



División de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física
Tesis de Licenciatura:

**Formación y Caracterización de Etosomas Zwitteriónicos para la Encapsulación
de Biomoléculas y su Evaluación Citotóxica**

Presentada por:
Jesús Alejandro Campa Rivera

Para obtener el grado de Licenciado en Física por la
Universidad de Sonora

Director de Tesis:
Dra. Ericka Rodríguez León

Enero de 2018

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Dedicatoria

Quiero dedicar esta tesis a mis padres María y Dolores, porque me han dado los motivos para terminar esta etapa de mi vida, por sus consejos, su apoyo incondicional y su paciencia, todo lo que soy se los debo a ellos.

A mis hermanos por su apoyo incondicional ya que son uno de los grandes pilares en mi vida.

A toda mi familia por su apoyo y amor, por apoyarme en esta trayectoria de preparación.

A mis amigos y amigas por todo lo que han hecho por mí, por encontrarse en los buenos y malos momentos.

Índice

Lista de figuras.....	iv
Lista de tablas.....	vii
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Objetivos Generales.....	5
Objetivos específicos.....	5
Capítulo 1 Antecedentes.....	6
1.1 Fosfolípidos iónicos: catiónicos, aniónicos y zwitteriónicos.....	6
1.2 Etosomas y Liposomas Definición.....	8
1.3 Métodos de preparación de etosomas.....	11
1.4 Liofilización.....	11
1.4.1 Primer secado.....	13
1.4.2 Segundo secado.....	13
Capítulo 2 Métodos Experimentales.....	14
2.1 Proceso de liofilización.....	14
2.2 Preparación de etosomas.....	15
2.2.1 Método de hidratación de película.....	16
2.2.2 Método de inyección rápida en etanol.....	17
2.2.3 Método caliente.....	17
2.2.4 Método frío.....	18
2.3 Potencial Zeta.....	19
2.3.1 Potencial Zeta.....	19
2.3.2 Dispersión dinámica de luz (DLS).....	22
2.4 UV-Vis.....	25
2.5 Conductividad.....	28

2.6	Métodos de separación de tamaños: Ultra centrifugación, Microfiltración...	28
2.6.1	Ultracentrifugación.....	28
2.6.2	Microfiltración.....	30
2.7	Microscopía Confocal de fluorescencia.....	31
2.7.1	La fluorescencia.....	32
2.8	Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y tinción negativa.....	34
2.8.1	Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	34
2.8.2	Tinción negativa.....	35
2.9	Citotoxicidad.....	36
2.10	Métodos estadísticos de análisis de resultados: ANOVA, tukey.....	40
Capítulo 3 Resultados y Discusión.....		42
3.1	Preparación de etosomas.....	42
3.2	Rh encapsulados en etosomas.....	45
3.3	Caracterización: Microscopía Confocal, Potencial zeta, Dispersión de tamaños.....	45
3.3.1	Conductividad.....	45
3.3.2	UV-Vis de etosomas y etosomas + Rh.....	46
3.3.3	Distribución de tamaños.....	47
3.3.4	Distribución de tamaños mediante DLS.....	49
3.3.5	Potencial Zeta.....	50
3.3.6	Microscopía Confocal.....	52
3.4	Caracterización de la separación de tamaños por ultracentrifugación: mediante UV-Vis, Microscopía Confocal, Potencial zeta, Dispersión de tamaños.....	54
3.4.1	Conductividad.....	55
3.4.2	UV-Vis de etosomas ultracentrifugados.....	55
3.4.3	Distribución de tamaños por DLS.....	56
3.4.4	Potencial Zeta.....	56
3.4.5	Microscopía confocal.....	57

3.5 Caracterización de la separación de tamaños por microfiltración: mediante UV-Vis, Microscopía Confocal, Potencial zeta, Dispersión de tamaños.....	59
3.5.1 Conductividad.....	59
3.5.2 UV-Vis de etosomas microfiltrados.....	60
3.5.3 Distribución de Tamaños por DLS.....	61
3.5.4 Potencial Zeta microfiltración.....	61
3.5.5 Microscopía Confocal.....	62
3.6 Tinción Negativa de Etosomas con Biomoléculas de Extracto de <i>Rh</i> encapsuladas	64
3.7 Citotoxicidad	66
Capítulo 4 Conclusiones.....	70
Perspectivas de este trabajo.....	71
Referencias.....	72

Lista de Figuras

Figura	Contenido	Página
1.1.1.	Estructura de los fosfolípidos.	6
1.1.2.	Cabezas de fosfolípidos.	7
1.1.3	DOPC y NBD-PE	8
1.2.1.	Estructura de liposomas.	9
1.2.2.	Tipos de liposomas	10
1.2.3.	Diferencia entre liposomas y etosomas	11
1.4.1.	Etapas del proceso de liofilización	12
1.4.2.	Tipos de secado.	13
2.2.1.	Método de hidratación de película.	16
2.2.2.	Preparación de etosomas método caliente.	18
2.2.3.	Preparación de etosomas método frío.	19
2.3.1.	Camino óptico de ZetaSizer Nano	20
2.3.2.	Celda para medición del potencial Z.	21
2.3.3.	Arreglo experimental para medición del potencial Z.	22
2.3.4	Esquema básico de dispersión de luz	23
2.3.5	Intensidades para partículas y correlacion	24
2.4.1.	Esquema de un espectrómetro de UV-Vis de doble haz.	26
2.4.2.	Ejemplo de celdas de cuarzo de 10 mm.	28
2.4.3.	Ejemplo de grafica UV-Vis.	28

2.6.1.	Velocidades y tiempos para distintos tipos de partículas.	29
2.6.2.	modelo utilizado en la tesis OPTIMA™ MAX-XP.	30
2.6.3.	Rotor rígido.	30
2.6.4.	Tubo de Microfiltración	31
2.7.1.	Esquema del principio microscopia confocal	32
2.7.2.	Ejemplo de microscopia de fluorescencia	33
2.7.3.	Espectro de excitación y emisión de un fluorocromo	34
2.7.4.	Diagrama de Jablonski	34
2.8.1	Diagrama básico de MEB	36
2.9.1.	Muestra de sangre y separación de plaqueta	37
2.9.2.	Azul de Tripano	38
2.9.3.	Ejemplo de cámara de Neubauer	39
2.9.4.	Cámara de Neubauer.	39
3.1.1.	Fosfolípido Zwitteriónico (DOPC)	42
3.1.2.	Preparación de Etosomas	43
3.1.3.	Rotavapor utilizado en la tesis	43
3.3.1.	UV-Vis etosomas, Rh y etosomas con Rh	46
3.3.2.	Distribución de tamaños	47
3.3.3	Interaccion de etanol en la membrana lipídica	49
3.3.4.	Distribución de tamaños para etosomas	49
3.3.5.	Distribución de tamaños para etosomas con Rumex	50
3.3.6.	Distribución del potencial Zeta sin extracto encapsulado	50

3.3.7.	Distribución de potencial Zeta con extracto encapsulado	51
3.3.8.	Etosomas sin Rh	52
3.3.9.	Etosomas con Rh	52
3.3.10.	Etosomas marcados.	53
3.3.11.	Etosomas ultra centrifugados.	54
3.4.1.	UV-Vis de etosomas ultra centrifugados.	55
3.4.2.	Distribución de tamaños Ultra centrifugación.	56
3.4.3.	Potencial Zeta etosomas con Rh ultra centrifugados.	57
3.4.4	Microscopia confocal etosomas ultra centrifugados	59
3.5.1	UV-Vis de etosomas microfiltración.	60
3.5.2	Distribución de tamaños microfiltración.	61
3.5.3	Potencial Zeta etosomas con Rh.	62
3.5.4	Etosomas microfiltrados vistos a 100x	64
3.6.1.	Tinción negativa de etosomas	66
3.7.1	Porcentaje de proliferación.	67
3.7.2.	Curva concentración letal 50.	68
3.8.1	Pruebas de citotoxicidad Microscopía Confocal	69

Lista de Tablas

Tabla	Contenido	Pagina
3.3.1.	Conductividad de los etosomas.	46
3.3.2.	Tamaños por Image J	48

Agradecimientos

Al Laboratorio de Biomateriales del Departamento de Física por las facilidades para el análisis de las muestras por Microscopía Confocal de Barrido, por la facilidades para la preparación de muestras, la utilización del UV-Vis.

Al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido por las facilidades para el uso del Microscopio Electrónico.

Dra. Maricela Ramírez Saldaña, por su apoyo en la evaluación citotóxica.

Al Proyecto SAGARPA con número 17-PFA-IIDTTT-001448-L000-DF.

Resumen

Los etosomas son liposomas (vesículas sintéticas formadas por fosfolípidos) que contienen moléculas de etanol como cosurfactante el cual se inserta en la bicapa en la región cercana a las cabezas polares del fosfolípido lo cual confiere menor rigidez a éstas vesículas permitiendo por ejemplo su difusión trans-epidermal de forma más eficiente convirtiéndolos en excelentes vehículos acarreadores de fármacos. En el presente trabajo de tesis se describe el proceso de síntesis y caracterización de etosomas formados por el fosfolípido zwitteriónico 1,2-Dioleil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC) en presencia del solvente etanol-agua 15:85 v/v. Dichos etosomas se emplearon para encapsular extracto de raíz de *Rumex hymenosepalus* (Rh) el cual es abundante en moléculas polifenólicas. Se exploró la ultracentrifugación y la microfiltración como técnicas empleadas para la recuperación de los etosomas “cargados” con extracto respecto al extracto sin encapsular remanente en el solvente. Los productos obtenidos son caracterizados por espectroscopia UV-Vis, Microscopia Confocal de Fluorescencia, Potencial Zeta (ζ), además se evaluó la citotoxicidad de los etosomas “cargados” con extracto de Rh en células de sangre periférica. Mediante UV-Vis se confirmó la presencia del extracto en el interior de los etosomas. Por la microscopia confocal se observó que los etosomas son esféricos con un promedio de tamaño de 1.2 μm . Para ζ se observó la estabilidad de los etosomas con el extracto y sin el Rh. La concentración letal 50 (CL₅₀) de los etosomas cargados con extracto de Rh sobre células de sangre periférica fue ubicada en 107 $\mu\text{g/mL}$.

Abstract

Ethosomes are liposomes (synthetic vesicles formed by phospholipids) that contain ethanol molecules as cosurfactant which insert into the bilayer in the region close to the polar heads of the phospholipid, which makes the vesicles less rigid allowing a more efficient trans-epidermal diffusion, making them excellent drug carriers. In the following work, the process of synthesis and characterization of ethosomes formed by the zwitterionic phospholipid 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DOPC) in the presence of the ethanol-water solvent 15:85 v / v is described. Said ethosomes were used to encapsulate root extract of *Rumex hymenosepalus* which is abundant in polyphenolic molecules. Ultracentrifugation and microfiltration were used to recover the loaded ethosomes with the extract from the non-encapsulated extract remaining in the solvent. The obtained product was characterized by UV-Vis spectroscopy, Confocal Fluorescence Microscopy and Z potential, also, the cytotoxicity of the loaded ethosomes with the Rh was assessed in peripheral blood cells. The presence of the extract inside the ethosomes was confirmed using UV-Vis. Using Confocal Microscopy it was observed that the ethosomes were spherical, with an average size of 1.2 μm . It was observed that the ethosomes were stable with and without the Rh using Z potential (ζ). The lethal concentration 50 (CL_{50}) of the loaded ethosomes with the Rh extract over peripheral blood cells was 107 $\mu\text{g/mL}$.

Introducción

La formación de vesículas lipídicas artificiales fue descrita por Bangham a mediados de los 1960¹, estas vesículas ahora conocidas como liposomas son muy utilizadas para el estudio de la permitividad de las membranas celulares, actualmente la atención en estas se ha tornado en la posibilidad de transportar material biológico en su interior, en los 70s se comenzó con la investigación en vivo de los liposomas, esto quiere decir que se hicieron pruebas con células vivas en vitro y animales vivos, el propósito de esta investigación fue para proponer las terapias farmacéuticas con estos liposomas, esto fue conciliado en el periodo de los 80s , después de este periodo los liposomas solo han tenido avances en su investigación de estabilidad en los fluidos biológicos, en la distribución de fármacos, por mencionar algunos.²

Los etosomas son biocompatibles y biodegradables ya que su composición está formada por fosfolípidos semejantes a los que constituyen los liposomas, donde se les agrega un porcentaje de etanol, el cual proporciona fluidez a la bicapa lipídica volviéndola más elásticas. Estas vesículas etanólicas son utilizadas en la industria farmacéutica ya que son capaces de incluir fármacos hidrófilos.^{3,4} Los etosomas contiene alrededor del 15-45% de etanol, esto es lo que les permite obtener flexibilidad en la membrana de los etosomas, esto se hace para que se deformen fácilmente y puedan penetrar el poro en el caso de tratamientos dérmicos o viajar a través de vasos capilares hasta sitios remotos dentro del organismo para lograr descargar el fármaco en cuestión. Los etosomas han sido reportados como más estables que los liposomas por la presencia del etanol, ya que le proporciona una carga neta negativa en la superficie de la membrana lo cual previene la agregación, gracias a la repulsión electrostática.⁵

Hoy en día se han utilizado con éxito para administración tópica de medicamentos. Al comparar la permeabilidad ente los etosomas y los liposomas tradicionales, se ha encontrado que los etosomas son prometedores para la administración tópica no invasiva de vacunas.⁶ En este trabajo se fabricaron etosomas de DOPC, con extracto de Rh el cual es obtenido de la raíz de la planta, el trabajo se dividió en 4 partes. La primera son los etosomas con el extracto en esta muestra fue medida la citotoxicidad en células mononucleares, la segunda muestra fueron etosomas sin extracto, la tercera muestra fue ultra centrifugada y la cuarta fue

micro filtrada, en las ultimas dos se utilizaron esos procesos para separar el solvente de los etosomas y asi poder caracterizarlos por los metodos de: potencial Zeta, dispersion dinamica de luz (DLS), UV-Vis y Microscopia confocal.

Objetivo General

Formar y Caracterizar etosomas zwitteriónicos para el encapsulamiento de biomoléculas y evaluar su citotoxicidad en monocitos de sangre periférica.

Objetivos Específicos:

- 1) Obtener el extracto liofilizado de Rh y evaluar sus propiedades espectroscópicas.
- 2) Producir etosomas y etosomas con moléculas bioactivas encapsuladas (extracto liofilizado de Rh).
- 3) Caracterizar los etosomas y los etosomas con moléculas bioactivas encapsuladas, usando las técnicas de electroforesis, DLS, espectroscopía UV-Vis, Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).
- 4) Separar los etosomas con moléculas bioactivas encapsuladas del solvente usando las técnicas de: microfiltración y ultracentrifugación.
- 5) Evaluar la citotoxicidad de los etosomas y los etosomas con moléculas bioactivas encapsuladas en monocitos de sangre periférica.

Capítulo 1 Antecedentes

1.1 Fosfolípidos iónicos: catiónicos, aniónicos y zwitteriónicos

1.1.1 Fosfolípidos

Los lípidos son moléculas orgánicas, que son constituidas principalmente por carbono e hidrógeno. Los lípidos que constituyen de un grupo fosfato reciben el nombre de fosfolípidos y generalmente contienen Nitrógeno en su grupo polar, alguno de estos fosfolípidos son la fosfatidilcolina, fosfatidilserina, entre otros.

Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas cuya parte hidrófoba está constituida por una cadena hidrocarbonada de carácter neutro y el componente hidrofílico es la cabeza del fosfolípido como se muestra en la Figura 1.1.1.⁷

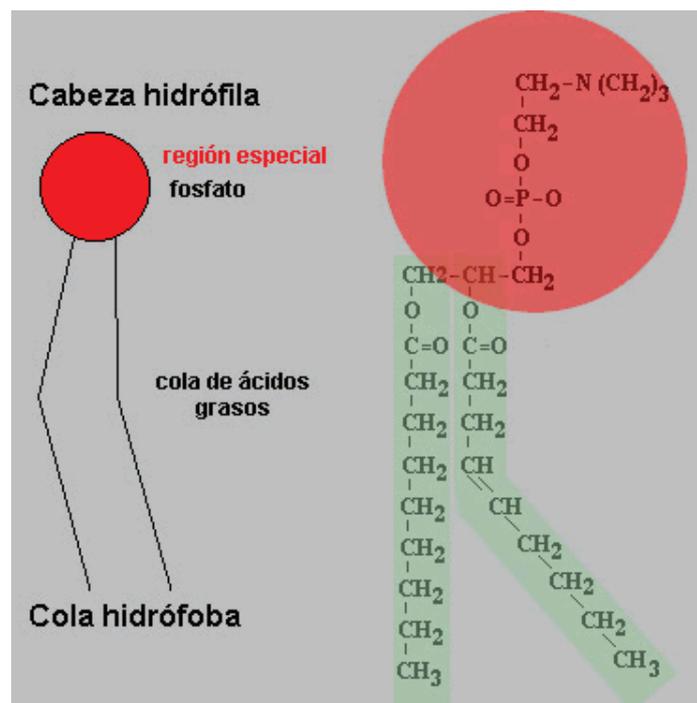


Figura 1.1.1. Estructura de los fosfolípidos la cual está formada por una cabeza hidrofílica y una cola hidrófoba.⁷

Los fosfolípidos al igual que otra molécula anfífilas se clasifican según el tipo de cabeza polar como aniónicas (cabeza polar negativa), catiónica (cabeza polar positiva) y zwitteriónicos (cabeza polar neutra).

La estructura de la membrana biológica se define principalmente por fosfolípidos anfipáticos heterogéneos que forman las bicapas de fosfolípidos. Los fosfolípidos contienen diacilglicerol como componente hidrofóbico con cadena ácido graso saturadas o insaturadas de longitud variable y un grupo de cabeza polar al grupo fosfato, esto es lo que define las cargas que tendrán las cabezas polares como se muestra en la Figura 1.1.2.⁸

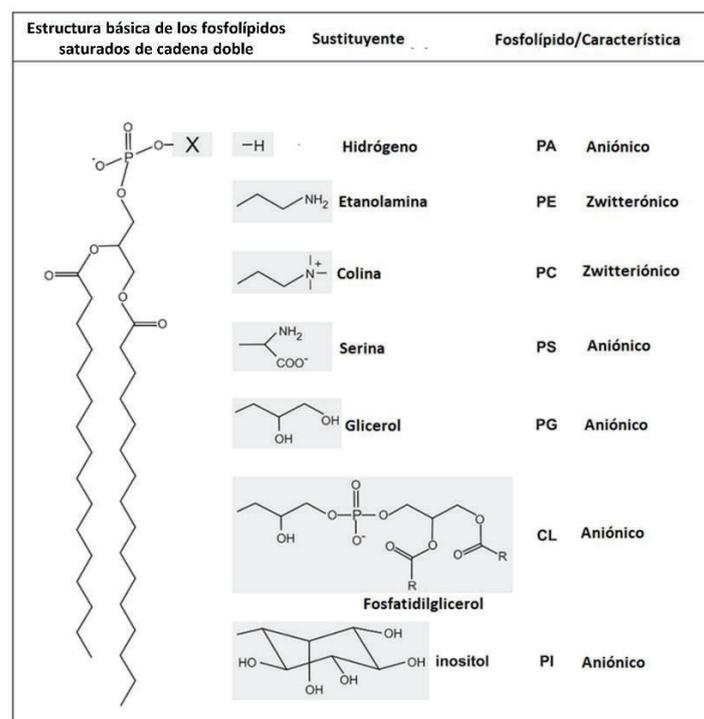


Figura 1.1.2. Estructura general de fosfolípidos y cabezas más comunes.⁸

En esta tesis se utilizó un fosfolípido zwitteriónico insaturado de cadena doble que posee como sustituyente la colina y se conoce como DOPC, por sus siglas en inglés y además se utilizó como marcador un fluorocromo conocido como NBD que está unido a la cabeza polar del fosfolípido fosfatidiletanolamina (PE) y que se muestran en la Figura 1.1.3.

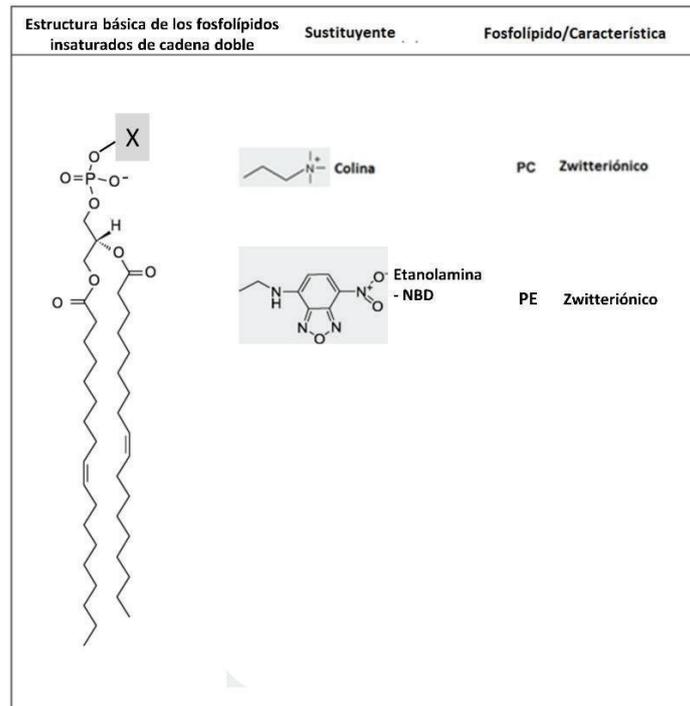


Figura 1.1.3 Estructura de los fosfolípidos DOPC y NBD-PE.

