fármacos a sitios específicos.

La composición de los liposomas, la lamellaridad y el proceso de fabricación influyen en sus propiedades fisicoquímicas y con esto, los mecanismos y cinética de liberación de fármacos. En la formulación de liposomas, los tensoactivos pueden ser adicionados sobre

un sistema liposomal con el objetivo de incrementar la permeabilidad y favorecer la cinética de liberación y biodisponibilidad del fármaco encapsulado. Debido al incremento de la permeabilidad de los sistemas liposomales tras la adición de tensoactivos, este tipo de liposomas ha sido utilizado en el desarrollo para aplicaciones tópicas y para aquellas que requieran el transporte transdérmico y/o localizado de sustancias bioactivas [6-8].

Capítulo 3.

Técnicas utilizadas en la elaboración y caracterización de suspensiones liposomales.

En este capítulo se exponen los fundamentos de las técnicas utilizadas en la fabricación de los sistemas liposomales de DMPC y las técnicas empleadas para el estudio de su interacción con el tensoactivo glucopiranosido OGP y el ibuprofeno.

3.1 Método convencional de fabricación de liposomas – Método de Bangham

El método convencional de fabricación de liposomas (método de Bangham), es uno de los más empleados a nivel laboratorio para la elaboración de sistemas liposomales; fue el primer método de elaboración propuesto, es un método efectivo en la encapsulación de fármacos hidrófobos y persiste a la fecha, siendo una de las alternativas más viables para el escalamiento industrial.

El método de Bangham, a nivel laboratorio, puede llevarse a cabo con ayuda de un rotavapor y tiene como primer paso la preparación de una solución de fosfolípidos, fármaco(s) y compuestos hidrófobos no termolábiles en la menor cantidad posible de un solvente no polar y volátil; la solución se deposita en un matraz bola y se coloca en el

rotavapor con el fin de evaporar el disolvente y formar una película hidrófoba sobre la pared del recipiente.

La formación de la película hidrófoba permite maximizar el área de contacto para llevar a cabo la siguiente etapa del proceso, que consiste en la hidratación de la película hidrófoba con la adición de una cantidad determinada de agua ó solución Buffer. En esta etapa del proceso se definen las concentraciones de los componentes del sistema y es uno de los puntos críticos del proceso de elaboración. Para conseguir la formación de estructuras liposomales en esta etapa del proceso, es importante que la temperatura del sistema rebase por al menos 5°C a la temperatura de transición (T_m) de los fosfolípidos durante el proceso de hidratación. La explicación acerca de las temperaturas de transición entre las mesofases liotrópicas de los liposomas se abordará en los siguientes apartados de este capítulo.

Una vez que se ha hidratado la película formada durante la etapa anterior, se suministra energía al sistema mediante una agitación suave para homogeneizar y se suspende el calentamiento. En este paso concluye el método de Bangham y se tiene como resultado un sistema liposomal polidisperso constituido por vesículas unilamelares, multilamelares y probablemente multivesiculares [31-33].

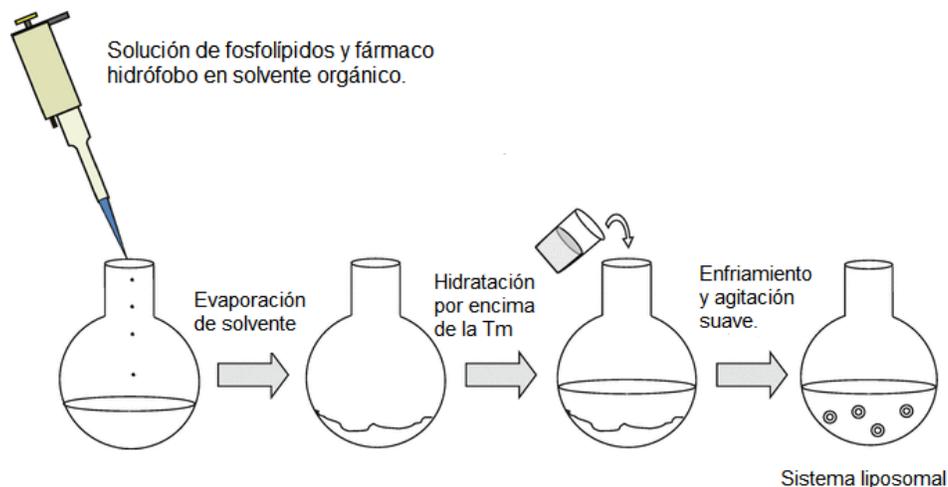


Figura 14. Representación esquemática de la formación de liposomas por método convencional [33]

3.2 Técnicas de homogenización auxiliares en la elaboración de sistemas liposomales

Cuando se fabrican liposomas por el método convencional se obtiene un sistema polidisperso de liposomas de gran tamaño, con diferente número de lamelas y con diferentes tipos de estructuras; este sistema complejo no es apto para una aplicación farmacéutica o para ser empleado como modelo de estudio en la interacción con otras sustancias.

El sistema liposomal que se obtiene mediante la fabricación con el método convencional posee baja estabilidad, ya que las estructuras liposomales grandes tienden a la inmediata segregación de fases; tal que, una forma de proporcionar estabilidad al sistema liposomal consiste en reducir y homogeneizar los tamaños de partícula de la fase dispersa mediante

métodos físicos como el uso de ondas ultrasónicas y la extrusión a alta presión. Un sistema monodisperso con tamaños de partícula menores resulta apto para una aplicación farmacéutica y como modelo de estudio en la interacción con otras sustancias.

El método de sonicación, ampliamente usado en la fabricación de sistemas liposomales, consiste en el suministro de energía acústica-mecánica mediante un baño de ultrasonido, el cual ejerce una presión que rompe las vesículas multilamelares y multivesiculares más grandes para formar vesículas de menor tamaño. El tiempo de sonicación determina el tamaño de las vesículas que se obtengan mediante esta técnica. La técnica de sonicación es simple y consume poco tiempo, sin embargo, por sí sola no permite obtener sistemas monodispersos ni reproducibles, es por ello que es más bien empleada como un auxiliar que permite reducir los tiempos en el proceso de extrusión

El proceso de extrusión es el paso secuencial de los liposomas a través de filtros de un tamaño de poro definido para generar vesículas unilamelares homogéneas. La técnica se lleva a cabo a altas presiones para forzar el paso de las vesículas en la fase cristal-líquido a través de una membrana con poros de tamaño definido, de tal forma que el sistema liposomal resultante es monodisperso y con menores tamaños de partícula [33-34].

3.3 Fundamento de las técnicas calorimétricas

Las técnicas de calorimetría son aquellos métodos de análisis que permiten caracterizar procesos físicos y químicos como transiciones de fase o reacciones químicas por medio de la transferencia de calor asociada al proceso bajo restricciones específicas.

Las técnicas calorimétricas permiten obtener directamente información acerca de los cambios de temperatura de un sistema bajo condiciones específicas, y por medio de la manipulación de los potenciales termodinámicos, es posible calcular al resto de variables termodinámicas que describen al sistema. A continuación se presenta una tabla que contiene a las ecuaciones que describen a los principales potenciales termodinámicos en su forma diferencial [35].

Tabla 1. Potenciales termodinámicos.

Potencial	Ecuación
Energía Interna	$dU=TdS-PdV$ (6)
Entalpía	$dH=TdS+VdP$ (7)
Energía libre de Gibbs	$dG=VdP-SdT$ (8)
Energía libre de Helmholtz	$dA=-SdT-PdV$ (9)

Como consecuencia de la primera ley de la termodinámica, se define que la variación de entalpía es equivalente a la cantidad de calor intercambiado en un proceso a presión constante

$$\Delta H = Q_p \quad (10)$$

Por lo tanto, para un proceso reversible a presión constante, por medio de la ecuación (7) se sabe que la variación de entropía del sistema puede ser calculada como:

$$\Delta S = \frac{Q_p}{T} \quad (11)$$

Mediante la igualación la ecuación 10 y 11 para un proceso isotérmico-isobárico se define entonces una condición de equilibrio tal que $\Delta H - T\Delta S = 0$ y se define al potencial termodinámico Energía Libre de Gibbs mediante la expresión:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (12)$$

3.4 Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

La calorimetría de titulación isotérmica es una técnica que determina de forma directa la cantidad de calor involucrada en procesos físicos y químicos. Su principal aplicación se ha encontrado en el estudio de interacciones moleculares.

En esta técnica, las moléculas interactúan bajo condiciones isotérmicas, y el fundamento de la técnica radica en el principio de la termodinámica en que las interacciones moleculares pueden absorber calor o emitirlo a sus alrededores, dependiendo del tipo de interacción. La formación de un enlace intermolecular es un proceso exotérmico, mientras que la disociación de un enlace intermolecular es un proceso endotérmico.

Un calorímetro de titulación isotérmica consta de dos celdas; una de ellas es la celda de muestra, que contiene a una solución o suspensión de una de las sustancias de estudio y la otra es la celda de referencia, la cual, contiene únicamente al solvente. Ambas celdas

se mantienen a temperatura y presión constante. En las jeringas se adiciona una solución de concentración conocida de la segunda sustancia de estudio y se programan adiciones parciales con respecto al tiempo. La interacción de las sustancias de estudio durante cada inyección puede desprender o absorber calor; el instrumento permite conocer la entalpía de la interacción al compensar el calor perdido o ganado en el sistema. El calor generado o consumido en la celda durante la calorimetría puede asociarse directamente a la fracción de moléculas unidas durante el proceso [36,37].

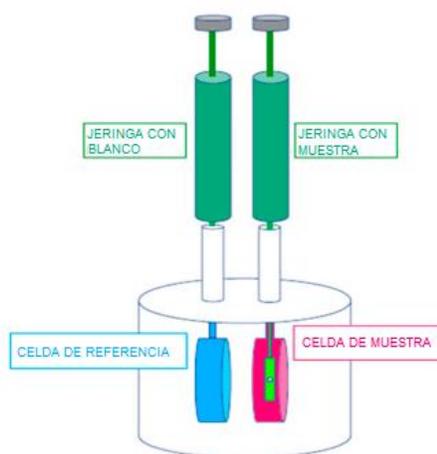


Figura 15. Representación esquemática de los componentes del calorímetro de titulación isotérmica [36].

Los datos proporcionados directamente por un calorímetro de titulación isotérmica son los correspondientes a la potencia ($\mu\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$ o $\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$) empleada para mantener las condiciones isotérmicas en el sistema a lo largo del tiempo. Tal que el potenciograma típico obtenido en ITC consta de una serie de picos, uno por cada inyección. El calor generado o emitido en cada inyección se determina mediante la estimación del área debajo de la curva de cada uno de estos picos. Progresivamente, es de esperarse que la magnitud de los picos

disminuya conforme se alcanza un estado de saturación, el cual puede observarse cuando el área debajo de la curva es la misma para una serie de inyecciones consecutivas y corresponde únicamente al calor de dilución.

Para determinar el calor asociado a las interacciones intermoleculares de interés, es necesario sustraer el calor de dilución asociado al proceso, lo cual se consigue por medio de los datos asociados a la celda de referencia [36-38].

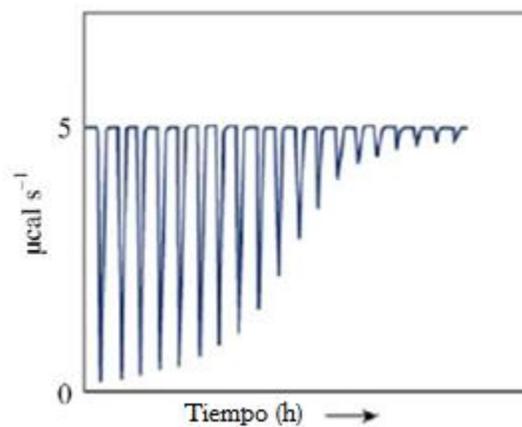


Figura 16. Termograma típico obtenido en una valoración por ITC [38].

3.5 Interacciones Tensoactivo-Liposoma

La interacción entre tensoactivos y membranas lipídicas se ha estudiado anteriormente con el fin de comprender procesos biológicos relacionados a la solubilización de membranas y su interacción con proteínas, sin embargo, estos estudios tienen relevancia para la formulación de sistemas liposomales con tensoactivos.

Uno de los trabajos más citados sobre la interacción de surfactantes con bicapas lipídicas es el estudio de Lichtenberg [39] donde se describe un modelo de tres etapas que representa el reparto de una cantidad creciente de monómeros de tensoactivo en una

cantidad fija de vesículas lipídicas. A continuación se describen las etapas de este modelo y se presenta un diagrama:

Etapa I. Se adiciona una baja cantidad de monómeros de tensoactivo al seno de una dispersión de estructuras liposomales. Algunos monómeros de tensoactivo migran a la interfase de los liposomas y se incorporan a la doble capa lipídica en las posiciones que presenten una menor tensión interfacial, formando así estructuras denominadas “vesículas mixtas”. En esta etapa, como en las demás, se presenta un constante equilibrio dinámico en el reparto de monómeros de tensoactivo y formación de estructuras autoensambladas.

Etapa II. Tras la continua adición de monómeros de tensoactivo, las vesículas mixtas comienzan a saturarse y la disposición de moléculas de tensoactivo comienza a dar origen a estructuras micelares denominadas “micelas mixtas”, constituidas por monómeros de tensoactivo y moléculas de fosfolípido. En esta etapa se presenta un equilibrio dinámico entre monómeros de tensoactivo, vesículas mixtas y micelas mixtas.

Etapa III. Esta etapa ocurre tras la completa saturación de vesículas mixtas para constituir un sistema únicamente de micelas mixtas con diferentes distribuciones de fosfolípido y tensoactivo. Las micelas mixtas se encuentran en equilibrio con monómeros de tensoactivo.

Dependiendo de las condiciones del experimento y de la naturaleza de los tensoactivos, fosfolípidos y otros componentes empleados en un sistema representado por el modelo de tres estados; pudieran presentarse estructuras micelares cilíndricas, tubulares, lamelares, etc [39-41].

Modelo de los 3 estados

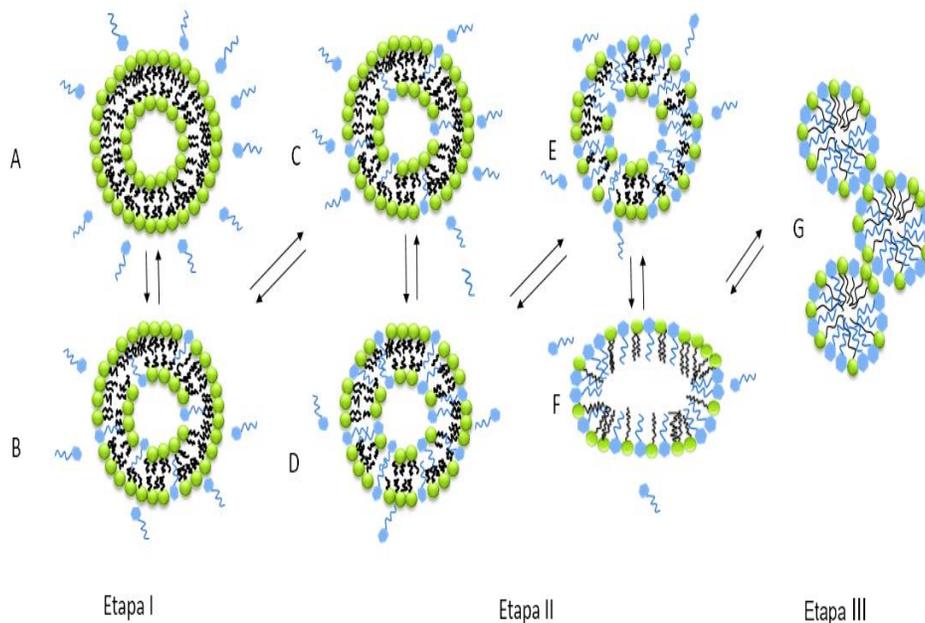


Figura 17. Representación esquemática del modelo de 3 estados de Lichtenberg [40]

3.6 Ecuación y modelo de reparto de tensoactivos en sistemas liposomales

Teniendo como referencia los conceptos de operación de la calorimetría de titulación isotérmica y el modelo de tres etapas descrito anteriormente [39-41], se puede suponer que si un tensoactivo es disuelto en una fase acuosa por debajo de su concentración micelar crítica ($C_D^0 < CMC$) y se hace interaccionar con liposomas, los monómeros de tensoactivo se repartirán en la membrana sin perturbarla.

Si se considera un experimento en el que un calorímetro de titulación isotérmica adiciona vesículas liposomales a una solución monomérica de tensoactivo, se tendría la hipótesis

de que ocurriría el reparto de monómeros de tensoactivo en la bicapa lipídica de los liposomas.

El calor de la interacción de estudio (Tensoactivo-liposoma) se determina en función del número de inyecciones, y considerando el antecedente de instrumentación de ITC, se definirá al calor de interacción liposoma-tensoactivo en una etapa de inyección “i” (δh_i), como una función de la cantidad molar de tensoactivo unido en la etapa “i” (δn_i) por la entalpía de reparto estándar (ΔH_D^0).

$$\delta h_i = \delta n_i \Delta H_D^0 \quad (13)$$

Debe considerarse que el calor de interacción liposoma-tensoactivo en una etapa de inyección “i”, es la resta del calor de reacción experimental (δH_i) y el calor de dilución (δH_{dil}):

$$\delta h_i = \delta H_i - \delta H_{dil} \quad (14)$$

Definiendo ahora el calor de reacción acumulado (δH) como la suma del calor de cada etapa “i”, y a la cantidad total de tensoactivo unido (n) como la suma de cada etapa, se define al calor de reacción acumulado como:

$$\delta H_i = \sum_{i=1}^n \delta h_i = \sum_{i=1}^n \delta n_i \Delta H_D^0 \quad (15)$$

$$\delta H_i = n_i \Delta H_D^0 \quad (16)$$

La concentración de tensoactivo unido es:

$$\delta C_{D,b} = \frac{n_i}{V_{cell}} \quad (17)$$

Y por medio de la ecuación (16), la concentración de tensoactivo unido puede determinarse en función del calor de reacción acumulado y la entalpía de reparto estándar :

$$\delta C_{D,b} = \frac{\delta H_i}{\Delta H_D^0 V_{cell}} = \frac{\delta h_i}{\Delta H_D V_{cell}} \quad (18)$$

Continuando con la definición de expresiones que permiten la descripción del reparto de tensoactivo en membranas lipídicas, es necesario establecer que durante el experimento ocurre un equilibrio dinámico de reparto de tensoactivo, tal que la cantidad total de tensoactivo (n_D^0) es la suma de moles de tensoactivo unido a membranas lipídicas ($n_{D,b}$) más los monómeros de tensoactivo en fase acuosa (n_f):

$$n_D^0 = n_{D,b} + n_f \quad (19)$$

Si la membrana está constituida de n_L^0 moles de lípido, la relación molar de tensoactivo incorporado a la membrana lipídica (R_b) está dada por:

$$R_b = \frac{n_{D,b}}{n_L^0} \quad (20)$$

Considerando las expresiones anteriores, se presenta el modelo de constante de reparto (K) [42], el cual propone una relación lineal entre la concentración de tensoactivo libre en solución ($C_{D,f}$) y la relación molar de tensoactivo insertado en la membrana (R_b):

$$\frac{C_{D,b}}{C_L^0} = R_b = K C_{D,f} \quad (21)$$

Y definiendo a la constante de reparto por medio del equilibrio entre los monómeros de tensoactivo libre en presencia de bicapas lipídicas y tensoactivo unido a bicapa lipídica:

$$C_{D,f} + C_L^0 \leftrightarrow C_{D,b} \quad (22)$$

$$K = \frac{C_{D,b}}{C_{D,f}C_L^0} \quad (23)$$

Una vez definida la constante de reparto, se buscará una expresión que relacione el calor de reacción de la interacción liposoma-tensoactivo en función del reparto de tensoactivo en la bicapa lipídica.

