



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD MONTERREY

**ESTUDIO TERMODINÁMICO DE NANOACARREADORES
DE CANNABIDIOL SOBRE MODELOS DE MEMBRANA**

Tesis que presenta:

Francisco Antonio López Pérez

Para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA Y FÍSICA
BIOMÉDICAS**

Directores:

Dr. Jesús Carlos Ruiz Suárez

Dr. Francisco Javier Sierra Valdez

DEDICADO A...

Este trabajo está dedicado a mi familia, a mi esposa por creer en mí, y apoyarme incondicionalmente en los proyectos de mi vida. A mi hijo; que es el principal motivo por el cual trato de ser mejor día a día, y a mis padres y hermanos que siempre me han animado para seguir adelante. Siempre los tengo cerca a pesar de la distancia.

Muchas gracias por todo su amor. Esto es para ustedes con amor Frank

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios por permitirme lograr un éxito más en esta vida. También, agradezco al CONACHYT por el apoyo brindado para la manutención durante el posgrado.

En segundo lugar, agradezco al CINVESTAV unidad Monterrey, por todas las facilidades prestadas y la oportunidad de poder cursar esta maestría en sus instalaciones. Así, agradezco al Dr. Carlos Ruiz y al Dr. Francisco Sierra por confiar en mí y permitirme ser su tesista.

De igual forma, agradezco a mi familia, que a pesar de que están lejos siempre me llenaron de motivación y ánimos para seguir adelante durante este trayecto.

Por último, pero no menos importante, agradezco a cada uno de los compañeros que fueron parte de mi travesía por esta institución, y en especial agradezco al colega Luis del Tecnológico de Monterrey, quién nunca escatimó en apoyar cuando se necesitó de su ayuda. También, agradecer a la Doctora Angela Jaramillo por ser mi mentora durante unos meses. Agradezco a cada uno de los amigos encontrados en esta ciudad, personas que pasaron de ser desconocidos a ser grandes amigos y compañeros.

A todos ustedes mis estimados," MUCHAS GRACIAS"

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 MEMBRANA CELULAR	8
1.2 CANNABIDIOL	9
1.3 NANOACARREADORES	11
1.3.1 LIPOSOMAS	13
1.3.2 NANOEMULSIONES	15
1.3.3 DIMETIL SULFÓXIDO (DMSO)	16
1.3.4 ETANOL	19
2. HIPÓTESIS	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 GENERAL	21
3.2 ESPECÍFICOS	21
4. METODOLOGÍA	22
4.1 PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS (NANOACARREADORES Y MODELOS DE MEMBRANAS BLANCO)	24
4.2 PREPARACIÓN DE NANOEMULSIÓN DE ACEITE DE LINAZA CON CBD	26
4.3 PREPARACIÓN DE ACARREADOR DMSO y ETANOL	27
5. TÉCNICAS	28
5.1 ESPARCIMIENTO DINÁMICO DE LUZ (DLS)	28
5.2 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)	30
5.3 CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA (ITC)	31
6. RESULTADOS	34
7. CONCLUSIÓN	48
8. PERSPECTIVAS	49
9. BIBLIOGRAFÍA	50

Índice de figuras

1. Representación de una membrana plasmática con sus principales componentes [8]-----9
2. Principales cannabinoides presentes en el cannabis sativa [4]-----10
3. Recopilación de la variedad de nanopartículas acarreadoras actuales reportadas, [14, 19, 20], -----13
4. Diagrama representativo de un liposoma con las modificaciones que se pueden realizar para transportar un fármaco [24], -----14
5. Simulación de interacciones de moléculas de DMSO con moléculas de agua (A, B). Se observa la representación de las interacciones entre moléculas de agua. (C) Interacción del DMSO al entrar en contacto con moléculas de agua [42]. -----18
6. Estructura molecular del CBD con su coeficiente de partición Log P.-----22
7. Estructura molecular de los lípidos de fosfatidilcolina y colesterol usados para los experimentos.-----23
8. Método de preparación de los modelos liposomales [37].-----25
9. Método de preparación de nanoemulsiones de aceite de linaza con CBD por ultrasonificación. -----26
10. Diagrama de preparación de los acarreadores de CBD en DMSO y etanol.-----27
11. Técnica de esparcimiento dinámico de luz, a) Equipo de DLS usado, b) Representación sobre la recolección de información a través de DLS, c) Resultado arrojado por el DLS después de hacer las mediciones, en este caso representa el porcentaje de tamaños que hay en la muestra.-----29
12. Señal característica de lípidos de DPPC en DSC, se muestra las diferentes fases en la que están los lípidos dependiendo de la temperatura a la que se encuentre.-----31
13. Visualización típica de un experimento de Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC).-----33
14. Distribución de tamaños de los nanoacarreadores para CBD -----34

15. <u>Efecto del CBD a través de los nanoacarreadores sobre una membrana de DPPC.</u> -----	35
16. <u>Efecto del CBD a través de los nanoacarreadores sobre una membrana de DPPC/chol.</u> -----	36
17. <u>Perfiles calorimétricos producidos por las diferentes concentraciones de CBD. Estos perfiles nos permiten encontrar la efectividad del nanoacarreador etanol (curva azul).</u> -----	38
18. <u>Estabilidad de tamaños de nanoemulsión de aceite de linaza con CBD a diferentes temperaturas: 25°C, 45°C y 60°C. Estas mediciones fueron repetidas con una N total de 5 veces y las barras de error corresponden a la desviación estándar de los datos.</u> -----	40
19. <u>Cinética de nanoemulsión de aceite de linaza con CBD sobre diferentes modelos de membrana con colesterol. En la imagen a) se muestra la cinética para el modelo de DMPC/colesterol, b) Se representa la cinética para el modelo de DPPC/colesterol y en la imagen c) La cinética para el modelo de DSPC/colesterol.</u> -----	41
20. <u>Resultados de ITC del sistema nanoemulsión de aceite de linaza/CBD titulado a modelos de membrana de DMPC (roja) y DMPC-colesterol (verde) imagen superior, variación de la entalpía entre ambos modelos de DMPC con y sin colesterol, imagen inferior.</u> -----	43
21. <u>Resultados de ITC del sistema nanoemulsión de aceite de linaza/CBD titulado a modelos de membrana de DPPC (marrón) y DPPC-colesterol (roja) imagen superior, variación de la entalpía entre ambos modelos de DPPC con y sin colesterol, imagen inferior.</u> -----	45
22. <u>Resultados de ITC del sistema nanoemulsión de aceite de linaza/CBD titulado a la membrana de DSPC (marrón) y DSPC- colesterol (roja) imagen superior, variación de la entalpía entre ambas membranas de DSPC con y sin colesterol, imagen inferior.</u> -----	46

Resumen

En el presente trabajo, se realizó un estudio termodinámico sobre la efectividad de liberación del Cannabidiol (CBD) en diversos nanoacarreadores. Para ello, se prepararon dos modelos de membranas con y sin colesterol (10 mol%).

En este estudio se utilizaron liposomas y nanoemulsiones como nanoacarreadores, y se compararon con dos solventes: etanol y dimetilsulfóxido (DMSO). Todos los análisis se realizaron mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC), y posteriormente se procesaron en MATLAB.

Los resultados demostraron una mejora en la efectividad de la entrega cuando la membrana blanco contiene colesterol. Además, se observó que el DMSO y el etanol generan micelas al entrar en contacto con moléculas de agua, lo cual indica que estos solventes encapsulan el CBD cuando se colocan en agua. Por último, se realizó una comparación entre diversos modelos con colesterol, esta vez aumentando la longitud de la cola de los fosfolípidos. Se demostró que cuanto más corta es la cola, mayor es el efecto del CBD. Esto se comprobó en ITC, donde se observó la variación de la energía entre los diferentes tamaños de cola de los fosfolípidos.

Abstract

In the present work, a thermodynamic study was conducted on the effectiveness of Cannabidiol (CBD) release in various nanocarriers. For this purpose, two membrane models with and without cholesterol (10 mol%) were prepared.

In this study, liposomes and nanoemulsions were used as nanocarriers and compared with two solvents: ethanol and dimethyl sulfoxide (DMSO). All analyses were performed using Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Isothermal Titration Calorimetry (ITC), and subsequently processed in MATLAB.

The results show an improvement in delivery effectiveness when the target membrane contains cholesterol. Additionally, it was observed that DMSO and ethanol form micelles upon contact with water molecules, indicating that these solvents encapsulate CBD when placed in water. Finally, a comparison was made between various models with cholesterol, this time increasing the length of the phospholipid tails. It was demonstrated that the shorter the tail, the greater the effect of CBD. This was confirmed in ITC, where the variation in energy between the different phospholipid tail lengths was observed.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 MEMBRANA CELULAR

La célula es la unidad estructural y funcional más pequeña de los organismos vivos, capaz de realizar todas las funciones vitales. Está formada por tres partes principales: el núcleo, que alberga todo el material genético; el citosol, donde residen los organelos; y la membrana plasmática, encargada de regular el transporte de sustancias dentro y fuera de la célula, además de brindar protección y dar forma [1].

La membrana celular (al igual que todas las membranas de los organelos) está compuesta de una bicapa de fosfolípidos y proteínas. Los fosfolípidos son moléculas anfifílicas que tienen una parte hidrofílica (la cabeza) y una parte hidrofóbica (las colas). La parte hidrofóbica está compuesta por cadenas hidrocarbonadas que, al entrar en contacto con el agua, se agrupan de manera tal que minimizan sus interacciones con ella, mientras que la parte hidrofílica permanece en contacto con el agua. Dentro de la gran variedad de fosfolípidos que existen, los lípidos de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS) son los más comunes y han sido objeto de numerosas investigaciones [2].

Aunque pueda parecer sencillo de entender, en realidad la estructura de la membrana es mucho más compleja. En su interior, encontramos una gran variedad de proteínas ancladas que actúan como receptores de sustancias, canales iónicos y proteínas de transporte. Otro componente crucial de la membrana es el colesterol, que le otorga estructura y rigidez, ver Fig 1 [3].

La membrana plasmática es un tema de gran interés en la investigación debido a su papel fundamental en la regulación del flujo de sustancias dentro y fuera de la célula, mediante canales y proteínas ancladas a ella. Un desequilibrio en este

proceso puede ocasionar desde daño celular hasta la muerte. Por lo tanto, cualquier molécula que pueda interactuar con la membrana y alterar sus funciones, ya sea estimulando o bloqueando alguna de ellas, se convierte en un objeto de estudio de gran importancia.

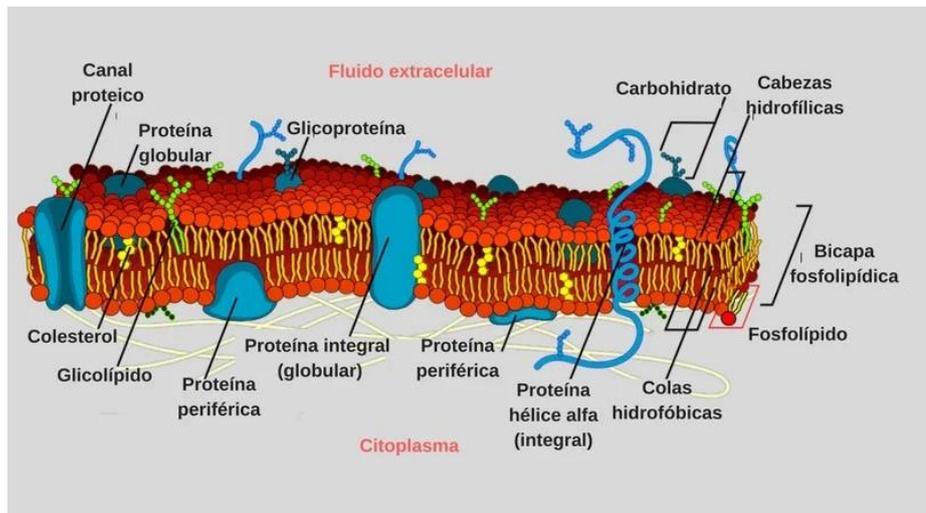


Figura 1: Representación de una membrana plasmática con sus principales componentes [8].

1.2 CANNABIDIOL

La cannabis sativa, también conocida como cáñamo, es una planta ampliamente reconocida por sus diversas propiedades medicinales, recreativas e industriales [4]. Se compone de una amplia variedad de moléculas (Fig. 2), entre las cuales se encuentran 113 cannabinoides, siendo el tetrahidrocannabinol (THC) y el cannabidiol (CBD) los más destacados.

El cannabidiol (CBD) es el segundo cannabinoide más abundante en la planta cannabis sativa, representando entre el 20\% y el 25\% del peso total de la planta, solo superado por el tetrahidrocannabinol (THC) [4]. El CBD guarda muchas similitudes con el THC, sin embargo, a diferencia de este último, no produce efectos psicoactivos.

