

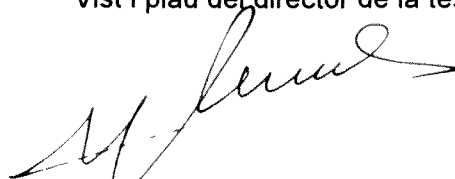
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
UNITAT DE BIOFÍSICA

OPTIMACIÓ DE FORMULACIONS AMB FOSFOLÍPIDS PER A ÚS DERMATOLÒGIC.

Memòria presentada per en Ramon Barnadas
Rodríguez per optar al grau de Doctor.

Els treballs exposats han estat dirigits pel Dr.
Manuel Sabés i Xamaní.

Vist i plau del director de la tesi:



Dr. Manuel Sabés i Xamaní.
UAB, Setembre de 1999.

T UAB
4761

SUPORT I COL·LABORACIONS.

Gran part del present treball ha estat realitzat amb l'ajut d'un beca del programa de "Ayudas para el intercambio de personal investigador entre industrias y centros públicos de investigación" del que en seu dia fou el *Ministerio de Educación y Ciencia*. S'ha dut a terme de manera complementària als Laboratoris d'Isdin S.A., sota la direcció del Sr. Carlos Pellejero, i a la Unitat de Biofísica de la UAB, amb la direcció del Dr. Manuel Sabés i Xamaní.

La tasca experimental, però, no s'hagués pogut realitzar sense la important col.laboració de moltes persones:

-En Carles Trullàs, cap de projectes del laboratori d'investigació d'Isdin S.A., ens ha assessorat gran part dels experiments realitzats.

-La Dra. Mar Recasens fou qui, a Antonio Puig S.A., realitzà el tractament dels ratolins amb butirat-propionat d'hidrocortisona encapsulat en liposomes, així com la posterior obtenció i tinció de les biòpsies.

- La bonhomia de Paz Terraz, Josep Maria Reig, Joaquim Coll i Àngels Capdevila, va permetre que aprenguéssim les tècniques aplicades en els assajos *in vivo* i *in vitro* d'efectivitat dels liposomes que es dugueren a terme en els laboratoris de Toxicologia i d'Avaluació de Propietats d'Antonio Puig S.A.

- Els experiments no invasius *in vivo* en humans han estat possibles gràcies a la col.laboració d'un gran nombre de voluntaris de tot arreu: Víctor-Manuel Barnadas, Tzvetana Lazarova, Pilar Rubert, Paz Terraz, Mònica Garcia, Mar Recasens, Manuela Rodríguez, Manuel Sabés, Judith Llobet, Josep Maria Reig, Joaquim Coll, Gemma Campos, Eulàlia Conangla, Cristina Costa, Carles Trullàs, Anna Villalba, Àngels Capdevila i Àlex Garcia.

- Na Mercè Rodríguez, Laura Pasapera i Cristina Costa, realitzaren les anàlisis de les cadenes d'àcids grassos dels fosfolípids i de l'oli de borratge mitjançant cromatografia de gasos al laboratori de control de qualitat de Antonio Puig S.A.

-Fins que arribà la oportunitat d'adquirir un aparell similar, i gràcies al Dr. Joan Estelrich, vam poder mesurar el diàmetre dels liposomes emprant un Malvern Autosizer IIc pertanyent al Departament de Físico-química de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. En un evident exemple d'abús de confiança també utilitzarem el seu crio-osmòmetre.

- El Dr. Paco Valero ens va permetre la utilització del refractòmetre de la Unitat d'Enginyeria Química de la UAB.

- El viscosímetre va ser aportat pel Dr. Ricardo Torres, del Departament de Mecànica de Fluids de la Universitat Politècnica de Catalunya (UPC) .

- La comparació de les mitjanes en l'anàlisi de la variabilitat del Microtrack UPA 150 es dugué a terme a la Unitat de Bioestadística de la UAB amb l'ajut de la Dra. Mercedes Campillo.

- Com que l'assessorament de la Dra. Campillo em va satisfer molt, vaig decidir que també m'ajudés el seu marit, en Josep Maria Paulís, director del Servei d'Anàlisi Química de la UAB, on es realitzaven les determinacions de crom per absorció atòmica.

- Raquel Palencia, Gemma Casañas, Elodia Serrano, Dani Peris i Dani Martínez, des de la seva situació d'ajudants de laboratori de la Unitat de Biofísica, sempre han col.laborat quan ha estat necessari.

En l'aspecte teòric, igualment necessàries han estat les converses mantingudes amb el Dr. Ricardo Torres del Departament de Mecànica de Fluids de la UPC, el Dr. Javier Bafaluy de la Unitat de Física Estadística de la UAB, el Dr. Gaspar Orriols de la Unitat d'Òptica de la UAB.

A ningú.
(No sóc tan cruel).