1.2 Etosomas y Liposomas Definición

Los liposomas son micro vesículas sintéticas que contienen una o varias bicapas paralelas de fosfolípidos los cuales se encuentran en un medio acuoso. Básicamente tienen la misma estructura que la membrana celular.⁹

La propiedad de los liposomas de obtener configuraciones en bicapas, se debe a que son moléculas anfipáticas como se muestra en la Figura 1.2.1.⁹

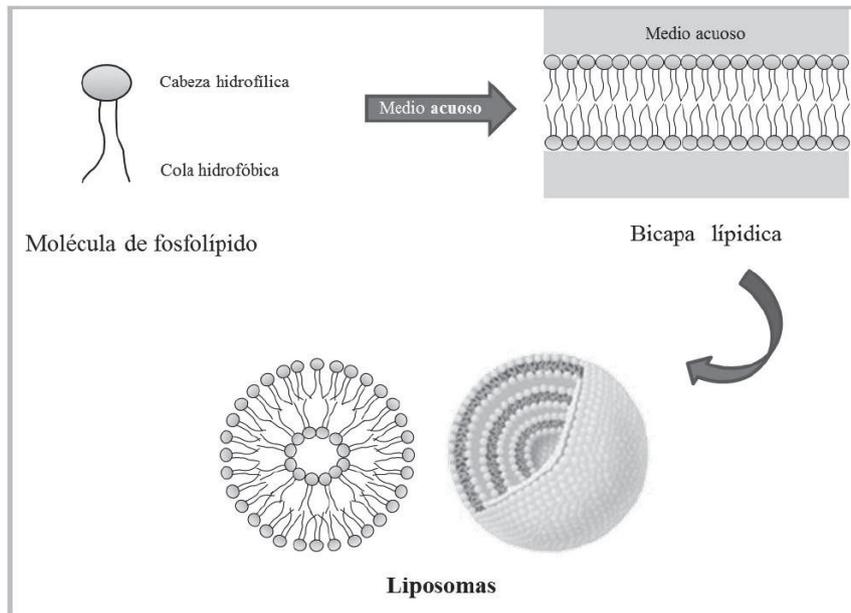


Figura 1.2.1. Estructura de liposomas ¹⁰.

Los fosfolípidos que se utilizan para hacer los liposomas son naturales o sintéticos, los más utilizados son naturales como la fosfatidilcolina, ya que son el principal componente de las membranas biológicas. Se pueden incorporar algún otro tipo de molécula para hacer que los liposomas sean más resistente ante la interacción con medios biológicos.

Las características de los liposomas pueden variar dependiendo de los fosfolípidos que se utilicen, pero el tamaño y la morfología se puede controlar mediante la temperatura, el tamaño de la cabeza polar, la longitud de la cola y el proceso de preparación. ¹⁰

Los tipos de liposomas son:

Vesículas grandes multilamelares (MLV, por sus siglas en inglés): estos liposomas miden en el rango de 1000 a 10,000 nm de diámetro. Se forman por múltiples bicapas concéntricas, separadas entre ellas por un medio acuoso de alrededor de 5 nm.

Vesículas gigantes unilamelares (GUV, por sus siglas en inglés): estos liposomas tienen un diámetro mayor a 1000 nm y posee una sola bicapa.

Vesículas grandes unilamelares (LUV, por sus siglas en inglés): este tipo de liposoma es de una sola bicapa y tienen un diámetro de 50 a 300 nm.

Vesículas pequeñas unilamelares (SUV, por sus siglas en inglés): este tipo de liposoma es el más pequeño como lo indica el nombre, los tamaños van desde 25 a 50 nm, estos liposomas tienen un problema de estabilidad ya que con este tamaño la bicapa no es estable por que el radio de curvatura es muy estrecho.⁹

Todos estos tipos se muestran en la Figura 1.2.2.

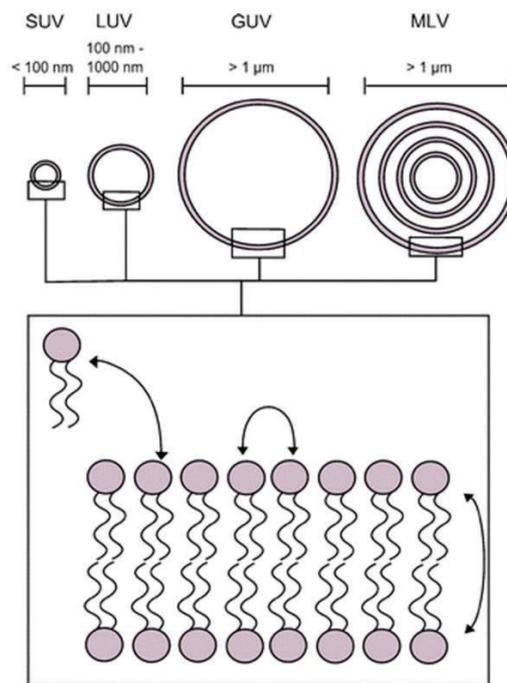


Figura 1.2.2. Tipos de liposomas ¹¹

En el liposoma se pueden encapsular moléculas bioactivas dispersas en un solvente apropiado, si la molécula es hidrofílica esta se coloca en el medio acuoso empleado para la rehidratación del liposoma, cuando es lipofílico el material se agrega en el solvente orgánico donde se disuelven los fosfolípidos incorporándose posteriormente en la región hidrófoba entre las colas hidrocarbonadas de las bicapas.¹⁰

Los etosomas tiene la misma forma que los liposomas tanto en sus tipos como en su estructura y fabricación, la única diferencia es, al momento de agregar los fosfolípidos en el medio

acuoso este tiene un porcentaje de etanol lo que hace que el etanol se introduzca parcialmente dentro de la bicapa (el grupo OH- se ubica próxima a las cabezas polares de los fosfolípidos) y en la solución del fármaco que se desee encapsular, tal como se muestra en la Figura 1.2.3., donde se observa la diferencia en cómo se acomodaría el etanol entre la membrana mientras que en el liposoma esto no ocurre.

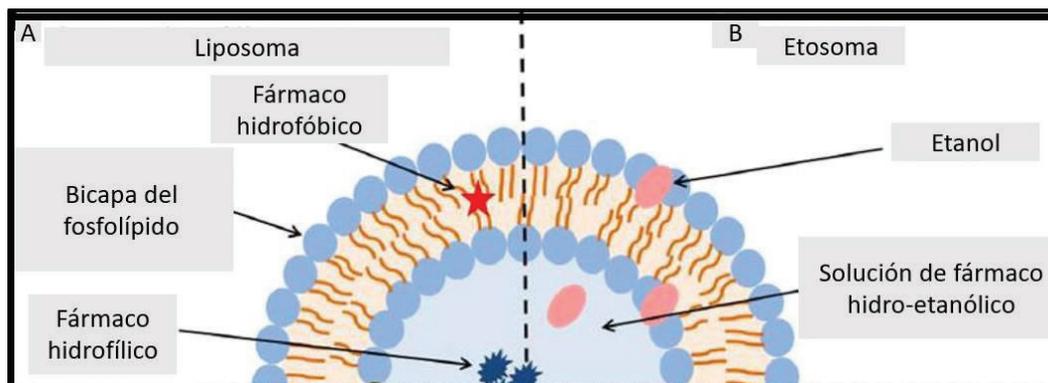


Figura 1.2.3. Diferencia entre liposomas y etosomas.¹²

1.3 Métodos de preparación de etosomas

La preparación de los etosomas es similar a la de los liposomas la cual es explicada en el capítulo 2. En particular para nuestros etosomas se utilizó como solvente de rehidratación una mezcla de agua: etanol 85:15 vol/vol. Para la preparación de los etosomas “cargados” con extracto de Rh el mismo solvente fue agregado al extracto liofilizado hasta formar una solución homogénea con la cual se hidratan los fosfolípidos.

1.4 Liofilización

La liofilización es un proceso que se da mediante la sublimación, este proceso se utiliza para que los extractos y alimentos no pierdan sus propiedades como lo harían si estas fueran secadas por algún otro método, como la deshidratación, en la liofilización no se pierde ni el aroma ni sus propiedades es por ello por lo que se utilizó en este trabajo.

El proceso de liofilización consiste en 2 pasos, en el primer paso es básicamente la congelación de la muestra, mientras que, en el segundo paso, es cuando se hace el secado por sublimación.¹³

El primer paso de la liofilización es la congelación, la congelación rápida provoca que se formen cristales de hielo pequeños, si la congelación es lenta formara cristales de hielo más grandes. Los cristales grandes provocan poros grandes los cual favorece a la sublimación del primer secado.¹⁴

En la Figura 1.4.1. se muestra las tres fases que tiene la liofilización, en la fase 1 la velocidad de sublimación crece rápidamente hasta que llega al punto máximo. Este tiempo lleva alrededor de un 10 a 15% del tiempo total de liofilización.¹³

La fase 2: muestra un descenso en la velocidad sublimación esto es por la formación de una capa porosa de material seco que empieza a oponer resistencia al vapor a medida que procede el secado.

Estas dos fases se denominan como el secado primario, donde se extrae la mayor cantidad de agua del producto.¹³

Fase 3: esta fase también conocida como secado secundario, la velocidad con la que ocurre la sublimación sigue decreciendo de tal forma que va a cero. Esto es porque, para retirar el agua el proceso se vuelve más lento.

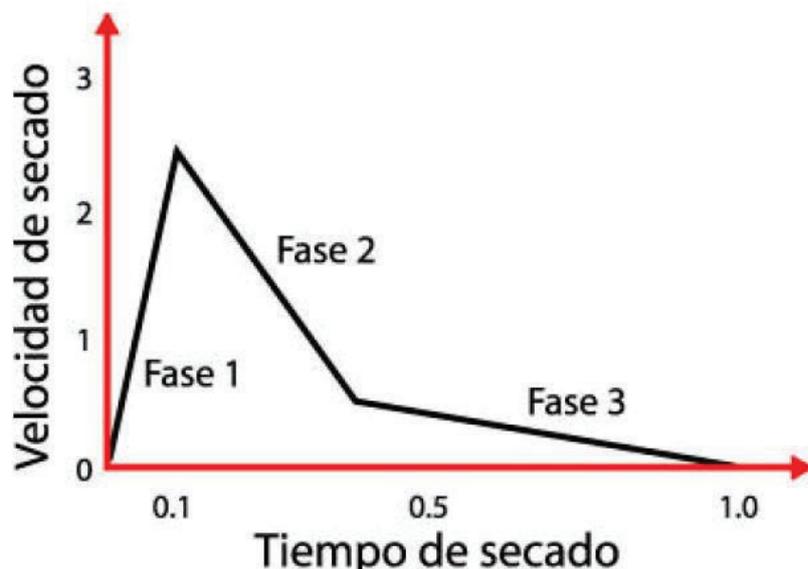


Figura 1.4.1. Etapas del proceso de liofilización.¹⁵

1.4.1 Primer secado

En este secado el hielo formado en la muestra se retira mediante sublimación desde la fase sólida a gaseosa.

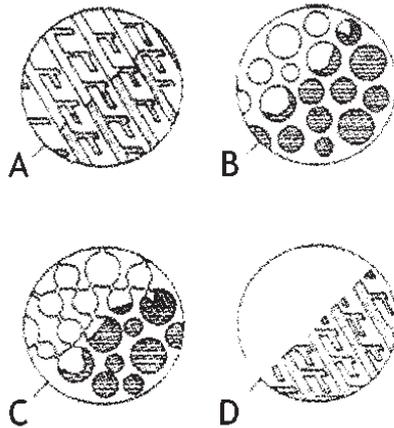


Figura 1.4.2. Tipos de secado.¹³

De la Figura 1.4.2, el vapor de agua se retira de la muestra de diferentes formas: A) sublimación del hielo con vapor retirándose por canales de la estructura. B) Difusión de moléculas de agua hasta el frente de secado de la matriz. C) vapor de agua escapándose por fracturas en la matriz. D) Pérdida de la estructura en el frente de secado por colapso.¹³

1.4.2 Secado secundario

Las porciones que quedaron de agua no congelada, que no subliman en la primera etapa del secado, lo hacen por evaporación en la segunda etapa donde se incrementa la temperatura. Las partes secas que se liofiliza pueden seguir con el secado secundario, aunque también puede haber presencia de hielo que no fue sublimado durante el primer secado. Cuando estas dos fases coexistan, como el hielo enfría la estructura, la temperatura permanece bajo control, ahora cuando la última parte de hielo desaparece es cuando la temperatura empieza a incrementar.

Capítulo 2 Métodos experimentales

Metodología

En esta sección se hablará de cada uno de los métodos experimentales utilizados en la caracterización del sistema: proceso de liofilización que se realizó al extracto de Rh, preparación de Etosomas, hidratación de película.

Obtención de extracto de *Rumex hymenosepalus*

El extracto de Rh se obtiene por un proceso de maceración de raíz de la planta también conocida como cañagria o rubarbo silvestre. Como solvente en la maceración se usó una mezcla etanol:agua 70:30 vol/vol con una relación de matriz sólida/solvente de 15 g/100ml. La raíz de Rh previamente cortada y deshidratada (obtenida comercialmente) y el solvente se depositan en frasco de vidrio cerrado herméticamente para la maceración durante 3 semanas. El recipiente se protege de la iluminación para evitar la fotodegradación de los compuestos polifenólicos obtenidos del proceso de extracción. Posteriormente la solución del macerado se hace pasar por dos filtros, el primero es de 8 μm para retirar los compuestos sólidos y de grandes tamaños, mientras el segundo se utilizó un filtro de 220 nm. Posteriormente el extracto filtrado es rotavaporado para retirar la mayor parte del solvente (etanol) y poder concentrarlo para su congelación previo a la liofilización del mismo.

2.1 Proceso de liofilización

- Una vez concentrado el extracto por rotavaporación lo que sigue es la congelación, en este paso cabe recalcar la importancia del tipo de congelación, ya que existen dos: congelación rápida y congelación lenta.
- En la congelación rápida, al congelar el agua de prisa se formarán cristales pequeños, la desventaja de esto es que la liofilización tarda más en retirar el agua ya que hace más difícil la extracción de la misma por sublimación debido a los cristales, esto hace que el proceso sea muy tardado.
- La congelación lenta conlleva a que se formen cristales muy grandes lo cual al ser sublimada es mucho más rápido, pero deja estructuras abiertas. Estos cristales al ser

grandes pueden llegar a dañar la membrana celular, dependiendo de que sea lo que se somete al proceso.

- En nuestro caso optamos por congelar el extracto rápidamente al colocarlo en congelador a -20°C en recipientes de 100 mL c/u con 50 mL de extracto rotavaporado para facilitar la rápida congelación.
- Después de que el extracto este perfectamente congelado, los recipientes se colocan rápidamente en los tentáculos de la liofilizadora (Labconco, Modelo FreeZone 1L) para empezar el proceso de liofilización. Las condiciones del proceso son $T=-50^{\circ}\text{C}$, $P=0.0156$ mbars y $t=72$ h.
- En este punto cuando se aplica el vacío empieza los secados de la muestra el cual se divide en dos: secado primario y secundario.
- Secado primario; en este paso hay tres papeles importantes los cuales son la presión, la temperatura y el tiempo, ya que cada uno depende de los demás para que haya una buena sublimación.
- Secado secundario; aquí es donde se retira todo el excedente o residuo de vapor de agua que pudo haber quedado en la muestra, en este paso el vacío es muy importante.
- Una vez terminado el proceso, la maquina procede a ambientar la recamara donde se encuentra el recipiente con la muestra y con esto poder retirar el extracto.
- El extracto el cual entró en un medio acuoso, al observarlo al final del proceso de liofilizado queda en un estado sólido (polvo), con un color café claro. El recipiente con el extracto liofilizado se forra con papel aluminio para evitar la exposición a la luz de los compuestos antioxidantes del extracto susceptibles a la foto-oxidación.

2.2 Preparación de los Etosomas

En este apartado se describirán los distintos métodos de preparación de etosomas. Los procesos por especificar serán los 4 siguientes.¹⁶

- Método de hidratación de películas.
- Método de inyección rápida en etanol.
- Método caliente.

- Método frío.

A continuación, se explicarán brevemente cada uno de los métodos.

2.2.1 Método de hidratación de película

El método consiste en disolver los fosfolípidos en un compuesto orgánico volátiles como el cloroformo, esto se hace para al momento de evaporar los componentes orgánicos se pueda obtener una fina película sobre las paredes del recipiente en el que se evaporó. La hidratación de esta película mediante un medio acuoso da como resultado la formación de liposomas del tipo MLV, como se puede observar en la Figura 2.2.1.

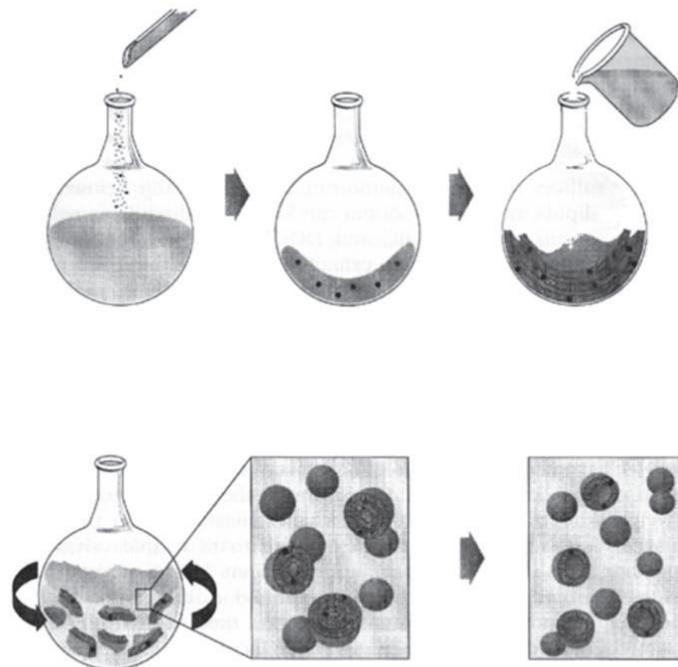


Figura 2.2.1. Método de hidratación de película.⁷

2.2.2 Método de inyección rápida en etanol

Consiste en inyectar a gran velocidad los fosfolípidos disueltos en etanol con ayuda de una jeringa sobre un gran volumen de fase acuosa y con este método se forman espontáneamente liposomas del tipo SUV.¹⁷

Otro método para preparar SUV, mediante MLV mediante sonicación o a través de una prensa French este método consiste en hacer el fosfolípido a través de un poro de tamaño reducido a altas presiones: hasta 20,000 psi, lo que provoca que en el poro se produzcan fuerzas de cizalladura que eliminan una a una las bicapas.¹⁷

2.2.3 Método caliente

En este método el fosfolípido se calienta hasta la temperatura de 40°C hasta que se obtiene una solución coloidal.

En un recipiente a parte se toma etanol y propilenglicol (propano-1,2-diol) se mezclan y calientan hasta los 40°C, una vez que las dos mezclas obtengan la misma temperatura la parte orgánica se agrega a la acuosa, dependiendo del fármaco que se utilice ya sea hidrofóbico o hidrofílico se agregara agua o etanol. Para obtener el tamaño deseado de los etosomas se puede mediante la sonicación o la extrusión.¹⁸ El proceso a seguir se encuentra en la Figura 2.2.2.

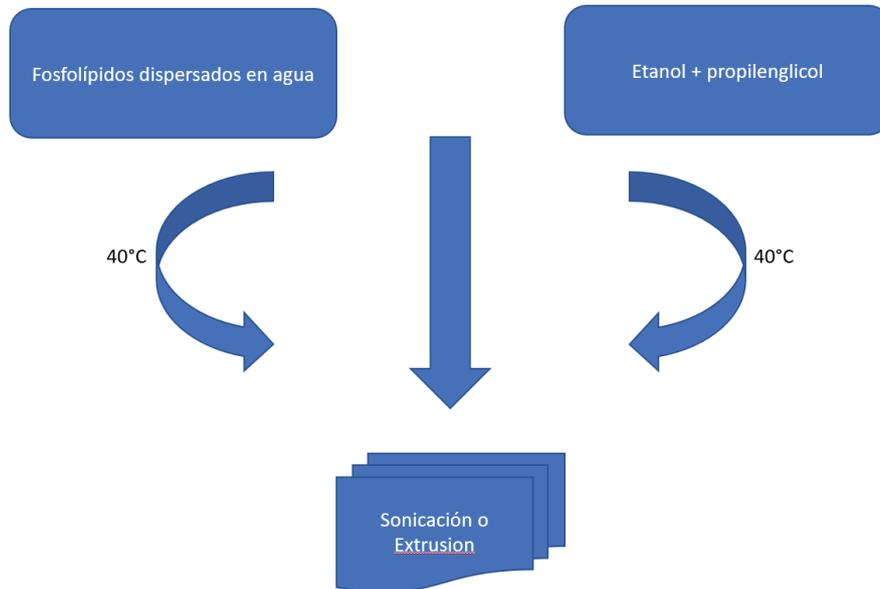


Figura 2.2.2. Preparación de etosomas método caliente.¹⁸

2.2.4 Método Frio

En este método se mezclarán los fosfolípidos, el fármaco y otros materiales lipídicos se disuelven en etanol en un recipiente cubierto a temperatura ambiente, mediante agitación vigorosa con ayuda de algún mezclador. Se añade propilenglicol durante la agitación. La mezcla se calienta a 30°C a baño maría. En otro recipiente aparte se calienta agua a 30°C el cual se agregará a la mezcla y se agitará vigorosamente por 5 min en un recipiente cubierto. El tamaño de los etosomas se puede obtener mediante los métodos de sonicación o extrusión. Finalmente la mezcla se guarda en refrigeración.¹⁸ El método a seguir se encuentra en la Figura 2.2.3.