A lo largo de los años, las investigaciones sobre esta molécula han revelado

que hasta 2015 se habían identificado al menos 65 receptores en el cuerpo, distribuidos en cuatro posibles blancos: 49% asociados a enzimas, 20% a proteínas de transporte, 15% a canales iónicos y 15% a receptores nucleares. A pesar de esta abundancia de receptores y de los beneficios observados, aún se están realizando investigaciones para comprender cómo interactúa el CBD en el organismo [4].

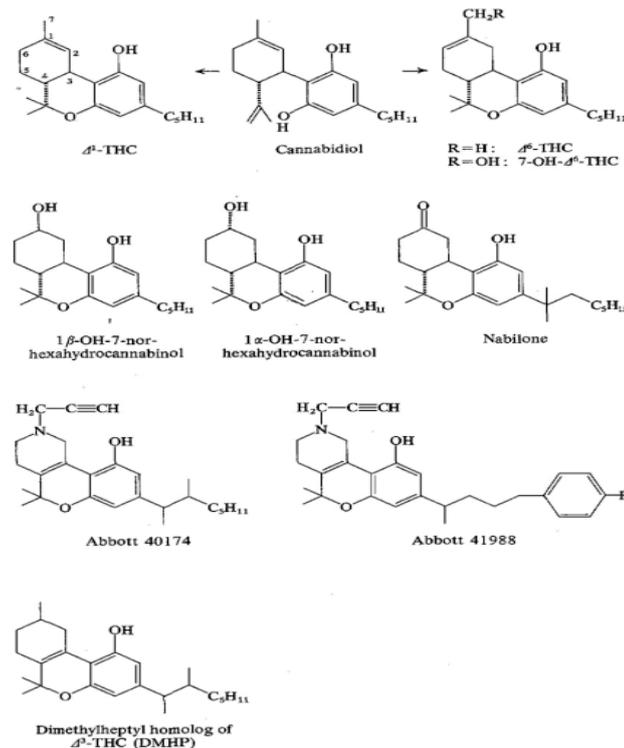


Figura 2: Principales cannabinoides presentes en la cannabis sativa [4].

Numerosos estudios [4-6], han demostrado que el CBD puede ser un agente terapéutico efectivo para tratar una amplia gama de enfermedades, como la epilepsia, el estrés, la neuro inflamación, el cáncer, la enfermedad de Parkinson, la ansiedad, la artritis, el lupus, la psicosis y las convulsiones, entre otras. Actualmente, se están investigando métodos efectivos para administrar esta sustancia en el cuerpo [7].

Sin embargo, uno de los mayores desafíos que enfrenta su administración es que la molécula de CBD es altamente hidrofóbica, con un coeficiente de partición (conocido como LogP) de 7.03, lo que dificulta su administración directa. Por esta razón, se han desarrollado una variedad de nanoacarreadores capaces de encapsularlo y facilitar su transporte a través del cuerpo.

1.3 NANOACARREADORES

Durante años, la investigación médica ha buscado mejorar la eficacia de la administración de fármacos. A menudo se ha intentado modificar la estructura molecular de los fármacos para hacerlos más resistentes a ambientes hostiles. Sin embargo, estos esfuerzos han avanzado lentamente [9].

La nanotecnología ha revolucionado la investigación científica en campos como la ingeniería, la medicina y la biología. Estos avances han permitido estudiar sistemas a una escala nanométrica, lo que ha dado lugar a equipos más compactos, reduciendo la cantidad de muestra necesaria y los tiempos de análisis, además de mejorar la calidad y confiabilidad de los resultados.

En las ciencias de la salud, la nanomedicina ha surgido como una posible solución. Esta disciplina tiene un área que se centra en el desarrollo de sistemas de transporte de fármacos, conocidos como nanoacarreadores [10]. Utilizando nanopartículas y nanoestructuras, los tratamientos se vuelven más eficaces, selectivos y con menos efectos secundarios. La nanomedicina se dedica al estudio, desarrollo y aplicación de la nanotecnología en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

Los nanoacarreadores de fármacos, también llamados plataformas moleculares o portadores de fármacos [11], ofrecen ventajas sobre la administración directa de drogas. Pueden ser modificados para proteger el fármaco de ambientes degradantes, mejorar su biodisponibilidad y eficacia, y

controlar su liberación en la región de interés. Esto permite reducir la dosis administrada y minimizar los efectos secundarios [12].

Sin embargo, muchas nanopartículas presentan deficiencias, desde una liberación insuficiente de fármacos hasta su rápida eliminación del sistema [13], y en algunos casos, un alto grado de toxicidad derivado de las modificaciones [14].

Las investigaciones realizadas a lo largo de los años buscan estudiar diversas perspectivas con nanopartículas, con el fin de mejorar la eficiencia en la liberación de drogas y prolongar su permanencia en el sistema sanguíneo. Además, se busca aumentar su especificidad para actuar en sitios específicos y reducir su toxicidad, con el objetivo de minimizar los efectos secundarios en el resto del cuerpo [15].

Actualmente, existen diversos tipos de nanoacarreadores de fármacos, como se muestra en la Fig. 3. Estos incluyen nanoacarreadores inorgánicos, como nanotubos de carbono y nanopartículas de oro, y orgánicos, como liposomas, nanoburbujas, nanoemulsiones, micelas, entre otros [16]. Además, hay sustancias como solventes que, en baja concentración, pueden utilizarse como acarreadores, como el dimetilsulfóxido y el etanol [17].

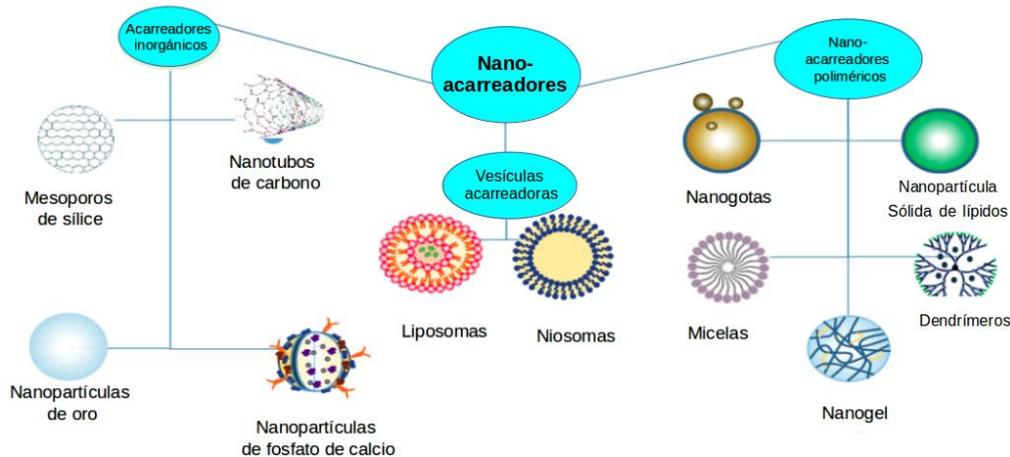


Figura 3: Recopilación de la variedad de nanopartículas acarreadoras actuales reportadas, [16-18].

1.3.1 LIPOSOMAS

En los últimos años, se ha despertado gran interés en las nanopartículas lipídicas conocidas como “liposomas” [19]. Los liposomas son vesículas formadas por una o más bicapas de fosfolípidos que adoptan una forma esférica en medios acuosos, lo que les proporciona estabilidad. Su tamaño varía desde 20 nm hasta más de 1 micra y se clasifican según su tamaño en SUV’s, LUV’s MLV’s y GU’V’s [16].

Estas partículas son objeto de estudio debido a que, al ser vesículas lipídicas, son un modelo de membrana ideal para representar la membrana plasmática. Ésta es más compleja, ya que además de fosfolípidos, contiene otros tipos de lípidos, proteínas ancladas con diversas funciones, colesterol para darle rigidez, canales iónicos, etcétera. Sin embargo, los liposomas nos permiten estudiar cómo se comporta la membrana en condiciones ideales y el efecto que podrían tener sobre ella fármacos u otras sustancias de interés [2].

Además de utilizarse como modelos de membrana, los liposomas se han empleado como transportadores de fármacos [20], demostrando ser viables para esta función. Se estudian detalladamente en sus fases gel y fluida para

aprovechar su potencial en la mejora de la entrega de fármacos o activos encapsulados en su interior. La transición de fase, donde se pasa de una fase gel a una fase fluida, marca el punto en el que la mitad de los lípidos están en una fase y la otra mitad en la otra.

Como resultado, se han desarrollado numerosas modificaciones en estas vesículas lipídicas para hacerlas sensibles a diversas propiedades y lograr una liberación rápida y eficaz de lo encapsulado. Por ejemplo, se han creado liposomas sensibles al pH, temperatura, presión, estrés oxidativo, cargas eléctricas, campos magnéticos, ultrasonido, luz, entre otros [21] (ver Figura 4).

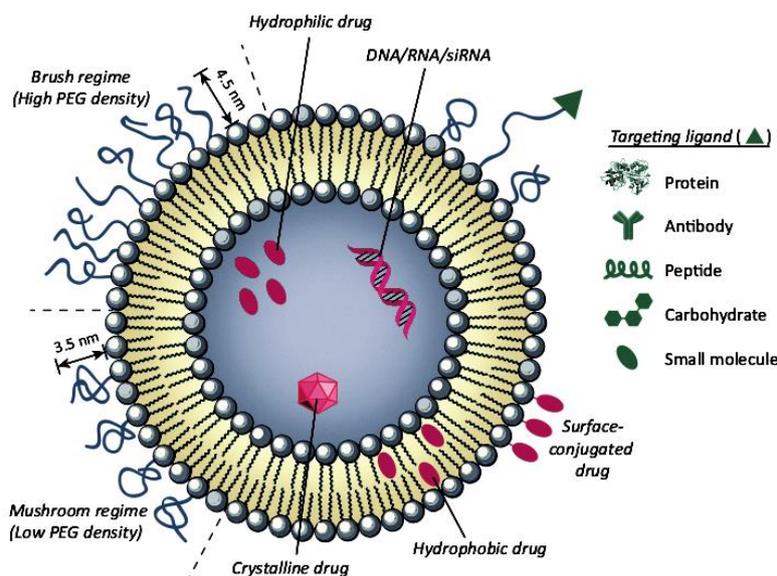


Figura 4: Diagrama representativo de un liposoma con las modificaciones que se pueden realizar para transportar un fármaco en él [22].

En 1986, W. Jan y H. Dick llevaron a cabo un estudio sobre los efectos de la adición de calcio a liposomas de fosfatidilserina (PS). En estos experimentos, se observó que este elemento inducía la fusión entre las vesículas en un tiempo más corto de lo esperado [23]. Desde entonces, la investigación en esta área ha continuado avanzando.

En 2001, D. Needham y Mark W. Dewhirst desarrollaron las primeras pruebas de administración de fármacos con liposomas sensibles a la temperatura para el tratamiento de tumores sólidos [24]. En esta investigación, crearon un liposoma termosensible que podía ser estimulado con un láser para inducir la liberación del fármaco.

En 2014, V. K. Sharma y colaboradores llevaron a cabo un estudio que demostró la importancia de la fluidez de la membrana en la liberación de fármacos [25]. Ese mismo año, R. Perez Isidro y F.J. Sierra Valdez utilizaron DSC para estudiar la difusión de fármacos anestésicos a través de membranas lipídicas, mostrando los efectos de estos fármacos en la fluidización de las membranas [26].

En 2020, B. Emek publicó un estudio que comparaba la administración directa de CBD con su administración mediante un liposoma, demostrando un aumento en la biodisponibilidad del CBD [20]. Y recientemente, en 2021, L. Yibo y colaboradores realizaron un estudio biofísico sobre la liberación de fármacos utilizando liposomas como transportadores, analizando las modificaciones realizadas a los liposomas para estimular la liberación y sus ventajas y desventajas [16].

1.3.2 NANOEMULSIONES

Las nanoemulsiones se definen como dispersiones bifásicas de aceite en agua o agua en aceite, donde dos líquidos naturalmente inmiscibles pueden estabilizarse mediante un tensoactivo, generando gotas del tamaño del orden de nanómetros. Estas nanoemulsiones suelen tener tamaños que varían de 20 a 500 nm. Gracias a estos tamaños, presentan una mejor estabilidad en comparación con las microemulsiones, debido a una disminución de la coalescencia y agregación [28].

En 2013, Sai-Ping Jiang y colaboradores desarrollaron una nanoemulsión utilizando Doxorrubicina y PEG como estabilizador, lo que permitió una mayor permanencia en el sistema y acumulación en ciertos órganos y tejidos blancos. Esto se logró gracias a un efecto de permeabilidad y retención mejorada, que ayudó a evitar la pronta eliminación por parte del sistema reticuloendotelial (RES) [29]. En 2014, Yue Zhang y colaboradores llevaron a cabo un estudio sobre las propiedades de las nanoemulsiones, encontrando que mejoran la biodisponibilidad del fármaco en el sistema, protegiéndolo de ambientes hostiles y aumentando su solubilidad [30]. Al año siguiente, Lu R, Liu S, Wang Q y Li X crearon nanoemulsiones compuestas de monooleato de poli(etilenglicol) (PM) y triglicéridos de cadena media para mejorar la estabilidad gástrica de ciertos fármacos y su biodisponibilidad al ser tomados por vía oral [31]

En 2016, Tianpeng Zhang y colaboradores estudiaron el efecto del cremofor EL cuándo se agregaba a una nanoemulsión, encontrando que mejoraba la permeación transcelular de emodina mediante la inhibición del metabolismo del UGT [32]. En 2022, Ángela M. Jaramillo y Carlos Ruiz S. realizaron un estudio sobre las interacciones y efectos de las nanoemulsiones en un modelo de membranas lipídicas, descubriendo que las nanoemulsiones de CBD y propofol modificaban la capacidad calorífica y fluidizaban las membranas, un efecto que se potenciaba cuando la membrana modelo contenía colesterol [33].