Se define la concentración total de tensoactivo y se busca una expresión de la cantidad de tensoactivo unido ($C_{D,b}$) en función de las concentraciones conocidas de tensoactivo (C_D^0) y fosfolípido (C_L^0).

$$C_D^0 = C_{D,b} + C_{D,f} \quad (24)$$

$$C_{D,f} = C_D^0 - C_{D,b} \quad (25)$$

Sustituyendo en la definición de la constante de reparto:

$$K = \frac{C_{D,b}}{(C_D^0 - C_{D,b})C_L^0} \quad (26)$$

$$C_{D,b} = KC_L^0 C_D^0 - KC_L^0 C_{D,b} \quad (27)$$

$$\frac{C_{D,b}}{C_{D,b}} = \frac{KC_L^0 C_D^0}{C_{D,b}} - \frac{KC_L^0 C_{D,b}}{C_{D,b}} \quad (28)$$

$$1 = \frac{KC_L^0 C_D^0}{C_{D,b}} - KC_L^0 \quad (29)$$

$$C_{D,b} = \frac{C_L^0 KC_D^0}{1 + C_L^0 K} \quad (30)$$

Hasta aquí, se tiene una expresión que permite conocer la concentración de tensoactivo unido a liposomas en función de las concentraciones iniciales y de la constante de reparto. Sin embargo, la constante de reparto continúa siendo una variable desconocida, pero que puede ser determinada mediante un ajuste no lineal de datos experimentales; para ello, se buscará la igualación de la ecuación (30) con la ecuación (18) mediante la obtención de la diferencial de esta ecuación con respecto a la concentración conocida de fosfolípido C_L^0 .

$$\delta C_{D,b} = \frac{(1+C_L^0 K) K C_D^0 \delta C_L^0 - (K C_D^0 C_L^0) K \delta C_L^0}{(1+K C_L^0)^2} \quad (31)$$

$$\delta C_{D,b} = \frac{K C_D^0 \delta C_L^0 + K^2 C_D^0 C_L^0 \delta C_L^0 - K^2 C_D^0 C_L^0 \delta C_L^0}{(1+K C_L^0)^2} = \frac{K C_D^0 \delta C_L^0}{(1+K C_L^0)^2} \quad (32)$$

$$\delta C_{D,b} = \frac{\delta h_i}{\Delta H_D V_{cell}} \quad (18)$$

$$\delta C_{D,b} = \frac{K C_D^0 \delta C_L^0}{(1+K C_L^0)^2} = \frac{\delta h_i}{V_{cell} \Delta H_D} \quad (33)$$

$$\delta h_i = \frac{K C_D^0 \delta C_L^0}{(1+K C_L^0)^2} V_{cell} \Delta H_D \quad (34)$$

La ecuación (34) puede ser empleada calcular el valor de la entalpía de reparto ΔH_D y del valor de la constante de reparto K mediante un proceso de correlación de datos experimentales conocidos como concentraciones de fosfolípido y surfactante (C_L^0 , C_D^0) y el calor de reacción de cada inyección durante el proceso de titulación. La ecuación (34)

corresponde a un polinomio de tipo $f = ax/(1+bx)^2$, y es por medio de una regresión no lineal que pueden determinarse los valores de K y ΔH_D [42,43].

3.7 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

A pesar de que actualmente, en las investigaciones sobre sistemas biológicos existe una tendencia por el enfoque teórico y computacional para el estudio de estos sistemas desde un enfoque molecular, las técnicas experimentales también se han sofisticado, desde las nuevas tecnologías en la instrumentación hasta el enfoque de la termodinámica clásica y estadística para el estudio de sistemas desde el enfoque molecular hasta el enfoque colectivo.

La calorimetría diferencial de barrido DSC (por sus siglas en inglés differential scanning calorimetry) es una técnica experimental que permite el estudio de membranas lipídicas desde el punto de la termodinámica clásica con el fin de obtener atributos fisicoquímicos asociados a transiciones de fase. La interpretación de los termogramas y de las propiedades fisicoquímicas asociadas a las transiciones de fase permiten plantear modelos del comportamiento molecular de los fosfolípidos en la membrana y de las propiedades colectivas del sistema de estudio.

Un calorímetro diferencial de barrido registra la dependencia de temperatura isobárica como capacidad calorífica (C_p) durante un barrido de temperatura desde T_0 a T_f . Cuando en el sistema de estudio se presenta una transición de fase, se tiene el registro de un valor máximo de capacidad térmica asociada a este proceso, donde la temperatura

correspondiente al punto máximo se define como Temperatura de Transición Principal (T_m). El valor de la entalpía de transición de fase se determina por medio de la integración del área debajo de la curva.

$$\Delta H = \int_{T_0}^{T_f} Cp dT \quad (35)$$

En la Figura 19 se presenta un termograma típico de las transiciones de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) con un punto máximo en la temperatura de transición principal T_m .

A partir del valor de la temperatura y entalpía de transición es posible determinar la entropía de transición para un sistema en equilibrio bajo condiciones isobáricas:

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T_m} \quad (36)$$

Un calorímetro diferencial de barrido cuenta con una celda de muestra y una celda de referencia. En la celda de muestra se introduce una solución o dispersión que contiene al sistema de estudio, mientras que en la celda de referencia contiene únicamente al disolvente o dispersante del sistema. Cuando ocurre una transición de fase en la celda de muestra se registra una diferencia de temperatura con respecto a la celda de referencia; la diferencia de temperatura es detectada por un sensor de temperatura que consiste en una termopila cuya señal eléctrica comanda un sistema de compensación de energía que suministra un exceso de potencia eléctrica para compensar la energía necesaria para llevar a un ΔT igual a cero y esta energía es traducida como valores de C_p (cantidad de calor requerida para elevar la temperatura en una unidad) con respecto al tiempo, tal que puede efectuarse la integración de la curva construida a partir de estos datos para calcular

la entalpía de transición de fase mediante la ecuación (35) y la entropía asociada a este proceso mediante la ecuación (36) [43-45].

3.8 Mesofases liotrópicas en bicapas lipídicas

Los fosfolípidos dispersos en medios acuosos pueden autoensamblarse en diferentes formas geométricas, cuya formación es dependiente de la naturaleza de los fosfolípidos, las condiciones presentes y la concentración de componentes de la muestra. En sistemas con un alto contenido de agua, la estructura más común es la doble capa lipídica, la cual, tiende a disminuir su energía interfacial mediante la formación de vesículas. Las estructuras que pudieran derivarse son dependientes de la composición química, la temperatura y la presión.

Se denomina “mesofase” a cualquier estado de la materia intermedio entre el estado sólido y el estado líquido, mientras que el término liotrópico es empleado para describir a materiales que poseen la capacidad de fases cristalinas líquidas. En el caso de fosfolípidos, se sabe que estos poseen un comportamiento termotrópico, en el que dependiendo de la temperatura, se observan diferentes fases liotrópicas.

En las fosfatidilcolinas existen cuatro fases estables: fase sub-gel (L_c), fase gel (L_β), fase ondulada (P_β') y fase cristal líquido (L_α) y por lo tanto, tres transiciones de fase asociadas:

Sub-Transición: Es la transición que ocurre de la fase sub-gel (L_c) a la fase gel (L_β). Es una transición meta-estable cuya aparición depende de la historia térmica de la muestra, pues para observarla es necesario incubar la muestra a bajas temperaturas durante varios

días. Esta transición está asociada a un incremento en el desorden de la cadena alifática de los fosfolípidos.

Pre-transición: Es la transición que ocurre de la fase gel (L_{β}) a la fase ondulada ($P_{\beta'}$). La temperatura a la cual ocurre esta transición se denomina como T_p . Esta transición está asociada al cambio en el empaquetamiento de los fosfolípidos, sin embargo, estudios recientes sugieren que se debe principalmente a un incremento en la hidratación de la bicapa lipídica. La ocurrencia de esta transición depende de la naturaleza de la región polar del fosfolípido y en general, de la composición química de la bicapa lipídica. Esta transición es muy sensible a perturbaciones en la membrana causadas por fármacos, péptidos o proteínas y es una transición muy poco energética, con valores de entalpía bajos.

Transición principal: Es la transición que ocurre de la fase ondulada ($P_{\beta'}$) a la fase cristal líquido (L_{α}). Cuando la composición química de la membrana lipídica no permite la conformación de una fase ondulada, la transición principal ocurre desde la fase gel (L_{β}) a la fase cristal líquido (L_{α}). La temperatura a la cual ocurre esta transición se denomina como T_m .

En la fase gel y fase ondulada, los fosfolípidos se encuentran fuertemente empaquetados por fuerzas de Van der Waals, y en el inicio de la transición de fase, los fosfolípidos funden cooperativamente para formar un estado de cristal-líquido, donde los fosfolípidos están débilmente asociados debido a una expansión lateral de las cadenas de acilo. En la fase cristal líquido (L_{α}), se tiene un mayor número de confórmeros gauche y un incremento en

la fluidez y desorden de la membrana. La transición principal es la de mayor entalpía y cooperatividad.

Mientras más ordenadas se encuentren las cadenas hidrocarbonadas, se tendrá un empaquetamiento más compacto, lo cual involucra una reducción del volumen de la vesícula y una condensación del área lateral. Consecuentemente, en una transición de fase fluida a fase gel se tiene una reducción de hasta 3% en volumen para sistemas de fosfolípidos puros.

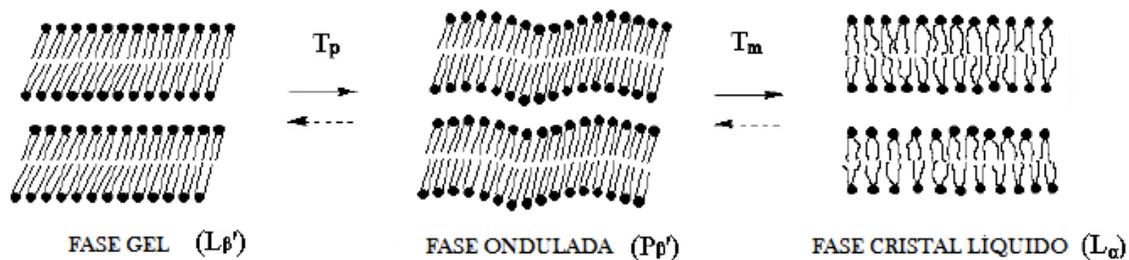


Figura 18. Ordenamiento de fosfolípidos y equilibrio entre mesofases [46].

En la Fig19 se presenta un esquema de la interpretación de un termograma donde se observa una pre-transición y una transición principal [43-46].

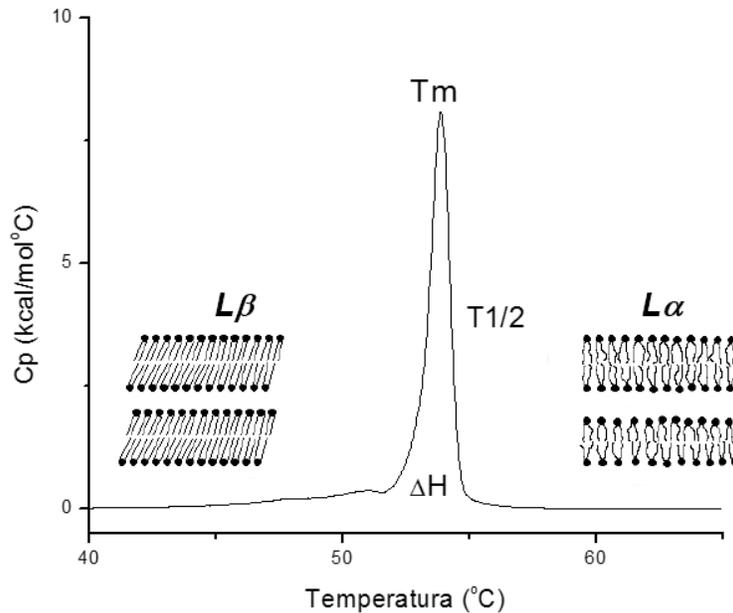


Figura 19. Termograma de DPPC y representación de mesofases presentes [40].

La transición principal de la doble capa de fosfolípidos involucra más que sólo un estado inicial y un estado final, ya que durante esta transición se presentan estados intermedios que resultan de la formación de dominios (regiones móviles desordenadas dentro de la fase gel) antes de la temperatura de transición de fase, y se deben al movimiento lateral de fosfolípidos dentro de la bicapa. La forma asimétrica de un pico obtenido en DSC refleja el hecho de que está ocurriendo una transición que no es de dos estados.

Las teorías fenomenológicas acerca de la cooperatividad de transiciones de fase han sido formuladas sobre la hipótesis de coexistencia de dominios de fosfolípidos en diferentes fases durante una transición. La teoría de Zimm y Bragg sobre transiciones de fase cooperativas considera tres estados: ordenado (fase gel), fluido (fase cristal líquido) y estados interfaciales. El grado de transición descrito por θ como la fracción de moléculas en estado fluido está dado por:

$$\theta = \frac{1}{2} \left[1 + \frac{\xi - 1}{\sqrt{(\xi - 1)^2 + 4\sigma\xi}} \right] \quad (37)$$

Donde ξ es el peso estadístico para el estado de esta transición y σ es un parámetro de cooperatividad. Ambos parámetros se definen por medio de la energía libre del estado fluido y de la energía libre de los estados interfaciales:

$$\xi = \exp(\Delta S/R) \exp(-\Delta H/RT) \quad (38)$$

$$\sigma = \exp(\Delta S_{in}/R) \exp(-\Delta H_{in}/RT) \quad (39)$$

Donde ΔS y ΔH corresponden a la entropía y entalpía calorimétrica respectivamente, mientras que ΔH_{in} y ΔS_{in} corresponden a la entropía y entalpía de estados interfaciales.

Al definir a T_m como la temperatura de transición de fase y derivar la ecuación (37) con respecto a T y con T_m constante, se podrá obtener entonces una expresión que describa al grado de transición con respecto a la temperatura:

$$\left(\frac{d\theta}{dT} \right)_{T_m} = \frac{1}{4\sqrt{\sigma}} \frac{\Delta H}{RT_m^2} \quad (40)$$

Si la transición de fase gel a cristal líquido (fase ordenada a fase fluida) es considerada como una reacción pseudo unimolecular ($\sigma=1$) con constante de equilibrio $k=\theta/(1-\theta)$, esta puede ser expresada como una ecuación de van't Hoff con una entalpía de van't Hoff (ΔH_{vH}):

$$\left(\frac{d\theta}{dT} \right)_{T_m} = \frac{\Delta H_{vH}}{4RT_m^2} \quad (41)$$

Experimentalmente, una curva obtenida en la calorimetría diferencial de barrido de un sistema de fosfolípidos es la tasa de absorción de temperatura del sistema en función del grado de transición θ :

$$Cp = \Delta H \cdot \left(\frac{d\theta}{dT}\right) \quad (42)$$

El pico de esta curva en un experimento de DSC se presenta en una temperatura T_m y a un valor máximo de Cp , denotado por Cp_{max} . Este punto corresponde a la transición de fase y su agudeza enfatiza en la cooperatividad de la transición de fase.

$$Cp_{max} = \Delta H \left(\frac{d\theta}{dT}\right)_{T_m} \quad (43)$$

$$Cp_{max} = \frac{\Delta H \Delta H_{vH}}{4RT_m^2} \quad (44)$$

La entalpía de Van't Hoff (ΔH_{vH}) es equivalente al calor requerido a cada unidad cooperativa de la transición de fase. Para una transición de primer orden entre dos estados, la entalpía de Van't Hoff es equivalente a la entalpía calorimétrica ΔH . Si la entalpía de Van't Hoff es menor a la entalpía calorimétrica ($\Delta H_{vH} < \Delta H$), el proceso involucra a uno o más estados intermedios y la cooperatividad no puede ser asociada a una transición de primer orden.

La entalpía de Van't Hoff, puede determinarse a partir de la entalpía calorimétrica, la temperatura de transición principal y la capacidad calorífica máxima (Cp_{max}):

$$\Delta H_{vH} = 4RT_m^2 \frac{Cp_{max}}{\Delta H} \quad (45)$$

Una transición de estado con un pico más agudo, da como resultado un valor mayor de ΔH_{vH} , ya que el valor de $C_{p_{max}}$ es mayor. La agudeza de la transición también se puede caracterizar por el ancho completo a la mitad del máximo del pico (C_p vs. T): $\Delta T_{1/2}$. Las transiciones agudas son más cooperativas.

Dado que las unidades de la entalpía de Van't Hoff son de Energía/Unidad cooperativa y las unidades de la entalpía calorimétrica son de Energía/mol; el cociente entre la entalpía de Van't Hoff y la entalpía calorimétrica permite estimar la relación de unidades cooperativas (C.U.):

$$C.U. = \frac{\Delta H_{vH}}{\Delta H} \quad (46)$$

Cuanto más cercana a la unidad resulte el valor de C.U., más cooperativa será esta transición.

En el estudio de proteínas, el valor de $\Delta T_{1/2}$ puede ser empleado para describir cualitativamente la cantidad de moléculas involucradas en una transición. El uso de este concepto para el estudio de bicapas lipídicas es controversial, sin embargo, el valor de C.U. puede proporcionar una medida relativa del grado de cooperatividad en una transición de fase [44-48,58].

3.9 Efecto de la adición de colesterol y tensoactivos a sistemas liposomales

Como se mencionó en la sección 1.0.2, el colesterol es una molécula que se encuentra presente en la membrana lipídica de células eucarióticas, y su presencia tiene implicaciones en las propiedades fisicoquímicas de la membrana. La presencia de

colesterol en una bicapa lipídica incrementa la fluidez de la fase gel, amplía la transición principal y disminuye la entalpía de transición. En calorimetría diferencial de barrido, el efecto de la adición de colesterol se hace visible en una reducción de la T_m y en un ensanchamiento del pico asociado a la transición principal del fosfolípido puro.

En un estudio realizado por McMullen en 1992 [49] sobre el efecto de la adición de colesterol en la serie homóloga de fosfatidilcolinas saturadas, se reportó que la adición de colesterol en más de 5% en mol, suprime la pre-transición del sistema. También se reporta la tendencia a la disminución de la temperatura de transición, disminución de la cooperatividad de la transición y disminución de la entalpía de transición conforme incrementa la proporción de colesterol.

En la Figura 20, se presentan los termogramas de tres sistemas liposomales de DPPC con tres diferentes proporciones de colesterol. La adición de colesterol deforma el pico de asociado a la transición principal y esta deformación puede analizarse mediante la deconvolución de la curva. En el ejemplo de la Figura 20 se observa la contribución de un “componente agudo” y un “componente abierto”, los cuales pueden ser asociados a diferentes dominios de colesterol presentes en el sistema.

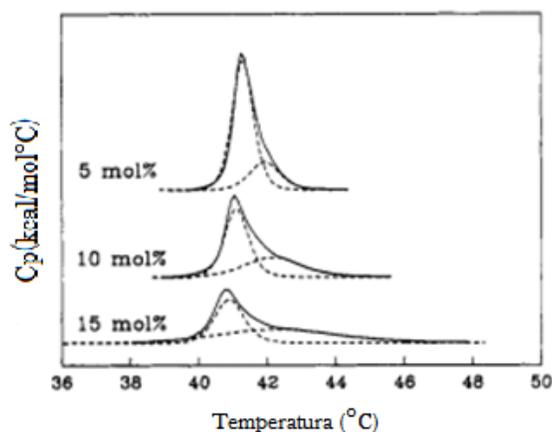


Figura 20. Deconvolución de termogramas de vesículas de DPPC para tres diferentes concentraciones de colesterol (5, 10 y 15% mol) [49].

De forma general, la adición de componentes que disminuyan el orden en el empaquetamiento de fosfolípidos, tenderán a favorecer la fluidez de la membrana asociada al estado líquido cristalino y a desfavorecer el estado ordenado asociado a la fase gel; por lo tanto, la adición de componentes que alteren el orden de la membrana lipídica, tenderán a disminuir la temperatura de transición principal T_m [49-51].

El efecto de la disminución de la temperatura de transición y de la entalpía de transición también se hace presente en la adición de tensoactivos para solubilizar liposomas, donde además de los efectos termotrópicos, se encuentran asociados fenómenos de reparto.

La espontaneidad del fenómeno de solubilización de liposomas y de la ocurrencia del proceso de tres estados de Lichtenberg es dependiente del coeficiente de reparto de tensoactivo en el sistema liposomal y de la CMC del tensoactivo. La espontaneidad del proceso está descrita mediante el potencial químico del tensoactivo ($\Delta\mu_D$) en la transición bicapa lipídica (b) \rightarrow micela (m):

$$\Delta\mu_D^{b \rightarrow m} = RT \ln(k * CMC) \quad (47)$$

Las moléculas que favorecen a la espontaneidad del proceso de micelización de vesículas poseen un valor de $\Delta\mu_D^{b \rightarrow m} < 0$, tal que $k*CMC < 1$ [47-48,52].

3.10 Dispersión dinámica de luz

La dispersión dinámica de luz DLS (Dynamic Light Scattering) es una técnica ampliamente utilizada para la determinación de tamaños de partícula en sistemas dispersos. Esta técnica determina la velocidad a la que las partículas de una fase dispersa se difunden debido al movimiento Browniano y analiza las fluctuaciones de la luz dispersada.

El fundamento teórico de la técnica se basa en la teoría de dispersión de Rayleigh para partículas pequeñas y esféricas, la teoría de Mie para partículas esféricas con tamaño superior a la longitud de onda y la teoría de Stokes-Einstein. Esta técnica permite obtener información dinámica de la fase dispersa, tal como el coeficiente de dispersión y el radio hidrodinámico.

Cuando un haz de luz monocromática entra en contacto con una partícula, la luz se dispersa en diferentes direcciones, tal que, si una pantalla se mantiene cerca de la partícula, la pantalla será iluminada por la luz dispersada. Para el caso de muchas partículas, la pantalla se iluminará con patrones de áreas brillantes y oscuras, debido a que la luz dispersada puede interactuar consigo misma de forma constructiva (ondas en fase) o destructiva (interferencia) para formar estos patrones.

Dado que las partículas están en constante movimiento, el patrón de manchas también lo está, con variación en su intensidad. En esta técnica se miden las fluctuaciones de la

intensidad de luz dispersada en distintos puntos, tal que la rapidez a la que ocurren estas fluctuaciones depende del tamaño de la partícula.

El espectro de frecuencias contenido en las fluctuaciones de intensidad provenientes del movimiento Browniano de las partículas se mide mediante un auto-correlacionador digital. En el auto-correlacionador se compara la intensidad de dispersión en intervalos de tiempo consecutivos para derivar la velocidad a la que la intensidad es variable.

Las fluctuaciones en la intensidad de la radiación son consecuencia del movimiento browniano de las partículas y la velocidad de este movimiento es definida por una propiedad conocida como coeficiente de difusión traslacional (D). Las partículas pequeñas presentan mayor movimiento Browniano en el medio, por lo tanto, presentaran mayor fluctuaciones de la intensidad de luz dispersada en comparación con partículas de mayor tamaño.