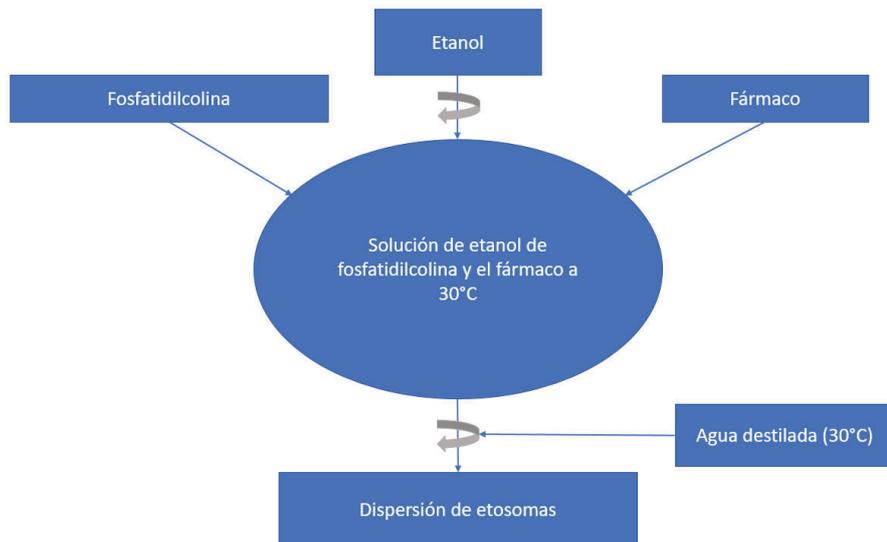


Figura 2.2.3. Preparación de etosomas método frío.¹⁸

2.3 Potencial Zeta y DLS

2.3.1 Potencial Zeta

Para la medición de ζ , se utilizó el equipo ZetaSizer Nano (MALVERN) el cual posee las siguientes características y se observa en la Figura 2.3.1.:

1. Un láser de ión He-Ne que opera a una longitud de onda (λ) de 632 nm.
2. Un divisor de haz, el cual separa el haz en dos y uno funciona como referencia mientras que el otro se modula para corregir la velocidad de las partículas que se mueven en el sentido de la franja de interferencia, lo que permite determinar el potencial zeta de las partículas.
3. Dos espejos que orientan los haces procedentes de la fuente hacia la celda de medición.
4. Un fotomultiplicador y funciona en modo de detección de fotones.

- Un correlador digital, que determina la función de correlación mediante una transformada de Fourier, a partir del cual se obtiene la movilidad electroforética y el potencial zeta.⁷

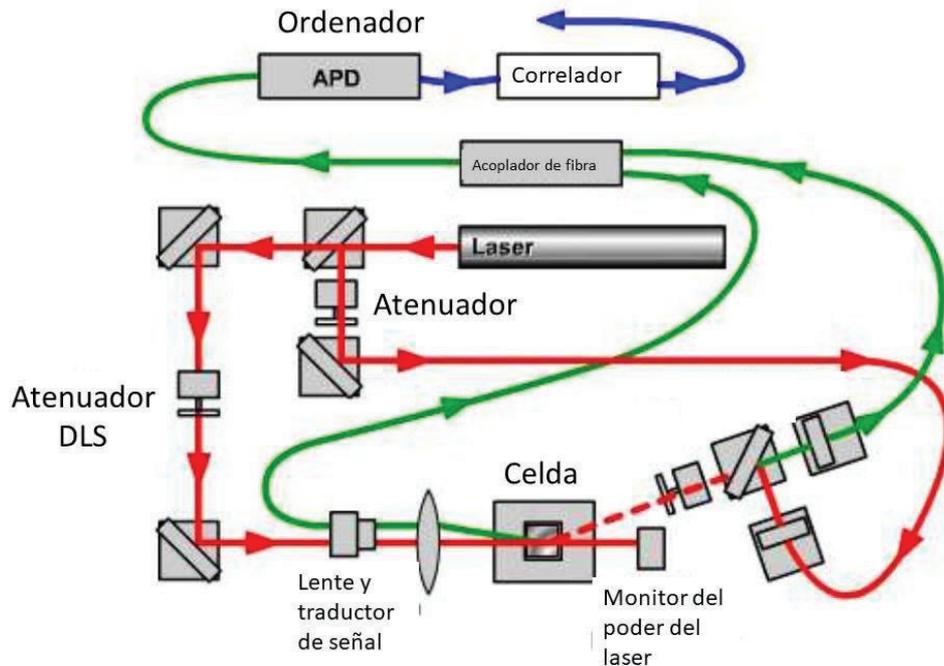


Figura 2.3.1. Composición óptica de ZetaSizer Nano (MALVERN).

La movilidad electroforética (μ_e) se obtiene mediante un experimento de electroforesis en la muestra, esta técnica para medir el movimiento de las partículas cargadas bajo un campo eléctrico el cual utiliza el efecto Doppler.

Si se aplica un campo eléctrico a un electrolito, las partículas que se encuentran suspendidas son atraídas hacia el electrodo de carga opuesta. La viscosidad es la fuerza que se opone a este movimiento. Al llegar a un equilibrio de fuerzas es cuando hay un movimiento constante en la velocidad de las partículas. La velocidad que se obtiene depende de los siguientes factores: campo eléctrico (E), constante dieléctrica (ϵ), la viscosidad del medio (η), y del potencial Z (ζ). La movilidad electroforética μ_e se le conoce a la velocidad de la partícula en un campo eléctrico.

Con esto podemos obtener ζ mediante la ecuación de Henry:

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta}$$

Donde $f(\kappa a)$ es la función de Henry, en la cual comúnmente se utilizan los valores aproximados de la función 1 o 1.5.

Para medir μ_e , se utiliza una celda como se muestra en la Figura 2.3.2, y donde se coloca el líquido por un capilar, una vez que el líquido está en el capilar se procede a colocarlo en la máquina y comenzar con las mediciones.

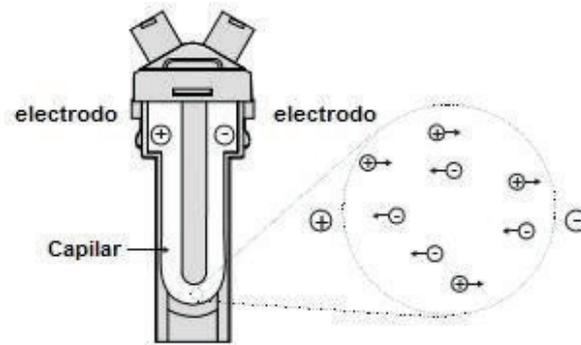


Figura 2.3.2. Celda para medición de ζ .

Como se puede observar en la siguiente Figura 2.3.3, la luz se dispersa a un ángulo de 17° se combina con el haz de referencia. Esto produce una fluctuación en la intensidad de la señal, donde la fluctuación es proporcional a la velocidad de la partícula. Se utiliza un procesador de señales digitales para extraer las frecuencias características de la luz dispersada y con esto se estima la velocidad promedio de las partículas.

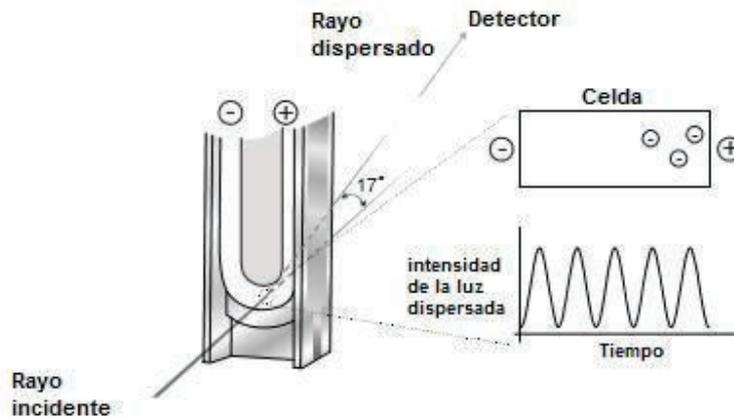


Figura 2.3.3 Arreglo experimental para medición del ζ .⁷

La forma que tiene el capilar favorece la medición de la velocidad electroforética puesto que, en un punto de la celda, llamada capa estacionaria, el flujo electrosmótico es cero, donde ambos flujos se cancelan. Si realizamos la medición de la velocidad electroforética en este punto, obtendremos la velocidad real.

Volviendo a la ecuación de Henry, utilizamos el valor medio para la movilidad electroforética para calcular ζ , teniendo un conocimiento previo de los parámetros restantes del medio.

2.3.2 Dispersión dinámica de luz (DLS)

El arreglo de los componentes utilizados para la medición de dispersión de luz en el equipo de Malvern (Nano ZSizer) se ilustra en la Figura 2.3.4. donde se observa el láser ($\lambda = 632 \text{ nm}$) que incide sobre la celda que contiene un sistema de partículas coloidales, lo cual provoca dispersión de luz en todas direcciones. Esta dispersión es captada por el sensor que se encuentra en este equipo a un ángulo de $\theta = 173^\circ$ respecto a la dirección del haz incidente.

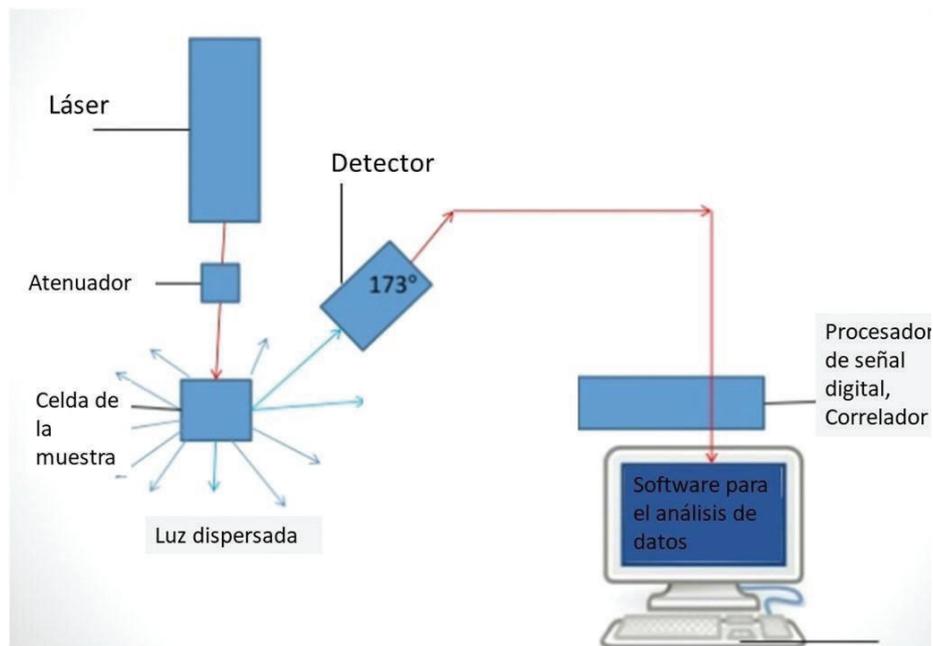


Figura 2.3.4. Esquema básico de dispersión de luz.¹⁹

El campo eléctrico, el cual es dispersado en la muestra cambia constantemente de tal forma que la intensidad de luz que arriba al detector fluctúa en el tiempo. Las fluctuaciones de la intensidad de la luz que llega al detector debidas al movimiento browniano de las partículas dentro del volumen de dispersión en la muestra son inversamente proporcionales al tamaño de las mismas y por lo tanto, directamente proporcionales al coeficiente de difusión traslacional de las partículas como se muestra en la siguiente Figura 2.3.5. La información dinámica de interés es la que se encuentra en las fluctuaciones y estas se pueden describir a través de la función de autocorrelación (ACF, por sus siglas en inglés) dependiente del tiempo. La función de autocorrelación indica como está de correlacionado un proceso consigo mismo a distintos tiempos. Para un ángulo dado de detección, las fluctuaciones de la intensidad permiten calcular ACF de la intensidad de la luz dispersada

$$I^{(2)} \quad (I^2)$$

como:

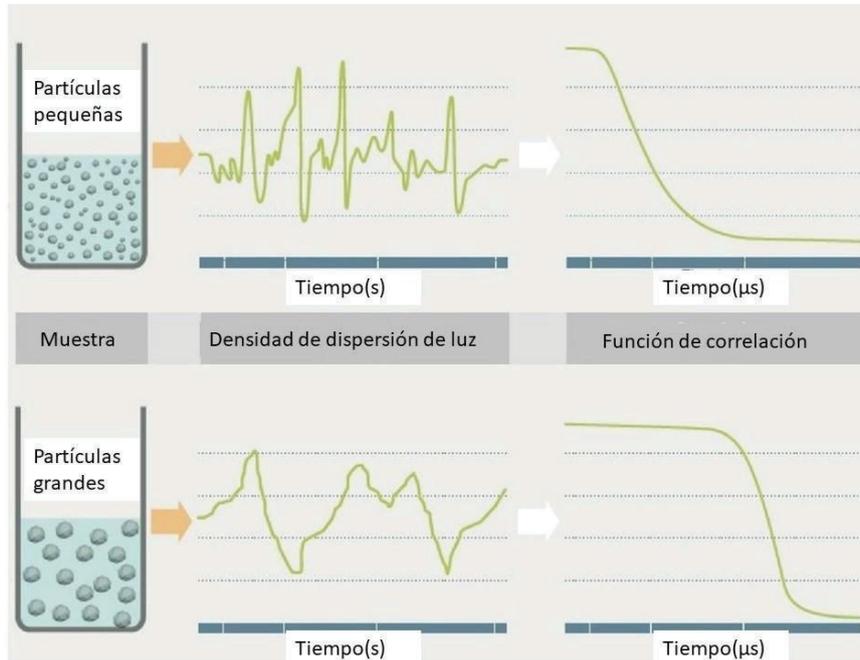


Figura 2.3.5. Fluctuación de intensidades de luz dispersada por dispersiones coloidales de partículas grandes y pequeñas y sus respectivas funciones de correlación.²⁰

$$\langle I^2(t) \rangle = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle + \langle I(t)I(t) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}$$

Donde $I(t)$ y $I(t+\tau)$ son las intensidades de la luz dispersada a los tiempos t y $t+\tau$, respectivamente y los paréntesis indican promedio temporal.

También podemos expresar la función de autocorrelación de intensidad en la función de autocorrelación de campo eléctrico como

$$\langle I^2(t) \rangle = \langle I(t) \rangle + \langle I(t) [E^{(1)}(t)]^2 \rangle$$

Donde

$\langle \psi |$

\langle

$$\frac{\langle \psi | \psi \rangle}{\langle \psi | \psi \rangle^2}$$

$(\psi |$

ψ

$($

$=$

ψ

)

ψ

$($

ψ

$+$

Donde $E(t)$ y $E(t+\tau)$ son los campos eléctricos dispersados en los tiempos t y $t+\tau$ respectivamente, β es un factor que depende del arreglo experimental y B es un factor debe ser igual a 1. Esta ecuación también es conocida como la relación de Siegert.

Para sistemas coloidales monodispersos y diluidos la función de autocorrelación de campo decae exponencialmente de la forma $\langle I(t)I(t+\tau) \rangle = \langle I \rangle^2 e^{-\Gamma \tau}$ como se ilustra en la figura 2.3.5, con una razón de $\Gamma = Dq^2$, donde D es el coeficiente de difusión de las partículas y q vector de onda definido como $q = (4\pi/\lambda) \sin(\theta/2)$. El coeficiente de difusión se relaciona con el radio hidrodinámico de las partículas mediante la relación Stokes-Einstein que se expresa como

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}$$

Donde R es el radio hidrodinámico, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y η es la viscosidad del medio.

Para el caso en que el sistema es polidisperso o el sistema presenta una distribución de tiempos de relajación, se utilizan ajustes con función modelo tipo integral y un método de regularización para llevar a cabo un proceso de deconvolución. Dicha rutina o protocolo es llamada CONTIN y se incluye en los software de los equipos comerciales de dispersión de luz.²¹

2.4 Espectroscopía UV-Visible

Los compuestos presentes en el extracto de Rh (catequinas y estilbenos) generan espectros de absorción óptica con las bandas características asociadas a las transiciones moleculares de moléculas fenólicas (210-220 nm y 265-280 nm), de tal forma, la espectroscopía UV-vis es una herramienta útil para determinar si los etosomas que encapsulan el extracto de Rh y son sometidos a procesos de separación del solvente (ultracentrifugación y microfiltración) contienen extracto remanente disuelto en la mezcla de etanol:agua en la cual son resuspendidos los etosomas. Para estudiar el fenómeno de absorción óptica se utilizan equipos llamados espectrofotómetros, de los cuales existen dos tipos los de haz sencillo y los

de doble haz, la diferencia entre estos dos es: el de haz sencillo al realizar la medición primero se coloca el blanco y después se coloca la muestra, a diferencia de el de doble haz el cual mide simultáneamente la muestra y el blanco.²² En el trabajo se utilizó uno de doble haz cuyo diseño esquemático es el que se encuentra en la Figura 2.4.1, el modelo es Perkin Elmer Lambda 45.

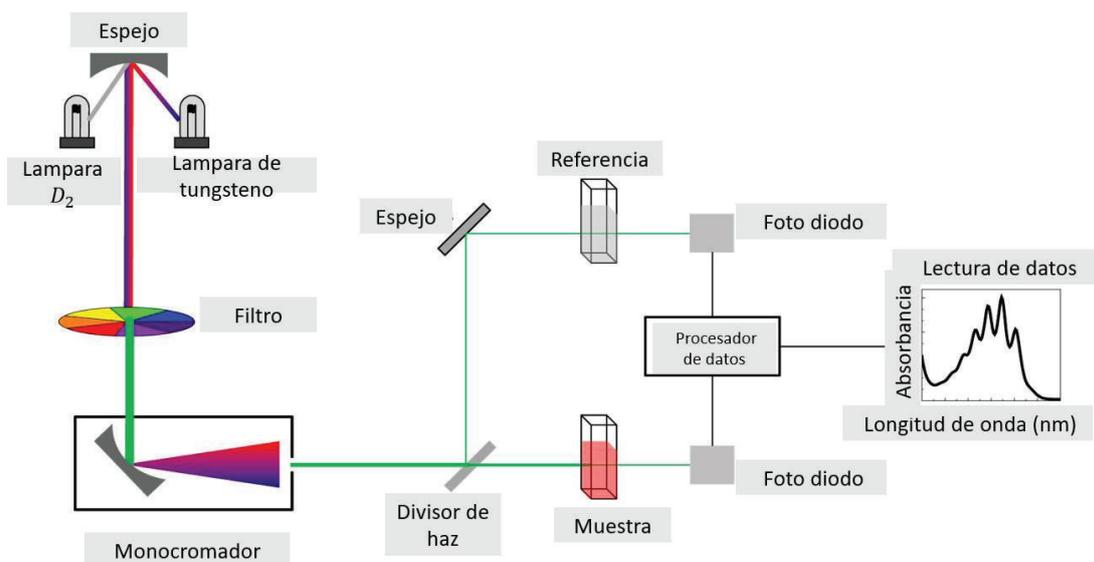


Figura 2.4.1. Esquema de un espectrómetro de UV-Vis de doble haz.

Los principales componentes del espectrómetro son los siguientes:

Fuente de luz. Proporciona la luz necesaria con una λ de 200-800 nm.

Debe de contar con que la luz emitida sea continua y de larga vida. Las fuentes empleadas son una lámpara halógena y una lámpara de deuterio (D_2).

Monocromador. Separa la luz que proviene de la fuente y la separa en una sola longitud de onda. Lo cual se logra mediante una rejilla de difracción la cual separa la luz que llega a ella y la separa en diferentes λ .

Rendijas: son las que filtran la intensidad de la luz para al momento de llegar a la muestra no ocurran anomalías o fallos en la medición por calentamiento u otros problemas.

Divisor de haz. Consta de un espejo el cual es dicróico: separa el haz en dos por lo cual es posible hacerla medición en la muestra y el blanco simultáneamente.

Celda: contiene la muestra a medir y el blanco, esta hecha de un material transparente el cual no absorbe luz, dependiendo de la zona en la que se trabaje ya sea en el visible o en la ultravioleta se debe de tomar en cuenta al momento de colocar las celdas ya que el vidrio absorbe en el ultravioleta por lo tanto para trabajar en los dos o en el ultravioleta se deberá trabajar con celdas de cuarzo, en este trabajo se utilizaron de cuarzo de 10 mm de base cuadrada ya que existen de varios tipos y diferentes volúmenes. En la siguiente Figura 2.4.2 se muestran unas celdas.



Figura 2.4.2. Ejemplo de celdas de cuarzo de 10 mm.