1.3.3 DIMETIL SULFÓXIDO (DMSO)

El dimetil sulfóxido, comúnmente conocido como DMSO, ha sido ampliamente utilizado en biología debido a su capacidad para disolver tanto moléculas polares como no polares [34]. Fue descubierto en 1866 por el químico ruso Alexander Saytseff mientras preparaba pulpa de celulosa, obteniéndolo como un subproducto de este proceso [35]. En 1963, se observaron sus grandes propiedades con potencial beneficio para la medicina, lo que llevó a una amplia gama de investigaciones sobre sus aplicaciones

médicas [36]. Una de las aplicaciones más comunes es su uso en cremas en la industria farmacéutica [37].

La capacidad del DMSO para penetrar las membranas lipídicas se debe principalmente a los puentes de hidrógeno que forma con las moléculas de agua y al tamaño de la molécula [38]. Desde su descubrimiento, las investigaciones han demostrado sus grandes beneficios. Por ejemplo, uno de los primeros avances, realizado por Jacobo y Stanley W, demostró que el DMSO mejora la permeabilidad de la membrana celular, facilitando el transporte de sustancias a través de ella. También se han encontrado efectos antiinflamatorios y vasodilatadores, así como efectos analgésicos y la capacidad de actuar como agonista o antagonista de algunos fármacos [39].

Posteriormente, se ha investigado el mecanismo por el cual el DMSO interactúa con la membrana. En 2006, una investigación de dinámica molecular propuso que crea poros de agua en la membrana, provocando su fluidez [40]. En 2010, Tofeeq Ur-Rehman y colaboradores analizaron el efecto de diferentes concentraciones de DMSO en la micelización del Poloxamer P407 y su relación con la liberación de fármacos, encontrando que mejoraba la liberación de fármacos hidrofóbicos y disminuía la de los hidrofílicos, además de afectar la temperatura crítica de micelización [41].

En 2012, M. Gaspar y colaboradores realizaron un análisis sobre los beneficios y desventajas de usar DMSO en tratamientos tópicos, observando que, a concentraciones menores al 50 %, no causaba daño celular significativo en tejidos de ratones y mejoraba la penetración del fármaco a través de la piel [37]. En 2018, un grupo de investigación de la Universidad de Sonora realizó un estudio sobre la síntesis y caracterización de moléculas anfífilicas, explorando la interacción del DMSO con las moléculas de agua [38] (Fig. 5). Para 2021, Claudia Taborda y colaboradores realizaron una investigación sobre el efecto del CBD en la funcionalidad de neutrófilos en donde usaban el DMSO como vehiculo para

administrar el CBD a células in vitro demostrando la efectividad del DMSO como vehículo y analizando el efecto del CBD sobre los neutrófilos [42].

Uno de los estudios más recientes realizados por Yuxi Li y colaboradores en 2022 titulado "Efectos in vitro del cannabidiol y sus principales metabolitos en células de Sertoli humanas y de ratón" se usa DMSO como vehículo y para disolver una gran cantidad de cannabinoides que se comparan entre ellos [43].

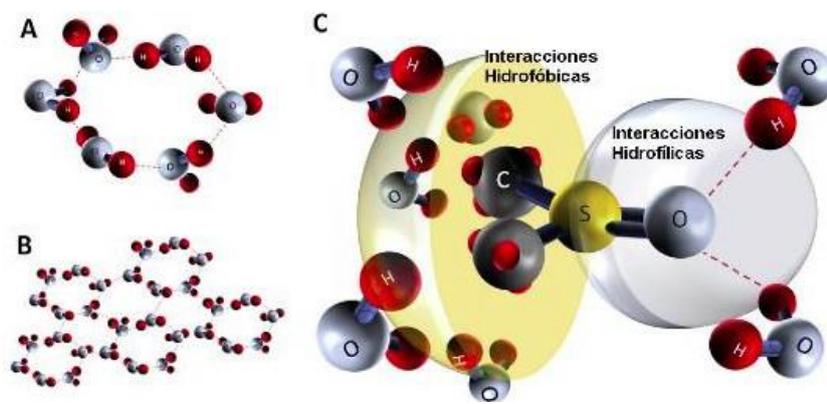


Figura 5: Simulación de interacciones de moléculas de DMSO con moléculas de agua (A, B). Se observa la representación de las interacciones entre moléculas de agua. (C) Interacción del DMSO al entrar en contacto con moléculas de agua [38].

1.3.4 ETANOL

El etanol es un solvente ampliamente utilizado en diversos ámbitos, incluyendo el área médica, los laboratorios de investigación y la industria automotriz. Sus aplicaciones principales incluyen mantener la limpieza de lugares, lavado de materiales, disolución de sustancias y combustible, entre otros [44].

Con una estructura química simple representada como $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH}$, es también el componente psicoactivo presente en cervezas y licores. Sin embargo, sus efectos son menos perjudiciales que los de otros compuestos. Se forma a partir de la fermentación de ciertas levaduras con agua y azúcar, donde se recombina las moléculas de carbono, oxígeno, hidrógeno y agua para formar alcoholes y dióxido de carbono [45].

En el campo médico, el etanol ha sido de gran importancia al permitir la disolución de sustancias para su administración en el cuerpo. Se utiliza en terapias como antiséptico, tratamiento del síndrome de abstinencia de alcohol, antídoto para la intoxicación por metanol o etilenglicol, entre otros. Además, se ha propuesto su uso como agente disolvente de sustancias hidrofóbicas [46].

En investigaciones recientes, se ha estudiado el transporte de proteínas inhaladas en suspensión de etanol, demostrando su efectividad en la disminución de la glucosa en sangre y el aumento de la insulina sérica [47]. Asimismo, se ha observado que al agregar etanol a liposomas se forman nanopartículas llamadas etanosomas, las cuales mejoran la penetración de los liposomas en los tejidos gracias a la capacidad del etanol para volver permeables las membranas [48].

2 HIPÓTESIS

La eficiencia de entrega del CBD mediante nanoacarreadores depende de las interacciones entre la molécula, el acarreador y la composición lipídica del blanco.

3 OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Estudiar la termodinámica de la liberación de CBD para diferentes nanoacarreadores y membranas modelo.

3.2 ESPECÍFICOS

- I Determinar los tamaños de los nanoacarreadores.
- II Determinar cómo cambia el perfil calorimétrico de la membrana blanco cuando entra en contacto con los nanoacarreadores con CBD.
- III Analizar el efecto de la composición lipídica de la membrana blanco en la entrega de CBD por nanoacarreadores.
- IV Determinar la energía de enlace como función de la dosis para los diferentes modelos de membrana, con el acarreador más eficiente.

4 METODOLOGÍA

Para realizar los experimentos se utiliza una molécula hidrofóbica del cannabis la cual es el CBD $\leq 98\%$ de Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). En la Fig. 6 se presenta la estructura molecular del CBD.

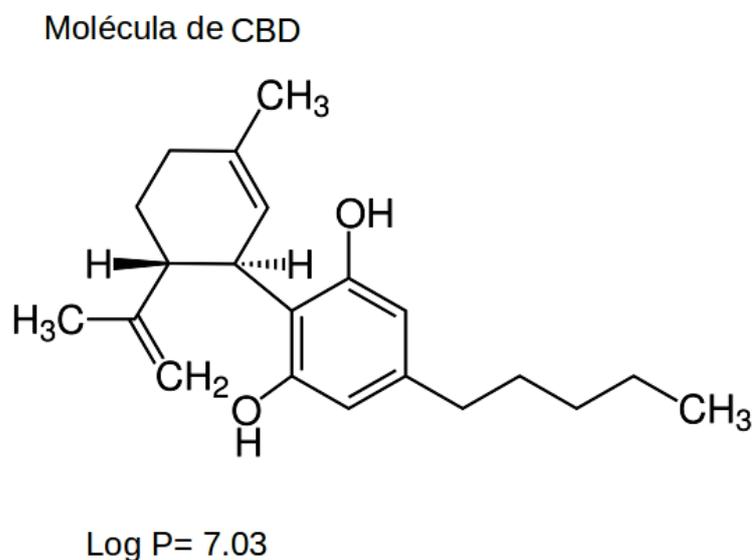


Figura 6: Estructura molecular del CBD con su coeficiente de partición (LogP).

Se opta por trabajar con lípidos de fosfatidilcolina (PC) debido a su alta presencia en la cara externa de la membrana celular. Se utilizan tres variantes de lípidos de PC que difieren en la longitud de la cadena de carbono en sus colas, como se muestra en la Fig. 7. La longitud de esta cadena confiere propiedades distintas cuando se encuentran en las membranas lipídicas.

Los lípidos de PC seleccionados son el 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) $\leq 99\%$, el 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) $\leq 99\%$ y el 1,2- Distearoyl-sn-glycero-3- phosphorylcholine o (DSPC)

≤ 99 %. El DMPC, con un peso molecular de 677.933 Da y una cadena de 14 carbonos, se emplea para generar los agentes acarreadores liposomales. El DPPC, con un peso molecular de 734.039 Da y una cadena de 16 carbonos y el DSPC con una cadena de 18 carbonos, se utilizaron como modelos de membrana blanco. Todos los lípidos son adquiridos por Avanti Polar Lipids, Inc.

Asimismo, se incluye el colesterol con un grado de pureza igual o superior al 99 %, suministrado por Sigma-Aldrich, USA.

Para elaborar cada uno de los nanoacarreadores, se comenzó preparando una solución concentrada de CBD en etanol, DMSO y aceite de linaza. Para ello, pesamos cuidadosamente la cantidad necesaria de CBD y lo disolvimos en cada solvente, obteniendo así las siguientes concentraciones: CBD en etanol a 30 mg/ml, CBD en DMSO a 70 mg/ml y CBD en aceite de linaza a 200 mg/ml. Con estos stocks primarios listos, procedemos a preparar cada nanoacarreador de manera individual. Para todas las preparaciones, se usa agua Milli-Q IQ 7000, con una resistividad de 18.6 MΩ

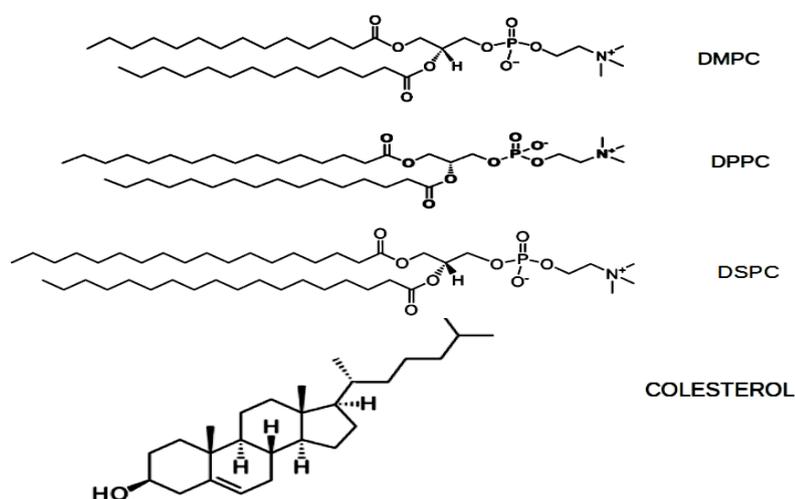


Figura 7: Estructura molecular de los lípidos de fosfatidilcolina y colesterol usados para los experimentos.

4.1 PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS (NANOACARREADORES Y MODELOS DE MEMBRANAS BLANCO)

El protocolo para la preparación de los liposomas multilaminares se detalla a continuación (ver Fig. 8): Se pesó la cantidad adecuada de DMPC y DPPC (con y sin colesterol), quedando a una concentración de 4 mM para cada lípido. Se utilizó una balanza analítica de la marca Ohaus.

Para formar los acarreadores liposomales de DMPC y los liposomas de que serán nuestro modelo de membrana de DPPC con colesterol, se usó etanol como solvente de los lípidos individuales. La solución se homogenizó mediante un vórtex.

Para formar los modelos de membrana blanco de DPPC sin colesterol, se hidrató con una solución buffer de hepes a 10 mM y pH de 7.4. Esta mezcla, se agitó a una temperatura por encima de su T_m durante 40-45 minutos a 600 rpm, utilizando un imán para la agitación.