A continuación se presenta un esquema de la instrumentación de un equipo DLS:

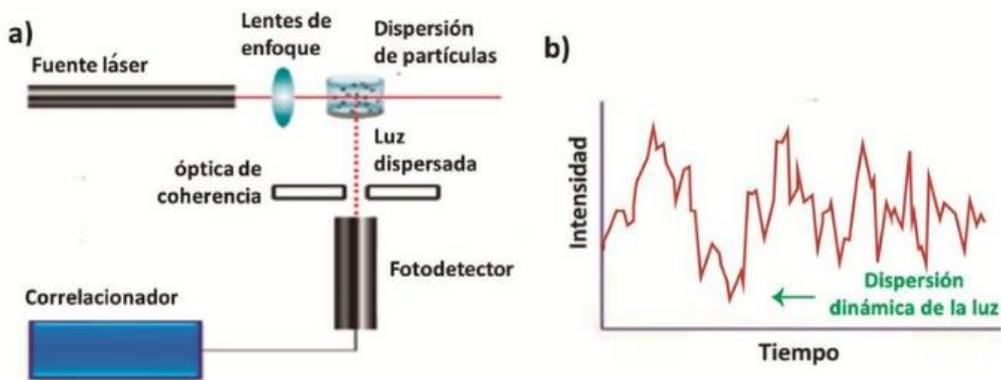


Figura 21. Representación esquemática de un equipo DLS [53].

Una vez determinado el coeficiente de difusión es posible conocer el tamaño de las partículas en función de la ecuación de Stokes-Einsten para partículas esféricas a dilución infinita:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta\mathcal{D}} \quad (48)$$

En donde

$d(H)$ = Diámetro hidrodinámico

k = Es la constante de Boltzmann (1.38×10^{-16} erg K^{-1})

\mathcal{D} = Coeficiente de difusión traslacional

η = Viscosidad del medio (1.002×10^{-2} poise en agua a $20^{\circ}C$, 0.890×10^{-2} poise a $25^{\circ}C$)

T = Temperatura absoluta.

Se requiere una temperatura estable, de lo contrario se provocarán movimientos no aleatorios que limitan una correcta interpretación de tamaño de las partículas, y del conocimiento de la viscosidad del líquido (debido a que la viscosidad de un líquido está relacionada con su temperatura) [41, 53-55].

3.11 Microscopía electrónica SEM y TEM

Los microscopios, en general, son instrumentos que generan imágenes amplificadas de objetos microscópicos enfocados. El microscopio electrónico de barrido convencional (SEM, Scanning Electron Microscope) es un instrumento cuyo principio de funcionamiento se basa en aprovechar el comportamiento ondulatorio de electrones que son acelerados

mediante una diferencia de potencial para ser enfocados hacia un objetivo. La interacción resultante de los electrones con la superficie del objetivo permite obtener información topográfica de la superficie del objetivo y mediante un detector y un procesador, se construye así la información gráfica de interés.

En microscopía SEM se realiza el barrido sobre la superficie sólida y la información es analizada punto por punto. Al emitir el haz de electrones sobre el objetivo, los electrones primarios son enfocados mediante lentes hacia el objetivo hasta que penetran en la muestra y ocurren interacciones entre los electrones emitidos por el microscopio y los electrones de los átomos de la muestra.

Al incidir el haz de electrones, estos son desviados mediante procesos de dispersión elástica. La energía perdida por los electrones al interactuar con la muestra puede generar que otros electrones de la misma muestra salgan despedidos. A estos electrones se les denomina electrones secundarios y su interacción con el detector genera información gráfica que permite develar el contraste topográfico del objetivo a modo de imagen microscópica. Este es el principio para la microscopía de barrido SEM.

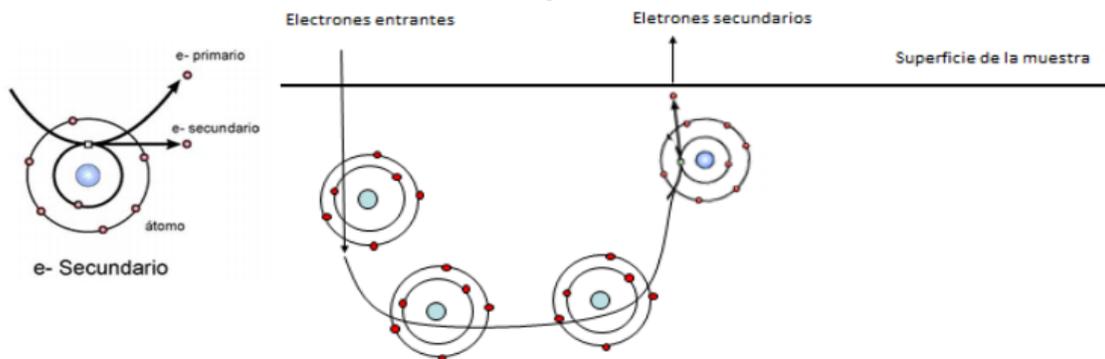


Figura 22. Esquema de la trayectoria de electrones secundarios en microscopía SEM.

Para el caso de la microscopía electrónica de transmisión (TEM), de forma similar a la instrumentación empleada en microscopía SEM, se tiene una fuente de electrones, un sistema de lentes magnéticas y un sistema de vacío que conducen a un haz de electrones para interacción con la muestra objetivo. En microscopía TEM, el fenómeno de interacción principal es la dispersión elástica colectiva (Dispersión de electrones). En este fenómeno las ondas entrantes de electrones, al interactuar con la muestra, producen ondas secundarias que interfieren unas con otras para producir patrones de difracción dadas por la interacción constructiva o destructiva de estas ondas.

En la microscopía de transmisión se detectan y analizan los electrones transmitidos durante la interacción. Los electrones que construyen el contraste de amplitud y el contraste de fase son los electrones retrodispersados. Los principios de esta técnica permiten obtener información más allá de la superficie ofrecida por la microscopía SEM. La microscopía TEM permite obtener información sobre la morfología interna de los objetivos analizados.

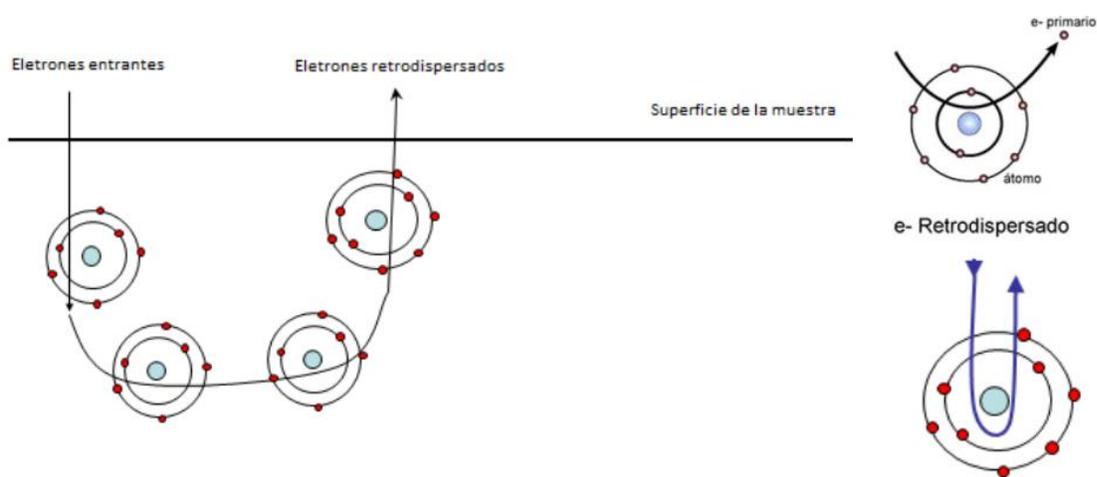


Figura 23. Trayectoria de electrones retrodispersados en microscopía TEM.

En el desarrollo de sistemas liposomales la microscopía SEM permite obtener información sobre la morfología superficial de los liposomas, mientras que la microscopía TEM permite obtener información visual sobre la morfología interna y lamelaridad de los sistemas liposomales [56, 57].

Capítulo 4

Metodología Experimental

4.1 Esquema general

En la Fig24. se muestra un esquema global del trabajo a realizar, el cual presenta el orden sistemático en el cual se aplican todas las técnicas de análisis mencionadas en las secciones anteriores.

El estudio consiste en la preparación de sistemas que contienen al fosfolípido puro o a sus correspondientes mezclas con colesterol o ibuprofeno. Los sistemas se analizan con todos los instrumentos de caracterización descritos en la sección 2 y posteriormente se someten a calorimetría de titulación isotérmica, donde se incorpora el tensoactivo a los sistemas y se caracterizan una vez más con todas las técnicas descritas.



Figura 24. Esquema general de trabajo

4.2 Elaboración de sistemas liposomales

Tabla2. Sistemas elaborados por el método convencional

Sistema liposomal
1 DMPC (10 mM)
2 DMPC: CHOL (4:1),
3 DMPC: CHOL: IBU (8:1:1)
4 DMPC: IBU (8:1)

- El primer sistema liposomal está formado por el fosfolípido DMPC con concentración de 10 mM, la cual se mantiene hasta antes de la titulación con el tensoactivo OGP. Los siguientes 3 sistemas, se obtienen de la combinación del DMPC 10mM con el ibuprofeno y colesterol en una proporción molar tal como se indica entre paréntesis en *Tabla2*.
- Disolver los reactivos en diclorometano para elaborar cada uno de los 4 sistemas liposomales.
- Evaporar el disolvente en rotavapor a 70 rpm, 45 °C y en condiciones de vacío para la formación de la película en el matraz bola durante 45 minutos.
- Después de la evaporación del disolvente agregar agua desionizada como medio de dispersión a la película formada a una temperatura de 30°C.
- Someter a sonicación durante 10 minutos.

Realizar el proceso de extrusión de la suspensión de cada uno de los sistemas por 15 veces utilizando una membrana de policarbonato de un tamaño de poro de 100 nm a una temperatura de 30 °C

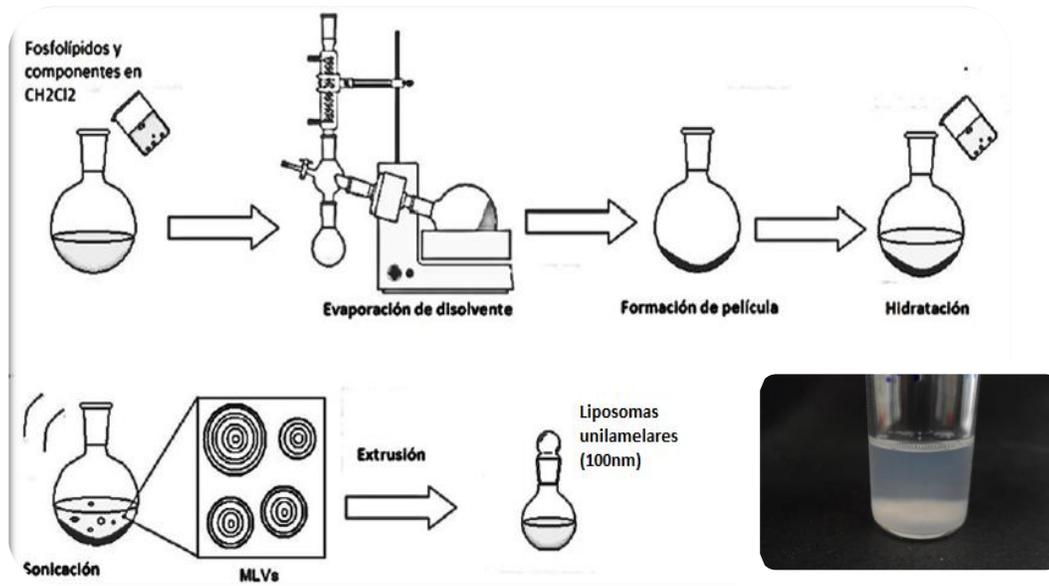


Figura 25. Preparación de sistemas liposomales [59].

4.3 Calorimetría de Titulación Isotérmica

La técnica calorimétrica se realizó en el equipo Thermal Activity Monitor (TAM, Thermometric, Suecia) donde se analizaron los sistemas que se muestran en la *Tabla 2*.

- Se colocó en las celdas de reacción 1.6 ml de OGP 15 mM y se adaptaron a las jeringas de inyección de 2500 μ L con la suspensión liposomal.
- El experimento se corrió a la temperatura controlada de 25 °C y una sensibilidad del equipo a 100 μ W.
- En este experimento se realizaron 30 inyecciones 20 μ L de la suspensión en periodos de 25 minutos.
- El área bajo la curva de cada pico debido a cada inyección y el cual representa el ΔH del proceso, se obtuvo por medio del software Digitam, que es el software procesador de datos del Thermal Activity Monitor, el cual permite ejecutar la

sustracción de calores de dilución de la celda de referencia y la integración de cada pico del potenciograma.

4.4 Calorimetría Diferencial de Barrido

La técnica de DSC se realizó para todos los sistemas liposomales de la *Tabla2*, antes y después de la titulación con el tensoactivo OGP.

- Se desgasificó 1mL la suspensión de liposomas y 1 mL de agua desionizada.
- Se colocaron 515 μ L de suspensión y 515 μ L de agua en la celda de muestra y referencia respectivamente.
- El compartimento de las celdas se cerró hasta ajustar la presión del sistema VP-DSC a 44.11 p.s.i. inicial.
- Las condiciones de análisis fueron, 3 barridos en intervalo de temperatura de 7 °C a 40 °C, y normalizando la concentración del fosfolípido en la muestra.
- El análisis de datos se realizó con el software VP-DSC para la obtención de los parámetros ΔH , T_m y $T_{1/2}$.

4.5 Dispersión Dinámica de Luz

El análisis de tamaño de partícula por DLS, se realizó con el equipo Malvern Zetasizer 4V, donde se lleva a cabo el estudio de los sistemas liposomales antes y después del estudio de la interacción con el tensoactivo OGP.

Tabla 3. Sistemas liposomales antes y después de la titulación calorimétrica isotérmica

Sistema	
1	DMPC
2	DMPC: CHOL
3	D,PC: IBU
4	DMPC: CHOL: IBU
ITC	
5	DMPC vs OGP
6	DMPC: CHOL vs OGP
7	DMPC: CHOL: IBU vs OGP
8	DMPC: IBU vs OGP

Se colocó 1 ml de la suspensión de los sistemas en una celda de cuarzo bajo las siguientes condiciones que se muestran en Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones experimentales de análisis de DLS.

Temperatura	25 °C
Viscosidad del medio	0.8902 cPoise
Índice de refracción del medio	1.333
Longitud de onda del laser	632.8 nm
Ángulo de dispersión	90 grados
Tiempo de análisis	10 minutos

El tiempo de análisis se estableció por 7 días o hasta observar la presencia de precipitación.

Capítulo 5.

Resultados y Discusión

5.1.0 Calorimetría de Titulación Isotérmica

El estudio de la interacción del tensoactivo OGP con los sistemas liposomales se llevó a cabo mediante la titulación de una solución de tensoactivo OGP [15mM] con cada uno de los sistemas liposomales (DMPC, DMPC:CHOL, DMPC:IBU y DMPC:CHOL:IBU). La solución de tensoactivo OGP [15 mM] posee una concentración menor a su CMC con el fin de aislar el estudio de la interacción de los monómeros de tensoactivo con los sistemas liposomales y no de las estructuras micelares con estructuras liposomales.

Como referencia, en cada uno de los sistemas de estudio, se empleó una celda cargada con solución de tensoactivo OGP 15 mM, la cual fue sometida a las mismas condiciones de titulación con agua desionizada; esto con el fin de restar el calor de dilución del tensoactivo OGP de las interacciones de este mismo con las estructuras liposomales.

A continuación se presentarán los perfiles obtenidos para la titulación de cada uno de los sistemas, así como el análisis de las propiedades termodinámicas en cada uno.

5.1.1 Sistema DMPC

Se llevó a cabo la calorimetría diferencial de barrido para el sistema liposomal constituido únicamente por el fosfolípido DMPC. La titulación del sistema se llevó a cabo el día de la fabricación del sistema liposomal.

En la celda de reacción se colocaron 1.6 mL de solución de tensoactivo OGP [15 mM] y en las jeringas del titulador se colocaron 2500 μ L de la suspensión liposomal. El experimento se corrió a la temperatura controlada de 25 °C y una sensibilidad del equipo a 100 μ w bajo 30 inyecciones de 20 μ l en intervalos de 25 min.

La integración de picos del potenciograma se llevó a cabo mediante el software Digitam. El calor de reacción asociado a cada inyección corresponde a un proceso endotérmico. Se realizó el ajuste no lineal asociado a la dispersión de puntos experimentales. La curva teórica de este ajuste no lineal está representada mediante una línea roja en el entalpograma de la Figura 26.

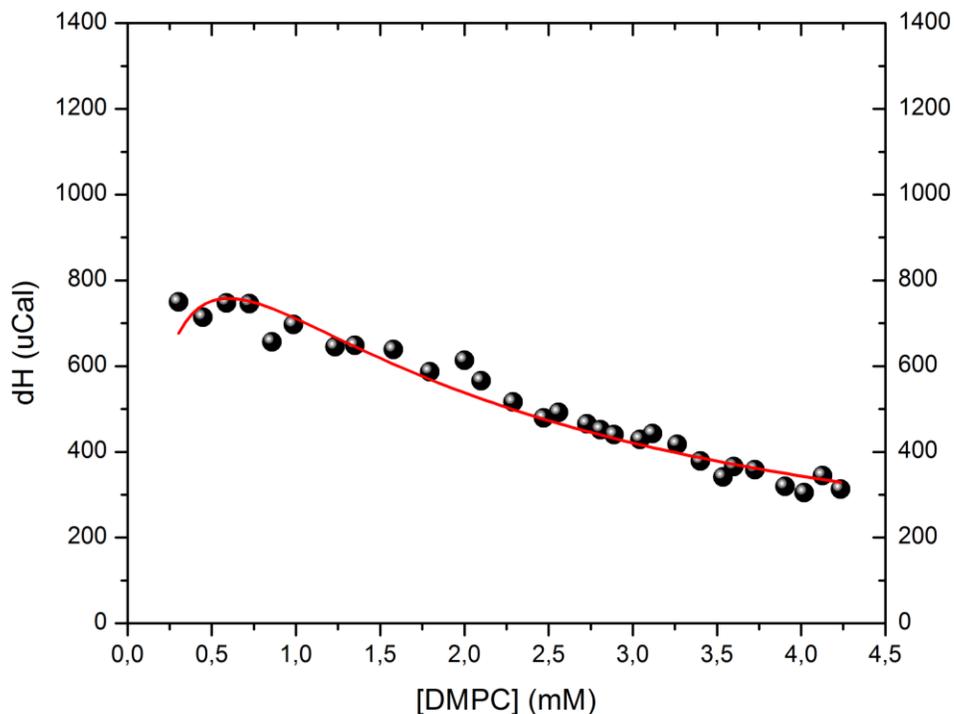


Figura 26. Entalpograma de la titulación del sistema DMPC.

El modelo de reparto de tensoactivo en vesículas lipídicas de Wenk [42] se ajusta a los datos experimentales, con lo cual, se determinaron los parámetros termodinámicos asociados al proceso.

Tabla 5. Resultados experimentales tras análisis de sistema DMPC en calorimetría de titulación isotérmica.

Titulación de OGP 15 mM con liposomas de DMPC	
R^2	0.946
k (mM^{-1})	1.669
ΔH_D (kcal/ mol)	1.896
ΔS_D (kcal/molK)	0.007
ΔG_D (kcal/mol)	-0.379

Durante el experimento, en todas las inyecciones de la suspensión de DMPC a la solución de OGP 15 mM se produce un calor de reacción endotérmico, el cual corresponde a un proceso de disociaciones entre las moléculas de DMPC a causa de la inserción de monómeros de OGP en la doble capa lipídica de los liposomas.

La constante de reparto con un valor >1 indica que los monómeros de tensoactivo, en este sistema, tienden a integrarse a las estructuras liposomales bajo un proceso de carácter endotérmico ($\Delta H_D > 0$), favorecido entrópicamente ($\Delta S_D > 0$) y espontáneo ($\Delta G_D < 0$).

De acuerdo con el ajuste del modelo de Wenk [42] y en relación al modelo de tres estados de Lichtenberg, para este experimento, se observa que el proceso inicia y concluye únicamente con la inserción de monómeros de tensoactivo en los liposomas de DMPC, esto es, la primera etapa del modelo de Lichtenberg, donde se presenta la formación de estructuras tipo “vesículas mixtas”. El sistema está constituido entonces por liposomas de DMPC con monómeros de tensoactivo insertados en la doble capa lipídica. Las estructuras liposomales mixtas se encuentran en equilibrio dinámico con su fase dispersora constituida por agua y monómeros de tensoactivo en solución.

5.1.2 Sistema DMPC:CHOL

Se llevó a cabo la titulación del sistema liposomal constituido por DMPC:CHOL bajo las mismas condiciones de trabajo y procesamiento de datos que en el sistema DMPC.