Detector. A este llega el haz de luz después de haber pasado por las muestras, el cual es un fotodetector.

La utilidad de esta técnica de medición es obtener la λ máxima de absorbancia, para esto se hará un barrido de la λ de la muestra y con esto se obtendrá una gráfica como en la Figura 2.4.3.

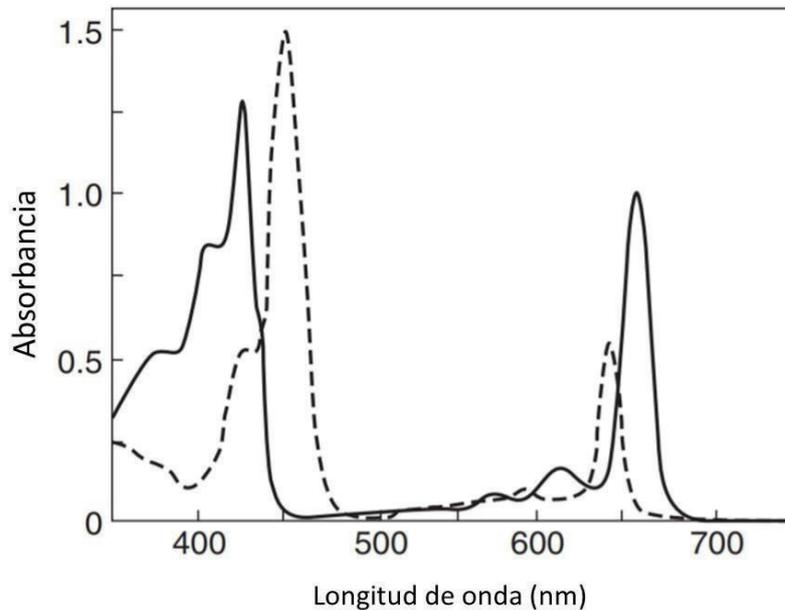


Figura 2.4.3. Ejemplo de grafica UV-Vis.²³

2.5 Conductividad

La capacidad de una muestra para conducir corriente eléctrica se conoce como conductividad. la estabilidad de la dispersión depende del balance entre las cargas electrostáticas repulsivas en la partícula coloidal.²⁴

2.6 Métodos de separación de tamaños: Ultracentrifugación, Microfiltración

2.6.1 Ultracentrifugación

La ultracentrífuga es un instrumento de laboratorio la cual fue diseñada para trabajar con la velocidad de rotación, esto es útil para separar los componentes de una mezcla.²⁵

Esta técnica es utilizada a velocidades que van desde las 20,000 a 60,000 rpm para separar los componentes de una solución según su peso.^{26,27}

Dependiendo del tamaño de las partículas es la velocidad a la que someterá la muestra, esto es a velocidades bajas las primeras partículas en precipitar serán las de mayor peso mientras que a velocidades muy grandes sedimentarán las partículas más pequeñas como se muestra en la Figura 2.6.1.

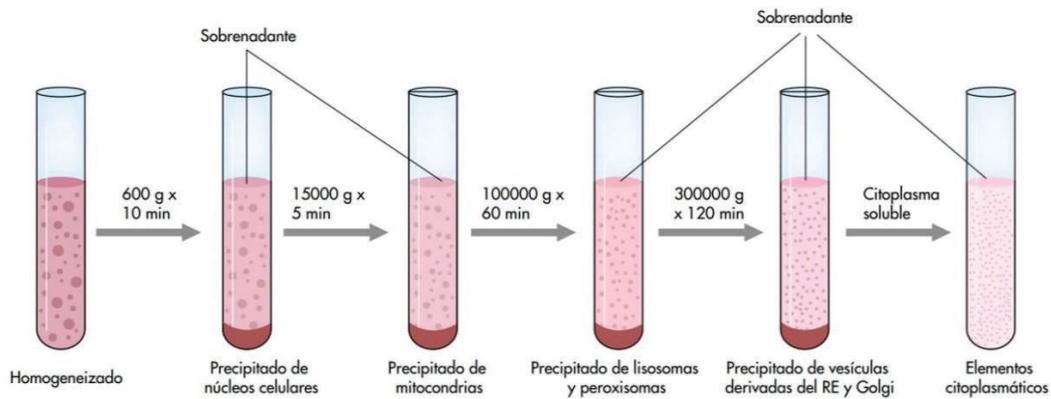


Figura 2.6.1. Velocidades y tiempos necesarios para distintos tipos de partículas. ²⁸

En la Figura 2.6.1. se muestra una cantidad con una g, esta g es una medida que se puede expresar en rpm con la ecuación siguiente:

$$g = (1.118 \times 10^{-5} \times R \times S^2)$$

Donde g es la fuerza de gravedad, R es el radio del rotor y S es la velocidad de la centrifugadora en rpm.

La máquina que se utilizó en este trabajo es Ultracentrifuge - Table Top - OPTIMA™ MAX-XP la cual se muestra en Figura 2.6.2.



Figura 2.6.2. Modelo utilizado en la tesis OPTIMA™ MAX-XP.

La cual cuenta con un rotor de ángulo rígido, como se muestra en la configuración de la siguiente Figura 2.6.3.

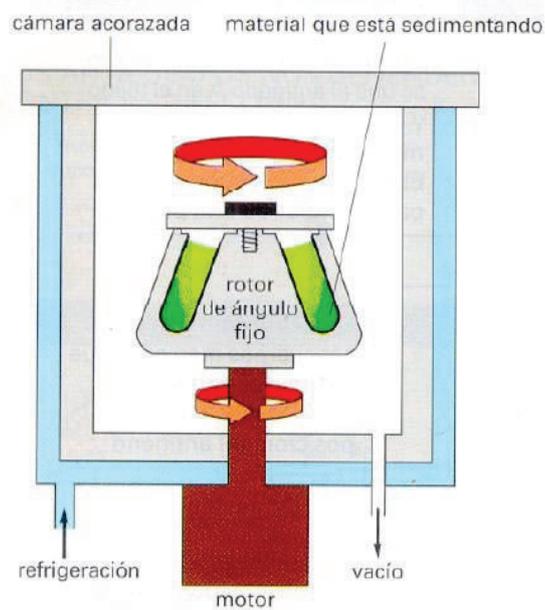


Figura 2.6.3. Rotor rígido con vacío como el que se utiliza en la Ultracentrífuga - Table Top - OPTIMA™ MAX-XP.²⁹

2.6.2 Microfiltración

Este método es utilizado para purificar o filtrar ya que consiste con una membrana de 0.1 μm . Al eppendorf se le introduce el filtro el cual tiene una capacidad de 500 μL y se coloca en una centrifugadora para separar el sólido del medio acuoso, el filtro que se utilizó se puede observar en la Figura 2.6.4.



Figura 2.6.4. Tubo de Microfiltración

2.7 Microscopía confocal de fluorescencia

Microscopía confocal de barrido láser (CLSM, por sus siglas en inglés) es una técnica que combina la imagen óptica de alta resolución con la selectividad de profundidad.³⁰

La luz emitida por la fuente de iluminación atraviesa un primer diafragma y el láser es reflejado mediante un espejo dicroico y se enfoca en un punto del espécimen mediante la lente de un objetivo. La misma luz vuelve por el mismo camino óptico, pasa a través del espejo dicroico y es enfocada en un detector, el pinhole es colocado frente al detector para eliminar las señales emitidas fuera de foco, este esquema se muestra en la Figura 2.7.1.³¹

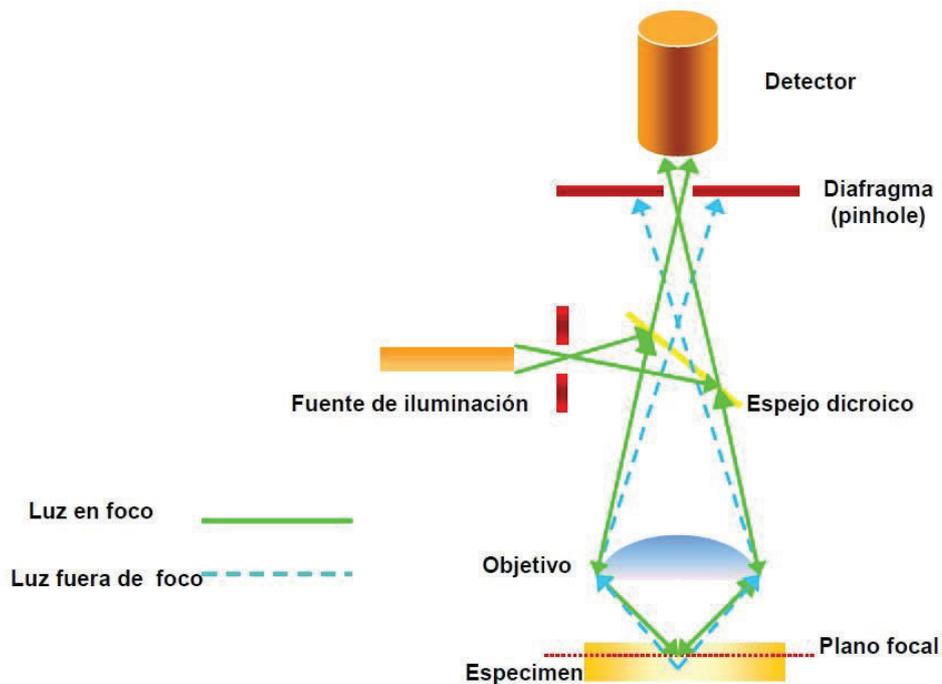


Figura 2.7.1. Esquema del principio de microscopía confocal.³¹

La utilización de láser como fuente de luz permite enfocar el haz en una zona muy pequeña de la muestra con gran intensidad. Como estas zonas son muy pequeñas para observar esas áreas, se necesita un barrido que permita muestrear todos los puntos y un sistema de formación de imagen donde se recoja la información de cada uno de los puntos.

Existen dos sistemas de barrido: donde el haz se desplaza por toda la muestra (barrido láser) o que la muestra se desplace mientras el láser esta inmóvil (barrido de placa).

La luz reflejada o fluorescencia emitida es recogida por un fotomultiplicador donde se transforma en señal de video que se hace digital y almacena en la computadora y visualizándose en el monitor.

Una de las principales características de este tipo de microscopia es el hecho de que puedes tener imágenes con mucha resolución (bien enfocadas) en diferentes profundidades dentro de la muestra a esto se le llama corte óptico. En la siguiente Figura 2.7.2 se puede observar la diferencia que existe entre el CLSM y el microscopio de campo amplio.

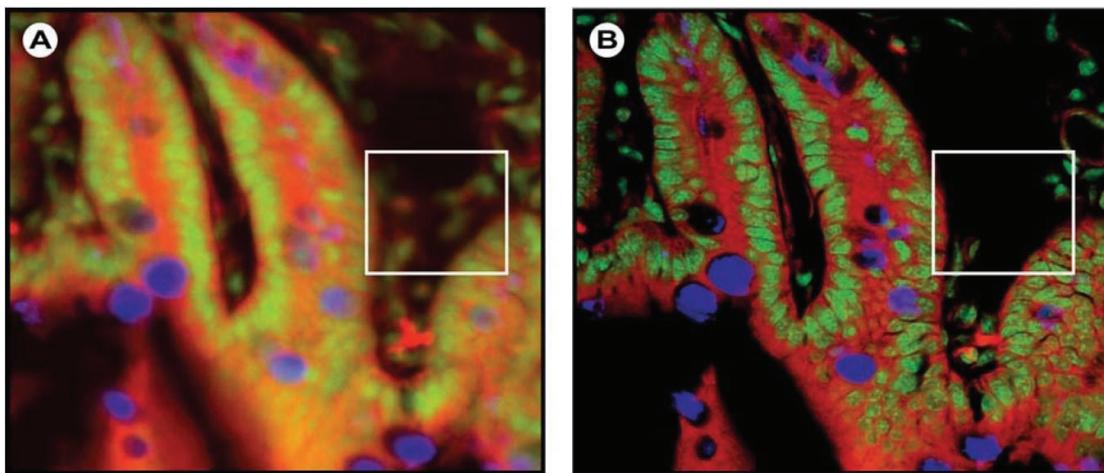


Figura 2.7.2. Donde A corresponde al microscopio de Fluorescencia y B al CLSM ³⁰. Esta

imagen de la Figura 2.7.2. (B) se logra al colocar un “pinhole” delante del detector, lo que hace esto es que la luz que no se desea no entre al detector y el ruido no aparezca en la imagen deseada.

2.7.1 La fluorescencia

Se denomina fluorescencia a la propiedad que tienen ciertas moléculas, de absorber cierta λ y emitir luz en una λ superior.

La fluorescencia puede darse de forma natural en determinadas sustancias denominada autofluorescencia, en otro caso si la muestra a observar no presenta el fenómeno de

fluorescencia primaria, es preciso teñirla con un marcador fluorescente, denominado fluorocromo.

Todo fluorocromo viene caracterizado con su espectro de excitación y emisión como se muestra en la Figura 2.7.3.

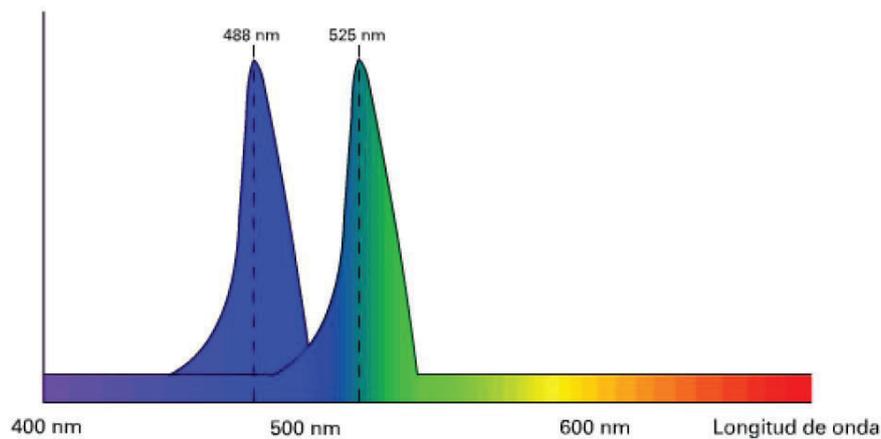


Figura 2.7.3. Espectro de excitación y emisión de un fluorocromo.³¹

El espectro de excitación es el rango de longitud de onda en la que el fluorocromo absorbe la luz en la Figura 2.7.3. este sería (su máximo) de 488 nm, el espectro de emisión es el rango de λ donde el fluorocromo emite la luz (525 nm).³¹

Esto se puede explicar con un diagrama de Jablonski como en la figura 2.7.4., muestra las distintas vías que una molécula puede seguir cuando absorbe luz y los distintos tipos de procesos fotoquímicos de emisión donde se disipa la energía.³²

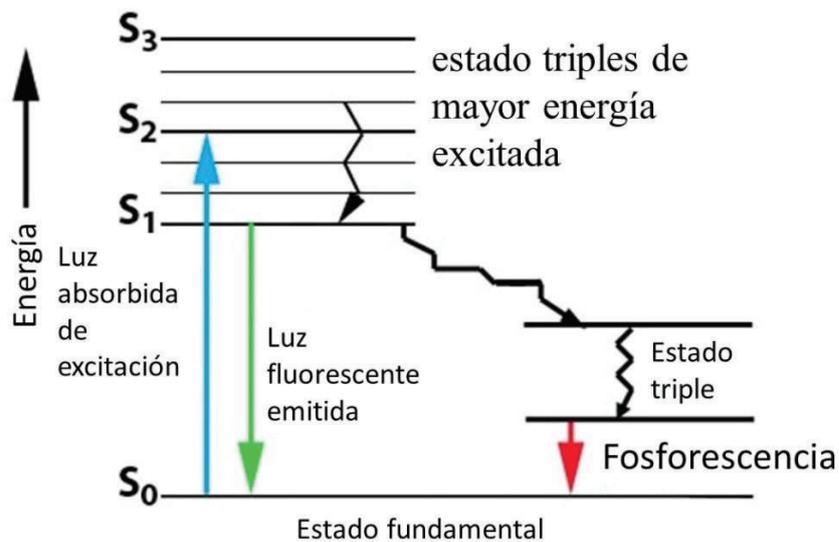


Figura 2.7.4. Diagrama de Jablonski.³²

Para que este fenómeno ocurra es necesario que la molécula absorba radiación de una longitud de onda adecuada. Así, algunos electrones pasan de estados vibracionales y electrónicos fundamentales (S_0) a los correspondientes estados excitados (S_1 , S_2 ... según la cantidad de energía absorbida). El tiempo de vida del electrón en el estado excitado es de 10^{-7} - 10^{-8} s y, posteriormente, la molécula pierde el exceso de energía que la hizo pasar del estado fundamental al estado excitado emitiendo o no radiación.³³

2.8 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y tinción negativa

2.8.1 SEM

La microscopía electrónica de barrido produce imágenes con electrones, con radiaciones emitidas o reflejadas por el espécimen del mismo lado que recibe el haz electrónico, de manera que generalmente se observa una superficie.

El SEM funciona básicamente de la siguiente manera.

El haz electrónico, atraviesa la columna y llega a la muestra. Un generador de barrido es el responsable de producir el movimiento del haz, de manera que barra la muestra punto a punto. De la interacción entre los electrones incidentes con los átomos que componen la muestra se

generan señales, las cuales pueden ser captadas con detectores específicos para cada una de ellas. El detector capta una señal y las convierte en una señal electrónica que es proyectada en una pantalla (CRT), como se observa en la Figura 2.8.1.³⁴

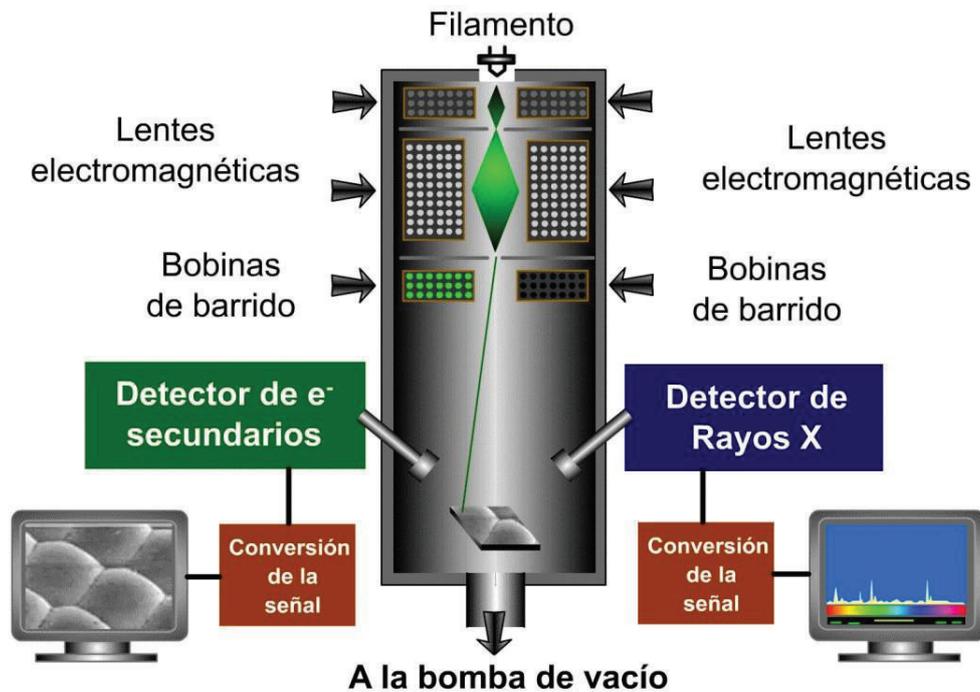


Figura2.8.1. Diagrama básico de SEM.

2.8.2 Tinción Negativa

La tinción negativa es un método fácil y rápido para examinar las estructuras como macromoléculas individuales y virus a nivel de microscopia electrónica (ME). La tinción negativa implica el depósito de soluciones de átomos pesados, los artefactos estructurales tales como el aplanamiento de estructuras esféricas o cilíndricas son comunes. Sin embargo, la tinción negativa es una técnica muy útil debido a su facilidad, rapidez, y también porque no requiere ningún equipo especializado.

En este trabajo se utilizó el ácido fosfotúngstico (PTA, por sus siglas en inglés) el cual consiste en una solución al 1-3% de PTA es una tinción útil para muchas muestras, pero es

especialmente buena para virus que se disocian a pH bajo. La mancha produce menos contraste que el acetato de uranilo.

Existen más tinciones negativas como por ejemplo: Acetato de uranilo, fosfotungstato de sodio, uranilo acetato, entre otros.

2.9 Citotoxicidad

En este apartado se verá el procedimiento para medir la citotoxicidad del extracto de Rh encapsulado en etosomas en células mononucleares de sangre periférica.

El proceso consta de obtener alrededor de 8 mL de sangre, una vez que la sangre este en un tubo se utiliza unos citratos como anticoagulantes.

El siguiente paso es centrifugar la sangre con los citratos a 2500 rpm por 10 min, una vez que el tiempo transcurre en la muestra se observara que en la parte superior queda plasma el cual hay que retirar cuidadosamente, ya que se retiró todo quedaran alrededor de 4 ml de plaquetas globular se le agregaran 6 ml de pbs (buffer fosfato salino), el pbs es una solución salina que contiene cloruro de sodio, fosfato de sodio, cloruro de potasio y fosfato de potasio.³⁵

Se prepara el ficol (Polímero de carbohidrato y metrizamida), por cada 2 mL de plaquetas con pbs se agregará 1 mL de ficol en un tubo vacío en el cual con mucho cuidado se agregará las plaquetas con el pbs sin romper el gradiente. Una vez que esté listo se centrifugara a 1500 rpm por 30 min.