En la solución de DMPC en etanol, se agregó la cantidad necesaria de CBD a partir de su stock en etanol, el cual tiene una concentración específica, y se agitó mediante un vórtex.

Después de la adición del CBD, se evaporó la muestra aplicando una corriente de nitrógeno durante aproximadamente 40-45 minutos a 55 °C y una agitación con el imán a 600 rpm.

Una vez completada la evaporación, se hidrató la muestra con buffer de hepes a 10 mM a pH de 7.4 a una temperatura de 55 °C y se agitó mediante un vórtex. Luego, se dejó incubar durante 30-40 minutos a una temperatura de 55 °C y una agitación con el imán a 600 rpm.

Para crear LUV's (Large Unilamellar Vesicles) se usó un equipo para extruír la muestra. La suspensión de liposomas se hizo pasar 15 veces a través de una

membrana de 200 nm (Nucleopore Track-etch Membrane de la marca Whatman) en un rango de temperatura de 55-60 °C. Este proceso garantiza que los LUV's sean de un tamaño uniforme.

En el caso de los modelos de membrana como el de DPPC con colesterol, se pesó la cantidad correspondiente para que las membranas tuvieran 10 % de colesterol y 90 % de DPPC. Luego se disolvió el colesterol y los lípidos de DPPC en etanol, se mezclaron y se aplicó vórtex para homogenizar la muestra. Después, se llevó esta al desgasificador para evaporarla con una corriente de nitrógeno a 55 °C (600 rpm) durante 40 minutos. Posteriormente, se hidrató con la solución de HEPES a 10 mM a pH de 7.4 a 55 °C y una agitación con el imán a 600 rpm durante 30-40 minutos.

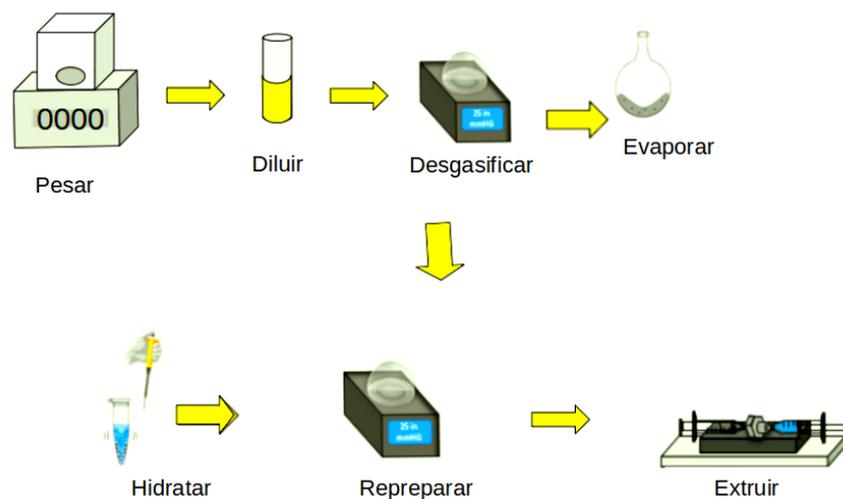


Figura 8: Método de preparación de los modelos liposomales [37]

4.2 PREPARACIÓN DE NANOEMULSIÓN DE ACEITE DE LINAZA CON CBD

La nanoemulsión que se preparó, pertenece al tipo de aceite en agua (O/W). Esta elección se fundamenta en la naturaleza hidrofóbica del CBD. Para confeccionar la nanoemulsión de CBD, empleamos un ultrasonicador (ultrasonic processor, modelo FB-705, de Fisher Scientific, ver Fig. \ref{nanoemulsion}). Este dispositivo cuenta con una punta la cual es sumergida en un frasco ámbar que contiene una mezcla O/W compuesta por un 99\% de agua y un 1 % de un stock de aceite de linaza con CBD, el cual está a una concentración de 200 mg/ml. Luego, se lleva a cabo un proceso de sonicación durante 5 minutos con una amplitud de 80 μ m, lo que resulta en una concentración final de 2 mg/ml de CBD en el volumen total de la nanoemulsión.

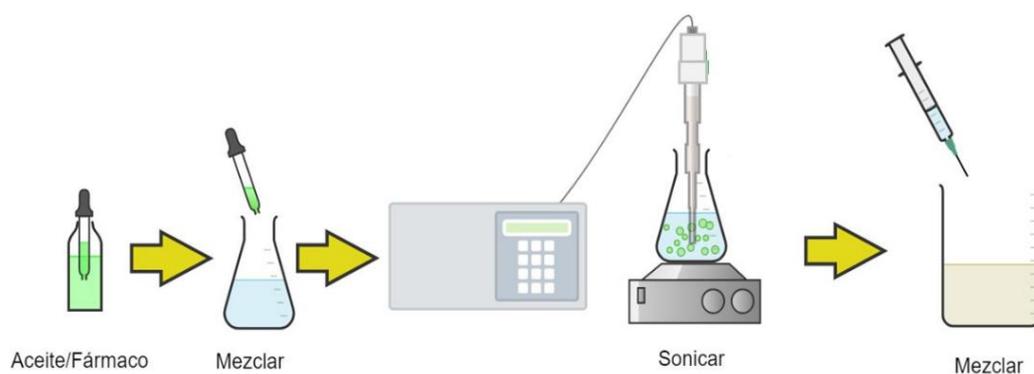


Figura 9: Método de preparación de nanoemulsiones de aceite de linaza con CBD por ultrasonicación.

4.3 PREPARACIÓN DE ACARREADOR DMSO y ETANOL

La preparación del acarreador de etanol es similar al del DMSO (Fig. 10), y se lleva a cabo a través de los siguientes pasos:

- 1 Primero, se pesó cuidadosamente la cantidad de CBD deseada para la concentración del stock (Fig. 10 (a)).
- 2 Después, se agregó con precisión el volumen correspondiente de DMSO (o etanol) al CBD (Fig. 10 (b)).
- 3 Para el DMSO, se sonicó utilizando un esterilizador por ultrasonido Branson mod. 1800 durante 10 minutos para asegurar que todo se diluyera correctamente (Fig. 10 (c)).
- 4 Para el etanol, se mezcló la solución usando un equipo Vortex Mixer para homogenizar la muestra y diluir correctamente el CBD (Fig. 10 (c)).
- 5 Finalmente, se agregó con cuidado el acarreador a la suspensión de liposomas que son utilizados como modelo de membrana (Fig. 10(d)).

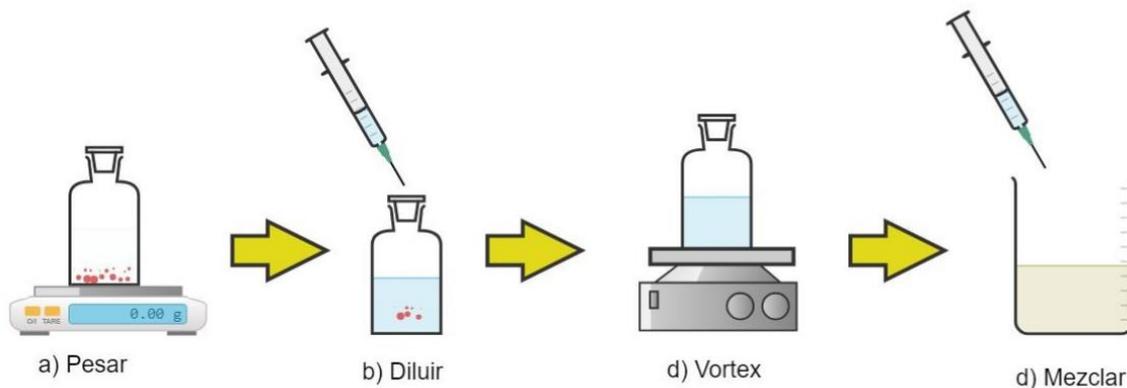


Figura 10: Diagrama de preparación de los acarreadores de CBD en DMSO y etanol.

5 TÉCNICAS

Después de haber preparado los acarreadores, procedemos a realizar las mediciones. Para ello, colocamos en un frasco ámbar la suspensión liposomal (1 ml de DPPC o DPPC/colesterol, respectivamente). Posteriormente, se agrega el acarreador que se va a estudiar (liposoma de DMPC, DMSO, nanoemulsión o etanol). La cantidad de vehículo acarreador corresponde a una concentración de 5 mol% de CBD en la suspensión final. Posterior a esto, se procede a mezclar usando el vórtex para distribuir homogéneamente todo el acarreador en el volumen y se dejó conviviendo durante 1 min, luego se colocó en el DLS y DSC para realizar la medición.

5.1 ESPARCIMIENTO DINÁMICO DE LUZ (DLS)

Las mediciones de los tamaños de los nanoacarreadores se llevaron a cabo utilizando la técnica de esparcimiento dinámico de luz (DLS). Para ello, utilizamos un Zsizer nano ZSP de Malvern Instrument, con una resolución que abarca desde 0,1 nm hasta 10 micras (ver Fig. 11 a).

Este método mide las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada cuando un haz de luz láser atraviesa la muestra.

El principio básico del DLS se basa en la dispersión de luz, que ocurre cuando un haz de luz láser incide sobre una muestra que contiene partículas, causando que la luz se disperse en todas direcciones debido a las diferencias en el índice de refracción entre las partículas y el medio circundante. Las partículas en suspensión están en constante movimiento debido a las colisiones con las moléculas del medio, un fenómeno conocido como movimiento browniano.

La luz dispersada por las partículas crea un patrón de interferencia que fluctúa con el tiempo debido a este movimiento. Un correlador digital mide estas fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada y calcula una función de

correlación de tiempo, proporcionando información sobre la velocidad de movimiento de las partículas, lo cual está relacionado con su tamaño.

Posteriormente, se realiza un análisis temporal que genera un correlograma, proporcionando información sobre el tamaño de las partículas presentes en la muestra. Cuanto más pequeña sea la partícula, más rápido decae este correlograma. Así, se estima el tamaño hidrodinámico de cada partícula (ver Fig. 11 c).

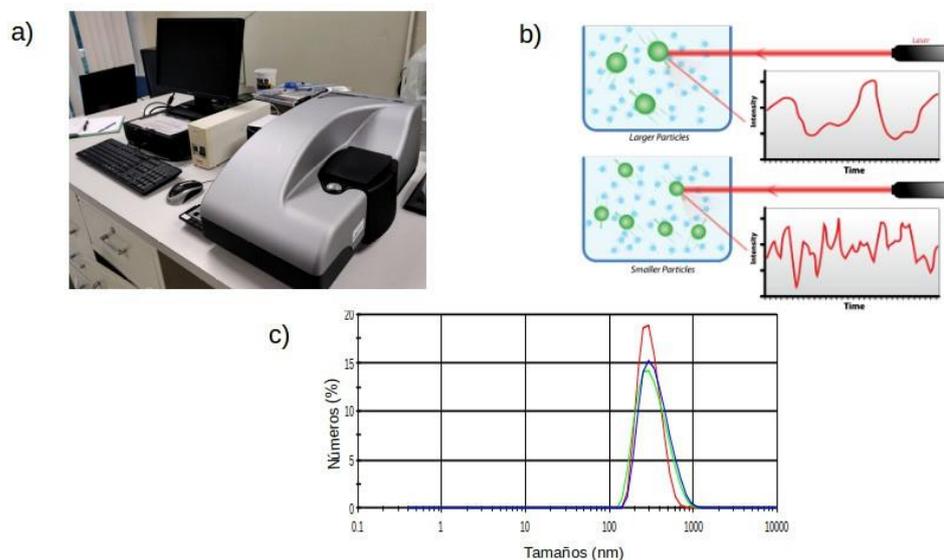


Figura 11: Técnica de esparcimiento dinámico de luz. a) Equipo de DLS usado. b) Representación sobre la recolección de información a través de DLS. c) Resultado obtenido por el DLS después de hacer las mediciones, en este caso representa el porcentaje de tamaños que hay en la muestra.

5.2 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) es una técnica utilizada en química y ciencia de materiales para investigar las propiedades térmicas de sustancias. Se basa en la medición de la diferencia de calor absorbido o liberado por una muestra y una referencia, mientras se someten a un programa de temperatura controlada.

En DSC, tanto la muestra como la referencia se calientan simultáneamente en un horno con una velocidad de calentamiento constante. La diferencia de temperatura entre la muestra y la referencia se mide continuamente mientras aumenta ésta. Cuando ocurren cambios físicos o químicos en la muestra, como transiciones de fase, reacciones químicas o relajaciones térmicas, se observan picos o valles en el gráfico de la capacidad calorífica contra temperatura.

La capacidad calorífica en la calorimetría diferencial de barrido (DSC) mide el calor necesario para aumentar la temperatura de una muestra comparada con una referencia. En un gráfico de DSC, la capacidad calorífica se observa como cambios en la línea de base del flujo de calor, indicando transiciones térmicas como fusiones y transiciones vítreas.