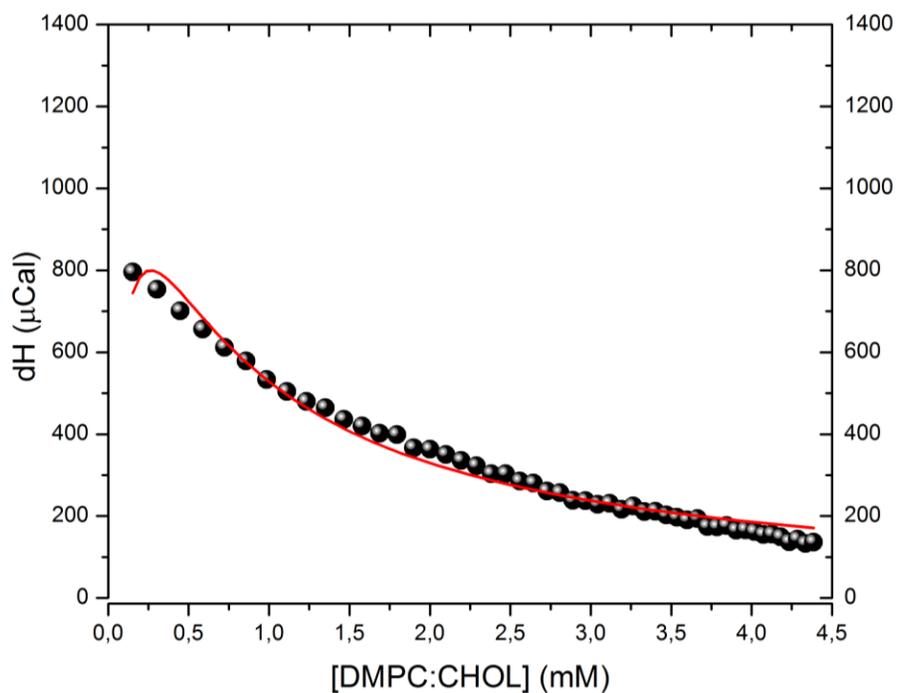


Figura 27. Entalpograma de la titulación del sistema DMPC:CHOL.

Tabla 6. Resultados experimentales tras análisis de sistema DMPC:CHOL en calorimetría de titulación isotérmica.

Titulación de OGP 15 mM con liposomas de DMPC:CHOL	
R^2	0.980
k (mM^{-1})	0.864
ΔH_D (kcal/ mol)	2.001
ΔS_D (kcal/molK)	0.004
ΔG_D (kcal/mol)	-0.411

El modelo de reparto de tensoactivo en vesículas lipídicas de Wenk [42] se ajusta a los datos experimentales, con lo cual, se determinó que los valores de la constante de reparto

y energía libre de reparto disminuyeron con respecto al sistema DMPC:OGP. La cantidad de tensoactivo OGP insertado en los liposomas es menor en el sistema DMPC:OGP.

Al igual que en el sistema DMPC:OGP, el experimento de titulación inicia y concluye con el proceso de inserción de tensoactivo en los liposomas de DMPC:CHOL. Las estructuras presentes en el sistema DMPC:CHOL:OGP son vesículas mixtas.

El proceso de inserción de tensoactivo en los liposomas de DMPC:CHOL es de naturaleza endotérmica y posee valores de entalpía y entropía de reparto más altos que los del sistema DMPC:OGP.

La adición de colesterol incrementa la rigidez de los liposomas de DMPC, disminuyendo así la permeabilidad y la posibilidad de inserción de los monómeros de tensoactivo en la doble capa lipídica, consecuentemente, se observa una disminución en la constante de reparto y en la energía libre de reparto. El incremento en la rigidez de la membrana de los liposomas de DMPC:CHOL incrementa el trabajo requerido en el proceso de reparto de tensoactivo en membranas lipídicas, tal que el valor de la entalpía de reparto es mayor que en el sistema constituido por liposomas de DMPC.

5.1.3 Sistema DMPC:IBU

Se llevó a cabo la titulación del sistema liposomal constituido por DMPC:IBU bajo las mismas condiciones de trabajo y procesamiento de datos que todos los sistemas anteriores.

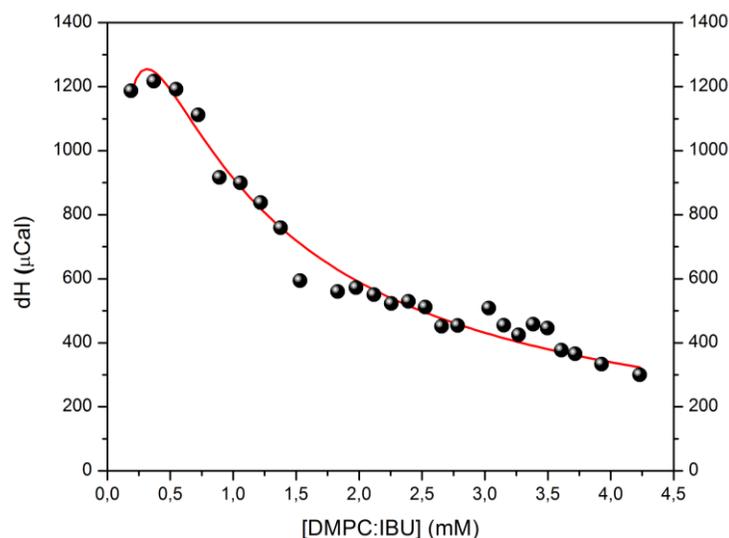


Figura 28. Entalpograma de la titulación del sistema DMPC:IBU

El modelo de reparto de tensoactivo en vesículas lipídicas de Wenk [42] se ajusta a los datos experimentales, con lo cual, se determinó que el sistema DMPC:IBU:OGP presenta una constante de reparto del tensoactivo mayor que los dos sistemas anteriores. En consecuencia, de acuerdo con el valor de la energía libre de reparto, se favorece la espontaneidad del proceso. La entalpía de reparto del sistema DMPC:IBU:OGP incrementa con respecto a los dos sistemas anteriores.

Tabla 7. Resultados experimentales tras análisis de sistema DMPC:IBU en calorimetría de titulación isotérmica.

Titulación de OGP 15 mM con liposomas de DMPC:IBU	
R^2	0.939
k (mM ⁻¹)	4.816
ΔH_D (kcal/ mol)	8.035
ΔS_D (kcal/molK)	0.020

El incremento de los parámetros termodinámicos característicos de un proceso espontáneo, sugieren que la presencia de ibuprofeno en liposomas favorece la inserción de tensoactivo en la doble capa lipídica.

5.1.4 Sistema DMPC:IBU:CHOL

Se llevó a cabo la titulación del sistema liposomal constituido por DMPC:CHOL:IBU bajo las mismas condiciones de trabajo y procesamiento de datos que todos los sistemas anteriores.

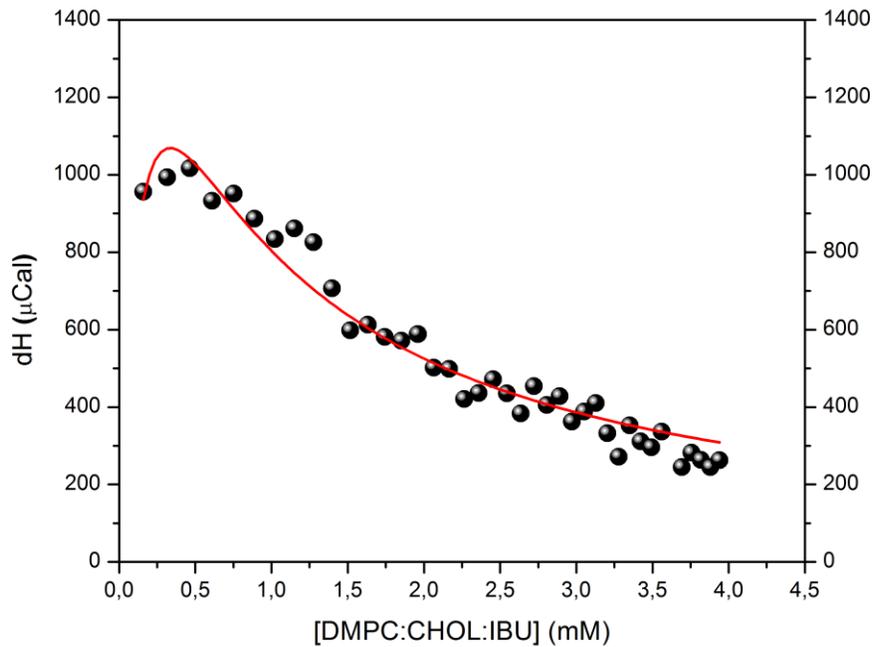


Figura 29. Entalpograma de la titulación del sistema DMPC:CHOL:IBU.

Tabla 8. Resultados experimentales tras análisis de sistema DMPC:CHOL:IBU en calorimetría de titulación isotérmica.

Titulación de OGP 15 mM con liposomas de DMPC:CHOL:IBU	
R ²	0.959
k (mM ⁻¹)	2.986
ΔH_D (kcal/ mol)	2.673
ΔS_D (kcal/molK)	0.012
ΔG_D (kcal/mol)	-0.582

El modelo de reparto de tensoactivo en vesículas lipídicas de Wenk [42] se ajusta a los datos experimentales, con lo cual, se determinó que la presencia de colesterol en el sistema DMPC:CHOL:IBU:OGP disminuye el valor de la constante de reparto y la espontaneidad del proceso con respecto al sistema DMPC:IBU:OGP, sin embargo, estos valores de k y ΔG_D son mayores con respecto a los sistemas que no contienen ibuprofeno, lo cual sugiere nuevamente que la presencia de ibuprofeno en liposomas favorece la inserción de tensoactivo en las membranas.

La entalpía de reparto y la entropía de reparto del sistema DMPC:CHOL:IBU:OGP disminuyen con respecto a los valores del sistema DMPC:IBU:OGP.

5.1.5 Análisis de tendencias. Calorimetría de Titulación isotérmica

Para todos los sistemas de estudio, de acuerdo con los valores obtenidos y el perfil de titulación observado en los cuatro sistemas, se sugiere que los sistemas DMPC:OGP,

DMPC:CHOL:OGP, DMPC:IBU:OGP y DMPC:CHOL:IBU:OGP están constituidos por vesículas mixtas y caracterizados en el primer estado del modelo de Lichtenberg [39].

A continuación se presenta un resumen de los resultados de los parámetros termodinámicos determinados en los cuatro experimentos de titulación:

Tabla 8. Parámetros termodinámicos del reparto de tensoactivo OGP en los sistemas liposomales estudiados.

	k (mM ⁻¹)	ΔH_D (kcal/ mol)	ΔS_D (kcal/molK)	ΔG_D (kcal/mol)
DMPC	1.669	1.896	0.007	-0.379
DMPC:CHOL	0.874	2.001	0.004	-0.411
DMPC:IBU	4.816	8.035	0.020	-1.235
DMPC:CHOL:IBU	2.986	2.673	0.012	-0.582

Los resultados obtenidos en este estudio calorimétrico indican que la presencia de colesterol inhibe el proceso de inserción de tensoactivo en la bicapa lipídica de los liposomas, a diferencia del ibuprofeno, que promueve considerablemente la inserción de tensoactivo en la bicapa lipídica. El parámetro fisicoquímico que presenta una relación directa sobre la cantidad de tensoactivo insertado en las estructuras liposomales es la constante de reparto. Los sistemas con un valor de “k” más grande, son aquéllos que contienen ibuprofeno. También se observa la disminución de este valor en sistemas que contienen colesterol con respecto a aquellos que no lo contienen.

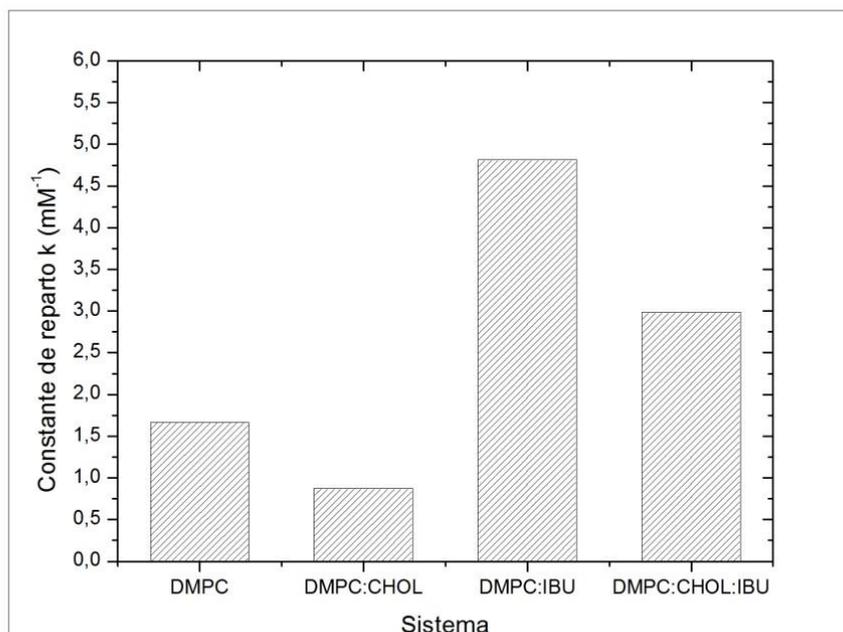


Figura 30. Valor de la constante de reparto en los cuatro sistemas de estudio.

Como se mencionó en el primer y segundo capítulos, el colesterol es empleado en la formulación de sistemas liposomales para incrementar la rigidez de la membrana. En este sistema, dentro de una bicapa lipídica, el colesterol tiende a orientar su grupo hidroxilo hacia la fase acuosa y a intercalar su región tricíclica y alifática con los primeros carbonos de las cadenas de los fosfolípidos (Figura 31).

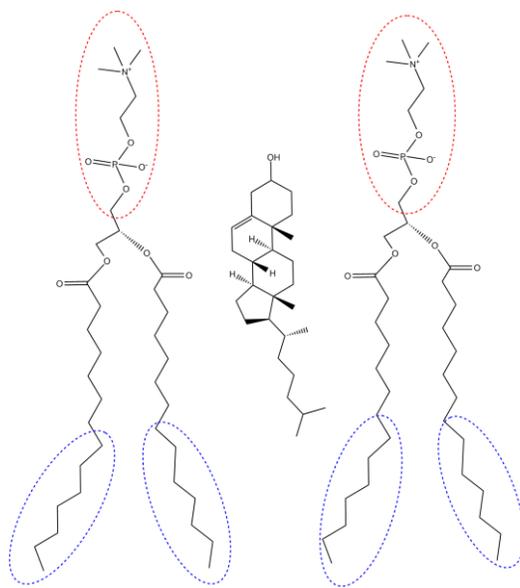


Figura 31. Interacción de colesterol con moléculas de DMPC.

La orientación del colesterol en los liposomas de DMPC produce un incremento en la densidad de la región hidrofóbica, y debido al impedimento de las cadenas de acilo del DMPC y a su fuerte interacción con la región cíclica del colesterol, las cadenas alifáticas reducen su posibilidad de adquirir diferentes conformaciones y con ello disminuye la fluidez y la permeabilidad de la membrana.

Debido a la disminución en la permeabilidad de la membrana al adicionar DMPC, la constante de reparto disminuye en los sistemas DMPC:CHOL y DMPC:CHOL:IBU con respecto a los sistemas que no contienen colesterol.

Por otra parte, el aumento en la constante de reparto en los sistemas DMPC:IBU y DMPC:CHOL:IBU, de debe a la interacción del ibuprofeno con los fosfolípidos de DMPC y su impacto en la permeabilidad de la membrana.

Se sugiere que las moléculas de ibuprofeno orientan su región hidrofílica constituida por un ácido carboxílico hacia la parte polar de las moléculas de DMPC (Figura 32). El anillo aromático de la molécula de ibuprofeno genera un impedimento que disminuye el orden de la membrana y que aleja entre sí a las moléculas de DMPC, tal que las cadenas de acilo adquieren mayor movilidad, la membrana adquiere mayor fluidez y con ello los liposomas que contienen ibuprofeno favorecen la inserción de tensoactivo en su doble capa lipídica.

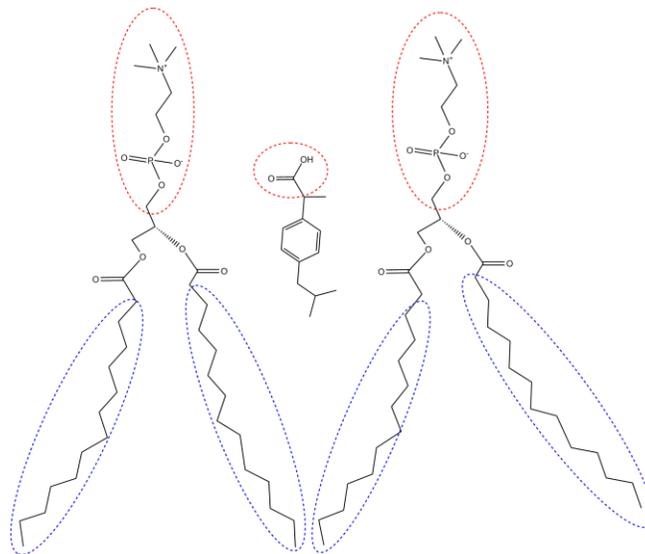


Figura 32. Interacción de ibuprofeno con moléculas de DMPC.

La espontaneidad del proceso de reparto de OGP en los liposomas se ilustra en la Figura 33, mediante la determinación de la energía libre de reparto ΔG_D . Los sistemas que contienen colesterol disminuyen la espontaneidad del proceso de reparto y los sistemas que contienen ibuprofeno lo favorecen.

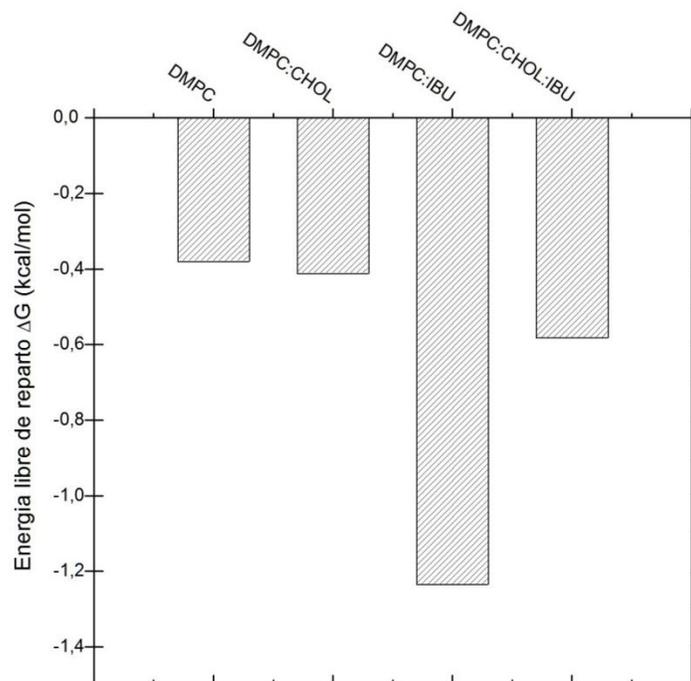


Figura 33. Energía libre de reparto de tensoactivo (OGP) en función de la composición del sistema.

La entalpía de reparto en los cuatro sistemas de estudio es mayor a cero, tanto en las inyecciones individuales como en la entalpía global de reparto, es decir, el reparto de tensoactivo OGP en los cuatro sistemas de estudio es de naturaleza endotérmica.

La naturaleza endotérmica del reparto de tensoactivo se debe a la disminución del número de interacciones entre las moléculas de DMPC a causa de la inserción de moléculas de tensoactivo en la doble capa lipídica de los liposomas.

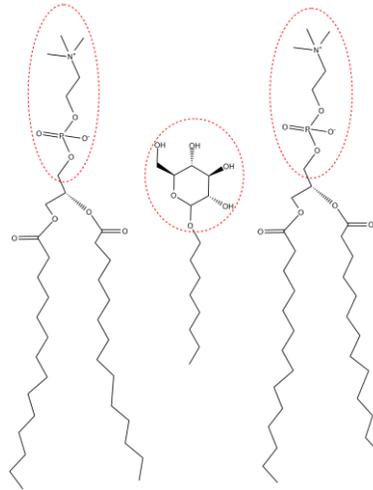


Figura 34. Interacción entre moléculas de OGP y moléculas de DMPC.

Se sugiere que debido al impedimento causado por las moléculas de ibuprofeno en la doble capa lipídica, los procesos de inserción de tensoactivo OGP en los liposomas de DMPC:IBU y DMPC:CHOL:IBU poseen valores mayores de entalpía y entropía.

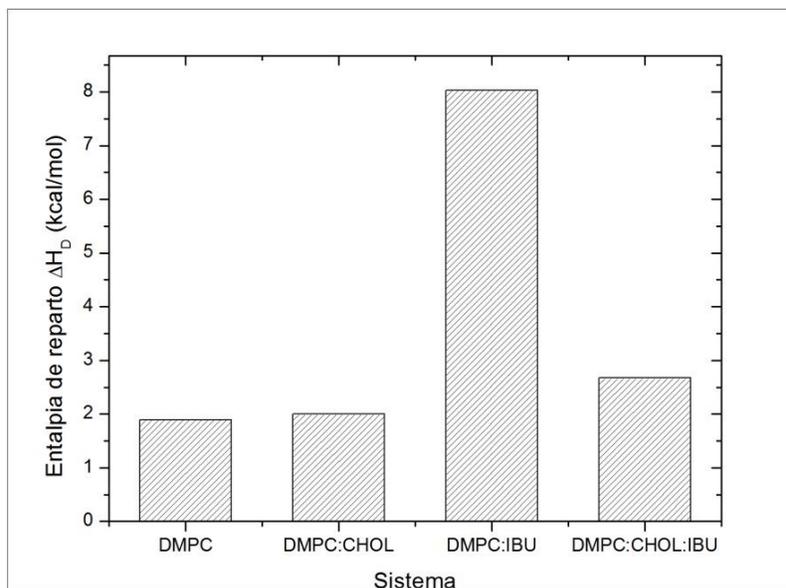


Figura 35. Entalpía de reparto de tensoactivo OGP en los cuatro sistemas liposomales de estudio.