Al retira la muestra de la centrifuga se observa que se ha separado en 3 partes como se muestra en la siguiente figura.

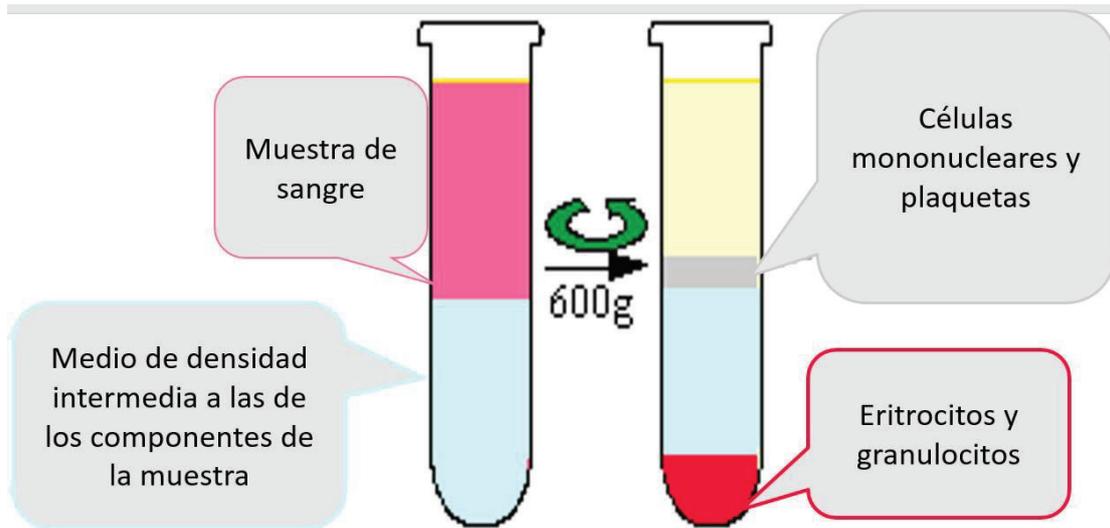


Figura 2.9.1. Muestra de sangre y separación de plaquetas.³⁶

Se extraen los mononucleares y se les agregara pbs para proceder hacer los lavados, en este proceso de lavado se centrifugará a 2500 rpm por 10 min, una vez que el proceso haya terminado se procede a retirar el sobrenadante y se podrá observar que hay un precipitado en el fondo del tubo, este precipitado con las células con las que se trabajara.³⁷

Con las células que quedaron en el botón las cuales son mononucleares se procede a agregarles 4 mL de RPMI (Roswell park memorial institute) el cual es un medio de sales y colorante rojo de fenol.

Ahora utilizaremos azul de tripano, esto es un colorante de color azul como el que se muestra en la Figura 2.8.2. Este colorante penetra en las células muertas y las tiñe de color azul sin afectar a las que están vivas. Este colorante se utiliza para hacer un conteo celular mediante la cámara de Neubauer.



Figura 2.9.2. Azul de tripano.³⁸

El colorante se diluye 1 a 1 con pbs, se procede a agregar 80 μ L de azul trypan y 20 μ L de RPMI con las células, se mezcla bien con la pipeta y se agregan 10 μ L en la cámara de Neubauer. Una vez que se encuentran en la cámara se procede al microscopio para hacer el conteo de las células.

En la cámara de Neubauer se muestra en la Figura 2.8.3.



Figura 2.9.3. Ejemplo de cámara de Neubauer.

En el microscopio la cámara se mira como la Figura 2.8.4., en estos recuadros que se muestran en la figura el método de conteo que se utilizó fue el siguiente, hay 16 cuadros en cada esquina, las células que se contarán son las que estén vivas y no toquen raya (las células vivas se observan muy brillantes). Los cuadros chicos que aparecen en la figura anterior sirven para hacer un conteo cuando la población de células es muy grande.

Una vez que los pozos están con sus respectivas muestras por triplicado, se pondrán en la incubadora por 24 h.

Después de las 24 h se agregarán los etosomas con extracto Rh y se incuban otras 24 h, después de los dos días se preparará 5 mg/mL³⁹ de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT por sus siglas en inglés) 98%, una vez que está preparado se agregan 10 µL por pozo.

Después de un periodo de 3 a 4 h en la incubadora se observan que efectivamente se formaron los cristales en las células. una vez que se corrobore que existen los cristales en las células se procede a hacer el diluyente el cual es isopropanol 5 mM de HCl (ácido clorhídrico) y detergente.

Después de agitar un tiempo y ver cómo cambia el color de la muestra se procederá hacer la medición de la misma, en la longitud de onda de 550 nm y 590 nm.

2.10 Métodos estadísticos de análisis de resultados: ANOVA, Tukey

En este apartado se hablará del método utilizado para obtener las estadísticas de



El software que se utilizó para hacer el cálculo de ANOVA fue el GraphPad Prism, este software el cual fue diseñado para experimentos biológicos en escuelas de medicina y compañías farmacéuticas, entre los análisis estadísticos que se pueden realizar en Prism están: t test, ANOVA, Two wat ANOVA, coeficiente de correlación de Spearman o Pearson, Mann-Whitney, Wilcoxon, Fisher, etc. En este caso se utilizó el método de ANOVA.

El método ANOVA, conocido también como análisis de varianza es el mejor método para obtener la variabilidad de un sistema de medición, porque tiene la ventaja de cuantificar la variación.⁴⁰

El método Tukey se utiliza en ANOVA para crear intervalos de confianza para todas las diferencias entre las medias de los niveles de los factores mientras controla la tasa de error por familia en un nivel específico. Es importante considerar la tasa de error por familia cuando se hacen comparaciones múltiples, porque la probabilidad de cometer un error de tipo I para una serie de comparaciones es mayor que la tasa de error para cualquier comparación

individual. Para contrarrestar esta tasa de error más elevada, el método de Tukey ajusta el

nivel de confianza de cada intervalo individual para que el nivel de confianza simultaneo resultante sea igual al valor que se especifique.

Capítulo 3 Resultados y Discusión

En esta sección se presenta, se analizan y discuten los resultados obtenidos mediante las técnicas experimentales utilizadas. Se hará un análisis del espectro UV-Visible, también se presentarán estadísticas de tamaños e imágenes obtenidas mediante el microscopio confocal y Potencial Z.

3.1 Preparación de los liposomas

Para la preparación de los Etosomas se utilizaron fosfolípidos que se encontraban en polvo comprados en Sigma-Aldrich, con esto se prepararon las soluciones a utilizar con concentraciones determinadas de metanol y cloroformo.

En este caso el fosfolípido que se utilizó fue un fosfolípido zwitteriónico.

- 1,2-Dioleil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC) lípido zwitteriónico cuenta con dos cadenas hidrocarbonadas con 18 carbonos y con una insaturación en cada una. Una característica importante del fosfolípido es que cuenta con un grupo de fosfatos en la cabeza polar y un grupo de aminos los cuales (fosfato y amina) le provoca una carga neutra.

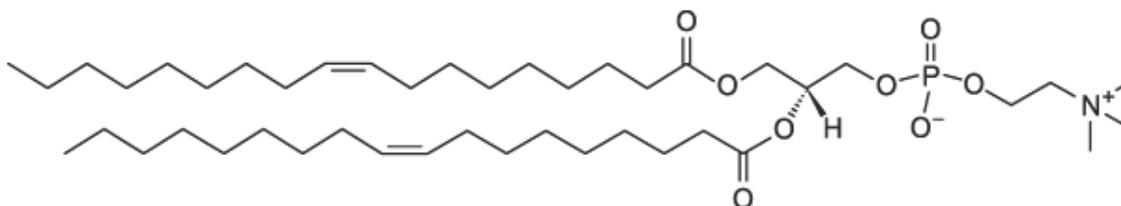


Figura 3.1.1. Lípido Zwitteriónico (DOPC)

Los liposomas se fabricaron mediante un proceso mecánico, con los siguientes pasos.

1.- Los fosfolípidos se pesan para poder agregarse a un matraz aforado, donde se disolverá con un solvente orgánico, el que se utilizó en esta tesis fue metanol y cloroformo, en este caso fue una solución de 70:30 respectivamente.

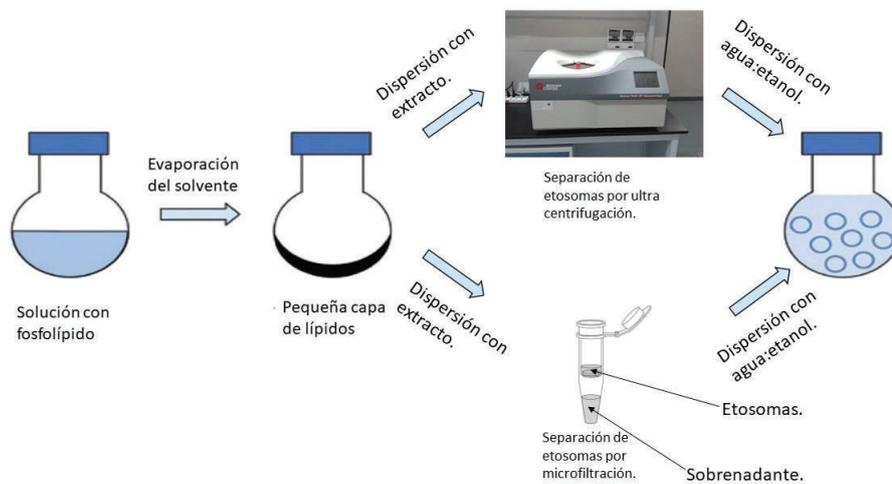


Figura 3.1.2. Se muestra el proceso realizado para la preparación de etosomas el cual es dispersión en película delgada.⁴¹

2.- Confirmando que los lípidos se disolvieron en el solvente orgánico, se sigue la evaporación del solvente para formar la película delgada de fosfolípidos. Para este proceso se utilizó un rotavapor, para continuar se vierte el soluto en un matraz de bola pequeño y se realizan una serie de pasos:



Figura 3.1.3. Rotavapor utilizado en la tesis.

- Una vez colocado el matraz en el rotavapor, se fija el giro del mismo a una velocidad de 75 rpm.
- El matraz se sumerge en un baño térmico, en donde la temperatura es superior a la de transición (T_m) del fosfolípido, para el caso del DOPC esta temperatura es de $50\text{ }^\circ\text{C}^{42}$, lo que se desea en este paso es que el lípido pase de su estado líquido a un estado gel-sólido.
- Dentro del matraz de depósito del rotavapor se utiliza un baño de recirculación con una temperatura baja la cual es necesaria para la condensación del solvente orgánico.
- Se utiliza una bomba de vacío para acelerar el proceso de evaporación.
- La solución se mantendrá en estas condiciones por alrededor de 2 h.

3.- Transcurridas las 2 h el solvente debería estar completamente evaporado y se debería observar una película blanca, el cual es un indicador de que el solvente fue completamente extraído de la solución.

4.- Finalizado el proceso de evaporación del solvente se obtuvo una película delgada de lípidos, lo que se tiene en la película es una superposición de varias bicapas lipídicas, de la cual se obtendrán los liposomas, mediante un proceso de hidratación.

- Para la hidratación se retira el matraz del rotavapor, primeramente, liberando el vacío.
- Se hidrata con agua: etanol 85:15 utilizando una micropipeta.
- Se fija de nuevo una velocidad la misma que se utilizó en el paso anterior.
- Se vuelve a sumergir en el baño térmico a la misma temperatura.
- Con esto la película se empezará a hidratar.
- Durante el proceso se podrá observar cómo se forman agregados, por lo cual se debe detener el proceso y deshacerlos mediante ondas de ultrasonido, utilizando un sonicador intercaladamente por nomas de un minuto o hasta que a simple vista la solución sea lo más homogénea posible, ya que si se deja por mucho tiempo los etosomas se empezaran a romper y provocara que se formen SUV.

- Se procede a colocar el matraz en el rotavapor con los mismos parámetros mencionadas antes durante aproximadamente 1 h, tomando en cuenta que si se vuelven a formar agregados se debería seguir los pasos anteriores.
- Al finalizar esto se obtiene etosomas multilamelares los cuales son dispersados un par de segundos con ondas ultrasónicas.

3.2 Rh encapsulado en Etosomas

En esta sección se describe el procedimiento utilizado para encapsular el Rh en los etosomas.

El método es el mismo que el anterior de la parte 3.1, con ciertas variaciones en la hidratación.

En la parte 3.1 al transcurrir las 2 h el solvente debe de estar completamente evaporado formando una película blanca y se procede hacer la hidratación de la película la cual es efectuada con el extracto de Rh en una solución de agua: etanol 85:15, utilizando los mismos parámetros anteriores.

Durante las 2 h restantes de hidratación se puede observar cómo se forman agregados, por lo cual se detiene el proceso y se procede deshacer los cúmulos mediante ondas de ultrasonido, una vez que el aglomerado es disuelto se continúa con el mismo proceso.

Transcurridas las 2 h, el Rh se encuentra encapsulado en los etosomas.

3.3 Caracterización: Microscopía Confocal, electroforesis, DLS

3.3.1 Conductividad (σ)

En este apartado se evaluó la conductividad (σ) de los etosomas encapsulados con Rh y sin el con una solución de agua: etanol 85:15 respectivamente, como se puede ver en la Tabla 3.3.1.

Muestra	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Etosomas	9.51
Etosomas + Rh	40.4

Tabla 3.3.1. Conductividad de los etosomas.

El extracto presenta una conductividad de 314 $\mu\text{S}/\text{cm}$ por lo que el aumento en la conductividad se debe a la aportación de los iones contenidos en el extracto de Rh, estos iones son de magnesio, sodio entre otros y esto promueve el aumento en la conductividad, la aportación a la conductividad de la mezcla agua:etanol (85:15 vol/vol) es de 0.9 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

3.3.2 UV-Vis de etosomas y etosomas + Rh

En esta sección se analiza el UV-Vis del extracto de Rh, también a los etosomas con el extracto y por último a los etosomas solamente con agua: etanol 85:15.

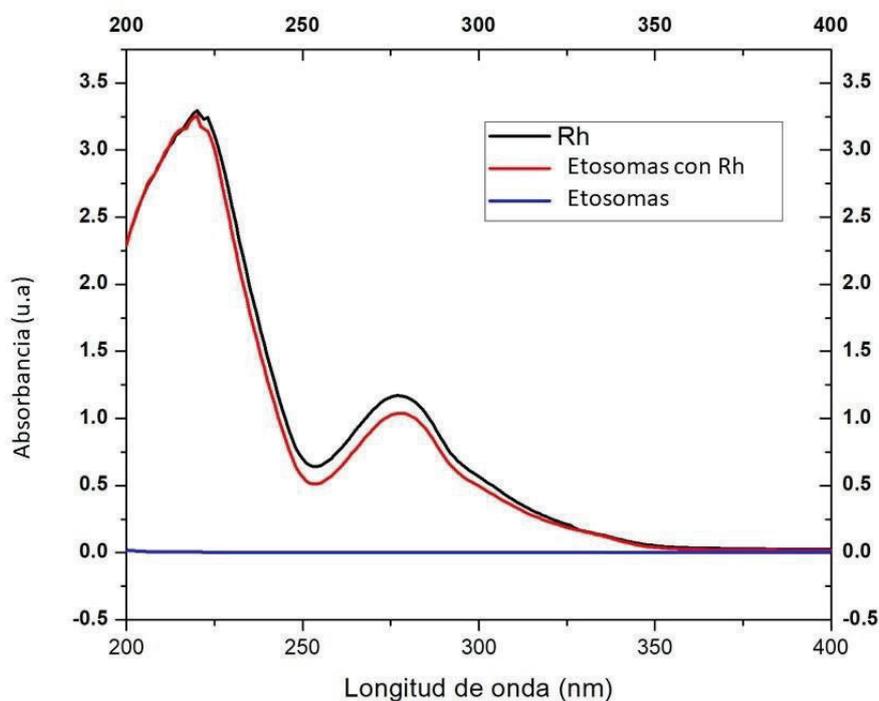


Figura 3.3.1. UV-Vis etosomas, Rh y etosomas con Rh.

En la Figura 3.3.1. se muestran 2 tipos de etosomas y el extracto por sí solo, como se puede observar el Rh y los etosomas con Rh muestran un comportamiento muy similar, mientras que los etosomas que no contienen el extracto no muestran cambio de ninguna manera en su absorbancia.

3.3.3 Distribución de tamaños

En esta sección se hablará de los métodos que se utilizaron para obtener los tamaños de las muestras de etosomas.

Para la distribución de tamaños se utilizó una imagen obtenida mediante un microscopio óptico y fue medido mediante el programa Image J, se midieron 400 partículas en total, las cuales pertenecían a varias muestras de diferentes concentraciones cada una.

En la Figura 3.3.1. se muestra dos gráficas las cuales representan las mediciones realizadas mediante el método de conteo mencionado anteriormente. En la gráfica se puede observar que se mencionan dos tipos de etosomas los que contienen extracto y los blancos.

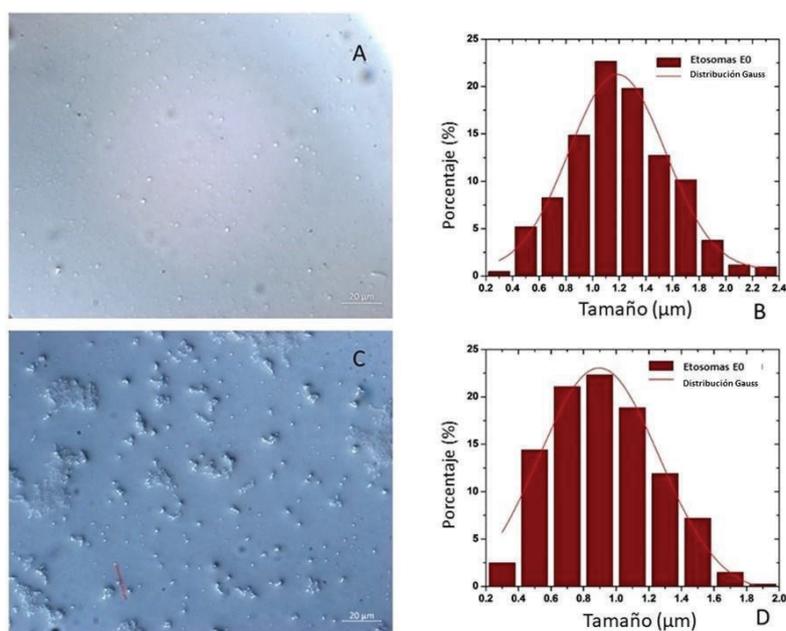


Figura 3.3.2. Distribución de tamaños.

Los tamaños que se obtuvieron se muestran en la Tabla 3.3.2.:

Muestra	Tamaños (µm)
Etosomas	1.20 ± 0.37
Etosomas + Rh	0.924 ± 0.31

Tabla 3.3.2. Tamaños de los etosomas medidos por Image J.

Se puede observar el tamaño son relativamente parecidos, los etosomas con extracto muestran un ligero tamaño más pequeño, mientras que los blancos están por arriba de la micra.

Kapoor and Burgess observan que el incremento en la carga va acompañado por el decrecimiento en el tamaño de la partícula. Esto lo atribuyen a la mayor repulsión entre las cabezas de lípidos cargados, lo cual incrementa el radio de curvatura de la capa lipídica dando por resultado partículas de menor tamaño.⁴³ Stetter and Hugel realizan un estudio sobre la influencia del etanol en las propiedades mecánicas de membranas y observan que cuando el etanol se agrega a una solución acuosa inmersa en una membrana lipídica, las moléculas de etanol son adsorbidas en la interface lípido/agua con sus grupos metilos dirigidos al núcleo hidrofóbico, estos desplazan las moléculas de agua y forman enlaces de hidrógeno con los grupos fosfato y carbonilo. Esto genera un incremento en el área efectiva de la cabeza y como consecuencia un decrecimiento en la interacción entre las cabezas. Debido a que las bicapas de lípidos se pueden considerar aproximadamente como incompresibles, el aumento del área efectiva de la cabeza de grupo y por lo tanto, el área superficial de la bicapa, debe conducir a un adelgazamiento de la membrana. Una importante consecuencia de la reducción de la interacción entre las cabezas es un decrecimiento en el parámetro de orden de las cadenas hidrocarbonadas, lo cual resulta en la reducción del módulo de Young. El modelo propuesto para la interacción etanol membrana se observa en la Figura 3.3.2. el modelo propuesto determina que el grosor de la membrana disminuye y se produce un incremento en el área de membrana. Además se reduce el parámetro de orden de las cadenas hidrocarbonadas.⁴⁴

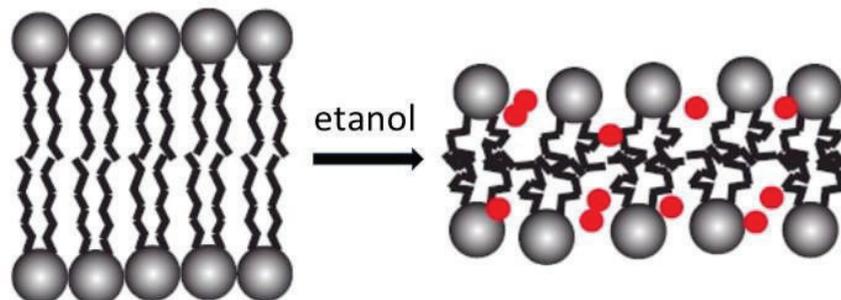


Figura 3.3.3. Interacción de etanol en la membrana lipídica.⁴⁴

3.3.4 Distribución de tamaños mediante DLS

Otra manera en la que los etosomas fueron medido y comparado con los anteriores fue en el instrumento ZetaSizer Nano mediante DLS, la Figura 3.3.4 muestra los resultados obtenidos en la muestra de etosomas en blanco.