Los datos obtenidos de un análisis DSC proporcionan información valiosa sobre una amplia gama de propiedades térmicas de la muestra, como la temperatura de fusión, la temperatura de transición vítrea, la entalpía de fusión, la estabilidad térmica y la cinética de las reacciones químicas (Fig. 12). Esto permite caracterizar materiales, identificar composiciones, investigar la pureza de las sustancias y estudiar la estabilidad de productos farmacéuticos, polímeros, alimentos, y otros materiales.

Una de las ventajas clave de la DSC es su sensibilidad para detectar cambios

térmicos pequeños, lo que la hace útil para analizar muestras en cantidades muy pequeñas y para estudiar procesos que ocurren en una amplia gama de temperaturas.

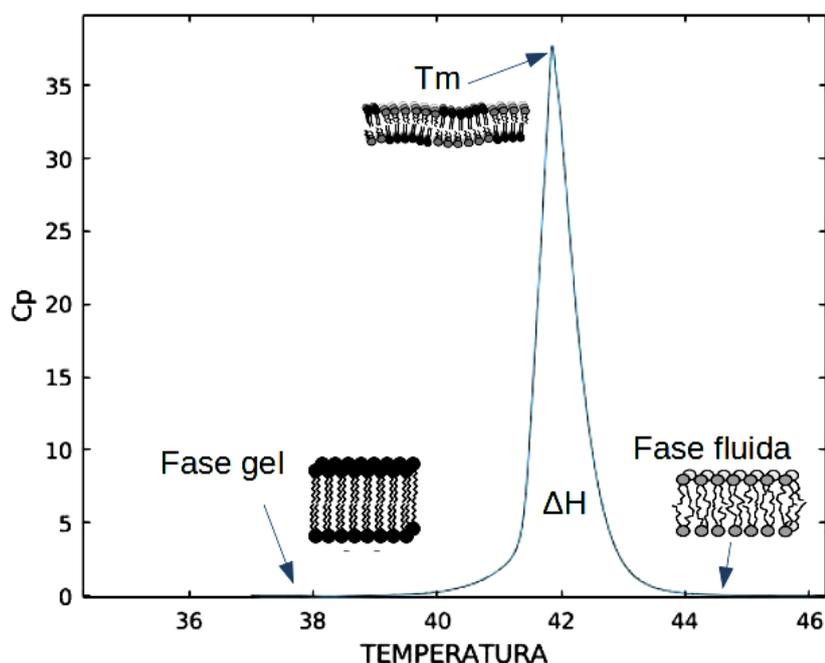


Figura 12: Señal característica de lípidos de DPPC en DSC. Se muestra las diferentes fases en la que están los lípidos dependiendo de la temperatura a la que se encuentren.

5.3 CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTERMICA (ITC)

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) es una técnica analítica utilizada en química para determinar la entalpía de reacción de un proceso químico, y en particular, para estudiar su cinética. Esta técnica combina los principios de la calorimetría, que mide el calor liberado o absorbido durante una reacción, con los de la titulación, que se utiliza para determinar la concentración de una especie química en una muestra.

El proceso de ITC, implica la adición gradual de una solución titulante a una solución de analito, mientras se mide continuamente la cantidad de calor liberado o absorbido. A diferencia de la DSC, donde la temperatura varía de un valor a otro, en la ITC la temperatura se mantiene constante durante todo el proceso, lo que permite obtener mediciones precisas del calor generado o absorbido en cada etapa de la titulación.

El instrumento de ITC (Fig. 13), está equipado con un termistor o termopar sensible que registra cualquier cambio en la temperatura de la muestra. Además, se necesita un sistema de titulación automático o semiautomático para controlar la adición de la solución titulante a la muestra de manera precisa (Fig. 13 a)).

Durante la titulación isotérmica, se observa un cambio en la temperatura de la muestra a medida que se añade la solución titulante (Fig. 13 b)). Este cambio en la temperatura está directamente relacionado con la cantidad de calor liberado o absorbido durante la reacción. Al registrar la variación de temperatura en función del volumen de solución titulante añadida, es posible determinar el punto de equivalencia de la titulación, así como la entalpía de la reacción (Fig. 13 c)).

La calorimetría de titulación isotérmica se utiliza en una variedad de aplicaciones, incluyendo la determinación de la estequiometría de una reacción química, la caracterización de catalizadores y la evaluación de la cinética de reacciones químicas. Además, esta técnica es especialmente útil para estudiar reacciones que ocurren a velocidades muy rápidas o lentas, ya que permite medir el calor generado o absorbido en tiempo real.

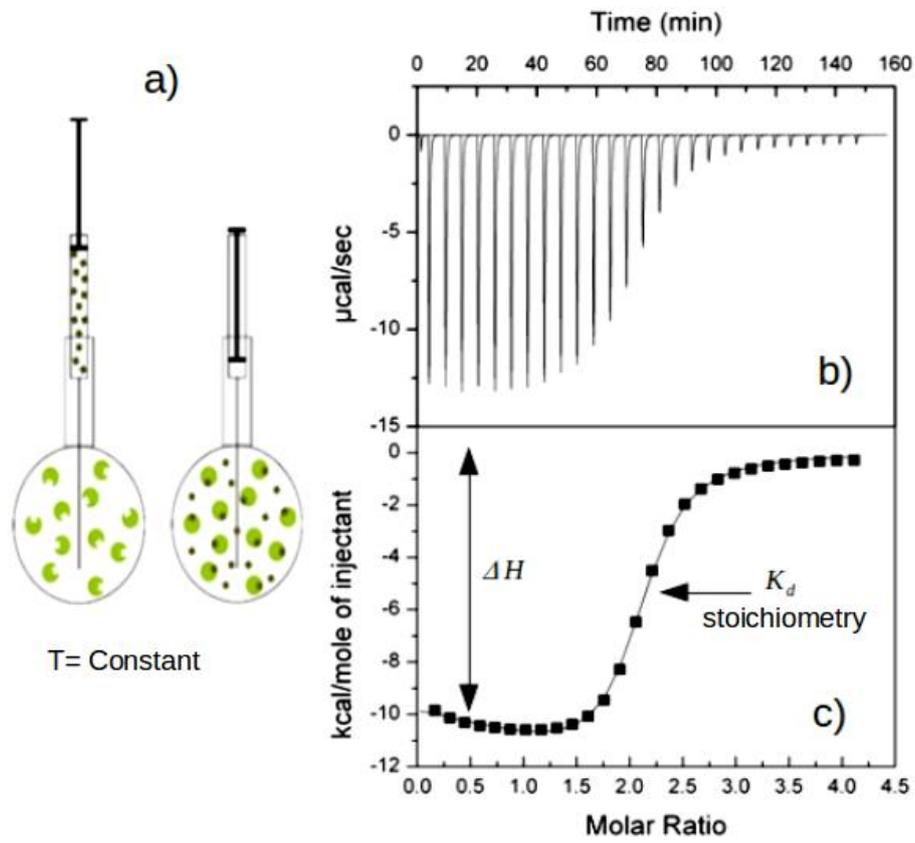


Figura 13: Visualización típica de un experimento de Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC). a) Proceso de titulación del ligando en una muestra. b) Señal obtenida por el sensor, esta señal está relacionada con el calor liberado durante la adición del ligando. c) Variables termodinámicas obtenidas a partir de la técnica [50].

6 RESULTADOS

Antes de medir el perfil calorimétrico del efecto de entrega de CBD a través de nanoacarreadores, se realizó primero una caracterización de los tamaños de cada uno de ellos. Esto se hizo con el objetivo de asegurar que los nanoacarreadores tienen el tamaño esperado, ya que está documentado que los tamaños influyen en la entrega de la droga.

Las mediciones se llevaron a cabo con el Zsizer a 25°C (ver Fig. 14), ya que a esa temperatura se mezcló cada uno de ellos con la membrana modelo.

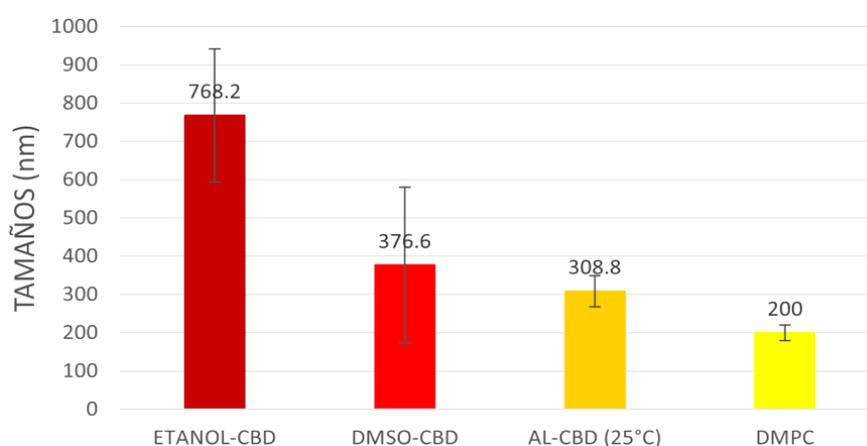


Figura 14: Distribución de tamaños de los nanoacarreadores para CBD. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los datos. Las mediciones totales corresponden a una N=5.

Al medir la distribución de tamaños (Fig. 14) se observó, que tanto el etanol como el DMSO (que ya tienen el CBD integrado), forman estructuras al entrar en contacto con el agua. Esto quiere decir que el CBD en realidad es encapsulando por los solventes. Este resultado es interesante, ya que generalmente se considera que estos solventes disuelven a las moléculas (en este caso al CBD). Sin embargo, nuestros resultados indican que este no es el caso. Más bien, el CBD se encuentra dentro de nanopartículas formadas por los solventes.

El etanol y el DMSO son moléculas anfifílicas, es decir, tienen una región que

interactúa con el agua y otra que interactúa con regiones hidrofóbicas, lo que les permite generar una estructura al entrar en contacto con el agua y así encapsular la droga que llevan. La distribución de tamaños para estos acarreadores es muy dispersa dentro de un amplio rango. Por otro lado, los tamaños de las nanoemulsiones de aceite de linaza y de DMPC mantienen un rango más homogéneo.

Una vez caracterizadas las distribuciones de tamaños de cada acarreador, se procedió a mezclar por separado cada uno con la membrana de DPPC, que recordemos, es la membrana blanco. En la Fig. 15 se presenta el perfil calorimétrico de esta membrana modelo y el efecto que produce cada acarreador sobre ella.

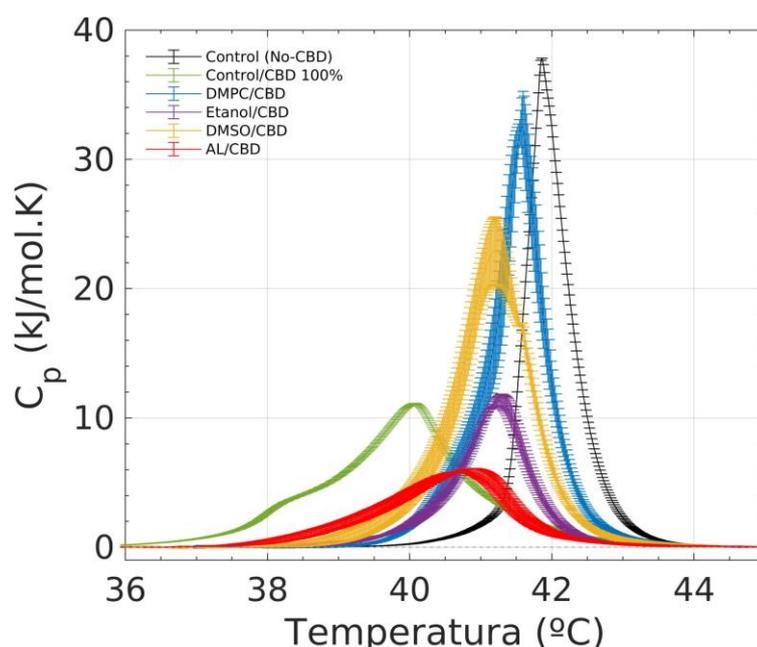


Figura 15: Efecto del CBD a través de los nanoacarreadores sobre una membrana de DPPC.

Con base en el perfil calorimétrico de la Fig. 15, se observó que el CBD genera fluidización de la membrana de DPPC, es decir, su transición de fase se desplaza a temperaturas más bajas. Se aprecia que el nanoacarreador de DMPC (curva azul) no generó un efecto considerable sobre el modelo de membrana. Sin

embargo, la nanoemulsión de aceite de linaza (curva roja) muestra una mejor efectividad en la entrega del CBD. Es decir, el corrimiento y modificación del perfil es mayor. Los solventes DMSO (curva amarilla) y etanol (curva morada) generaron efectos considerables. Este resultado, es inesperado ya que normalmente se consideran estos solventes tan eficientes que pueden entregar hasta el 100 % de su carga.

Posteriormente, se preparó un nuevo modelo de membrana con colesterol, con el fin de determinar la importancia de esta molécula en la entrega de CBD a través de los nanoacarreadores. La concentración de colesterol se fijó en un 10 % molar.

Se midió nuevamente el perfil calorimétrico de la membrana DPPC con colesterol, ver Fig. 16.