De acuerdo con la Figura 35 y la Figura 36, es posible sugerir que, bajo las consideraciones estructurales de la doble capa lipídica de liposomas y la espontaneidad del proceso, el reparto de tensoactivo en los liposomas y la consecuente formación de vesículas mixtas, se encuentra dirigido por la entalpía y la entropía del proceso.

Considerando el fenómeno de hidrofobicidad que se presenta en moléculas anfífilas en solución, se plantea que la incorporación de moléculas de OGP en los sistemas liposomales conduce a un incremento en la entropía del sistema a causa de la pérdida de orden de las moléculas de agua que comprenden a las capas de solvatación. El incremento de entropía es mayor para los sistemas que contienen ibuprofeno, tal que, es en estos sistemas en los que la concentración de tensoactivo insertado en liposomas también es mayor.

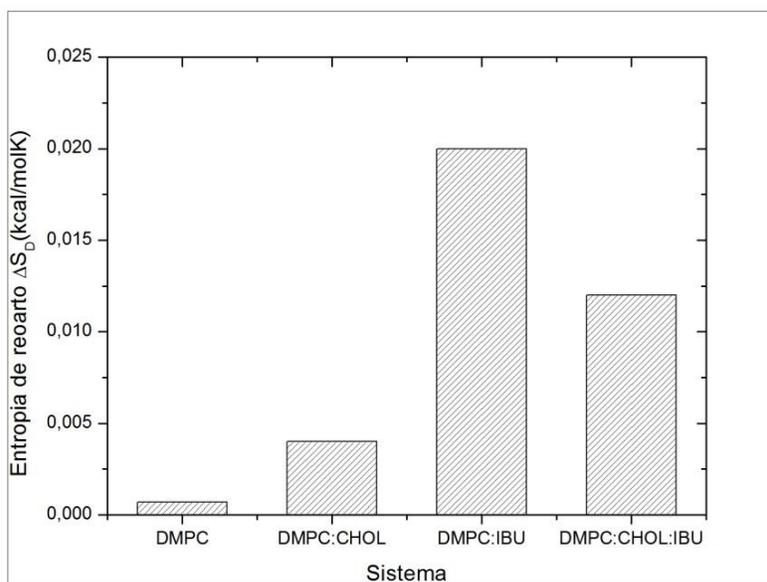


Figura 36. Entropía de reparto de tensoactivo OGP en los cuatro sistemas liposomales de estudio.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la calorimetría de titulación isotérmica para sistemas de DMPC y DMPC:CCHOL, se sugiere que para el desarrollo de formulaciones farmacéuticas o cosméticas de sistemas liposomales, la carga de principios activos de naturaleza hidrófoba favorece la permeabilidad de la estructura liposomal y el reparto de tensoactivo.

5.2.0 Calorimetría Diferencial de Barrido

Una vez que se ha caracterizado y analizado el proceso de reparto de tensoactivo en los sistemas liposomales, se procede al análisis mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) para conocer el impacto de la inserción de tensoactivo sobre los parámetros termodinámicos de la transición principal de los liposomas.

El proceso de transición principal es fundamental para el desarrollo y aplicación de formulaciones con tecnología liposomal. Los parámetros termodinámicos de este proceso como la temperatura de transición principal (T_m), la entalpía, entropía y energía libre de transición, así como el mismo perfil de la traza calorimétrica, permiten caracterizar las propiedades del sistema y elucidar consideraciones sobre la estructura microscópica del sistema y para su aplicación tecnológica.

5.2.1 Sistema DMPC y DMPC:OGP

De acuerdo con los resultados obtenidos en ITC para la titulación del sistema liposomal de DMPC, se determinó que al final de la titulación el sistema estaba constituido por vesículas mixtas de DMPC:OGP.

Los sistemas DMPC y DMPC:OGP fueron sometidos a barridos de 10-40 °C, donde se reprodujeron los parámetros reportados por otros autores [4] para el sistema DMPC y se determinaron los parámetros para el sistema DMPC:OGP.

Por medio del tratamiento a los termogramas obtenidos mediante el software Origin 8, se determinaron las temperaturas de transición, la entalpía de transición, $T_{1/2}$ y la capacidad calorífica máxima $C_{p_{max}}$. Por medio de la ecuación (36) se determinó la entropía de transición y por medio de las ecuaciones (39) y (40) la entalpía de Van't Hoff y el valor de C.U. respectivamente como un segundo parámetro de referencia para evaluar la cooperatividad del evento de transición.

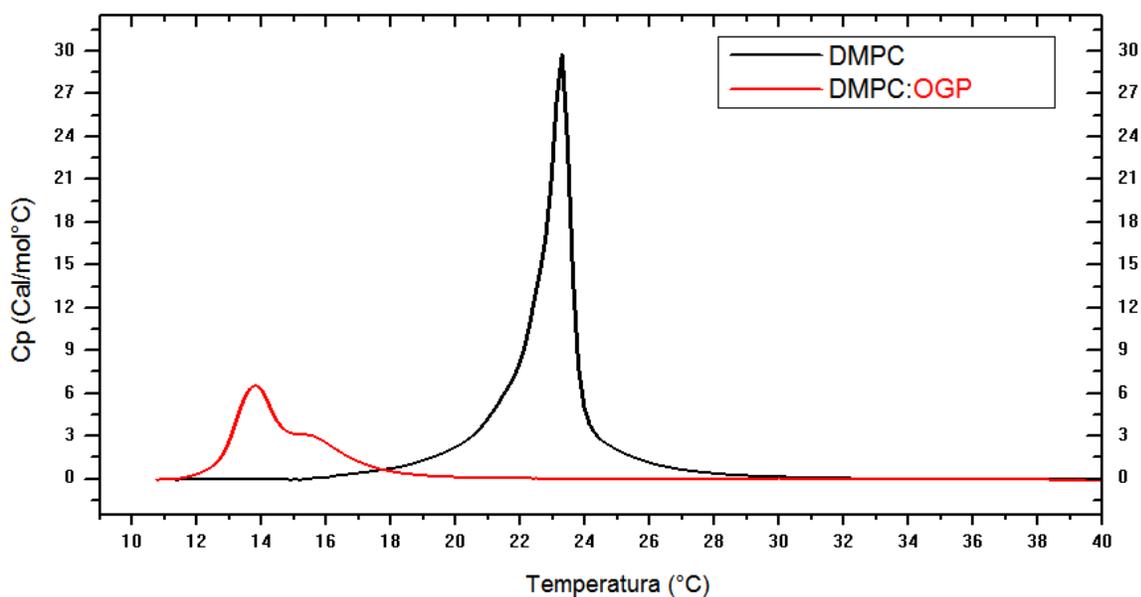


Figura 37. Termograma de los sistemas DMPC y DMPC:OGP

La traza calorimétrica del sistema DMPC presenta un pico angosto y con mayor simetría que el resto de los picos presentados en este estudio. El perfil de este pico es característico de un sistema puro, de una transición de primer orden. La traza del sistema DMPC:OGP presenta un perfil muy diferente al del sistema DMPC.

Los valores de los parámetros de transición reportados en la Tabla 9 muestran que en el sistema DMPC:OGP se presentó una disminución de la T_m , de la $C_{p_{max}}$, de la entalpía y entropía de transición y de la cooperatividad de la transición principal con respecto al sistema DMPC.

La traza asimétrica del termograma DMPC:OGP sugiere que la inserción de tensoactivo perturba la estructura y con ello las propiedades termodinámicas del sistema. La curva del sistema DMPC:OGP sugiere que la distribución del tensoactivo OGP en la doble capa lipídica de los liposomas de DMPC no es homogénea y el abatimiento de los parámetros

T_m , $C_{p_{max}}$ y ΔH y ΔS puede asociarse a una disminución en el número de interacciones entre cadenas de acilo que dan origen al estado de cristal líquido. En el sistema DMPC, las interacciones de las cadenas de acilo generan que los valores de T_m , $C_{p_{max}}$ y ΔH y ΔS sean mayores que en el sistema DMPC:OGP, donde la interacción entre cadenas alifáticas es menor.

Tabla 9. Parámetros termodinámicos obtenidos por DSC para los sistemas DMPC y DMPC:OGP

	DMPC	DMPC:OGP
$T_m(^{\circ}C)$	23.28 ± 0.27	13.68 ± 0.19
$T_{1/2}$	0.90 ± 0.08	1.38 ± 0.06
$C_{p_{max}}$ (cal/mol $^{\circ}C$)	29.314 ± 0.221	7.605 ± 0.097
ΔH (kcal/mol)	4.977 ± 0.160	2.503 ± 0.051
ΔS (kcal/molK)	16.79 ± 0.21	8.73 ± 0.11
ΔH_{vH} (kcal/mol)	4.110 ± 0.171	1.985 ± 0.030
C.U.	0.826 ± 0.022	0.793 ± 0.039

Los parámetros de evaluación de la cooperatividad del evento ($T_{1/2}$ y C.U.) muestran que la transición de DMPC es más cooperativa y con tendencia a ser un evento de primer orden, mientras que el sistema DMPC:OGP es menos cooperativa y se pudiera asociar con un mayor número de microestados involucrados en el proceso de transición. Los “hombros” presentes en la curva del sistema DMPC:OGP pueden atribuirse a dominios de OGP y a una distribución heterogénea del tensoactivo en los liposomas.

5.2.2 Sistema DMPC:CHOL y DMPC:CHOL:OGP

Se llevó a cabo la calorimetría diferencial de barrido del sistema DMPC:CHOL antes y después de la titulación con tensoactivo. De acuerdo con los resultados obtenidos en ITC para la titulación del sistema liposomal, se determinó que al final de la titulación el sistema estaba constituido por vesículas mixtas de DMPC:CHOL:OGP.

Los sistemas DMPC:CHOL y DMPC:CHOL:OGP fueron sometidos a barridos de 6-40°C, donde se reprodujeron los parámetros reportados por otros autores [4] para el sistema DMPC:CHOL y se determinaron los parámetros para el sistema DMPC:CHOL:OGP.

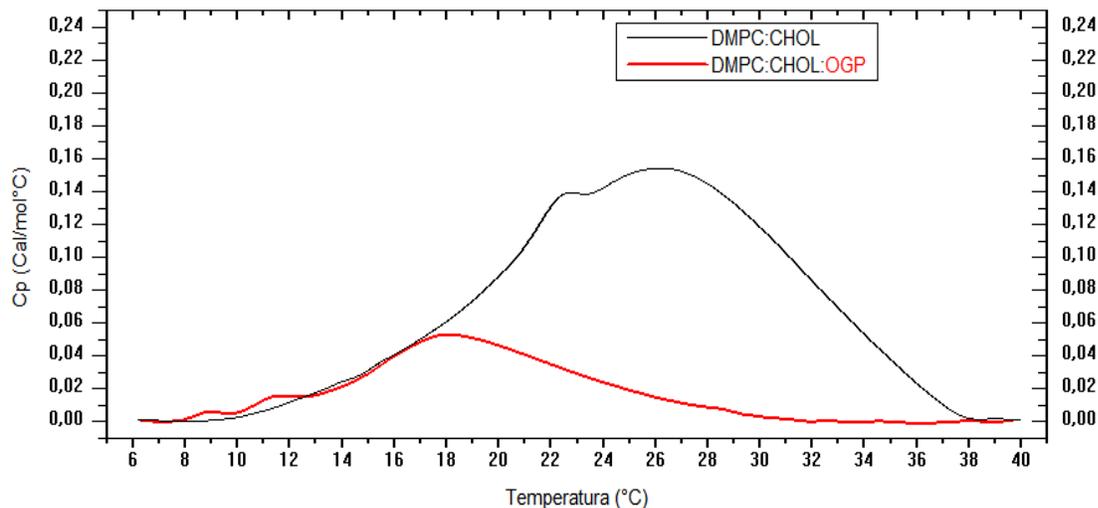


Figura 38. Termograma de los sistemas DMPC:CHOL y DMPC:CHOL:OGP

La traza calorimétrica del sistema DMPC:CHOL presenta una curva que se extiende a lo largo del barrido. En este experimento se consiguió replicar el perfil y parámetros termodinámicos reportados en la literatura [59,60]. En la traza de este sistema se observa un hombro alrededor de los 22°C.

Los valores de los parámetros de transición reportados en la Tabla 10 muestran que en el sistema DMPC:CHOL se presentó un incremento de la T_m y una disminución de la $C_{p_{max}}$, de la entalpía y entropía de transición y de la cooperatividad del evento con respecto al sistema DMPC.

De forma análoga a la comparación anterior de sistemas con y sin tensoactivo, en el sistema DMPC:CHOL:OGP se presentó una disminución de la T_m , de la $C_{p_{max}}$, de la entalpía y entropía de transición y de la cooperatividad del evento con respecto al sistema DMPC:CHOL.

También de forma análoga, la traza calorimétrica del sistema DMPC:CHOL:OGP sugiere que la distribución del tensoactivo en la doble capa lipídica de los liposomas de DMPC:CHOL no es homogénea y que el abatimiento de los parámetros T_m , $C_{p_{max}}$ y ΔH y ΔS puede asociarse a una disminución en el número de interacciones entre cadenas de acilo que dan origen al estado de cristal líquido.

Tabla 10. Parámetros termodinámicos obtenidos por DSC para los sistemas DMPC:CHOL y DMPC:CHOL:OGP

	DMPC:CHOL	DMPC:CHOL:OGP
$T_m(^{\circ}C)$	25.35 ± 0.19	17.86 ± 0.13
$T_{1/2}$	10.66 ± 0.13	8.02 ± 0.09
$C_{p_{max}}$ (cal/mol $^{\circ}C$)	0.158 ± 0.031	0.058 ± 0.002
ΔH (kcal/mol)	1.556 ± 0.071	0.437 ± 0.013
ΔS (kcal/molK)	5.21 ± 0.10	1.50 ± 0.02
ΔH_{vH} (kcal/mol)	0.072 ± 0.003	0.099 ± 0.01
C.U.	0.046 ± 0.003	0.205 ± 0.013

5.2.3 Sistema DMPC:IBU y DMPC:IBU:OGP

Las trazas calorimétricas de los sistemas DMPC:IBU y DMPC:IBU:OGP, al igual que en el caso de los sistemas con colesterol DMPC:CHOL y DMPC:CHOL:OGP, también presentan curvas asimétricas que se extienden en intervalos amplios de temperatura.

De acuerdo con los resultados de la Tabla 12, la incorporación de ibuprofeno a los sistemas liposomales de DMPC disminuye la temperatura de transición principal T_m . Los parámetros termodinámicos Entalpía de Transición ΔH y Entropía de transición ΔS se ven favorecidos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en calorimetría de titulación isotérmica, debido a un incremento en la constante de reparto, se dedujo que la adición de ibuprofeno al sistema liposomal de DMPC favorecía la inserción de monómeros de tensoactivo en las estructuras liposomales debido a que la presencia de ibuprofeno disminuye el número de interacciones favorables entre las cadenas de acilo de los fosfolípidos, contribuyendo así a que la membrana sea más permeable. Se sugiere que debido a este mismo fenómeno la transición principal es caracterizada por valores de entropía y entalpía mayores con respecto a los sistemas DMPC:CHOL y DMPC:CHOL:OGP.

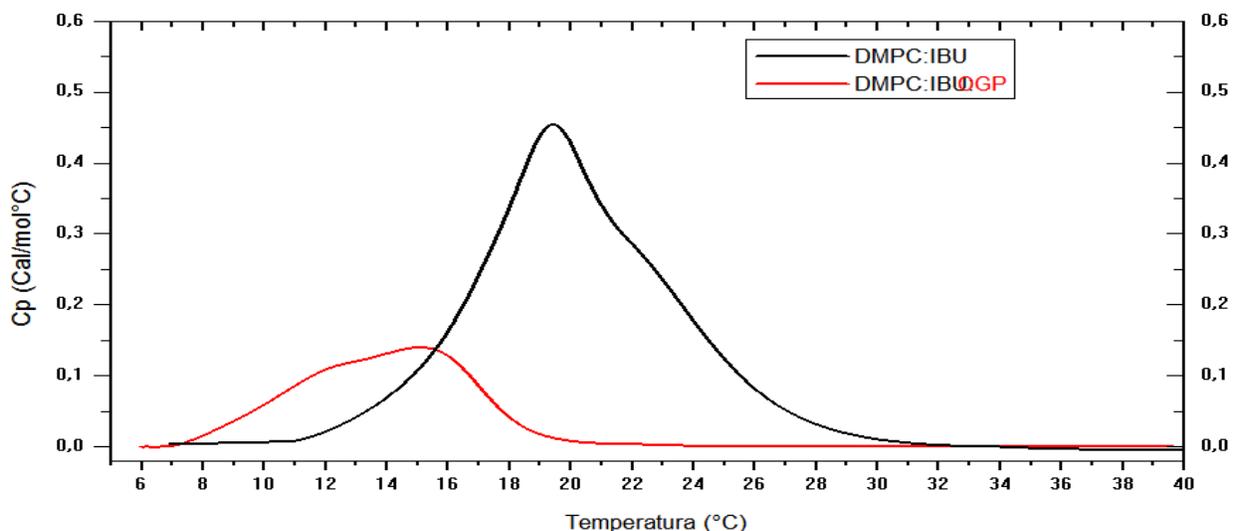


Figura 39. Termograma de los sistemas DMPC:IBU y DMPC:IBU:OGP

Al igual que en los sistemas presentados anteriormente, se sugiere que la distribución del tensoactivo en la doble capa lipídica de los liposomas no es homogénea y que el abatimiento de los parámetros T_m , $C_{p_{max}}$, ΔH y ΔS con respecto al sistema que no contiene tensoactivo, puede asociarse a una disminución en el número de interacciones entre cadenas de acilo que dan origen al estado de cristal líquido.

Tabla 12. Parámetros termodinámicos obtenidos por DSC para los sistemas DMPC:IBU y DMPC:IBU:OGP

	DMPC:IBU	DMPC:IBU:OGP
$T_m(^{\circ}C)$	19.50 ± 0.22	15.26 ± 0.16
$T_{1/2}$	7.28 ± 0.13	6.73 ± 0.09
$C_{p_{max}}$ (cal/mol $^{\circ}C$)	0.451 ± 0.098	0.134 ± 0.010
ΔH (kcal/mol)	3.041 ± 0.032	0.972 ± 0.061
ΔS (kcal/molK)	10.39 ± 0.10	3.37 ± 0.09
ΔH_{vH} (kcal/mol)	0.101 ± 0.006	0.091 ± 0.005
C.U.	0.033 ± 0.002	0.094 ± 0.006

La traza calorimétrica de ambos sistemas son curvas que se extienden en un intervalo amplio de temperatura y son asimétricas, en ambos casos también, se aprecia que la cooperatividad de la transición principal es baja. La adición de OGP al sistema liposomal cargado con ibuprofeno favorece la transición de fase de este sistema, debido a la disminución de T_m y ΔH de transición. También se presentó una disminución de la entropía de transición. De acuerdo con los resultados y la hipótesis propuesta en el análisis de resultados de ITC para el sistema cargado con ibuprofeno, se propuso que en este sistema existe afinidad de las moléculas de OGP por integrarse a la doble capa lipídica de los liposomas cargados con ibuprofeno.

De acuerdo con lo propuesto anteriormente, tanto la presencia Ibuprofeno como la presencia de OGP en la doble capa lipídica de los liposomas, favorecen la movilidad de las cadenas de acilo, y con ello la disminución en la energía requerida para llevar a cabo la transición, es decir, la disminución de los parámetros termodinámicos caracterizados mediante DSC.