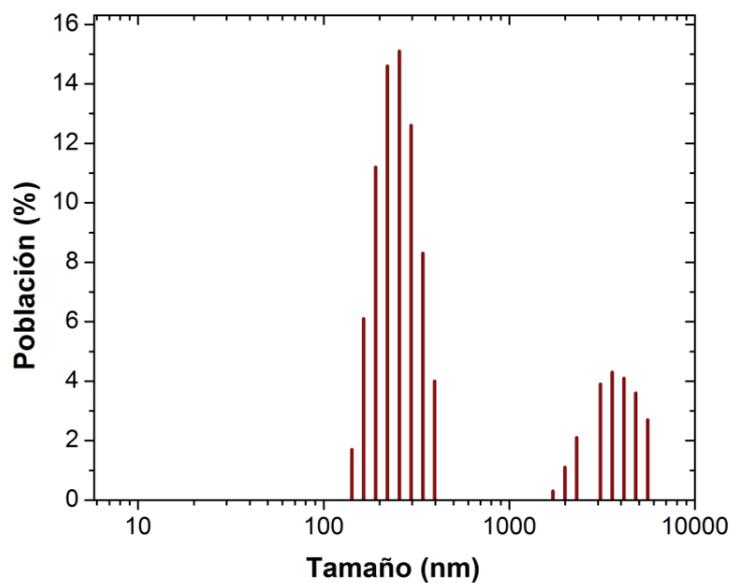


Figura 3.3.4. Distribución de tamaños para etosomas.

En la Figura 3.3.5, se muestran los datos arrojados por la muestra que contiene a los etosomas con el extracto de Rh.

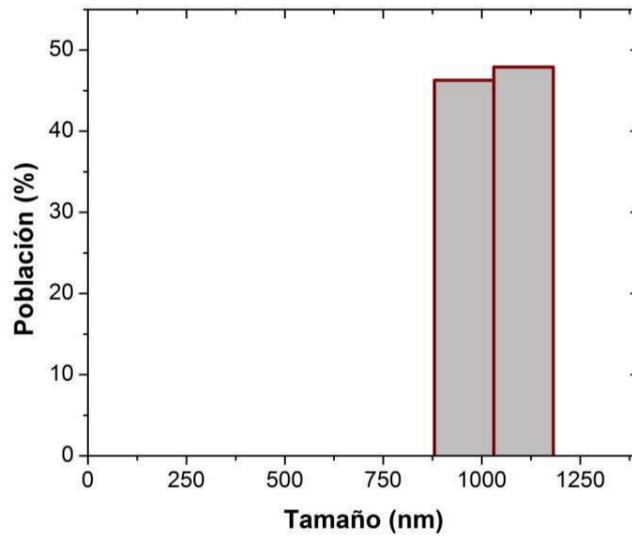


Figura 3.3.5. Distribución de tamaños para etosomas con Rh.

Al momento de comparar los resultados de los dos métodos se puede observar que los etosomas con Rh son de tamaños similares.

3.3.5 Potencial Zeta

En esta sección se evaluó ζ de los etosomas con y sin el extracto Rh.

La Figura 3.3.6 muestra la medición sin el extracto.

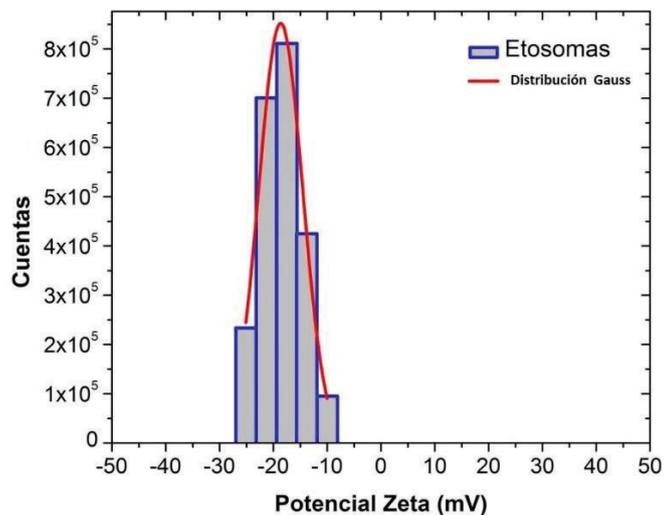


Figura 3.3.6. Distribución de ζ de los Etosomas sin extracto.

La Figura 3.3.7 muestra la distribución de ζ con el extracto encapsulado en los etosomas.

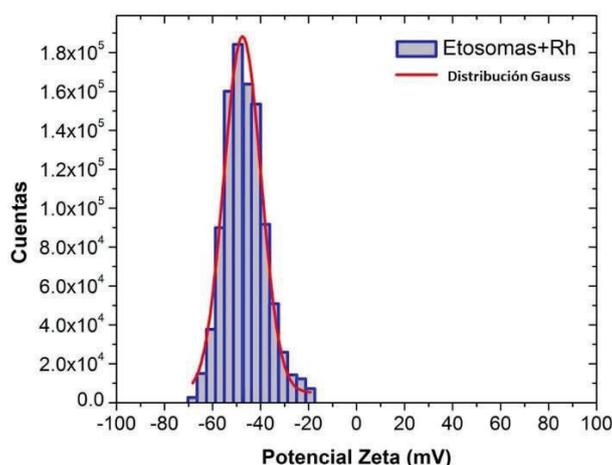


Figura 3.3.7. Distribución de ζ etosomas con extracto encapsulado.

El ζ de los etosomas es de -18.8 mV, mientras que los etosomas más extracto presenta ζ de -50.2 mV.

Esta variación de ζ sugiere modificaciones en la superficie del etosoma, modificado al agregarse moléculas bioactivas al sistema además las moléculas de etanol se insertan entre las moléculas de fosfolípido la parte hidrofílica de la molécula de etanol se une a la cabeza polar y la parte hidrofóbica a las colas hidrocarbonadas, el ion OH aporta carga negativa al sistema. a la aportación del etanol al interaccionar con la membrana Helgi I. Ingólfsson and Olaf S. Andersen sugieren que la actividad biológica del alcohol se genera por los cambios producidos por el alcohol (ellos hablan en general de los alcoholes con distintas longitudes de cadena) en las propiedades de la membrana, estas propiedades son el módulo de flexión, la permeabilidad iónica, la tensión interfacial, la temperatura de transición de fase, la hidratación entre otras. El cambio en la permeabilidad iónica es una propiedad que probablemente tenga influencia en el aumento de ζ , debido a los iones que puedan estar disueltos en el extracto.^{45,46}

3.3.6 Microscopía Confocal

En esta sección se analizarán las imágenes tomadas con el microscopio confocal, donde las muestras observadas son de los etosomas encapsulados, sin encapsular y por otra parte los etosomas fueron marcados con un fluorocromo (NBD).

Los etosomas de la Figura 3.3.8 son sin encapsulación.

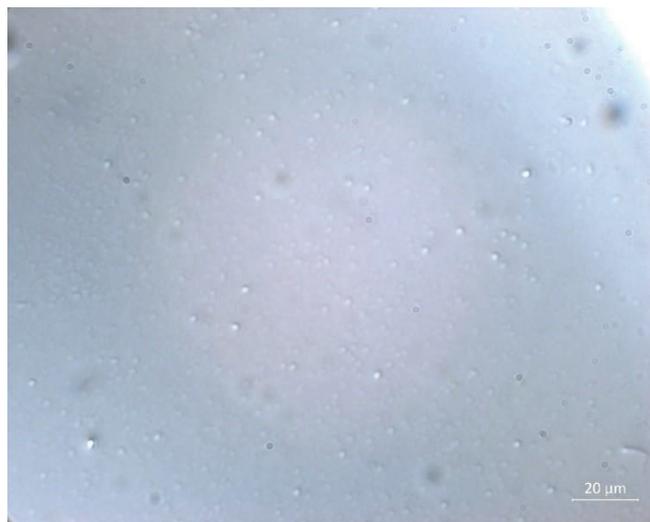


Figura 3.3.8. Etosomas sin Rh.

La Figura 3.3.9 muestra los etosomas encapsulados con Rh.

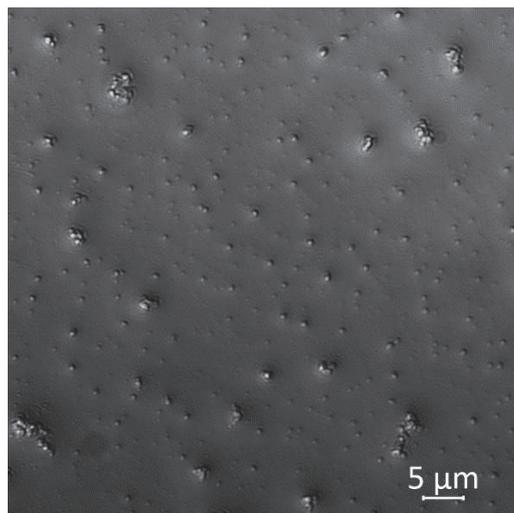


Figura 3.3.9. Etosomas con Rh, observados por microscopía óptica.

La Figura 3.3.10. muestra una imagen de 10 μm , donde se observan los etosomas marcados con un fluorocromo NBD (4cloro-7nitrobenceno-2-oxal-diazol) el cual está unido a la fosfatidiletanolamina (PE) o cefalina, con un promedio de tamaños de 1.456 μm , esta medición se realizó con image J. Estos etosomas fueron excitados con una longitud de onda de 488 nm y emite en 540 nm.

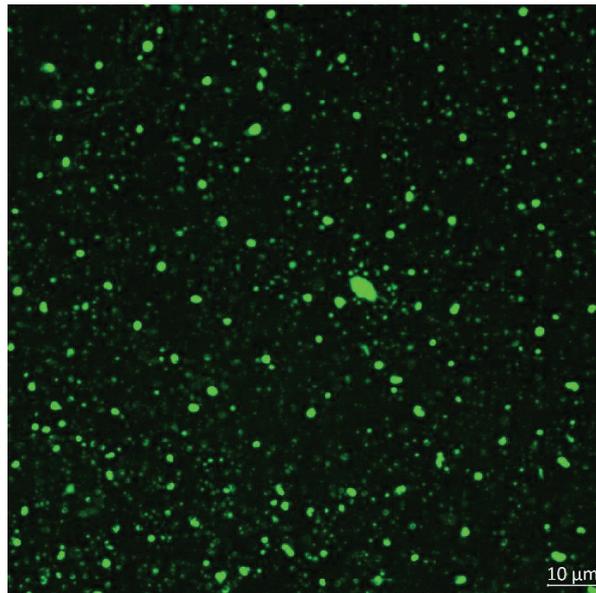


Figura 3.3.10. Etosomas marcados y excitado con 488 nm de longitud de onda (40X).

La siguiente Figura 3.3.11 muestra un etosoma aislado y se observan claramente delimitada su estructura y muestra la emisión en verde del fluorocromo NBD-PE colocado en la superficie del etosoma, el interior contiene extracto de Rh y no se observa extracto disperso en el solvente.

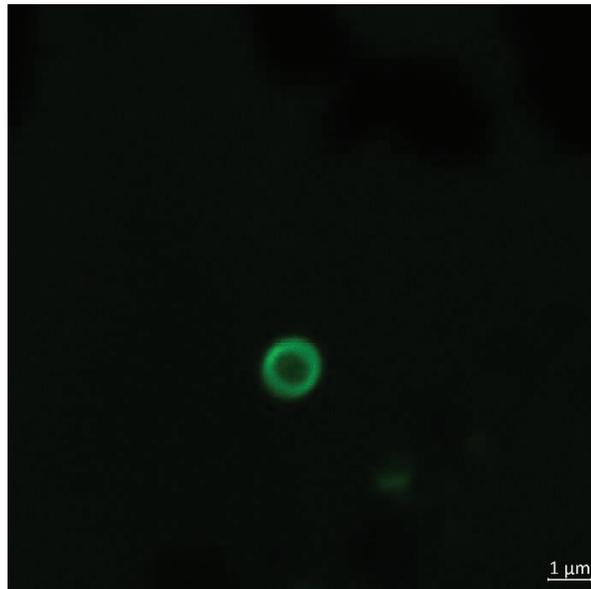


Figura 3.3.11. Etosomas ultra centrifugados.

3.4 Caracterización de la separación de tamaños por ultracentrifugación: mediante UV-Vis, Microscopía Confocal, Potencial zeta, Dispersión de tamaños

En este apartado se mostrará el método de ultra centrifugación que se utilizó para separar la mezcla homogénea de etosomas con extracto.

Para empezar a utilizar la ultracentrífuga se debe de pesar los tubos que contiene el extracto y verificar que el peso de los dos sea parecido para que no haya un desbalance y estropee el rotor o la máquina, una vez que esto esta echo se procede a colocar en la cabeza los tubos en direcciones opuestas para conservar el balance.

Una vez que está listo lo demás se introdujeron los datos deseados en la ultracentrífuga las rpm, tiempo, vacío y temperatura, las cuales fueron 50,000 rpm, a una Temperatura de 4°C, por 60 min.

Una vez que todo está listo la cabeza se coloca en el motor con la muestra en su interior se procede a cerrar la capsula y esperar a la temperatura deseada y el vacío y se comienza el proceso de 50,000 rpm por 60 min.

Una vez que ha transcurrido el tiempo en la muestra se observó el botón que se formó de etosomas, se extrae el sobrenadante y se procedió a pesar los tubos con y sin el botón, los pesos fueron los siguientes:

Para la muestra se obtuvo que el tubo sin los etosomas peso 1.2825 g mientras que con el botón obtuvo un peso de 1.3031 g esto nos dice que 0.0206 g pertenecen a los etosomas que quedaron de la solución con el extracto.

La muestra se re-suspendió en agua:etanol 85:15, para su análisis de UV-Vis, Microscopía Confocal, μ_e , Dispersión de tamaños.

3.4.1 Conductividad (σ)

Se evaluó la conductividad por medio de ζ , con la muestra re-suspendida en agua: etanol 85:15, la medición obtenida de la $\sigma = 70.4 \mu\text{S}/\text{cm}$.

3.4.2 UV-Vis de etosomas ultracentrifugados

En el análisis que se hizo de UV-Vis para los etosomas del precipitado re-suspendido y del sobrenadante, como se observa en la Figura 3.4.1. Lo cual indica que el extracto fue casi totalmente removido y solamente quedó el extracto que contienen los etosomas en su interior.

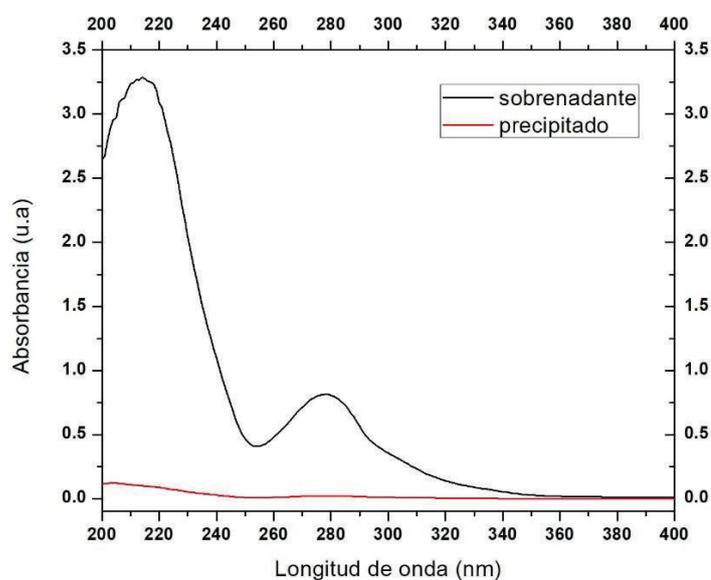


Figura 3.4.1. UV-Vis de etosomas ultracentrifugados.

3.4.3 Distribución de Tamaños por DLS

En esta sección se midió el tamaño de los etosomas por DLS, de una muestra que fue ultra centrifugada, los datos que nos muestra la Figura 3.4.2.

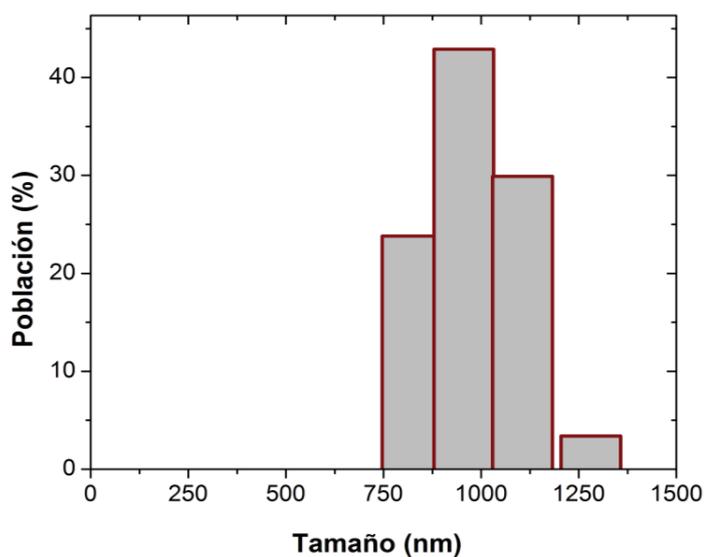


Figura 3.4.2. Distribución de tamaños Ultra centrifugación por DLS.

3.4.4 Potencial Zeta

Para el resultado de ζ se obtuvo, en promedio, $\zeta = -27.6\text{mV}$, como estas se encuentran por debajo del rango de los -30 mV^{47} , esto nos dice que las partículas no se encuentran en un rango de estabilidad, lo que indica que los etosomas podrían llegar a hacer que los etosomas se “adhieran” entre ellos, provocando agregaciones o que la solución se sedimente.

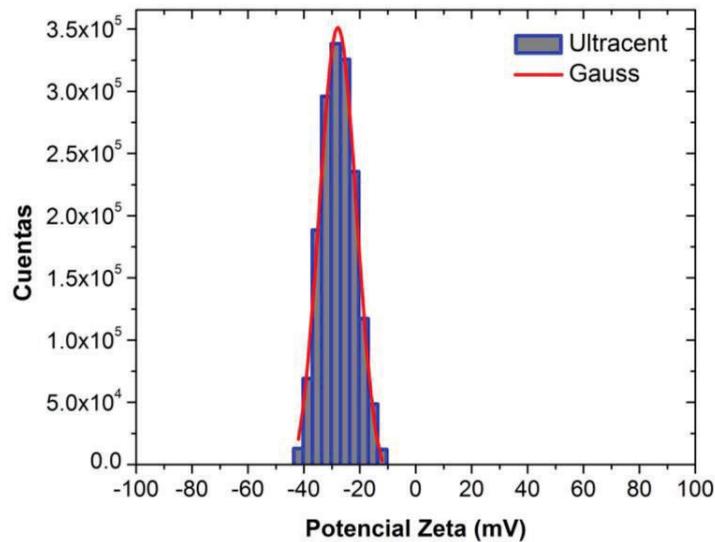
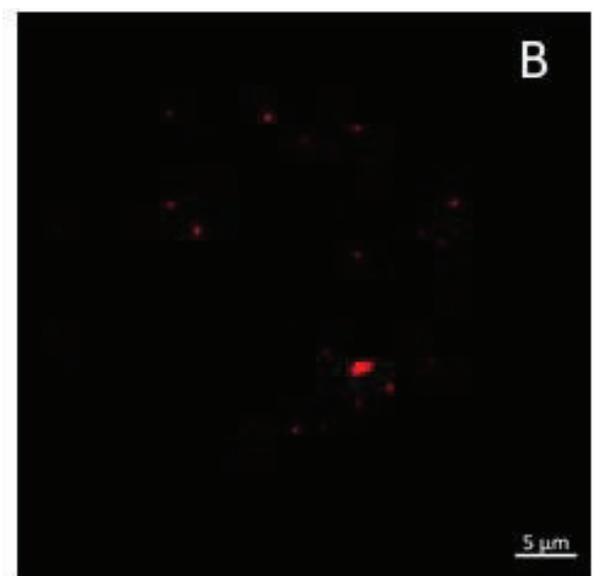
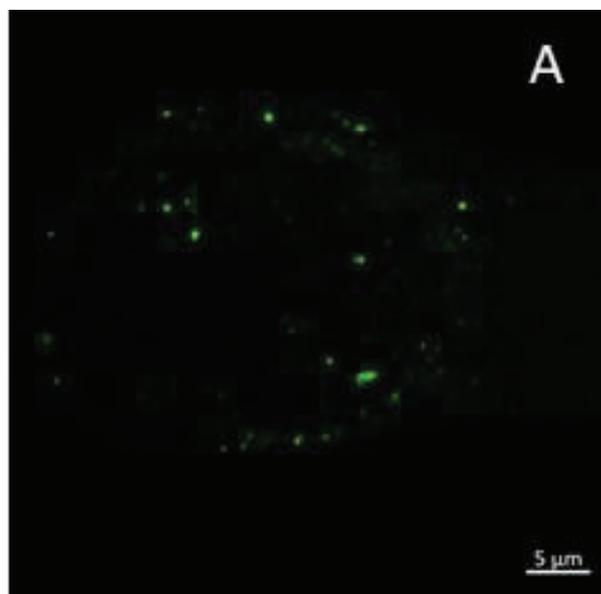


Figura 3.4.3. Potencial Zeta de etosomas con Rh ultracentrifugados.