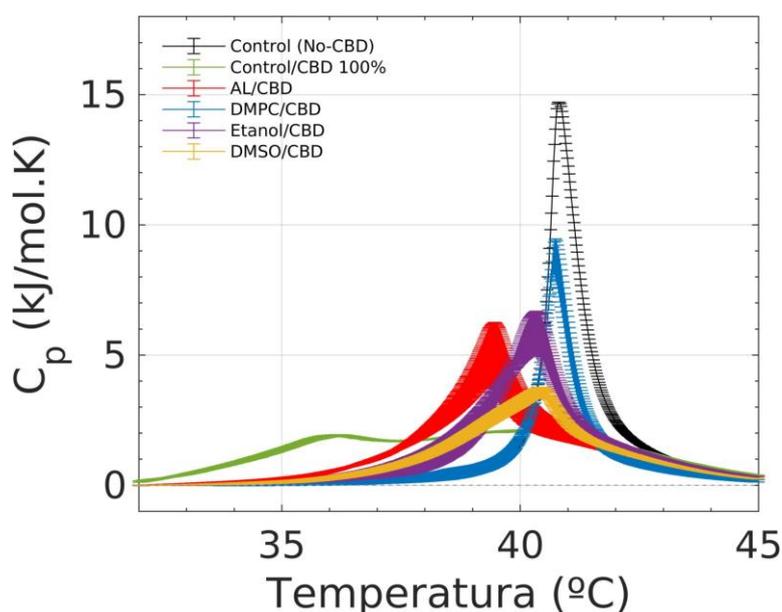


Figura 16: Efecto del CBD a través de los nanoacarreadores sobre una membrana de DPPC/chol.

Se observa que la presencia de colesterol en la membrana de DPPC genera dos efectos importantes: Primero, disminuye la capacidad calorífica (C_p) de la membrana, lo cual implica que requiere menos calor para fundirse y pasar de una fase a otra. En segundo lugar, la presencia de colesterol parece estimular la

entrega de CBD en cada acarreador. Sin embargo, el acarreador liposomal de DMPC (curva azul) de nueva cuenta generó muy poco efecto sobre la membrana, lo que indica una deficiencia en la liberación del CBD. En contraste, los otros acarreadores muestran un mayor efecto.

Para estimar qué concentración de CBD entra a la membrana de DPPC con colesterol, debemos realizar una curva de calibración. Para tal fin, se prepararon membranas de DPPC/colesterol con diferentes concentraciones de CBD. Es decir, tanto el DPPC como el colesterol y el CBD se integraron desde el inicio (ver metodología).

Los perfiles calorimétricos utilizados para la calibración se muestran en la Fig. 17. Se observa el perfil calorimétrico (para cada una de las concentraciones de CBD integrado desde la formación de la membrana blanco): 5, 10 ,25, 50 y 100 %. La manera en la que determinamos la efectividad de, por ejemplo, la entrega de CBD que lleva el nanoacarreador etanol, es comparar el perfil calorimétrico asociado al etanol (curva azul, Fig. 17) con los perfiles de las diferentes concentraciones. Así, es claro que el porcentaje del CBD que entrega el nanoacarreador etanol es de 10 %. De la misma forma se encontraron las efectividades de los demás nanoacarreadores.

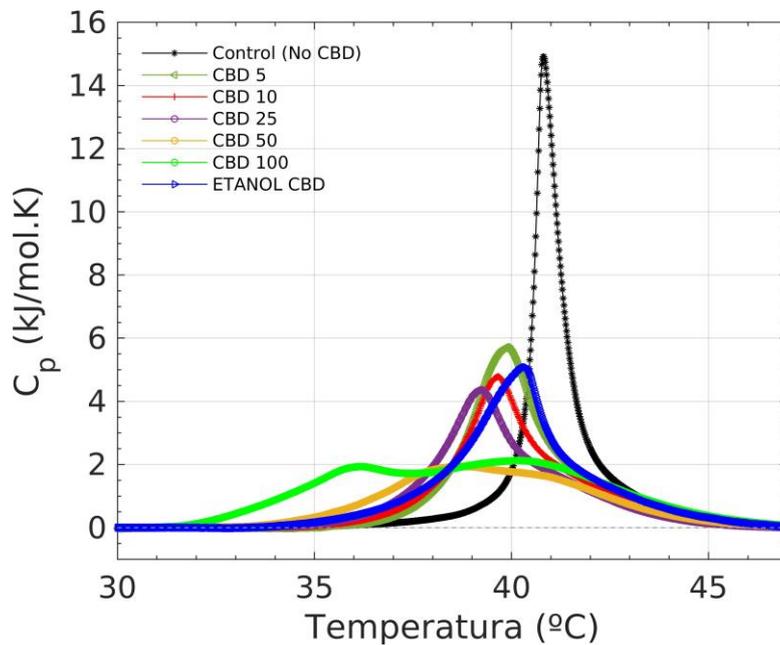


Figura 17: Perfiles calorimétricos producidos por las diferentes concentraciones de CBD. Estos perfiles nos permiten encontrar la efectividad del nanoacarreador etanol (curva azul).

Los resultados de esta calibración se muestran en la Tabla 1 en la que se presenta la efectividad en términos de porcentajes (nota: recordando que el porcentaje máximo de CBD en la membrana corresponde al 5 mol%. Este 5 mol% equivale al 100 % en la Fig. 17):

Tabla 1: Efectividad de entrega de CBD a través de cada acarreador medido en un modelo de membrana de DPPC/colesterol.

ACARREADOR	EFFECTIVIDAD
NANOEMULSIÓN AL ETANOL	25 % - 50 %
DMSO	10 %
LIPOSOMA DMPC	5 %
	2 % - 3 %

De la tabla 1, podemos observar que el acarreador más efectivo para entregar el CBD a la membrana de DPPC/colesterol es la nanoemulsión de aceite de linaza, seguido por etanol, mientras que el menos efectivo es el acarreador liposomal.

Después de realizar la calibración y obtener la efectividad de entrega de cada acarreador, se procedió a escoger el más efectivo para nuestro siguiente experimento. Es decir, en adelante usaremos la nanoemulsión de aceite de linaza como acarreador del CBD. Esta elección se basó en varios factores importantes:

Primero, se realizó un estudio para determinar el efecto de los acarreadores vacíos sobre la membrana. Se comprobó que la nanoemulsión de aceite de linaza vacía no genera ningún cambio sobre el perfil calorimétrico del DPPC/colesterol.

Segundo, se evaluó la estabilidad de la nanoemulsión de aceite de linaza a diferentes temperaturas para asegurar que su efectividad se mantuviera bajo distintas condiciones. Este paso es importante porque las variaciones de temperatura pueden afectar la estructura y tamaño de las nanoemulsiones, lo que a su vez puede influir en su capacidad para entregar CBD de manera efectiva.

En la Fig. 18, se muestra la distribución de tamaños de la nanoemulsión de aceite de linaza con CBD a tres temperaturas diferentes: 25°C, 45°C y 60°C. Estas mediciones permiten observar si la distribución de tamaños varía con la temperatura y, por lo tanto, evaluar la estabilidad de la nanoemulsión bajo diferentes condiciones térmicas.

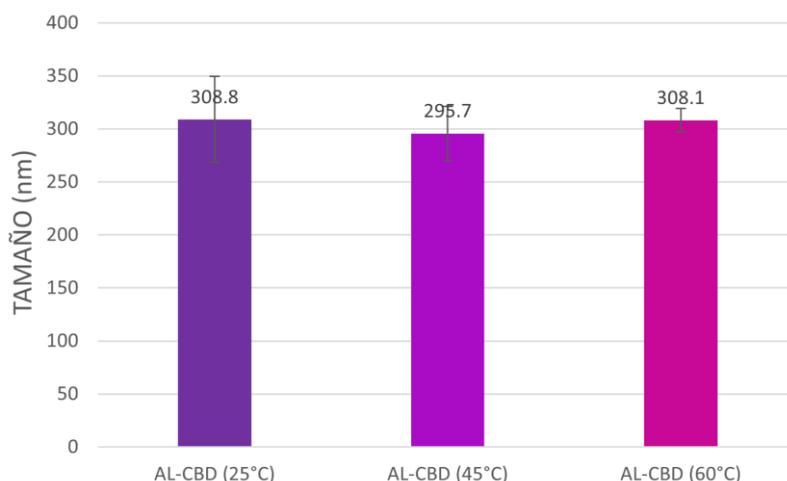


Figura 18: Estabilidad de tamaños de nanoemulsión de aceite de linaza con CBD a diferentes temperaturas: 25°C, 45°C y 60°C. Estas mediciones fueron repetidas con una N total de 5 veces y las barras de error corresponden a la desviación estándar de los datos.

Para comprender mejor el proceso de entrega de CBD por parte de la nanoemulsión, llevamos a cabo un estudio cinético detallado. Este estudio nos proporciona información sobre el tiempo que la nanoemulsión tarda en entregar el CBD y la cantidad máxima que puede entregar.

Preparamos tres modelos diferentes de membranas, todos ellos con un contenido de colesterol del 10 % molar. La distinción entre estos modelos radica en el grosor de la membrana, que está determinado por el tamaño de la cola de los fosfolípidos. Estos modelos incluyen membranas de DMPC-colesterol (Fig. 19 (a)), DPPC-colesterol (Fig. 19 (b)) y DSPC-colesterol (Fig. 19 (c)). Cada uno de estos tipos de membranas posee una cola hidrocarbonada de diferentes longitudes: 14, 16 y 18 carbonos, respectivamente.

Realizamos mediciones detalladas a lo largo del tiempo para observar cómo la nanoemulsión interactúa con cada tipo de membrana y cuánto CBD se entrega en cada caso. Esto nos permite comprender mejor cómo la estructura y

composición de la membrana influyen en la eficacia de la entrega de CBD por parte de la nanoemulsión.

La Fig. 19 muestra los resultados de este estudio cinético, proporcionando una visualización clara de los tiempos de entrega y las cantidades máximas de CBD entregadas para cada tipo de membrana.

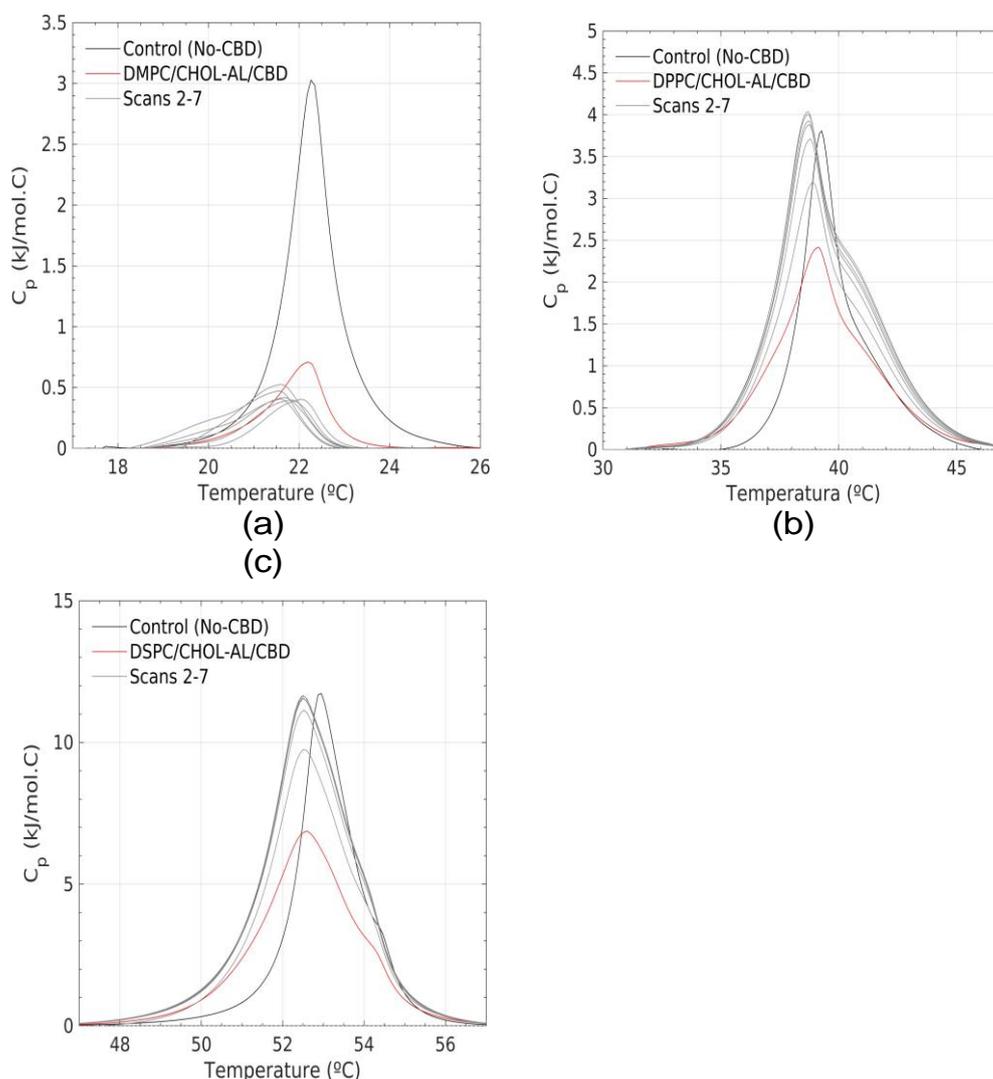


Figura 19: Cinética de nanoemulsión de aceite de linaza con CBD sobre diferentes modelos de membrana con colesterol. En la imagen a) se muestra la cinética para el modelo de DMPC/colesterol, b) se representa la cinética para el modelo de DPPC/colesterol y en la imagen c) la cinética para el modelo de DSPC/colesterol.