5.2.4 Sistema DMPC:IBU:CHOL y DMPC:IBU:CHOL:OGP

De acuerdo con los resultados de calorimetría diferencial de barrido y en su correlación con los resultados obtenidos por calorimetría de titulación isotérmica, se propone que la presencia de componentes como colesterol, ibuprofeno o tensoactivo OGP desfavorecen las interacciones entre cadenas de acilo y que con ello, estas cadenas poseen mayor libertad de movimiento, disminuyendo así, la energía requerida para efectuar la transición de fase,

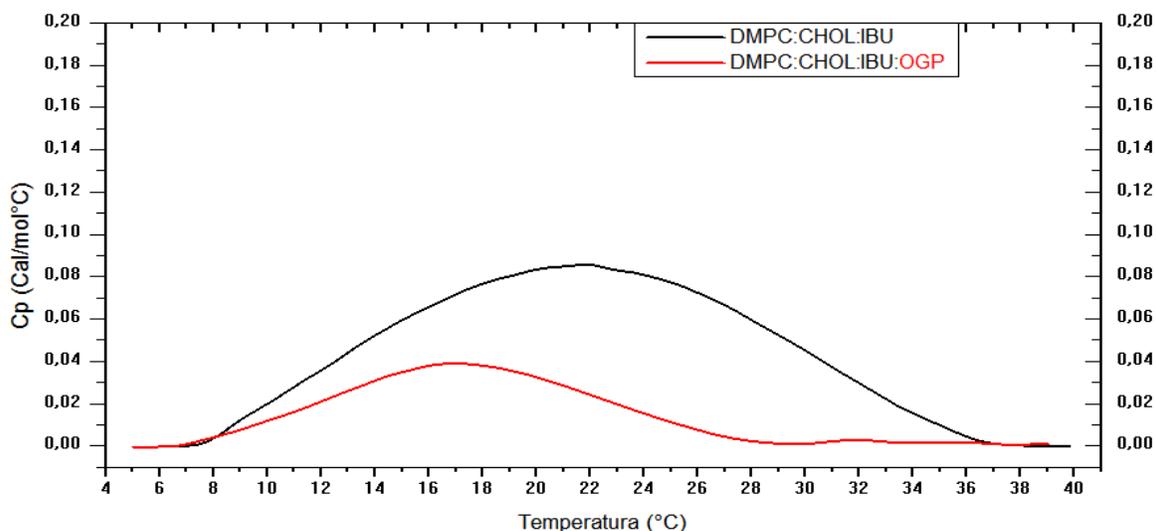


Figura 40. Termograma de los sistemas DMPC:CHOL:IBU y DMPC:CHOL:IBU:OGP

Los termogramas de la Figura 40 presentan hasta este punto las curvas más anchas del estudio, es decir, las transiciones menos cooperativas. De igual forma, los termogramas de los sistemas DMPC:CHOL:IBU y DMPC:CHOL:IBU:OGP presentan entalpías de transición bajas. Al igual que en los demás sistemas estudiados, la adición de tensoactivo OGP disminuye la temperatura, entalpía y entropía de transición.

Tabla 13. Parámetros termodinámicos obtenidos por DSC para los sistemas DMPC:CHOL:IBU y DMPC:CHOL:IBU:OGP

	DMPC:CHOL:IBU	DMPC:CHOL:IBU:OGP
T _m (°C)	21.55 ± 0.17	16.82 ± 0.11
T _{1/2}	17.07 ± 0.11	11.26 ± 0.06
c _{pmax} (cal/mol°C)	0.084 ± 0.009	0.033 ± 0.004
ΔH(kcal/mol)	1.425 ± 0.025	0.463 ± 0.009
ΔS(kcal/molK)	4.84 ± 0.12	1.60 ± 0.02
ΔH _{vH} (kcal/mol)	0.040 ± 0.006	0.047 ± 0.005
C.U.	0.028 ± 0.002	0.103 ± 0.009

5.2.5 Análisis de tendencias DSC

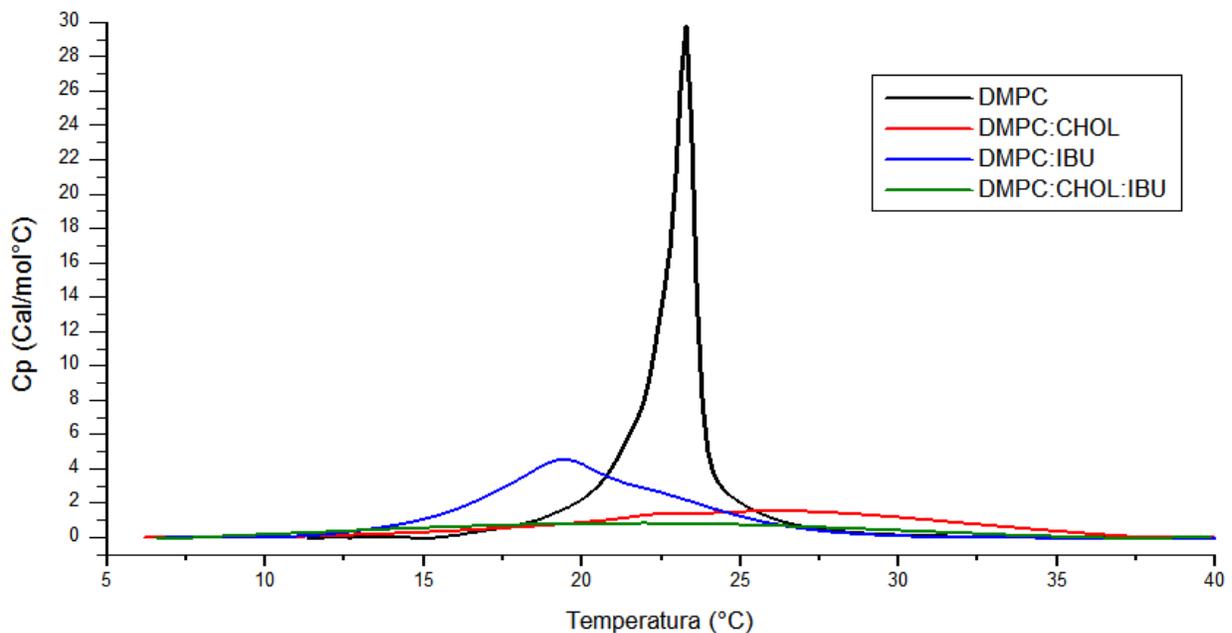


Figura 41. Superposición de termogramas de sistemas liposomales sin tensoactivo OGP.

En los resultados obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC), es posible observar que la incorporación de componentes a la bicapa lipídica genera cambios significativos en la entalpía de transición de fase, la temperatura de transición y la cooperatividad del evento. Para todos los sistemas estudiados, la entalpía de transición de fase y la cooperatividad del evento disminuyen. La incorporación de tensoactivo a los sistemas también reduce la temperatura de transición de fase.

La adición de colesterol e ibuprofeno disminuyen la entalpía de transición y reducen la cooperatividad del evento. En las proporciones estudiadas, el colesterol incrementa la temperatura de transición de fase. En el sistema que contiene colesterol e ibuprofeno hay un efecto sinérgico por parte de ambas sustancias en la variación de este parámetro.

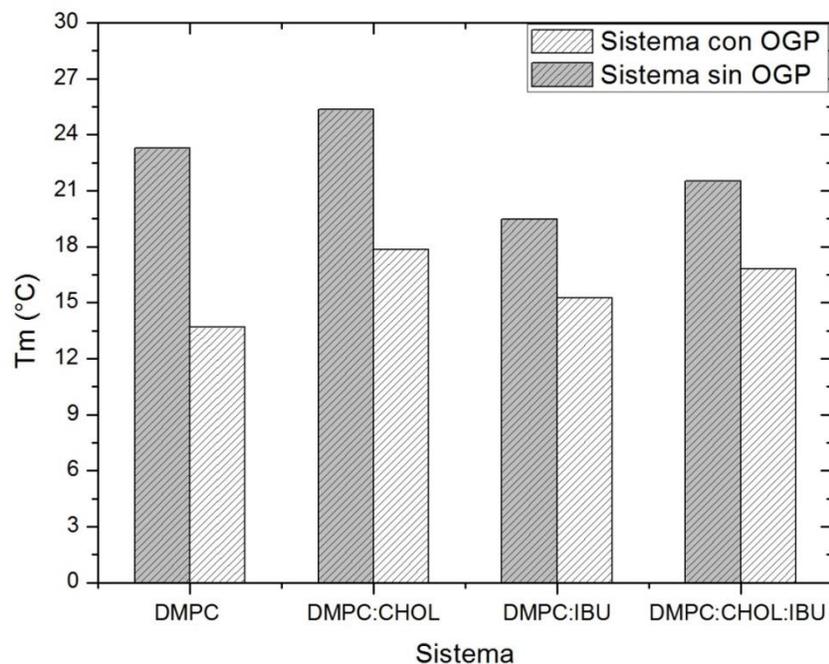


Figura 42. Variación de la temperatura de transición principal en función de la composición de los sistemas liposomales.

De acuerdo con las hipótesis sugeridas en los análisis de resultados de secciones anteriores, el colesterol interactúa fuertemente con las cadenas de acilo de los fosfolípidos, tal que la movilidad de estas cadenas de acilo se ve reducida y con ello se presenta el requerimiento de una mayor temperatura para conducir el sistema a un estado de cristal líquido. Se sugiere que esta es la razón por la cual los sistemas DMPC:CHOL y DMPC:CHOL :IBU presentan valores mayores de T_m con respecto a sus análogos DMPC y DMPC:IBU.

El caso contrario ocurre con la adición Ibuprofeno y OGP, pues estas moléculas desfavorecen las interacciones entre las cadenas de acilo y su adición genera una disposición tal que, las cadenas de acilo presentan una mayor movilidad y con ello un menor requerimiento de temperatura para llevar a cabo la transición a fase cristal líquido.

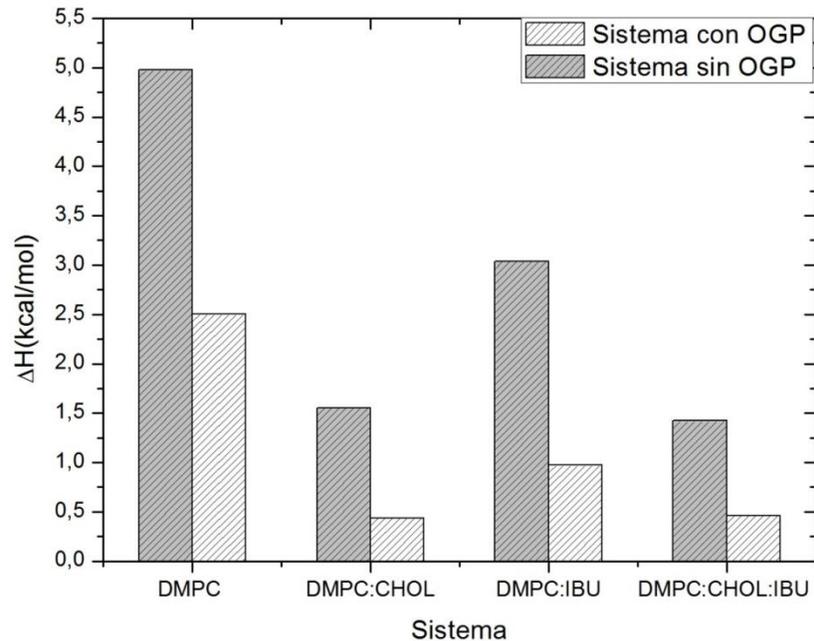


Figura 43. Variación de la entalpía de transición principal en función de la composición de los sistemas liposomales.

Dado que la entalpía de transición es una función dependiente de la capacidad calorífica y de la temperatura, al relacionar los perfiles de la Figura 41 con el gráfico de la Figura 43, se observa que los sistemas que adquieren valores más grandes para la integración de valores de C_p , son aquellos que también poseen mayores valores de ΔH , esto de acuerdo con la definición de entalpía de transición dada por la ecuación (35).

La capacidad calorífica máxima y la consecuente entalpía de transición principal son dependientes de las asociaciones intermoleculares de la composición de cada sistema. Es en el sistema constituido únicamente por DMPC donde se presenta una transición de primer orden que se caracteriza por una mayor demanda energética debido a las interacciones entre cadenas de acilo. La adición de componentes como OGP, colesterol

o ibuprofeno perturban a la membrana de tal forma que la demanda energética es menor para llevar a cabo la transición de fase.

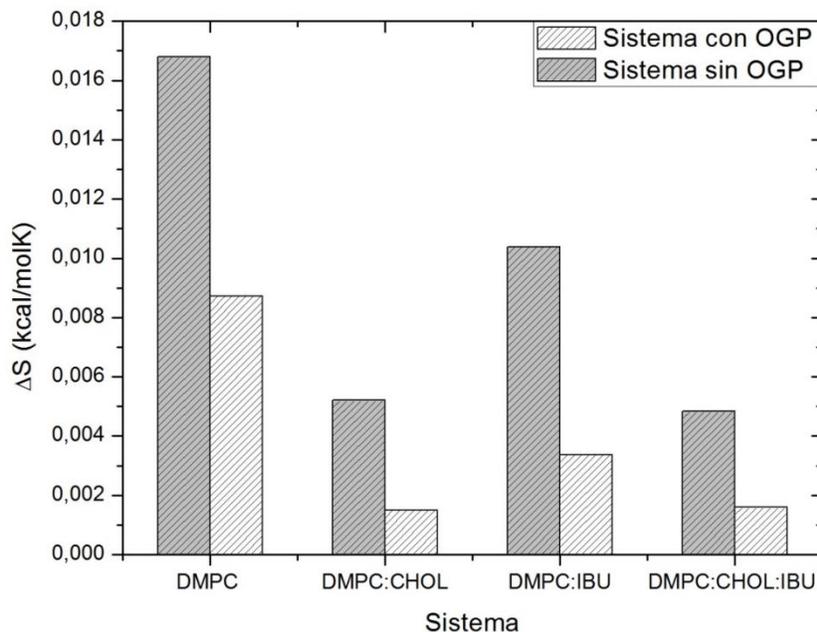


Figura 44. Variación de la entropía de transición principal en función de la composición de los sistemas liposomales.

Debido a la relación dada por la ecuación (36), el gráfico de variación de entropía presentado en la Figura 44 presenta la misma tendencia que el gráfico de variación de entalpía de transición, presentando así la transición del sistema constituido por DMPC como la más entrópica debido a su carácter de transición de primer orden y al efecto de la adición de componentes en una disminución de la entropía de transición, siendo el OGP y el colesterol, los principales componentes en abatir los valores de la entropía de transición de fase.

La cooperatividad de las transiciones de los ocho sistemas de estudio fue evaluada mediante el inverso de $T_{1/2}$ (mientras mayor es el valor de $1/T_{1/2}$ mayor es la cooperatividad

del evento) y mediante la determinación de unidades cooperativas C.U. La cooperatividad del evento es evaluada de forma gráfica de acuerdo con qué tan angosta es la curva del cromatograma de estudio a la mitad de la altura del pico, tal que, el sistema DMPC representa al proceso más cooperativo debido a su carácter de transición de primer orden. La adición de OGP en el sistema DMPC disminuye la cooperatividad del evento debido a la disminución de interacciones entre cadenas de acilo y grupos polares de las moléculas de DMPC.

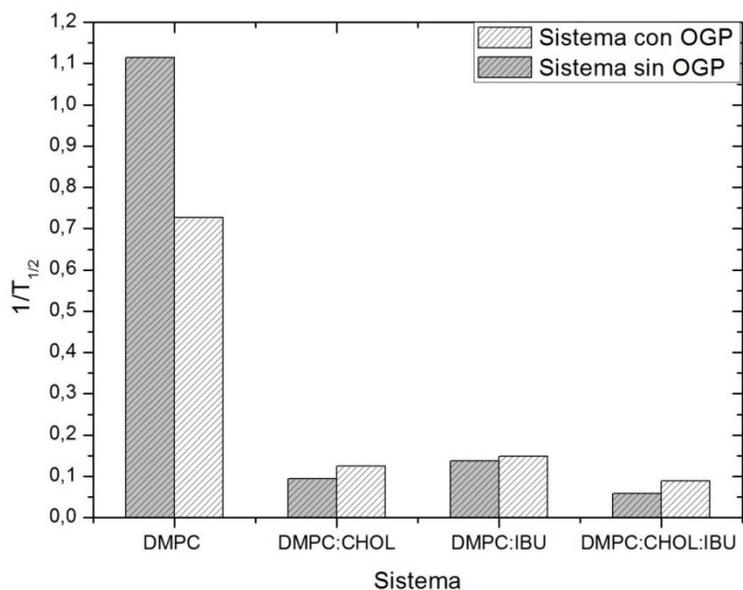


Figura 45. Variación de la cooperatividad de transición principal en función de la composición de los sistemas liposomales evaluada por el inverso de $T_{1/2}$.

En la Figura 45 y la Figura 46 se observa que la adición de tensoactivo OGP en los sistemas DMPC:CHOL, DMPC:IBU y DMPC:CHOL:IBU incrementa la cooperatividad del evento, debido a que las interacciones entre los grupos polares de las moléculas anfífilas favorecen el ordenamiento requerido para llevar el sistema a un estado de cristal líquido.

Existe una concordancia entre la cooperatividad de transición evaluada mediante el inverso de $T_{1/2}$ y la cooperatividad determinada mediante la entalpía de van't Hoff, sin embargo, la evaluación mediante unidades cooperativas C.U. presenta un decaimiento más pronunciado de la cooperatividad de los eventos al perturbar la membrana de DMPC con otros componentes. En esta evaluación, un valor igual o mayor a la unidad caracterizaría como transición de primer orden a la transición de fase gel a cristal líquido del sistema DMPC, sin embargo, el valor obtenido es menor a la unidad

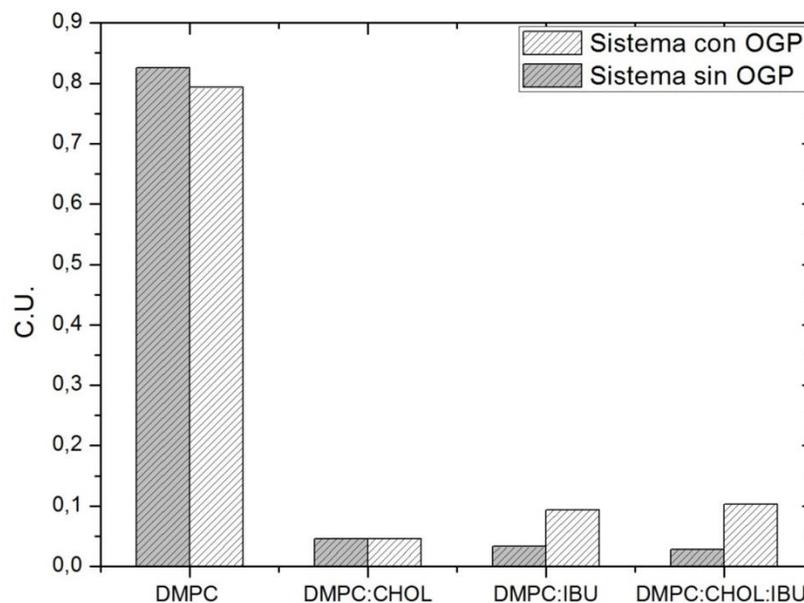


Figura 46. Variación de la cooperatividad de transición principal en función de la composición de los sistemas liposomales evaluada por cálculo de unidades cooperativas (C.U.).

5.3.0 Dispersión Dinámica de Luz y Microscopía Electrónica SEM y TEM

De forma simultánea a los estudios de calorimetría, se llevaron a cabo estudios que permitieron conocer la morfología y tamaño de las estructuras liposomales de este estudio, así como un monitoreo de su estabilidad coloidal por medio del análisis de tamaño de partícula e índice de polidispersión (PDI). Se presentan los resultados obtenidos mediante dispersión de luz dinámica (DLS), seguido de imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión y/o barrido.

5.3.1 Sistema DMPC y DMPC:OGP

Durante un periodo de diez días se analizaron muestras de los sistemas DMPC y DMPC:OGP mediante dispersión de luz dinámica. En la Tabla 14 se presentan los promedios de los resultados obtenidos para tres mediciones continuas de radio hidrodinámico (Rh) e índice de polidispersión (PDI).

Tabla 14. Radio hidrodinámico e índice de polidispersión de los sistemas DMPC Y DMPC:OGP

Tiempo (días)	DMPC		DMPC:OGP	
	RH (nm)	PDI	Rh (nm)	PDI
1	111 ± 5	0.099 ± 0.009	166 ± 7	0.159 ± 0.006
2	110 ± 4	0.078 ± 0.003	143 ± 8	0.199 ± 0.010
5	112 ± 8	0.116 ± 0.004	161 ± 12	0.287 ± 0.030
10	109 ± 8	0.118 ± 0.004	--	--

El sistema constituido únicamente por el fosfolípido DMPC presenta un comportamiento estable, sin la formación de coágulos o flóculos, sin embargo, la adición del tensoactivo OGP en este sistema incrementa el tamaño de partícula hasta llevar al sistema a una segregación de fases después del quinto día de mediciones. El PDI inicial del sistema DMPC:OGP es mayor con respecto al del sistema DMPC. Los valores de PDI del sistema DMPC:OGP incrementaron con respecto al tiempo.

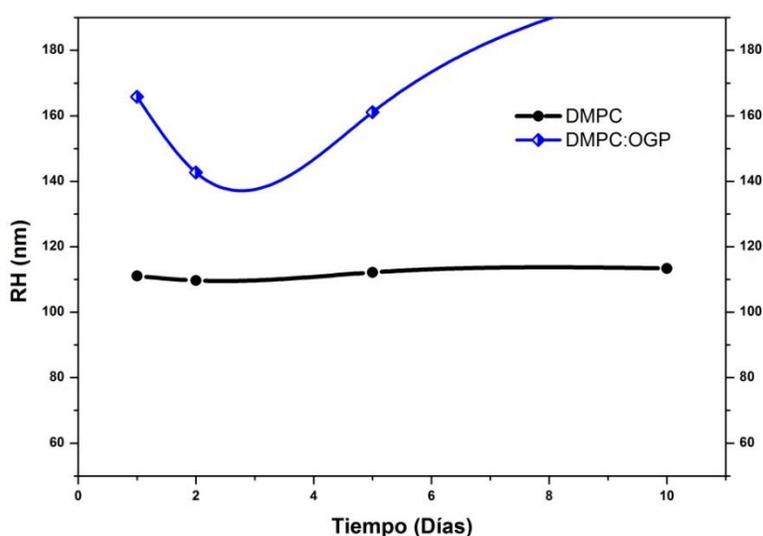


Figura 47. Radio hidrodinámico en función del tiempo. En negro sistema DMPC y en azul sistema DMPC:OGP.