3.4.5 Microscopía confocal

Una muestra de 10 μL de los etosomas ultracentrifugados y resuspendidos en una mezcla de agua: etanol y fueron sonicados por 5 s y depositados en un portaobjeto limpio la cual fue protegida por un cubreobjeto el cual se selló utilizando barniz transparente. Posteriormente se observó en un microscopio confocal de barrido láser LSM800 de Carl Zeiss. En la Figura 3.4.4 A observamos etosomas del orden de 1 μm los cuales fueron excitados a una longitud de onda de 405 nm y observamos en la región de los 535 nm. El color verde es característico del fluorocromo NBD, posteriormente se excitó a 535 nm y se observó una emisión en la región de los 650 nm finalmente se realizó la observación simultanea de las dos excitaciones obteniendo la Figura 3.4.4 C. La separación del extracto que permanecía en el solvente fue separado por medio de ultracentrifugación mediante el procedimiento descrito antes. En este caso podemos observar relativamente pocas estructuras y la forma de las mismas ya no es esférica, pues se aprecia deformación de la estructura esto debido presumiblemente a la combinación de fuerzas ejercidas al ser sometidas a ultracentrifugación. El procedimiento de separación además generó aglomeración de los etosomas y disminuyó ζ a casi la mitad. La observación de las fotografías confirma que el extracto no se encuentra disperso en el medio la fluorescencia es delimitada a las estructuras.



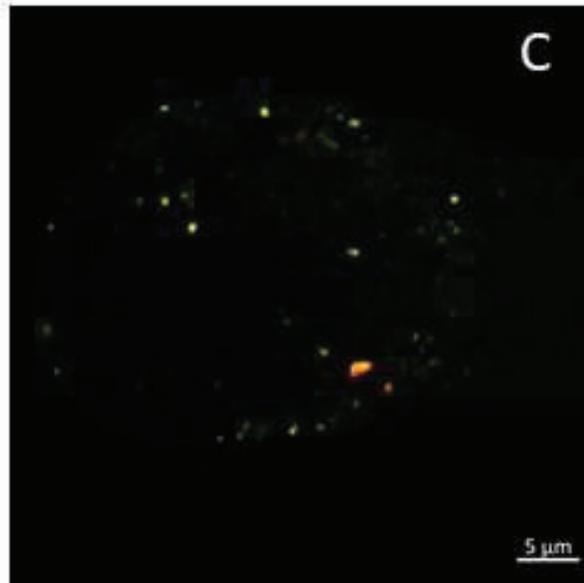


Figura 3.4.4. Microscopia confocal etosomas ultra centrifugados a 100X, donde en A se muestra la fluorescencia del fluorocromo el cual es excitado con 488 nm, B se muestra la fluorescencia del extracto el cual es excitado con una longitud de onda de 561 nm, C muestra las dos longitudes de onda.

3.5 Caracterización de la separación de tamaños por microfiltración: mediante UV-Vis, Microscopía Confocal, Potencial zeta, Dispersión de tamaños

En este apartado, al igual que en el anterior, se mostrará un método de separación de la mezcla de etosomas con el extracto en solución, en este método la diferencia es que se utilizó una centrifuga a 14,000 rpm y un filtro de 0.1 μm donde se colocó 0.500 mL de solución durante 5 min.

Al extraer la muestra de la centrifuga se observó como en el filtro quedaron residuos los cuales fueron suspendidos en el mismo volumen, y se procedió a obtener las mediciones de UV-Vis, Microscopía Confocal, Potencial zeta, Dispersión de tamaños.

3.5.1 Conductividad

Se evaluó la conductividad por medio de μ_e , con la muestra re-suspendida en agua: etanol 85:15, el resultado de esta medición fue que la $\sigma = 45.4 \mu\text{S/cm}$

3.5.2 UV-Vis de etosomas microfiltrados

En la Figura 3.5.1. se puede observar como el botón que quedo en el filtro después de someterse a una centrifugación tiene un pico más pequeño que el sobrenadante lo cual nos quiere decir que, efectivamente hubo una disminución en la absorbancia, esto nos dice que se retiró parte del extracto en el cual estaban en suspensión. Lo que indica que disminuyo la concentración.

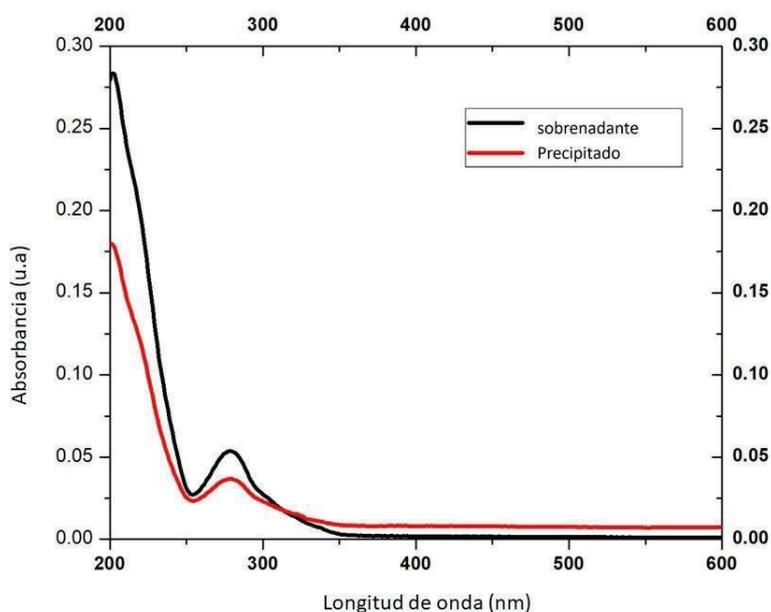


Figura 3.5.1. UV-Vis de etosomas microfiltración.

En la Figura 3.5.1. se puede observar como el botón que quedo en el filtro después de someterse a una centrifugación tiene un pico más pequeño que el sobrenadante lo cual nos quiere decir que, efectivamente hubo una disminución en la absorbancia, esto nos dice que se retiró parte del extracto en el cual estaban en suspensión. Lo que indica que disminuyo la concentración.

3.5.3 Distribución de tamaños por DLS

Los resultados de este estudio de medición de tamaños por DLS, lo cual se muestra en la Figura 3.5.2, estos tamaños fueron medidos de una muestra de etosomas con extracto y microfiltrados.

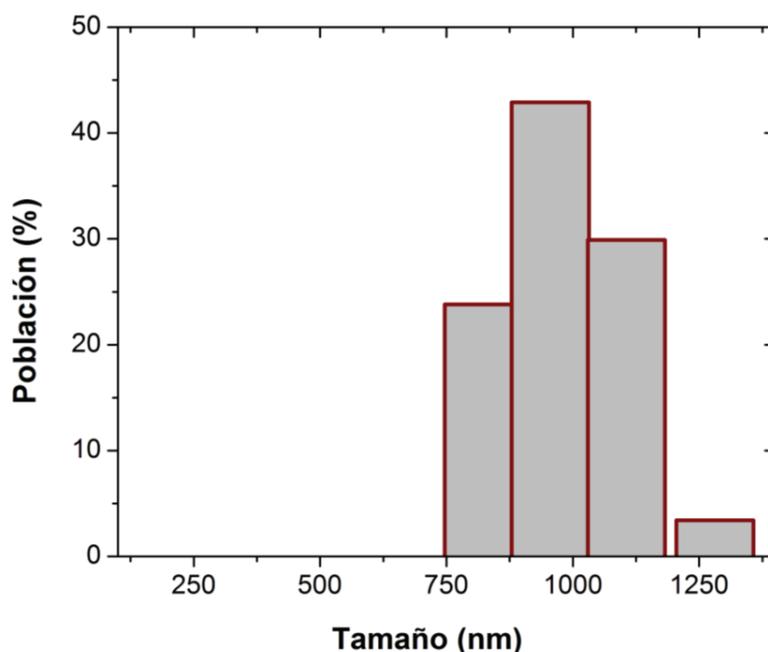
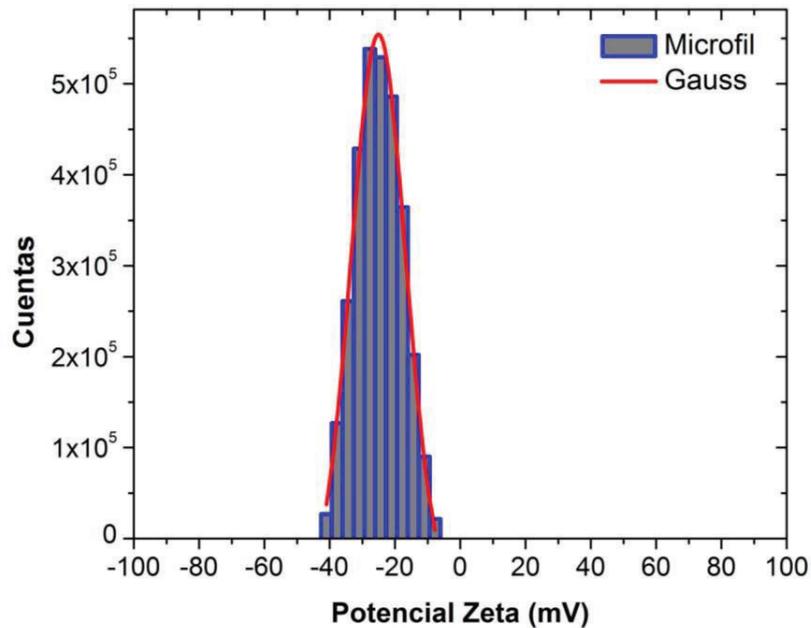


Figura 3.5.2. Distribución de tamaños microfiltración por DLS.

3.5.4 Potencial Zeta microfiltración

En la Figura 3.5.3. se muestra el ζ de los etosomas con Rh micro filtrados donde el promedio de la medición $\zeta = -25.3$ mV, estos etosomas se encuentran fuera del rango de $\zeta = -30$ mV, el proceso de microfiltración así como el de ultracentrifugación generan etosomas de mayor tamaño o con aglomeración, presumiblemente debido a las fuerzas externas a las que se ven sometidos.



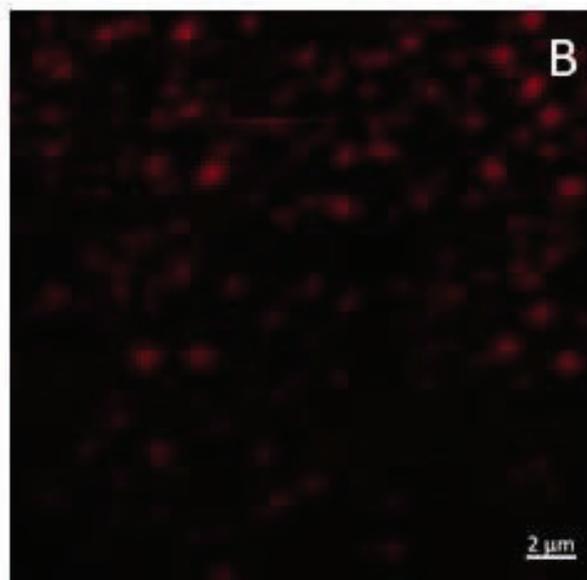
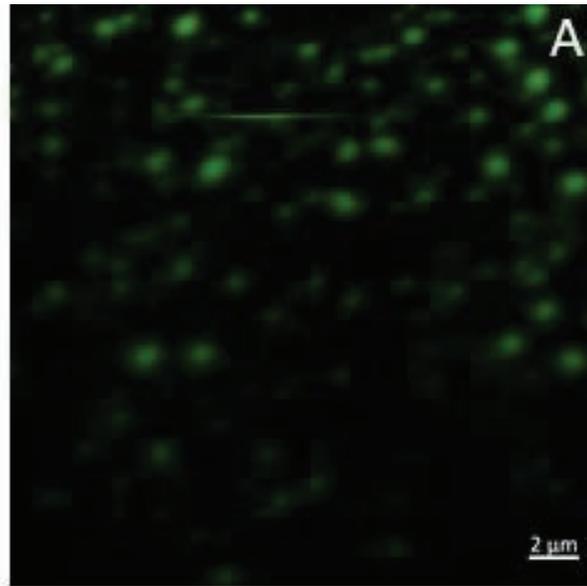
3.5.3. ζ de etosomas con Rh microfiltrados.

Al comparar las Figuras 3.3.5., 3.4.3. y 3.5.4., se tiene que ζ para la primera es de -50.2 mV, para la segunda -27.6 mV y la tercera -25.3 mV, como se puede observar los etosomas que contienen el extracto de Rh el cual es -50.2 mV tienen un ζ menor que los -30 mV, lo cual indica que la interacción electrostática de repulsión entre ellos es lo suficientemente grande como para evitar que se aglomeren o que la solución se sedimente.

3.5.5 Microscopía confocal

Para las muestras sometidas a microfiltración se siguió el procedimiento descrito anteriormente para su observación por microscopía confocal, las muestras fueron observadas con un objetivo 100X de inmersión en aceite y se observa mayor cantidad de etosomas para la misma cantidad de muestra. En la Figura 3.5.4 A-C una característica importante es que se observan estructuras esféricas principalmente y los tamaños no muestran cambios apreciables con respecto a los etosomas con Rh que no fueron sometidos a separación del solvente. Podemos observar que el extracto no se encuentra disperso en el medio y que los etosomas presentan emisión tanto del fluorocromo NBD agregado como la emisión atribuida al extracto. No se observa aglomeración de los etosomas, sin embargo en este caso ζ

disminuyó a la mitad igual que en el caso del método de ultracentrifugación. Este resultado nos permite determinar que el extracto tiene una importante aportación de carga al sistema, ζ del extracto de Rh es de -27 mV, en tanto que ζ del DOPC disuelto en buffer de fosfatos es de +3.1 mV esto implica que el etanol tiene una aportación importante de carga negativa que contribuye al cambio de ζ .



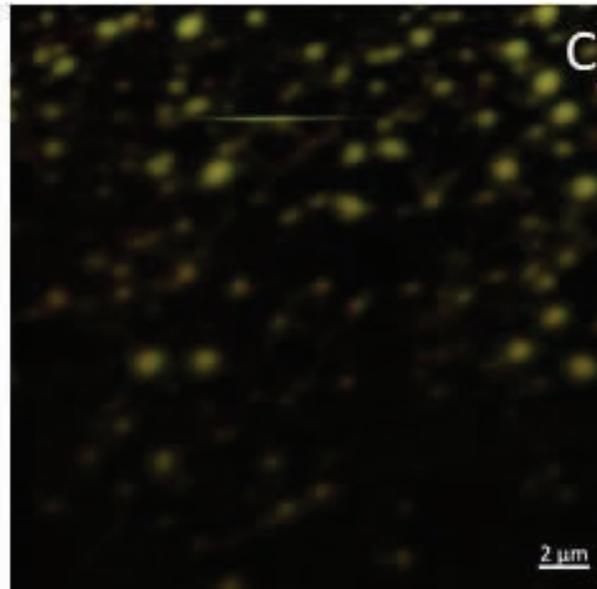


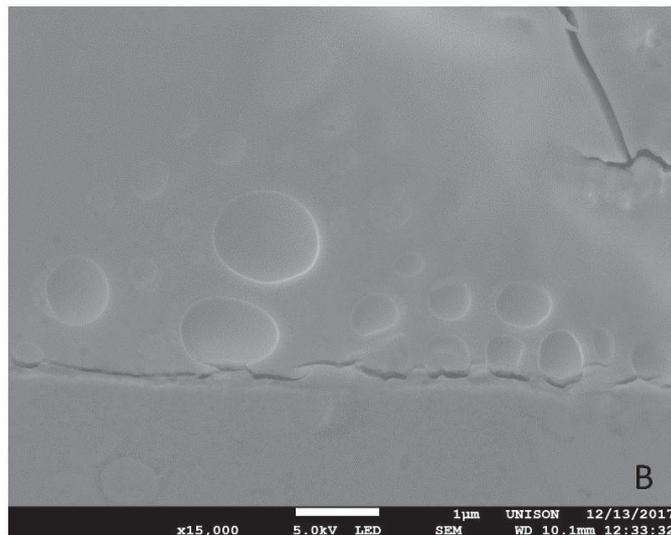
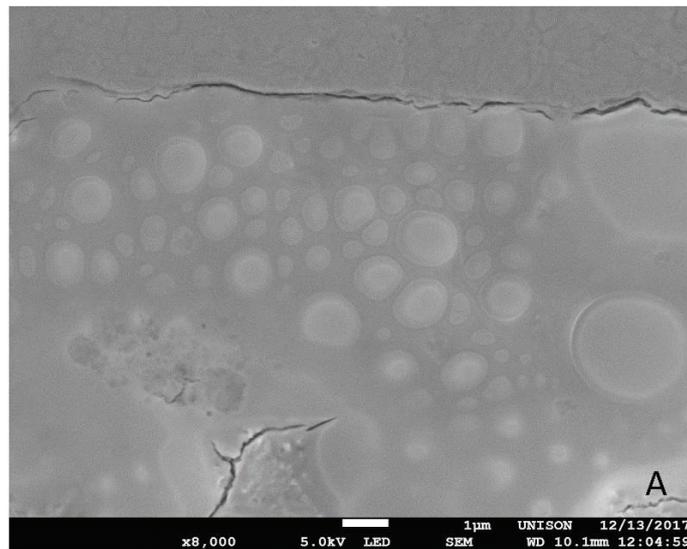
Figura 3.5.4. Etosomas microfiltrados vistos a 100x, donde en A se muestra la fluorescencia del fluorocromo el cual es excitado con 488 nm, B se muestra la fluorescencia del extracto el cual es excitado con una λ de 561 nm, C muestra las dos λ empalmadas una sobre la otra.

3.6 Tinción Negativa de Etosomas con Biomoléculas de Extracto de Rh encapsuladas

Los etosomas que se muestran en la Figura 3.7.1. fueron obtenidas por medio de la técnica de tinción negativa. Se agregaron 5 μ L de muestra sobre una rejilla de cobre de 400 mesh del tipo holey carbon, posteriormente se agregó 15 μ L de una solución de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) al 2%. Esta solución se retira de la superficie de la muestra después de transcurridos 30 s y se deja secar por espacio de 2 h. Las muestras se preparan 24 h antes de su observación. Se utilizó un equipo de microscopía electrónica de barrido con emisión de campo de ultra-alta resolución JEOL JSM-7800F.

Podemos observar en la Figura 3.7.1 A-C estructuras que han sufrido deformación presumiblemente por efecto del tungsteno depositado en la superficie para lograr el contraste con el solvente, las estructuras son de diferentes tamaños y se encuentran bien delimitadas y

no se observa ruptura en la membrana. Las imágenes que se muestran corresponden a un aumento de 8000X, 15000X y 20000X de A-C respectivamente. En la Figura 3.7.1 C se muestra una aglomeración entre tres etosomas, mismos que han sido observados por microscopía confocal. Se realizó un conteo de 50 partículas utilizando los campos de 2 fotografías en campos distintos y se obtuvo una distribución de tamaños que corresponde con los tamaños obtenidos por DLS y microscopía confocal.



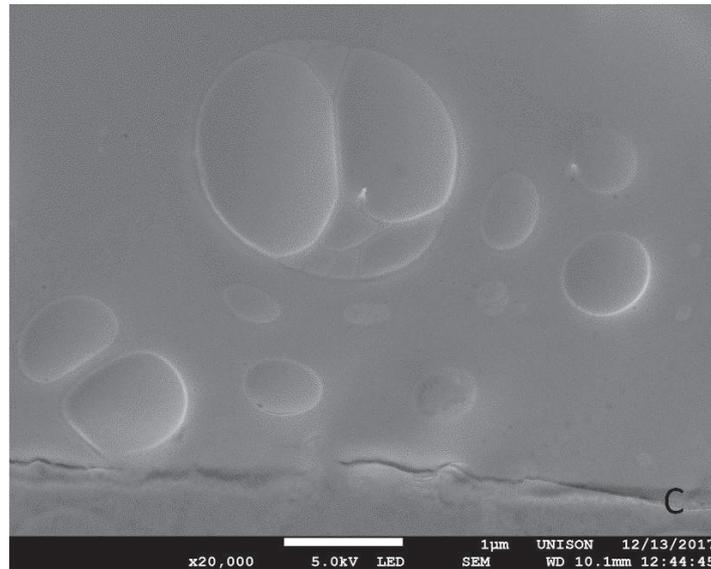


Figura 3.6.1. Tinción Negativa de Etosomas A) Muestra a 8000X, B) 15000 X y C) 20 000X.