En el perfil calorimétrico de la Fig. 19, se observa un estado de saturación de los liposomas con colesterol a partir del scan 7. Esto indica que, desde este punto, la forma de la señal permanece constante, lo que sugiere que la nanoemulsión ha dejado de entregar CBD a la membrana blanco con colesterol.

Además, notamos que, al aumentar el tamaño de la cola hidrocarbonada, los efectos del CBD sobre la membrana son menores en comparación con la membrana de la cola más pequeña (DMPC-colesterol). Esto podría deberse a que, a medida que la cola de carbonos se alarga, el colesterol puede integrarse más profundamente en la membrana. Es decir, cuando la cola de carbonos es pequeña (14 carbonos), la molécula de colesterol puede separar tanto las colas como las cabezas de los fosfolípidos, facilitando así la entrada del CBD y afectando la distribución lateral de los fosfolípidos.

Hasta donde sabemos, los experimentos que a continuación siguen, nunca antes se habían realizado para moléculas hidrofóbicas. Se trata de medir cómo varía la energía de interacción del CBD con las membranas lipídicas conforme aumenta la longitud de la cola de carbonos. Para ello, utilizamos la técnica de Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC). En la Fig. 20, se presentan los resultados obtenidos de los calores liberados para dos modelos de membranas de DMPC con y sin colesterol (10 mol%). La imagen superior nos brinda información importante sobre la velocidad de la interacción entre la nanoemulsión de aceite de linaza con CBD y las membranas blanco de DMPC (curva roja) y DMPC-colesterol (curva verde). Podemos notar que la cinética de interacción para ambos casos es similar; la interacción está asociada a un proceso exotérmico. Sin embargo, se observa que los picos de calor liberado son un poco más grandes para la membrana con colesterol.

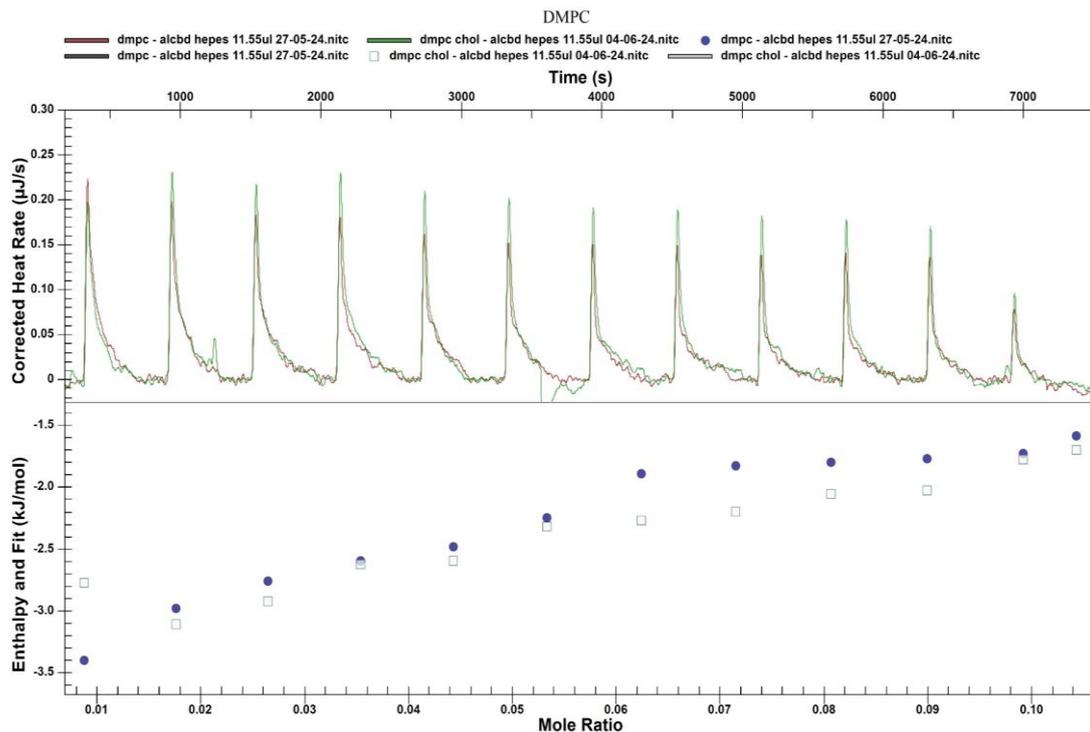


Figura 20: Resultados de ITC del sistema nanoemulsión de aceite de linaza/CBD titulado a modelos de membrana de DPPC (marrón) y DPPC-colesterol (rojo) imagen superior, variación de la entalpía entre ambos modelos de DPPC con y sin colesterol, imagen inferior

En la imagen inferior de la Fig. 20 se muestra la variación de la energía de interacción en términos de la entalpía conforme aumenta el radio molar. La entalpía por inyección se puede determinar midiendo el área bajo la curva de cada uno de los picos de calor. Podemos ver que la entalpía aumenta (acercándose a cero) conforme incrementa el radio molar (el cual está asociado al número de inyecciones que se van titulando a la muestra).

Además, se observa que para el modelo de la membrana de DMPC con colesterol (cuadros verdes), los valores de entalpía son más pequeños (valores de

entalpía más negativos). Se sabe que, cuanto más negativo es el valor de la entalpía, más favorable es la interacción. Sin embargo, la variación de las áreas de integración para calcular la entalpía entre ambos modelos de membrana es pequeña, lo que indica que no hay una diferencia significativa en la energía de enlace entre ambos modelos de membrana de DMPC.

Se realizaron mediciones en Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) para evaluar las diferentes membranas blanco de DPPC, tanto con cómo sin la presencia de colesterol.

Los resultados se presentan en la Fig. 21. En la imagen superior, se puede observar la magnitud de los calores liberados durante la interacción entre la nanoemulsión de aceite de linaza con CBD y los distintas de membranas de DPPC (con y sin colesterol). Es notable que los picos de calor para la membrana de DPPC (representado en el gráfico marrón) son más altos que los de la membrana con colesterol (representado en la gráfica roja).

Además, se aprecia que la cinética de interacción en la membrana con colesterol parece ser más rápida en comparación con la sin colesterol, sugiriendo una dinámica de unión más acelerada en presencia de colesterol.

En la imagen inferior de la Fig. 21, se puede observar la variación de la energía en términos de entalpía conforme aumenta el número de titulaciones aplicadas a la muestra. Al integrar las áreas bajo la curva de los picos de calor en la imagen superior, es posible determinar el valor de la entalpía y su variación a medida que se incrementa el número de titulaciones.

Este análisis revela que la de membrana de DPPC con colesterol (representado por cuadros verdes) resulta ser menos energético que el modelo sin colesterol (representado por puntos azules) en términos de entalpía. Esto implica que, desde una perspectiva energética, la interacción es menos intensa en el modelo que incluye colesterol, lo cual puede ser un indicativo de una mayor estabilidad estructural conferida por el colesterol en la membrana.

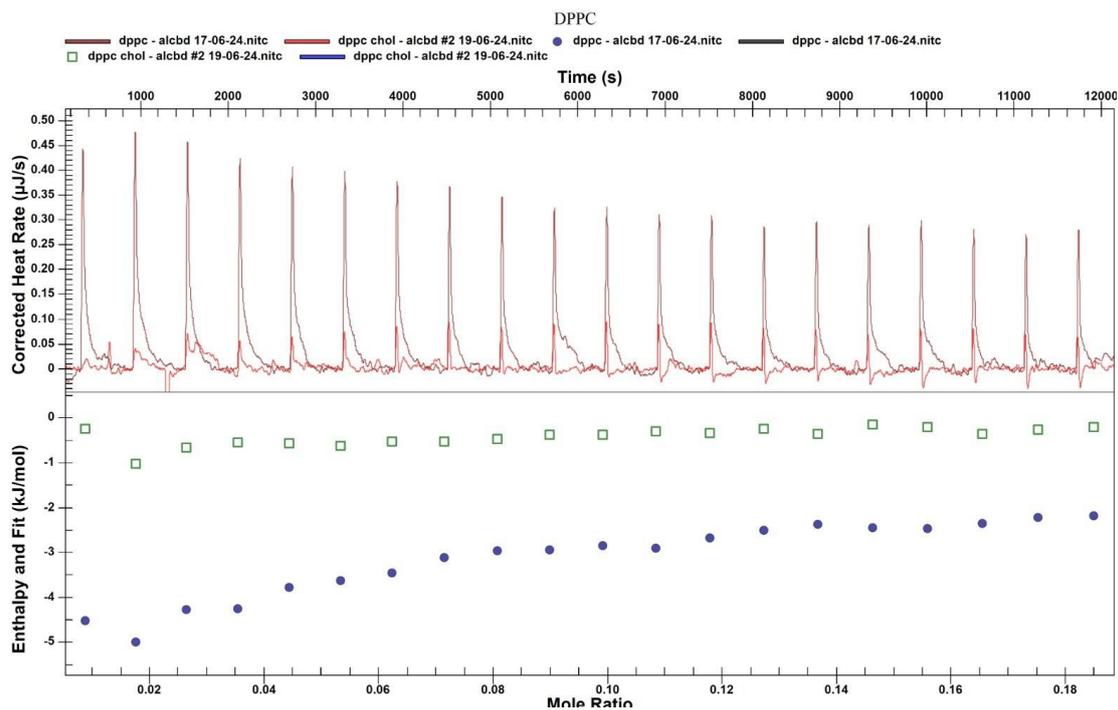


Figura 21: Resultados de ITC del sistema nanoemulsión de aceite de linaza/CBD titulado a modelos de membrana de DPPC (marrón) y DPPC-colesterol (roja) imagen superior, variación de la entalpía entre ambos modelos de DPPC con y sin colesterol, imagen inferior.

Por último, se preparó una membrana de DSPC con y sin colesterol, en la Fig. 22, se presentan los resultados obtenidos para esta membrana. Podemos ver que los picos de calor son menores que los del DMPC, además la cinética de interacción es mucho más rápida en comparación con los otros modelos.

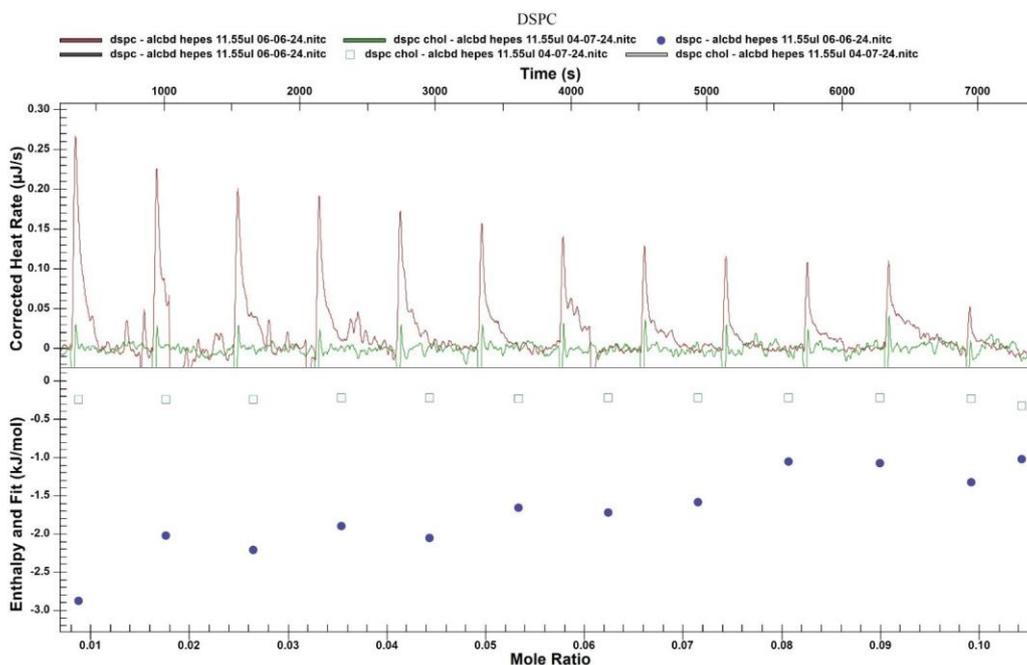


Figura 22: Resultados de ITC del sistema nanoemulsión de aceite de linaza/CBD titulado a la membrana de DSPC (marrón) y DSPC-colesterol (roja) imagen superior, variación de la entalpía entre ambas membranas de DSPC con y sin colesterol, imagen inferior.