A continuación, se presentan las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido y de transmisión. En la microscopía SEM del sistema DMPC (A) se observa que los liposomas de DMPC presentan una morfología esferoide y regular, por medio de microscopía TEM de este mismo sistema (B) se corroboró que los liposomas de DMPC poseen un tamaño que ronda los 100 nm, tal como se determinó en el estudio por DLS. Los liposomas de DMPC son unilamelares.

En la imagen presentada para el sistema DMPC:OGP por microscopía TEM se observan estructuras vesiculares más ovoides y alargadas con respecto a las estructuras esféricas del sistema DMPC. En la imagen presentada de microscopía TEM se observa una estructura liposomal multilamelar con un tamaño superior a los 200 nm.

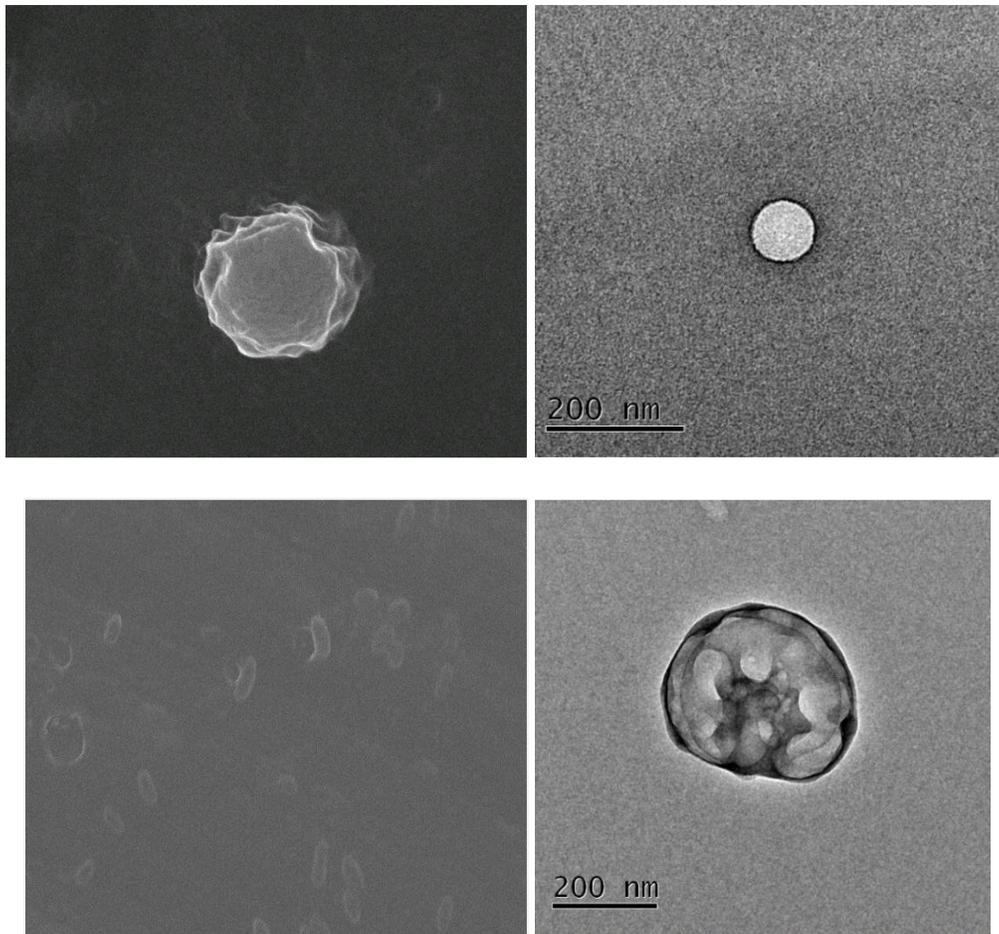


Figura 48. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica: (A) Sistema DMPC - microscopía electrónica de barrido SEM. (B) Sistema DMPC - microscopía electrónica de transmisión TEM. (C) Sistema DMPC:OGP - microscopía electrónica de barrido SEM. (D) Sistema DMPC:OGP - microscopía electrónica de transmisión TEM

Se sugiere que, de acuerdo con la literatura y con lo observado en los estudios calorimétricos de este trabajo, la adición de OGP al sistema liposomal de DMPC disminuye la interacción entre los fosfolípidos de la doble capa lipídica y favorece la solubilidad del liposoma debido a la orientación de las cabezas polares de los monómeros de tensoactivo OGP, haciendo así a esta doble capa más permeable y susceptible a la fusión con otras estructuras liposomales.

5.3.2 Sistema DMPC:CHOL y DMPC:CHOL:OGP

De acuerdo con los resultados obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y calorimetría de titulación isotérmica (ITC) se propuso que la presencia de colesterol en los liposomas de DMPC disminuye la permeabilidad de los liposomas debido a las interacciones fuertes que se presentan entre el colesterol y las cadenas de acilo de los fosfolípidos. La doble capa lipídica de los sistemas DMPC:CHOL y DMPC:CHOL:OGP es más rígida que la de los sistemas análogos DMPC y DMPC:OGP. En este sistema, de acuerdo con el bajo valor de la constante de reparto k obtenido por ITC, se dedujo que el tensoactivo OGP permea en menor proporción en los liposomas de DMPC:CHOL con respecto a los liposomas de DMPC.

Tabla 15. Radio hidrodinámico e índice de polidispersión de los sistemas

DMPC:CHOL y DMPC:CHOL:OGP

Tiempo (días)	DMPC:CHOL		DMPC:CHOL:OGP	
	Rh (nm)	PDI	Rh (nm)	PDI
1	125 ± 6	0.065 ± 0.003	139 ± 7	0.071 ± 0.003
2	128 ± 6	0.057 ± 0.003	139 ± 7	0.069 ± 0.003
5	132 ± 3	0.032 ± 0.002	132 ± 6	0.055 ± 0.002
10	128 ± 6	0.061 ± 0.003	134 ± 6	0.063 ± 0.003

Pese a que los radios hidrodinámicos de los sistemas DMPC:CHOL y DMPC:CHOL:OGP son más grandes que los de sus análogos DMPC y DMPC:OGP, estos permanecen constantes a lo largo de los diez días de estudio. Para ambos sistemas, los valores de PDI son bajos con respecto a los de los sistemas DMPC y DMPC:OGP, lo cual indica que en estos sistemas los tamaños de partícula son más uniformes y con ello, consecuentemente, el sistema es más estable. De acuerdo con estándares como ISO 22,412:2017, valores de PDI menores 0.1 pueden ser asociados a sistemas monodispersos, mientras que valores superiores son asociados a sistemas polidispersos. De acuerdo con esta información, se determina que los sistemas DMPC:CHOL y DMPC:CHOL:OGP pueden ser asociados a sistemas monodispersos de acuerdo a sus valores de PDI.

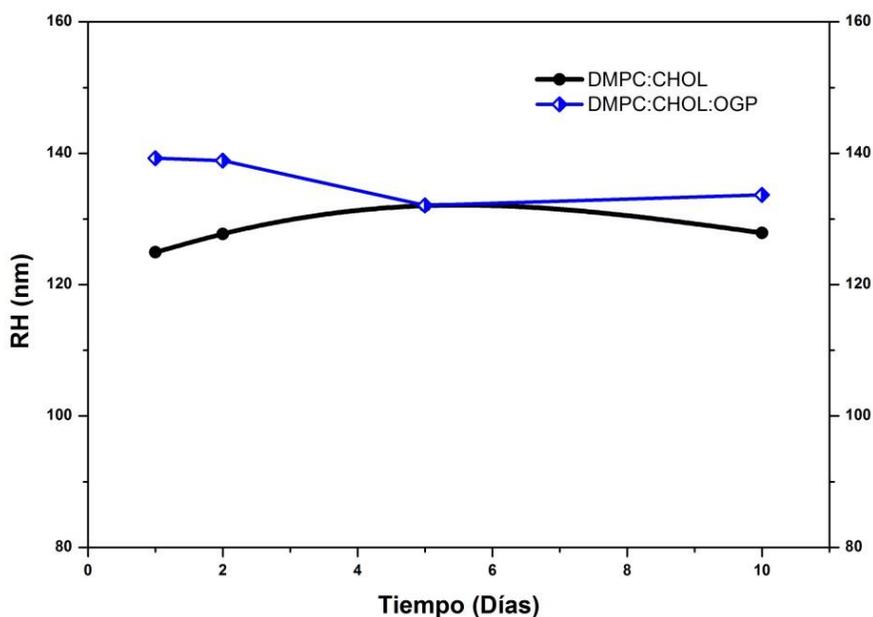


Figura 49. Radio hidrodinámico en función del tiempo. En negro sistema DMPC:CHOL y en azul sistema DMPC:CHOL:OGP.

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica revelan que para ambos casos, las estructuras liposomales tienden a una forma esférica, y de acuerdo con los resultados de microscopía TEM, estas estructuras liposomales son unilamelares y de un tamaño congruente con los resultados obtenidos por DLS.

De acuerdo con los resultados de tamaño y morfología analizados hasta este punto, y en relación con sus respectivos estudios calorimétricos, se infiere que incrementar la rigidez de la membrana de los liposomas mediante la adición de colesterol favorece su estabilidad coloidal debido a que disminuye la probabilidad de que las estructuras liposomales se fusionen. En consecuencia, el sistema es estable por más tiempo y permanece con índices de polidispersión bajos

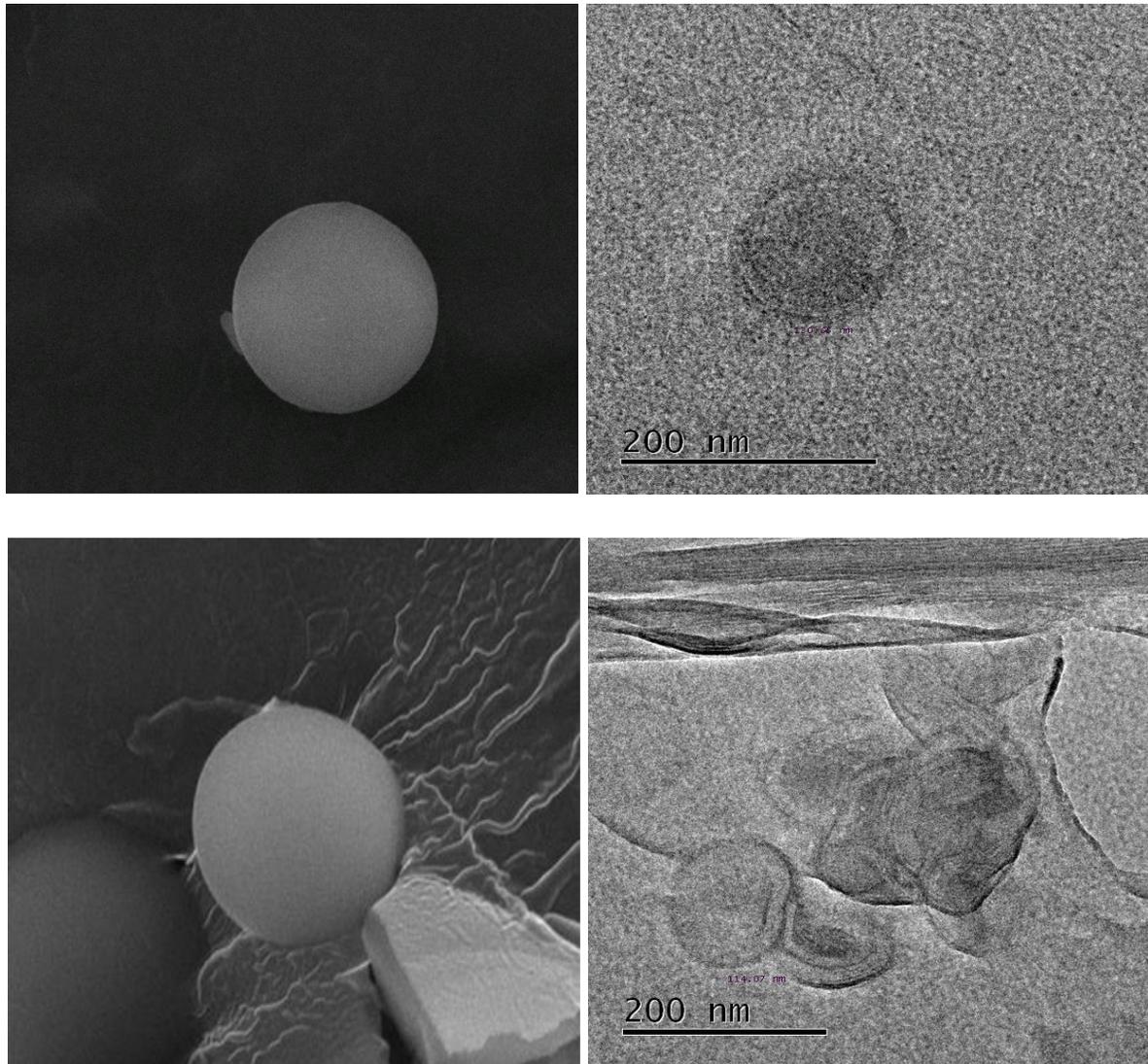


Figura 50. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica: (A) Sistema DMPC:CHOL - microscopía electrónica de barrido SEM. (B) Sistema DMPC:CHOL - microscopía electrónica de transmisión TEM. (C) Sistema DMPC:CHOL:OGP - microscopía electrónica de barrido SEM. (D) Sistema DMPC:CHOL:OGP - microscopía electrónica de transmisión TEM.

5.3.3 Sistema DMPC:IBU y DMPC:IBU:OGP

De acuerdo con los resultados obtenidos por ITC y DSC para los sistemas DMPC:IBU y DMPC:IBU:OGP, se propuso que la presencia de Ibuprofeno en los liposomas de DMPC favorece la permeabilidad de los liposomas debido a que la inserción de ibuprofeno desfavorece las interacciones fuertes de las cadenas de acilo. Se infirió mediante estos análisis que la presencia de Ibuprofeno favorece la permeabilidad de la doble capa lipídica de los liposomas.

Tabla 16. Radio hidrodinámico e índice de polidispersión de los sistemas DMPC:IBU y DMPC:IBU:OGP

Tiempo (días)	DMPC:IBU		DMPC:IBU:OGP	
	Rh (nm)	PDI	Rh (nm)	PDI
1	117 ± 5	0.142 ± 0.013	119 ± 4	0.100 ± 0.007
2	117 ± 8	0.165 ± 0.016	119 ± 4	0.123 ± 0.009
5	119 ± 12	0.277 ± 0.025	120 ± 6	0.138 ± 0.010
10	--	--	125 ± 9	0.162 ± 0.021

En los resultados de la Tabla 16 y de la Figura 51 se observa que el sistema DMPC:IBU permanece con un radio hidrodinámico constante y cercano a los 100 nm, sin embargo, inicia y permanece con valores de PDI altos, que pueden asociarse a una distribución variable de tamaños en el sistema liposomal. Para el día diez, el sistema se ha separado por completo, por lo que no fue posible determinar el tamaño de partícula y PDI de la muestra.

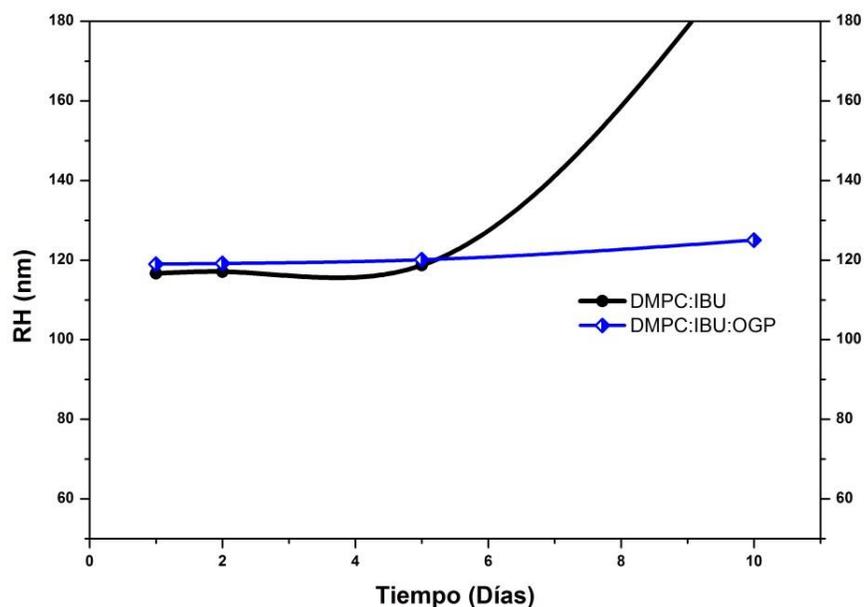


Figura 51. Radio hidrodinámico en función del tiempo. En negro sistema DMPC:IBU y en azul sistema DMPC:IBU:OGP.

Por otra parte, los liposomas del sistema DMPC:IBU:OGP permanecen con un radio hidrodinámico constante a lo largo del estudio y el sistema permanece estable durante los diez días. En el sistema DMPC:IBU:OGP se presentan valores de PDI menores con respecto al sistema DMPC:IBU. Los valores de PDI incrementan con respecto al tiempo y se infiere que este incremento en el valor de PDI pudiera conducir a una segregación de fases, sin embargo, es importante destacar que la adición de OGP en el sistema DMPC:IBU contribuye favorablemente a la estabilidad del sistema.

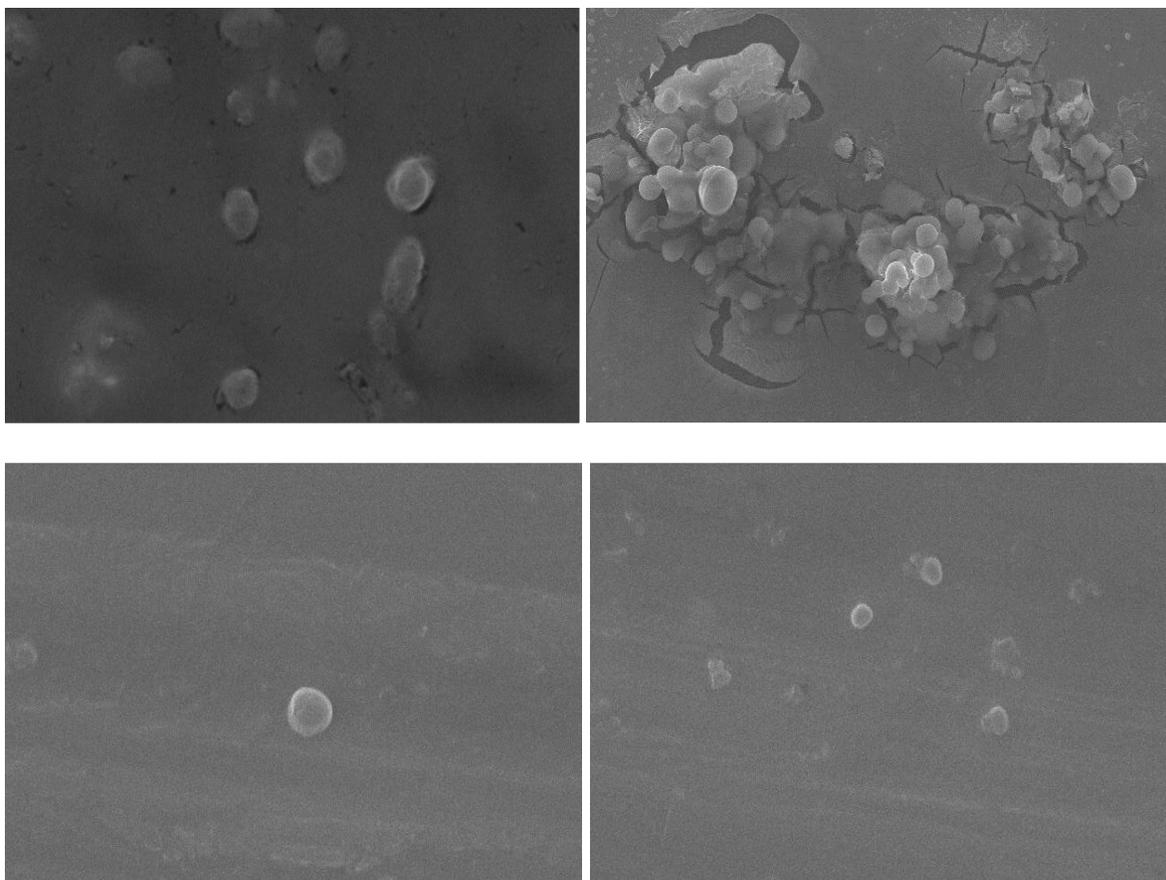


Figura 52. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido SEM:

(A) y (B) Sistema DMPC:IBU. (C) y (D) Sistema DMPC:IBU:OGP.

En la Figura 52 de las imágenes obtenidas por microscopía SEM para el sistema DMPC:IBU, se observa que las estructuras liposomales son ovoides y de tamaños variables, también se observa la tendencia a la agregación o fusión de liposomas. Por otra parte, en el sistema DMPC:IBU:OGP, las imágenes obtenidas presentan estructuras liposomales esferoides y una menor tendencia a la agregación con respecto al sistema DMPC:IBU.