3.7 Citotoxicidad

En esta sección se evaluó la citotoxicidad del extracto Rh encapsulado en etosomas en células mononucleares mediante el método de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), se utilizaron diferentes concentraciones. El ensayo de MTT se hizo en una placa de 96 pozos esterilizada bajo una campana de flujo laminar, el diseño de experimento para evaluar la citotoxicidad es:

Las concentraciones que se utilizaron fueron las siguientes: 25, 50, 100 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Con estas concentraciones y el método de MTT se obtuvo la proliferación de las células con los etosomas, los cuales tienen encapsulado Rh, en la siguiente Figura 3.7.1 se muestra las concentraciones y la proliferación.

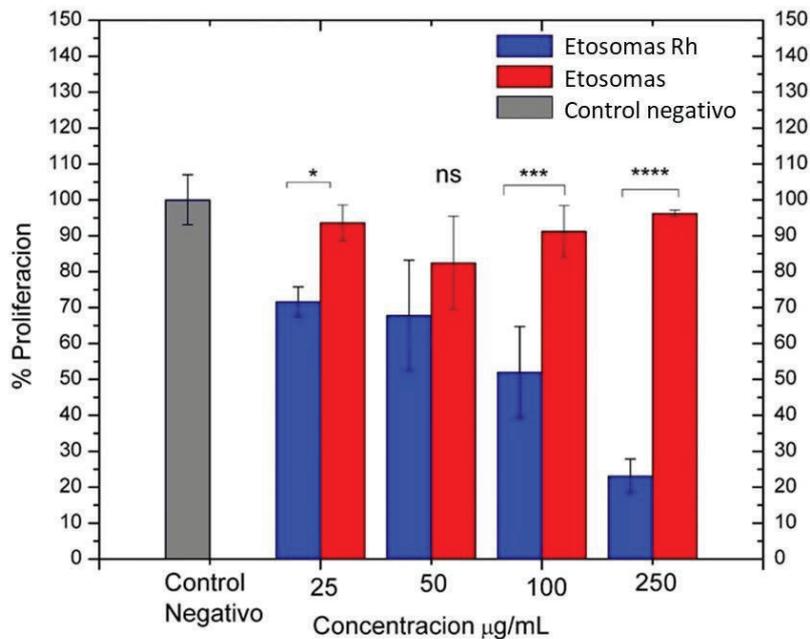


Figura 3.7.1. Porcentaje de proliferación

En la Figura 3.7.1. se muestra como la población disminuye entre más concentración de etosomas tenga, tomando como el 100% el control negativo el cual no contiene etosomas con Rh.

Las columnas en rojo son etosomas sin Rh, mientras que las azules contienen etosomas con Rh, se puede observar que el extracto provoca que la población de células disminuya mientras que con el rojo no es muy variante, pero al momento de compararla con la azul en la gran mayoría de los casos si hay una diferencia significativa, sobre todo en las concentraciones más grandes.

Con estos datos de los etosomas con el Rh se pudo obtener la LD_{50} , la cual consiste en obtener a que concentración el 50% de las células vivas murieron con el extracto, en la Figura 3.7.2, se observa la curva y el resultado el cual es a una concentración de 107 µg/mL.

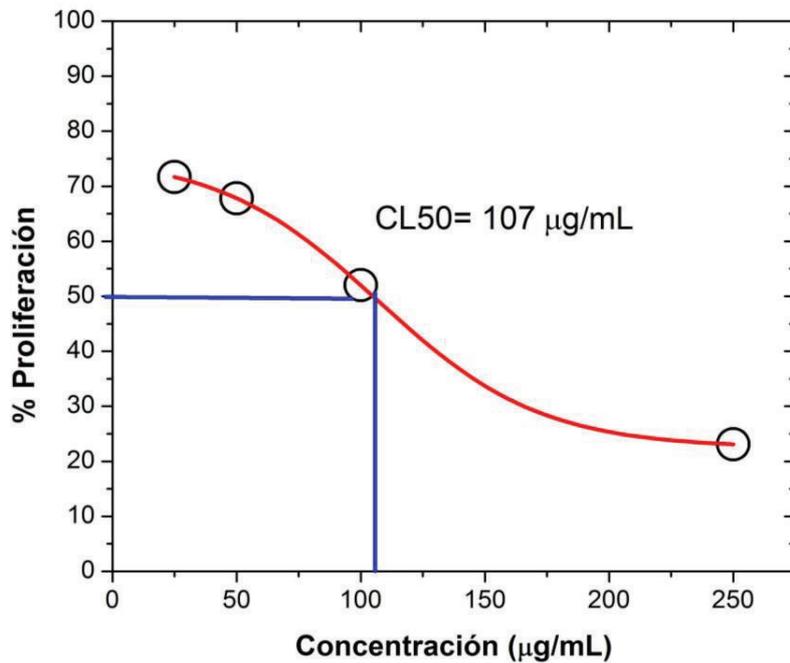


Figura 3.7.2. Concentración letal 50.

Las moléculas bioactivas obtenidas de plantas son solubles en agua, y eso implica la dificultad de pasar a través de la membrana biológica rica en fosfolípidos y por lo tanto esto genera dificultad para su absorción, las principales razones son : 1) el gran peso molecular y 2) su baja solubilidad en lípidos⁴⁸, el etanol genera fluidez en las bicapas de lípidos, Nimmathota Madhavi et. al.⁴⁹ argumentan que esto permite que los etosomas sean vesículas sintéticas maleables de tamaño por debajo de la micra y de forma esférica. En comparación con los liposomas convencionales los etosomas son absorbidos más rápidamente a través de las capas de la piel. En particular el DOPC, tiene una temperatura de transición de 50°C, lo cual implica que es factible sea utilizado en sistemas biológicos. ζ es uno de las propiedades físicas determinantes que aseguran la estabilidad de los etosomas, existen un sin número de estudios donde esta propiedad caracteriza los sistemas, Tunyaluk Limsuwan et. al.⁵⁰, discute en particular sobre la participación del etanol con carga negativa en la superficie de la membrana mejorando la estabilización por repulsión electrostática y evita por tanto la agregación de etosomas, nuestros etosomas blanco muestran un ζ del orden de -18 mV en tanto que los etosomas usados en la encapsulación alcanzan valores del orden de -50 mV (esto ocurre por el Rh) en este caso observamos que existe una participación mucho más

activa en la aportación de carga negativa a la superficie por parte de las moléculas bioactivas, el extracto libre muestra una conductividad del orden de 314 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Los resultados de citotoxicidad muestran una proliferación mayor al 90% para el caso de etosomas blanco lo que demuestra que no son tóxicos para monocitos obtenidos de sangre periférica. En tanto que para el caso de la toxicidad del 50% se obtiene para etosomas que encapsulan biomoléculas activas de Rh con una concentración de 107 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este resultado discrepa con los experimentos realizados por los autores Rodríguez et. al.⁵¹ en monocitos de sangre periférica, donde la toxicidad para el extracto de Rh en una prueba con MTT resulta ser del 70% para muestras de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y similar para el resto de las concentraciones el mismo resultado, se obtiene para pruebas realizadas por microscopía confocal de barrido láser en pruebas de (marcaje fluorescente de células vivas y muertas) live/dead como se observa en la Figura 3.8.1. Sin embargo, cabe destacar que la encapsulación de los compuestos bioactivos implica que estos puedan ser internalizados de manera más efectiva que los compuestos bioactivos que se encuentran disueltos en el medio. Un monocito tiene un tamaño promedio de 18 μm en tanto que en promedio los etosomas zwitteriónicos miden alrededor de 1 μm .

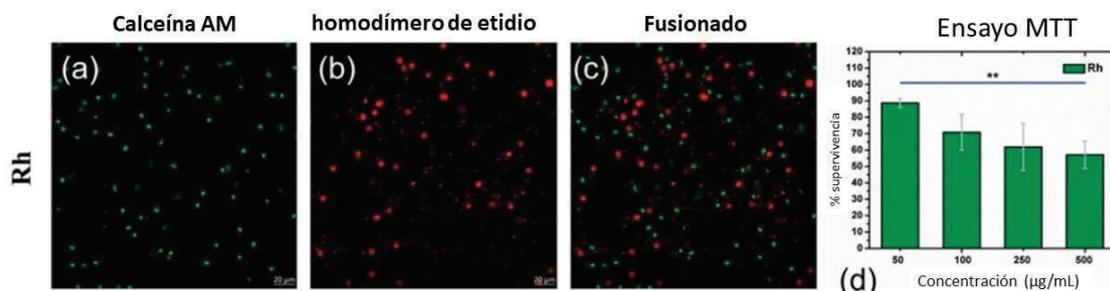


Figura 3.8.1. (a-c) Las pruebas de citotoxicidad MCB (LD Live and Dead assay) para monocitos de sangre periférica para Rh y (d) Pruebas de MTT para Rh. Adaptado de ⁵¹.

Capítulo 4 Conclusiones

El tamaño de las etosomas es del orden de $1.2 \pm 0.37 \mu\text{m}$ y para el caso de etosomas que contienen extracto el tamaño es del orden $0.924 \pm 0.31 \mu\text{m}$. Al comprar con los resultados obtenidos en la ultra centrifugación y microfiltración se obtienen tamaños de $0.955 \mu\text{m}$ y $1.106 \mu\text{m}$ respetivamente. Se puede observar que los tamaños son parecidos, esto indica que los etosomas no presentan afectación en sus tamaños por efecto del uso de ultracentrifugación y microfiltración, para la separación del extracto que queda suspendido en el solvente. La estabilidad de los mismos se determinó por medio de potencial zeta, donde se realizaron diferentes mediciones para los 4 tipos de etosomas que se obtuvieron, los etosomas solos tuvieron un $\zeta = -18.8 \text{ mV}$, los que contienen el extracto un $\zeta = -50.2 \text{ mV}$, los ultra centrifugados un $\zeta = -27.6 \text{ mV}$ y los micro filtrados un $\zeta = -25.3 \text{ mV}$. Esto nos dice que los etosomas son más estables y que evitan en mayor medida la aglomeración o sedimentación son los etosomas con el extracto ya que están por debajo del -30 mV , mientras que los demás resultados muestran una tendencia hacia la estabilidad.

Los resultados de la evaluación de citotoxicidad en monocitos usando MTT fueron realizados con los etosomas en el extracto donde la concentración letal 50 corresponde a $107 \mu\text{g/mL}$ mientras que los etosomas sin extracto no presentan citotoxicidad destacable en las mismas líneas celulares hasta a una concentración de $250 \mu\text{g/mL}$. Interesantemente, para el mismo sistema celular nuestros etosomas en extracto de Rh resultan mucho más tóxicos que el extracto de Rh en solución lo cual atribuimos a que los etosomas permiten la internalización de los compuestos del extracto en las células de forma mucho más eficiente. Este resultado respalda la hipótesis de que los etosomas funcionan como un buen vehículo como acarreadores en la liberación de compuestos de interés dentro de sistemas celulares.

Perspectivas de este trabajo

- Medir la eficiencia de encapsulación del sistema.
- Utilizar los etosomas para la encapsulación de extracto Rh para su evaluación en sistemas en vivo como antihiper glucemiante.
- Medir las propiedades mecánicas del sistema con la técnica de DLS y fuerza atómica comparándolo con las propiedades de los liposomas.
- Observar la interacción mediante la técnica de microscopía confocal de los etosomas con la membrana celular de células sanas y células cancerosas.
- Proponer modificaciones a las técnicas de formación de etosomas para obtener tamaños monodispersos.
- Determinar la interacción de las moléculas bioactivas del extracto con la membrana de los etosomas, usando técnicas como FRET en Microscopía Confocal, con el fin de determinar la localización de estas biomoléculas ya sea en la superficie de la membrana o en el interior de los etosomas.

Bibliografía

- ¹ MAGEE, W. E. et al. The interaction of cationic liposomes containing entrapped horseradish peroxidase with cells in culture. **The Journal of cell biology**, v. 63, n. 2, p. 492-504, 1974. ISSN 0021-9525.
- ² GREGORIADIS, G. Liposome research in drug delivery: the early days. **Journal of drug targeting**, v. 16, n. 7-8, p. 520-524, 2008. ISSN 1061-186X.
- ³ BHALARIA, M. K.; NAIK, S.; MISRA, A. N. Ethosomes: a novel delivery system for antifungal drugs in the treatment of topical fungal diseases. **Indian journal of experimental biology**, vol. 47 2009. ISSN 0019-5189.
- ⁴ GOINDI, S.; DHATT, B.; KAUR, A. Ethosomes-based topical delivery system of antihistaminic drug for treatment of skin allergies. **Journal of microencapsulation**, v. 31, n. 7, p. 716-724, 2014. ISSN 0265-2048.
- ⁵ MISTRY, A.; RAVIKUMAR, P. Development and Evaluation of Azelaic Acid Based Ethosomes for Topical Delivery for the Treatment of Acne. **INDIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL EDUCATION AND RESEARCH**, v. 50, n. 3, p. S232-S243, 2016. ISSN 0019-5464.
- ⁶ ZHANG, J.-P. et al. Ethosomes, binary ethosomes and transfersomes of terbinafine hydrochloride: a comparative study. **Archives of pharmacal research**, v. 35, n. 1, p. 109-117, 2012. ISSN 0253-6269.
- ⁷ RUANO ALDEA, M. Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas. 2013.
- ⁸ AKTAS, M. et al. Membrane lipids in *Agrobacterium tumefaciens*: biosynthetic pathways and importance for pathogenesis. **Frontiers in plant science**, v. 5, 2014.

- ⁹ BALL, E. Liposomas en dermatología. **Dermatología Venezolana**, v. 33, n. 1, 1995. ISSN 2343-5755.
- ¹⁰ GONZALEZ, M. L. V. Desarrollo y caracterización de liposomas para aplicación tópica de fármacos (Tesis Doctoral), Universidad de Barcelona, 2015.
- ¹¹ VOSKUHL, J.; RAVOO, B. J. Molecular recognition of bilayer vesicles. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 495-505, 2009.
- ¹² ANEIROS, P. G. Desarrollo de formulaciones transdérmicas III(Tesis Licenciatura). Universidad de Complutense, Madrid. 2016.
- ¹³ ALZATE, C. E. O. **Congelación y liofilización de alimentos**. Gobernación de Caldas, 2008. ISBN 9584444360.
- ¹⁴ WANG, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. **International journal of pharmaceutics**, v. 203, n. 1, p. 1-60, 2000. ISSN 0378-5173.
- ¹⁵ RAMÍREZ-NAVAS, J. S. **Liofilización de alimentos**. Revista ReCiTeIA, 2006.
- ¹⁶ MURILLO, M. et al. Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas. 2001. ISSN 0556-6177.
- ¹⁷ DÍAZ, R.; GAMAZO, C. Liposomas. Aplicaciones en terapia antimicrobiana y en inmunoprofilaxis. **Revista de Medicina de la Universidad de Navarra**, p. 30, 2017.
- ¹⁸ AUTE, P. P. et al. A Comprehensive Review on Ethosomes. **International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences**. 2012.

- 19 EL HADJI MAMOUR SAKHO, E. A.; OLUWAFEMI, O. S. Dynamic Light Scattering (DLS). **Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization**, v. 3, p. 37, 2017. ISSN 032346145X.
- 20 LORENZO, O. D. **Técnicas de light scattering para la caracterización de nanopartículas y moléculas**. 2013.
- 21 YEOMANS REYNA, L. **Metodos y Herramientas para el Estudio de la Materia Condensada Blanda**. Universidad de Sonora, capítulo 7, 2017. ISBN 978-607-518-244-5
- 22 PRIMER, A. Fundamentals of UV-visible spectroscopy. **Copyright Hewlett-Packard Company, Hewlett-Packard publication**, n. 12-5965, 1996.
- 23 LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, 2001. ISSN 0471142913.
- 24 MAYORAL, J. B.; MORENO, A. C.; MARTÍNEZ, E. S. M. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. **Latin-American Journal of Physics Education**, v. 8, n. 4, p. 19, 2014. ISSN 1870-9095.
- 25 SCHACHMAN, H. K. **Ultracentrifugation in biochemistry**. Elsevier, 2013. ISBN 1483270947.
- 26 Ultracentrifugation, diffusion, and viscometry. **Methods in enzymology**, v. 4, p. 32-103, 1957. ISSN 0076-6879.
- 27 LAUE, T. M. Analytical ultracentrifugation. **Current Protocols in Protein Science**, p. 7-5, 2001. ISSN 0471140864.

- 28 LODISH, H. **Biología celular y molecular**. Ed. Médica Panamericana, 2005. ISBN 9500613743.
- 29 ALBERTS, B.; BRAY, D. **Introducción a la biología celular**. Ed. Médica Panamericana, 2006. ISBN 8479035234.
- 30 ISHIKAWA-ANKERHOLD, H. C.; ANKERHOLD, R.; DRUMMEN, G. P. C. Advanced fluorescence microscopy techniques—Frap, Flip, Flap, Fret and flim. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 4047-4132, 2012.
- 31 NISTAL, Á. M. Microscopia laser confocal. **Universidad de Oviedo**. **Disponível em:** <http://www.unioviado.es/BOS/Novidades/Libro/0prefac.pdf>. **Acesso em**, v. 21, 2013.
- 32 SOTO MARFULL, C. D. Estudio cinético de la fotodegradación de 1, 4-dhidropiridinas en presencia de aminas (Tesis licenciatura). Universidad Andres Bello, Chile. 2014.
- 33 GARCÍA SUÁREZ, A. Determinación de rendimientos cuánticos de fluorescencia por métodos indirectos. **Universitario en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas**. Oviedo 2015.
- 34 NIN, G. V. **Introducción a la microscopia electrónica aplicada a las ciencias biológicas**. UNAM, 2000. ISBN 9681662407.
- 35 BECA, T. et al. Plasma rico en plaquetas: Una revisión bibliográfica. **Avances en Periodoncia e Implantología Oral**, v. 19, n. 1, p. 39-52, 2007. ISSN 1699-6585.
- 36 FREIFELDER, D. **Técnicas de bioquímica y biología molecular**. Reverté, 1981. ISBN 8429118195.

- 37 RODRÍGUEZ FLORES, J.; PALOMAR GALLEGO, M. A.; TORRES GARCÍA-DENCHE, J. Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. **Revista Española de cirugía oral y maxilofacial**, v. 34, n. 1, p. 8-17, 2012. ISSN 1130-0558.
- 38 INC.'S, S. T. Disponible en: <https://www.stemcell.com/trypan-blue.html>, **Tryan Blue** 2017.
- 39 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. ISSN 0022-1759.
- 40 ARBELÁEZ, M. B.; SALAZAR, O. A.; VARGAS, J. A. M. Método ANOVA utilizado para realizar el estudio de repetibilidad y reproducibilidad dentro del control de calidad de un sistema de medición. **Scientia et technica**, v. 1, n. 37, 2007. ISSN 2344-7214.
- 41 SEJWAL, K. et al. Proteoliposomes—a system to study membrane proteins under buffer gradients by cryo-EM. **Nanotechnology Reviews**, v. 6, n. 1, p. 57-74, 2017. ISSN 2191-9097.
- 42 LEONENKO, Z. V. et al. Investigation of temperature-induced phase transitions in DOPC and DPPC phospholipid bilayers using temperature-controlled scanning force microscopy. **Biophysical journal**, v. 86, n. 6, p. 3783-3793, 2004. ISSN 0006-3495.
- 43 KAPOOR, M.; BURGESS, D. J. Physicochemical characterization of anionic lipid-based ternary siRNA complexes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1818, n. 7, p. 1603-1612, 2012. ISSN 0005-2736.

- 44 STETTER, F. W. S.; HUGEL, T. The nanomechanical properties of lipid membranes are significantly influenced by the presence of ethanol. **Biophysical journal**, v. 104, n. 5, p. 1049-1055, 2013. ISSN 0006-3495.
- 45 TERAMA, E. et al. Influence of ethanol on lipid membranes: from lateral pressure profiles to dynamics and partitioning. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 13, p. 4131-4139, 2008. ISSN 1520-6106.
- 46 INGÓLFSSON, H. I.; ANDERSEN, O. S. Alcohol's effects on lipid bilayer properties. **Biophysical journal**, v. 101, n. 4, p. 847-855, 2011. ISSN 0006-3495.
- 47 BATALLA MAYORAL, J.; CUADROS MORENO, A.; MARTÍN-MARTÍNEZ, S. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. **Latin-American Journal of Physics Education**, v. 8, n. 4, 2014. ISSN 1870-9095.
- 48 LI, J. et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian journal of pharmaceutical sciences**, v. 10, n. 2, p. 81-98, 2015. ISSN 1818-0876.
- 49 MADHAVI, N.; SUDHAKAR, B.; RATNA, J. V. Colloidal Dispersions (Liposomes and Ethosomes) for Skin Drug Delivery and their Role on Rheumatoid Arthritis. **Asian Journal of Pharmaceutic• Jul-Sep**, v. 10, n. 3, p. 1, 2016.
- 50 LIMSUWAN, T. et al. Ethosomes of Phenylethyl Resorcinol as Vesicular Delivery System for Skin Lightening Applications. **BioMed research international**, v. 2017, 2017. ISSN 2314-6133.
- 51 RODRÍGUEZ-LEÓN, E. et al. Silver nanoparticles synthesized with Rumex hymenosepalus extracts: effective broad-spectrum microbicidal agents and cytotoxicity

study. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, p. 1-13, 2017. ISSN 2169-1401.