Los valores de entalpía (imagen inferior Fig. 22) para este sistema son menores a los otros dos sistemas, sin embargo, en el caso de la membrana de DSPC sin colesterol el sistema tarda un poco más en llegar a un estado de saturación. Además, la membrana con colesterol presenta unos picos muy pequeños, lo que demuestra que la interacción del CBD con la membrana es muy débil en comparación con las otras membranas de cola más cortas.

Los resultados de ITC nos presentan toda la termodinámica de los enlaces asociada a este tipo de sistemas, los cuales lo podemos clasificar como sistemas "no específicos", es decir, en este tipo de sistemas, la droga en el acarreador no se une a un receptor en la membrana (como los otros procesos específicos donde

existe un binding entre un receptor y un ligando).

Por otro lado, también se puede notar que el aumento en el tamaño de las colas de los fosfolípidos genera una disminución en la energía liberada al momento de unirse la nanogota con los liposomas en ambos modelos, esto explica por qué se ve menos afectada la membrana al aumentar el tamaño de las colas, pues la unión entre el CBD y la membrana es menos energético, esto hace que se mantenga más estable la membrana al entrar el CBD en ella.

Además, podemos observar que los procesos de interacción son más rápidos conforme aumenta el grosor de la membrana. Estos procesos se ven más marcados en la membrana con colesterol, en los cuales, al aumentar el tamaño de la cola, la energía asociada a la unión del CBD con la membrana se hace más pequeña.

Finalmente, es importante señalar que no se observa una caída de las entalpías conforme transcurre la titulación (como la mostrada en la Fig. 13). Este comportamiento es distintivo de una interacción no específica.

7 CONCLUSIÓN

Hemos logrado caracterizar distintos tipos de acarreadores a través de dos técnicas complementarias, que nos dan una descripción completa de la termodinámica asociada.

Encontramos que tanto el DMSO como el etanol forman nanoestructuras al entrar en contacto con el agua, lo cual fue un hallazgo novedoso y significativo para comprender la interacción de estos solventes con el CBD. Además, observamos que la presencia de colesterol en la membrana blanco promueve la entrega de CBD, lo que sugiere un papel crucial del colesterol en el proceso estudiado.

Por otro lado, de la caracterización de los nanoacarreadores, determinamos que el más eficiente es la nanoemulsión de aceite de linaza, mientras que el menos eficiente resultó ser el acarreador liposomal de DMPC. Estos hallazgos son fundamentales para la comprensión e identificación del acarreador óptimo para la entrega de CBD en nuestro sistema.

Con la cinética realizada se encontró que el tamaño de la cadena de carbono en las colas de los fosfolípidos puede influir en el efecto que el CBD hace sobre la membrana, así como en la entrega. Es decir, entre mayor es la cola de carbonos los efectos sobre las propiedades como entalpía, capacidad calorífica, y temperatura de transición de fase se ven menos afectadas por el CBD.

Por último, los resultados de ITC nos demostraron que los procesos de unión entre este tipo de sistemas (nanoemulsión titulada a liposomas con y sin colesterol) son menos energéticos que los procesos de unión sustrato- proteína, ya que es un sistema no específico. Además, al medir la energía entre los diferentes modelos, se encontró una disminución en ésta, conforme aumenta el largo de cadena de carbonos en las colas de los fosfolípidos.

PERSPECTIVAS

1.-Usar la nanoemulsión de aceite de linaza con CBD para administrarlo en modelos animales.

2.-Estudiar el efecto de la nanoemulsión con aceites esenciales.

3.-Usar la técnica de ITC para medir uniones entre la nanoemulsión con CBD y una célula o parásito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mazzarello P. A unifying concept: the history of cell theory. *Nat Cell Biol.* 1999 May;1(1):E13-5. doi: 10.1038/8964. PMID: 10559875.
2. Thomas Heimburg "Thermal Biophysics of Membranes", Editorial WILEY-VCH Verlag GmbH Y Co. KGaA, pp. 15-25
3. Cooper G, Hausman RE. *The Cell.* 4 Edition. Editorial ASM Press. USA. pp. 4-37
4. Bih, Clementino Ibeas, et al. "Molecular targets of cannabidiol in neurological disorders." *Neurotherapeutics* 12.4 (2015): 699-730.
5. Etxebeste, Mikel. "Nuevas aplicaciones del CBD." *El farmacéutico: profesión y cultura* 615 (2022): 26-30.
6. Bonavento, Risso, and Juan Manuel. "Eficacia de la utilización del cannabidiol (CBD) en el tratamiento complementario de la epilepsia refractaria en adultos." (2022).
7. White, C. Michael. "A review of human studies assessing cannabidiol's (CBD) therapeutic actions and potential." *The Journal of Clinical Pharmacology* 59.7 (2019): 923-934.
8. Ana Zita Fernandes. "Membrana Celular". Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), con licenciatura en Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela. (2021)
9. Asociación Americana de Diabetes, et al. "Conferencia de desarrollo de consenso sobre fármacos antipsicóticos y obesidad y diabetes". *Cuidado de la diabetes* 27.2 (2004): 596-601.

10. Lechuga, Laura M. "Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud." (2011).
11. Rojas-Aguirre, Yareli, Karina Aguado-Castrejón, and Israel González-Méndez. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educación química* 27.4 (2016): 286-291.
12. Maiolo, Daniele, et al. "Nanomedicine delivery: does protein corona route to the target or off road?." *Nanomedicine* 10.21 (2015): 3231-3247.
13. Qhattal, Hussaini Syed Sha, et al. "Hyaluronan polymer length, grafting density, and surface poly (ethylene glycol) coating influence in vivo circulation and tumor targeting of hyaluronan-grafted liposomes." *ACS nano* 8.6 (2014): 5423-5440.
14. Jayesh A. Kulkarni, Pieter R. Cullis and Roy van der Meel. "Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility" *NUCLEIC ACID THERAPEUTICS* Volume 28, Number 3, 2018 ^a Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/nat.2018.0721.
15. Arévalo Hurtado, Lina Marcela. "Modificación superficial de liposomas mediante un polímero catiónico bioadherente para la vehiculización de ampicilina." (2017).
16. Yibo Liu, ab Karla M. Castro Bravo a and Juewen Liu: "Targeted liposomal drug delivery: a nanoscience and biophysical perspective", *Nanoscale Horiz.*, 2021, pag. 6, 78 DOI: 10.1039/d0nh00605j
17. Lopez-Pinto, J. M., M. L. Gonzalez-Rodriguez, and A. M. Rabasco. "Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes." *International journal of pharmaceutics* 298.1 (2005): 1-12.

18. Mazdaei, M. y Asare-Addo, K., (2022) "Una minirevisión de nanoportadores en sistemas de administración de fármacos", *British Journal of Pharmacy* 7(1). doi: <https://doi.org/10.5920/bjpharm.780>
19. David Needham and Ana Ponce "Nanoscale Drug Delivery Vehicles for Solid Tumors: A New Paradigm for Localized Drug Delivery Using Temperature Sensitive Liposomes"
20. Blair, Emek. "Liposomal cannabidiol delivery: A pilot study." *Am J Endocannabinoid Med* 2.1 (2020): 19-21.
21. Kashkooli, Farshad Moradi, et al. "Ultrasound-mediated nano drug delivery for treating cancer: Fundamental physics to future directions." *Journal of Controlled Release* 355 (2023): 552-578.
22. Noble, Gavin T. y otros. "Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations". *Tendencias en biotecnología* 32.1 (2014): 32-45.
23. Jan W. Dick H. "Membrane Fusion : lipid vesicles as a model system" *Chemistry and Physics of Lipids*, 40 (1986) 145-166, 145, Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd .
24. David Needham Mark W. Dewhirst "The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors." (September 2001) *Advanced Drug Delivery Reviews* 53 (2001) 285–305.
25. Sharma VK, Sarwa KK, Mazumder B. (2014). "Fluidity enhancement: a
26. critical factor for performance of liposomal transdermal drug delivery system". *J Liposome Res* 24:83–9
27. Pérez-Isidoro, R., Sierra-Valdez, F. J., y Ruiz-Suárez, J. C. "Anesthetic diffusion through lipid membranes depends on the protonation rate". (2014) *Scientific reports*, 4(1), 1-9.

28. Martha Leticia V.G. Jordi Borrell H." Desarrollo y caracterización de liposomas para aplicación tópica de fármacos." Universidad de Barcelona (2015).
29. Yuvraj Singh, Jaya Gopal Meher, Kavita Raval, Farooq Ali Khan, Mohini Chaurasia, Nitin K. Jain, Manish K. Chourasia "Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery" Journal of Controlled Release, (December 2016)doi: 10.1016/j.jconrel.2017.03.008.
30. S.-P. Jiang, S.-N. He, Y.-L. Li, D.-L. Feng, X.-Y. Lu, Y.-Z. Du, H.-Y. Yu, F.-Q. Hu, H. Yuan, "Preparation and characteristics of lipid nanoemulsion formulations loaded with doxorubicin", International Journal of Nanomedicine, 8 (2013) 3141-3150.
31. Y. Zhang, Z. Shang, C. Gao, M. Du, S. Xu, H. Song, T. Liu, "Nanoemulsion for Solubilization, Stabilization, and In Vitro Release of Pterostilbene for Oral Delivery", AAPS PharmSciTech, 15 (2014) 1000-1008.
32. W. Sun, X. Ma, X. Wei, Y. Xu, "Nano composite emulsion for sustained drug release and improved bioavailability", Pharmaceutical research, 31 (2014) 2774-2783.
33. T. Zhang, D. Dong, D. Lu, S. Wang, B. Wu, "Cremophor EL-based nanoemulsion enhances transcellular permeation of emodin through glucuronidation reduction in UGT1A1-overexpressing MDCKII cells", International journal of pharmaceutics, 501 (2016) 190-198
34. Angela M. Jaramillo G. Dr. J. Carlos Ruiz S. "Estudio de la interacción de nanoemulsiones y nanoespumas con membranas lipídicas". (Diciembre 2022.)
35. M. Gaspar, M. Bovaira, F.J. Carrera-Hueso, M. Querol, A. Jiménez y L. Moreno "Efectividad de un protocolo de tratamiento tópico con dimetilsulfóxido al 50 % en el síndrome de dolor regional complejo tipo 1" (enero de 2012) www.elsevier.es/farmhosp.

36. Letona, Carlos Manuel Monzon. "dimetilsulfoxido y el retraso mental."
37. P. M. P, Humble, J, Cítrico, Generales, Kalcker, Gracia. "DMSO–Dimetil Sulfóxido". salud Perú
38. Gaspar, M., et al. "Efectividad de un protocolo de tratamiento tópico con dimetilsulfóxido al 50\% en el síndrome de dolor regional complejo tipo 1." Farmacia Hospitalaria 36.5 (2012): 385-391.
39. María del Carmen Ley Flores. "SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS ANFIFÍLICAS BASADAS EN L-CISTEÍNA" (Diciembre 2018)
40. Jacob, Stanley W. y Robert Herschler. "Farmacología del DMSO". Criobiología 23.1 (1986): 14-27.
41. Notman, Rebecca y col. "Base molecular de la acción del dimetilsulfóxido (DMSO) sobre las membranas lipídicas". Revista de la Sociedad Química Estadounidense 128.43 (2006): 13982-13983.
42. Ur-Rehman, Tofeeq, Staffan Tavelin y Gerhard Gröbner. "Efecto del DMSO sobre la micelización, gelificación y perfil de liberación de fármaco del Poloxámero 407". Revista internacional de farmacia 394.1-2 (2010): 92-98.
43. Gómez, Claudia Taborda, et al. "Cannabidiol (CBD) alters the functionality of neutrophils (PMN). Implications in the refractory epilepsy treatment." Pharmaceuticals 14.3 (2021): 220.
44. Li, Yuxi, et al. "In vitro effects of cannabidiol and its main metabolites in mouse and human Sertoli cells." Food and Chemical Toxicology 159 (2022): 112722.
45. Paz María de Lourdes Cornejo Arteaga, "Aplicaciones del alcohol etílico". Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

46. Pohorecky, Larissa A. y John Brick. "Farmacología del etanol". *Farmacología y Terapéutica* 36.2-3 (1988): 335-427.
47. Le Dare, Brendan, and Thomas Gicquel. "Therapeutic applications of ethanol: A review." *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 22 (2019): 525-535.
48. Choi, Won Seon y otros. "Suministro por inhalación de proteínas a partir de suspensiones de etanol". *Actas de la Academia Nacional de Ciencias* 98.20 (2001): 11103-11107.
49. Pilch, Ewa, and Witold Musiał. "Liposomes with an ethanol fraction as an application for drug delivery." *International journal of molecular sciences* 19.12 (2018): 3806.
50. Adrián Velázquez Campo "Calorimetría isotérmica de titulación: desentrañando interacciones biológicas". Investigador ARAID, Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), Universidad de Zaragoza adrianvc@unizar.es
DOI: http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_ANC.2020.07.1