5.3.4 Sistema DMPC:IBU:CHOL y DMPC:IBU:CHOL:OGP

Los resultados obtenidos por ITC, DSC, DLS y microscopía electrónica para los sistemas liposomales de este estudio, hasta este punto del análisis, han indicado que la adición de colesterol a liposomas de DMPC incrementa la rigidez de la doble capa lipídica y favorece a la estabilidad del sistema por su impacto en la uniformidad de tamaños de partícula. La adición de Ibuprofeno genera sistemas polidispersos y su adición tiene un impacto desfavorable en la estabilidad de los liposomas de DMPC. La adición de tensoactivo OGP en sistemas liposomales favorece la permeabilidad de la doble capa lipídica y tiene un impacto positivo sobre la estabilidad de sistemas liposomales cargados con Ibuprofeno.

Los resultados de radio hidrodinámico y PDI para el sistema DMPC:CHOL:IBU presentan una tendencia de incremento de tamaño con respecto al tiempo, sin embargo, el sistema no segregó en dos fases como en el caso del sistema DMPC:IBU. A pesar del incremento en radio hidrodinámico los índices de polidispersión no ascendieron de forma considerable. Se observa nuevamente que la adición de Ibuprofeno a liposomas de DMPC desfavorece su estabilidad, sin embargo, la adición de colesterol contribuye a la estabilidad del sistema.

Tabla 17. Radio hidrodinámico e índice de polidispersión de los sistemas DMPC:CHOL:IBU y DMPC:CHOL:IBU:OGP

Tiempo (días)	DMPC:CHOL:IBU		DMPC:CHOL:IBU:OGP	
	RH (nm)	PDI	RH (nm)	PDI
1	95 ± 4	0.128 ± 0.012	116 ± 3	0.086 ± 0.004
2	97 ± 4	0.123 ± 0.009	115 ± 4	0.099 ± 0.006
5	102 ± 7	0.146 ± 0.018	118 ± 6	0.118 ± 0.018
10	146 ± 5	0.145 ± 0.020	122 ± 4	0.122 ± 0.022

De forma análoga a lo observado en el sistema DMPC:IBU:OGP, en el sistema DMPC:CHOL:IBU:OGP el tamaño de partícula permanece sin variaciones considerables a lo largo del tiempo. Los valores de PDI, para este sistema cargado con colesterol e ibuprofeno disminuyen al adicionar tensoactivo OGP. Se observa una tendencia al incremento de los valores de PDI con respecto al tiempo.

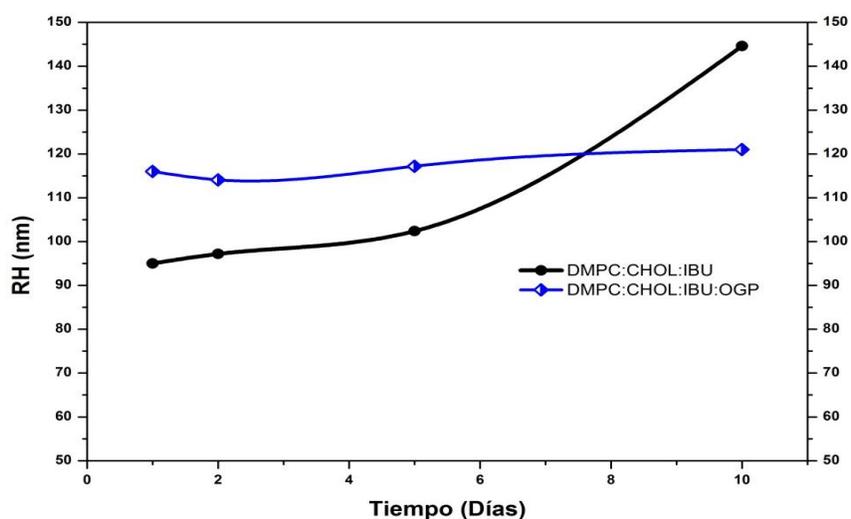


Figura 53. Radio hidrodinámico en función del tiempo. En negro sistema DMPC:CHOL:IBU y en azul sistema DMPC:CHOL:IBU:OGP.

Las imágenes obtenidas mediante microscopía SEM para el sistema DMPC:CHOL:IBU presentan estructuras liposomales amorfas y ovoides. La imagen (A) presenta un conjunto agregado de liposomas. Por otra parte, las imágenes de microscopía SEM del sistema DMPC:CHOL:IBU:OGP presentan un conjunto de liposomas con mayor tendencia a la esfericidad y con menor tendencia a la agregación con respecto al sistema sin OGP.

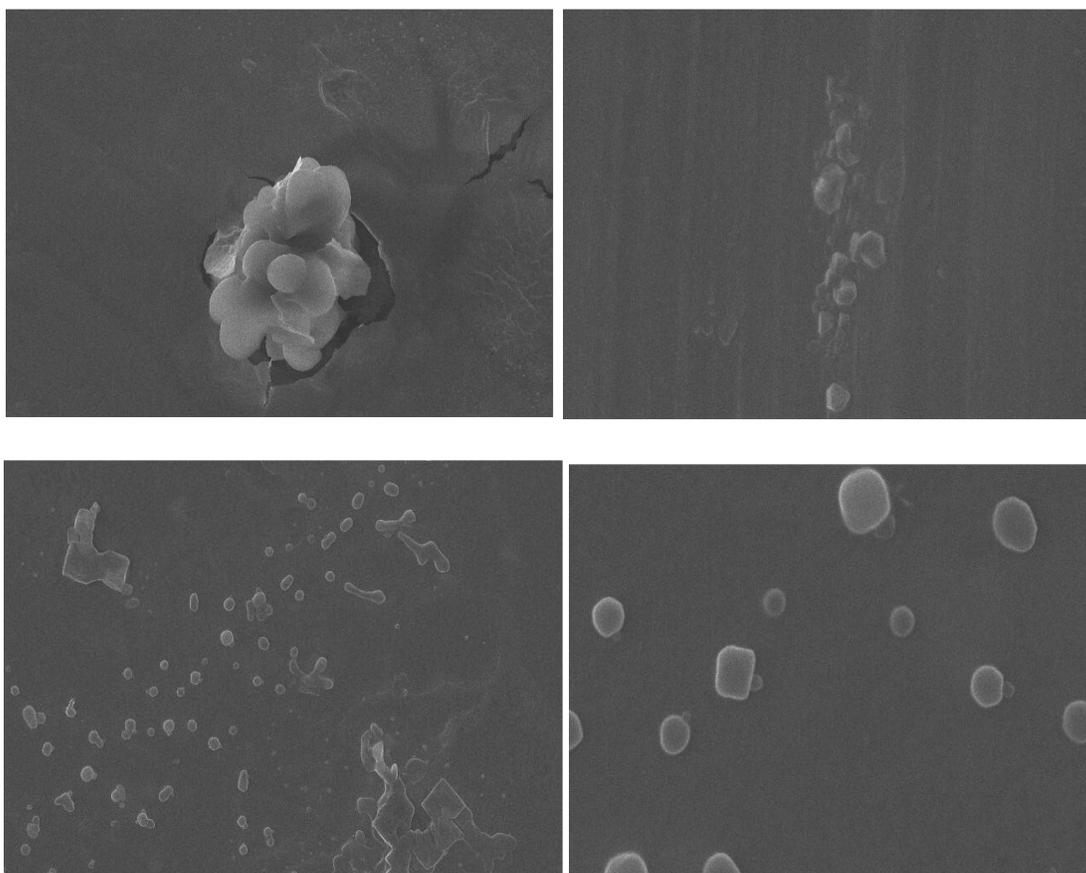


Figura 54. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido SEM: (A) y (B) Sistema DMPC:IBU. (C) y (D) Sistema DMPC:IBU:OGP.

Capítulo 7.

Conclusiones y perspectivas

7.1 Conclusiones

De acuerdo con el análisis de los resultados obtenidos por ITC, DSC, DLS y microscopía electrónica para los sistemas liposomales de DMPC y su interacción con el tensoactivo OGP, colesterol e ibuprofeno se concluye que:

- En todos los sistemas de estudio presentados en este trabajo (DMPC, DMPC:CHOL, DMPC:IBU y DMPC:CHOL:IBU) se presentó el fenómeno de reparto de tensoactivo OGP en las estructuras liposomales y los parámetros termodinámicos de esta interacción pudieron ser estudiados mediante un ajuste satisfactorio del modelo de Wenk [42]. Sobre los resultados obtenidos en ITC. Se determinó que los cuatro sistemas estudiados se caracterizan como vesículas mixtas según la primera etapa del modelo de Lichtenberg [39].
- De acuerdo con los resultados obtenidos por ITC, se observó que la adición de colesterol disminuye la inserción de tensoactivo en los liposomas de DMPC, mientras que la adición de Ibuprofeno favorece la inserción de tensoactivo en los liposomas de DMPC.
- Para todos los sistemas de estudio, y de acuerdo con los resultados obtenidos por DSC, se observó que la inclusión de tensoactivo en liposomas reduce su temperatura de transición, modifica la traza calorimétrica, reduce la entalpía de

transición de fase gel a fase cristal líquido y reduce la cooperatividad de la transición principal.

- La adición de colesterol y/o ibuprofeno a liposomas de DMPC no es uniforme y se sugiere la presencia de dominios de colesterol y/o ibuprofeno. La inclusión de colesterol y/o Ibuprofeno disminuyen la entalpía de transición, la entropía de transición y la cooperatividad de la transición.
- La inclusión de componentes a una bicapa lipídica afecta su esfericidad y radio hidrodinámico, así como la estabilidad de la suspensión liposomal. La adición de colesterol favorece la formación de sistemas monodispersos, mientras que la adición de ibuprofeno genera sistemas con tendencia a tornarse polidispersos.
- El tensoactivo octil-glucopiranosido incrementa la permeabilidad de la doble capa lipídica de los liposomas de DMPC y permite mejorar la estabilidad de liposomas cargados con Ibuprofeno. La adición del tensoactivo OGP sobre sistemas liposomales cargados con Ibuprofeno permite mejorar la estabilidad coloidal y provee parámetros favorables para el diseño de liposomas termosensibles.
- Los experimentos y resultados reportados pueden ser considerados como una referencia del comportamiento de liposomas de DMPC ante otros excipientes o principios activos para el desarrollo de medicamentos, suplementos alimenticios o productos cosméticos en los que sea empleada la tecnología liposomal.

7.2 Perspectivas

En este estudio se presentó el impacto de la adición de componentes sobre las propiedades termotrópicas, funcionales y coloidales de sistemas liposomales de DMPC empleando a la molécula de ibuprofeno como modelo de fármaco hidrófobo. El desarrollo de formulaciones liposomales de DMPC que consideren la nanoencapsulación de principios activos hidrófobos de bajo peso molecular puede confirmar o descartar la posibilidad del uso de ibuprofeno como referencia de fármaco hidrófobo.

Las hipótesis sobre interacciones intermoleculares que se propusieron en este estudio para justificar los atributos termodinámicos y de estabilidad coloidal pudieran ser estudiadas y validadas con técnicas de simulación molecular. De igual forma, el estudio de la uniformidad de la encapsulación del modelo de fármaco y su liberación, son tópicos que pueden ser estudiados mediante el desarrollo y validación de técnicas analíticas para este propósito.

REFERENCIAS

[1] Kulkarni, V. and Shaw, C. (2016) “Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages” Academic Press, 21-28

[2] Villafuerte-Robles, L. (2009). Nanotecnología Farmacéutica. *Razón y Palabra* ISN 1605 4806, 2-18. Recuperado de <http://www.razonypalabra.org.mx/N/n68/9Villafuerte.pdf>

[3] Akbarzadeh, A. et al. (2013) “Liposome: Classification, preparation and applications” *Nanoscale Research Letters*, 2-12.

[4] Torchilin, V.P. and Weissing, V. E. (2003) “Liposomes” Oxford University Press, Oxford, U.K.

[5] Fan, Y. and Zhang Q. (2013) “Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations” *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 8, 81-87

[6] Allen ,T. andCullis, P.(2013) “Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications” *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 36–48

[7] Jensen, G. M., & Hodgson, D. F. (2020). Opportunities and challenges in commercial pharmaceutical liposome applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*.

[8] Li, M., Du, C., Guo, N., Teng, Y., Meng, X., Sun, H. Galons, H. (2019). Composition design and medical application of liposomes. *European Journal of Medicinal Chemistry*.

- [9] Ishii, F., & Nii, T. (2014). Lipid emulsions and lipid vesicles prepared from various phospholipids as drug carriers. *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development*, 469-501.
- [10] Fisher, A. B. (2015). Lung Lipid Composition and Surfactant Biology. *Comparative Biology of the Normal Lung*, 423-430.
- [11] Wade, L. G., Pedrero, Á. M. M., & García, C. B. (2004). *Química orgánica* (5ta Edición). Madrid, España: Pearson Educación.
- [12] Morrison, R. T., & Boyd, R. N. (1998). *Química orgánica* (5ta Edición). México: Pearson Educación.
- [13] Adam-Day, Sam. (2018). *Structure of a phospholipid*. Recuperado de <https://alevelnotes.com/notes/biology/biological-molecules>
- [14] McElanhey, R. (1982) "The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes". *Chemistry and Physics of Lipids*, 229-259
- [15] Benesch, M. G. and McElhaney, R. (2016) "A comparative differential scanning calorimetry study of the effects of cholesterol and various oxysterols on the thermotropic phase behavior of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes" *Chemistry and Physics of Lipids*, 195, 21–33
- [16] Kulkarni, V. S., & Shaw, C. (2016). *Surfactants, Lipids, and Surface Chemistry. Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages*, (1ra Edición), 5-19.

- [17] Nakama, Y. (2017). Surfactants. *Cosmetic Science and Technology*, (1ra Edición), 231-244.
- [18] Eastoe, J., & Tabor, R. F. (2014). Surfactants and Nanoscience. *Colloidal Foundations of Nanoscience*, 135-157.
- [19] Hoffmann, B. and Platz, G. (2001) "Phase and aggregation behavior of alkylglycosides". *Curr.Opin. Colloid interfaced Sci.*, 6:171-177
- [20] Strubenrauch, C. (2001) "Sugar sufractans aggregation, interfacial and adsorption phenomena". *Curr.Opin. Colloid interfaced Sci.*, 6, 160-1174.
- [21] Vemuri,S and Rhodes, C.T. "Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review." *Pharmaceutics ActaHelvetiae* 70, 95-11 (1995)
- [22] Carbone, C., Musumeci, T., & Pignatello, R. (2013). Non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Drug-Biomembrane Interaction Studies*, 281-303.
- [23] Reuvers, M., & Schaefer, C. (2007). Analgesics and anti-inflammatory drugs. *Drugs During Pregnancy and Lactation*, 28-56.
- [24] Lygre, H; Moe, G. and Holmsen, H. (2003) "Interaction of ibuprofen with eukaryotic membrane lipids".*Actaodontolscand*, 61, 303-309.
- [25] Khajeh, A. and Modarress, H. (2014) "The influence of cholesterol on interactions and dynamics of ibuprofen in a lipid bilayer". *BiochimicaetBiophysicaActa*, 1838, 2431–2438.
- [26] Tadros, T. F. (2009). *Emulsion Science and Technology*. Wiley-Vch 4-55.

- [27] Ravera, F., Dziza, K., Santini, E., Cristofolini, L., & Liggieri, L. (2021). Emulsification and emulsion stability: The role of the interfacial properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, 288, 102344. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102344>
- [28] Maron, S. H., & Prutton, C. F. (1984). *Fundamentos de fisicoquímica*. México, México: Limusa.
- [29] Lasic, D. (1998b). Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, 16(7), 307-321.
- [30] Felipe-Anastasio. A. (2017) Estudio fisicoquímico de la nanoencapsulación de ibuprofeno en vesículas mixtas de Diestearoil fosfatidilcolina y Octil beta-D-Glucopiranósido. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
- [31] Vladimir, P. T. and Volmar, W. (2003)“Liposomes a practical approach” Oxford university press, 2nd edition, 20-98
- [32] Wagner, A., & Vorauer-Uhl, K. (2011). Liposome Technology for Industrial Purposes. *Journal of Drug Delivery*, 1-9.
- [33] Rajendar, M., & Saraswathi, B. (2014). *World Journal of Pharmaceutical Research*. Preparation and optimization of diclofenac encapsulated liposomes using lipid hydration technique, 755-768.
- [34] Lapinski, M. M., Castro-Forero, A., Greiner, A. J., Ofoli, R. Y., & Blanchard, G. J. (2007). Comparison of Liposomes Formed by Sonication and Extrusion: Rotational and Translational Diffusion of an Embedded Chromophore. *Langmuir*, 23, 11677-11683.

- [35] Butt H., Graf K. (2003). *Physics and Chemistry of Interfaces*. (s/n). Alemania: Wiley-VCH. 1- 7, 26-37.
- [36] García Colín-Scherer, (2012). *Introducción A La Termodinámica Clásica* (4.a ed.). Trillas.
- [37] Florence A.T., Atwood D. (2006). *Physicochemical Principles of Pharmacy*. (4a ed.). Reino Unido: Pharmaceutical Press. pp 177-185, 202-254
- [38] Seelig, J. (1997). Titration calorimetry of lipid-peptide interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1331(1), 103-116.
- [39] Lichtenberg, D. (1985) "Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants". *Biochim. Biophys. Acta*, 821, 470-478
- [40] Nsairat, H., Khater, D., Sayed, U., Odeh, F., Al Bawab, A. & Alshaer, W. (2022). Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*, 8(5)
- [41] Martínez-Galicia C. J. (2016) Caracterización fisicoquímica de la nanoencapsulación de ibuprofeno en vesículas mixtas de liposomas de 1-alfa-dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPE) y n-nonil-beta-D-glucopiranosido (OGP). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
- [42] Wenk, M. R. and Seelig, J. "Vesicle-micelle transformation of phosphatidylcholine/octyl-beta-D-glycopyranoside mixtures as detected with titration calorimetry". *J Phys. Chem. B*, 101, 5224-5231 (1997)

- [43] Heerklotz, H. and Seelig, J. (2000) "Titration calorimetry of surfactant/membrane partitioning and membrane solubilization" *Biochimica et Biophysica Acta* 1508, 69-85
- [44] Raudino, A., Sarpietro, M. G., & Pannuzzo, M. (2013). Differential scanning calorimetry (DSC): theoretical fundamentals. *Drug-Biomembrane Interaction Studies*, 127-168.
- [45] Yang, Z., & Brouillette, C. G. (2016). A Guide to Differential Scanning Calorimetry of Membrane and Soluble Proteins in Detergents. *Methods in Enzymology*, 319-358. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.08.014>
- [46] A., E., & K., P. (2013). Differential Scanning Calorimetry Studies of Phospholipid Membranes: The Interdigitated Gel Phase. *Applications of Calorimetry in a Wide Context - Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry*, 407-433.
- [47] Biltonen, R. L., & Lichtenberg, D. (1993). The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. *Chemistry and Physics of Lipids*, 64(1-3), 129-142.
- [48] Demarest, S. J., & Frasca, V. (2020). Differential scanning calorimetry in the biopharmaceutical sciences. *Biophysical Characterization of Proteins in Developing Biopharmaceuticals*, 311-332.
- [49] Benesch, M. G. and McElhaney, R. (2016) "A comparative differential scanning calorimetry study of the effects of cholesterol and various oxysterols on the

thermotropic phase behavior of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes”*Chemistry and Physics of Lipids*, 195, 21–33

[50] Benesch, M. G. and McElhaney, R. (2016) “A comparative differential scanning calorimetry study of the effects of cholesterol and various oxysterols on the thermotropic phase behavior of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes”*Chemistry and Physics of Lipids*, 195, 21–33

[51] Drolle, E; Kučerka, C; Hoopes, M.I; Choi, Y; Katsaras, J; Karttunen, Mand Leonenko, Z. (2013) “Effect of melatonin and cholesterol on the structure of DOPC and DPPC membranes”. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828, 2247–2254

[52] Heerklotz, H; Tsamaloukas, A and Keller, S. (2009) “Monitoring detergent-mediated solubilization and reconstitution of lipid membranes by isothermal titration calorimetry”. *Nature protocols*, 686, 282-294

[53] Guidice, F. (2016) Facultad de Ciencias Químicas, Córdoba Argentina. Caracterización estructural de liposomas y su interacción con moléculas anfifílicas de interés farmacológico.

[54] Glatter, O. (2018). *Dynamic Light Scattering (DLS). Scattering Methods and their Application in Colloid and Interface Science*, 223-263.

[55] Majhi, P. and Blume, A. (2002) “Temperature-Induced Micelle-Vesicle Transitions in DMPC-SDS and DMPC-DTAB mixtures Studied by Calorimetry and Dynamic Light Scattering” *J. Phys. Chem. B*, 106, 10753-10763

[56] Inkson, B. J. (2016). Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*, 17-43.

[57] Crawford, B. and Burke, R. (2004) “ TEM and SEM Methods” *Methods in Cell Biology*. 74, 411-441

[58] Hobai, S. (2001). An approximate cooperativity analysis by DSC of phase transitions of DPPC-DOCNa dispersions. *arXiv preprint physics/0101022*. Cornell University.

[59] Maswadeh, Hamzah. (2004). The modulation of thermal properties of vinblastine by cholesterol in membrane bilayers, *Biochimica and Biophysica Acta - - Biomembranes*. 1661, 1-8.

[60] Anderson, T. G., & McConnell, H. M. (2001). Condensed Complexes and the Calorimetry of Cholesterol-Phospholipid Bilayers. *Biophysical Journal*, 81, 2774–2785.