ÍNDEX

	Pàgina
1. INTRODUCCIÓ.	1-25
PRESENTACIÓ.	3-4
1.1 LÍPIDS, TRIACILGLICÈRIDS, I FOSFOLÍPIDS.	5-9
1.2 ELS SISTEMES BINARIS FOSFOLÍPID-AIGUA.	9-11
1.3 EMULSIONS OLI/AIGUA (O/W).	12-13
1.4 PREPARACIÓ DE LIPOSOMES I D'EMULSIONS O/W A GRAN ESCALA.	13-16
1.5 APLICACIONS DELS LIPOSOMES.	16-19
1.6 ESTRUCTURA DE LA PELL HUMANA.	19-22
1.7 VESÍCULES LIPÍDIQUES PER APLICACIÓ TÒPICA DE FÀRMACS.	23-25
2. OBJECTIUS.	27-29
3. MÈTODES.	31-79
3.1 MÈTODES ANALÍTICS.	33-58
3.1.1 MÈTODES DE QUANTIFICACIÓ.	33-37
3.1.1.1 Quantificació de la concentració de fosfolípids per complexació amb ferrotiocianat amònic.	33-34
3.1.1.2 Quantificació de fosfolípids mitjançant la densitat òptica UV-Vis de les suspensions de liposomes.	34
3.1.1.3 Quantificació de fàrmacs per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC).	34-35
3.1.1.4 Quantificació del ditranol per espectrofotometria UV-Vis.	35-37
3.1.1.5 Quantificació de crom mitjançant absorció atòmica.	37
3.1.1.6 Quantificació de les cadenes d'àcid gras de fosfolípids i d'oli de borratge mitjançant cromatografia de gasos.	37
3.1.1.7 Mesura de l'osmolaritat.	37
3.1.1.8 Mesura de l'índex de refracció.	37
3.1.2 MÈTODES DE CARACTERITZACIÓ DE FOSFOLÍPIDS, FÀRMACS, SUSPENSIONS DE LIPOSOMES I EMULSIONS D'OLI DE BORRATGE.	7-49
3.1.2.1 Anàlisi de fosfolípids per cromatografia en capa prima (TLC).	38
3.1.2.2 Índex d'oxidació de fosfolípids i d'oli de borratge.	38-41
3.1.2.3 Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR).	41-42
3.1.2.4 Determinació de la sedimentació de liposomes i de l'estabilitat física de les preparacions mitjançant espectrofotometria UV-Vis.	42-43
3.1.2.5 Estabilitat de les suspensions d'oli de borratge centrifugades.	43
3.1.2.6 Mesura de la viscositat dinàmica.	43
3.1.2.7 Microscòpia (òptica i electrònica).	43-44
3.1.2.8 Determinació del diàmetre de vesícules mitjançant tècniques espectroscòpiques.	44-49
3.1.3 MÈTODES D'AVUACIÓ DE L'EFFECTIVITAT DE LES FORMULACIONS.	49-58
3.1.3.1 Mesura de la pèrdua transepidermica d'aigua (TEWL).	49-51
3.1.3.2 Mesura de la capacítància.	51-52
3.1.3.3 Avaluació de la capacitat vasoconstrictora del butirat-propionat d'hidrocortisona mitjançant velocimetria de làser doppler (VLD).	52-56

3.1.3.4	Avaluació histològica del poder atrofiant del butirat-propionat d'hidrocortisona.	56-57
3.1.3.5	Test d'irritació <i>in vitro</i> (Skintex).	57-58
3.2	MÈTODES PREPARATIUS.	59-67
3.2.1	PURIFICACIÓ DE FOSFATIDILCOLINA D'OU.	59-60
3.2.2	MÈTODES DE PREPARACIÓ DE LIPOSOMES I D'EMULSIONS AMB OLI DE BORRATGE.	60-63
3.2.2.1	Obtenció de liposomes multilaminars grans (MLVs).	60-61
3.2.2.2	Evaporació en fase reversa.	61-62
3.2.2.3	Pro-Lipo S.	62
3.2.2.4	Natipide II.	62-63
3.2.2.5	Emulsions d'oli de borratge.	63
3.2.3	MÈTODES DE PROCESSAT DE LIPOSOMES I D'EMULSIONS D'OLIDE BORRATGE.	63-65
3.2.3.1	Sonicació.	63-64
3.2.3.2	Extrusió.	64
3.2.3.3	Homogenització a alta pressió.	64
3.2.3.4	Liofilització.	64-65
3.2.3.5	Incorporació en hidrogels.	65
3.2.4	MÈTODES DE SEPARACIÓ EMPRATS EN LA QUANTIFICACIÓ DE LES SUBSTÀNCIES ASSOCIADES A LIPOSOMES I A MICROGOTES OLIOSES.	65-67
3.2.4.1	Cromatografia d'exclusió molecular.	65-66
3.2.4.2	Centrifugació de minicolumnes d'exclusió molecular.	66
3.2.4.3	Centrifugació.	66-67
3.2.4.4	Ultrafiltració.	67
3.3	MÈTODES MATEMÀTICS.	69-79
3.3.1	DISSENY I AVALUACIÓ D'EXPERIMENTS.	69-78
3.3.2	TRACTAMENT D'ESPECTRES MITJANÇANT LA 4 ^a DERIVADA.	78-79
4.	RESULTATS.	81-225
4.1	VALIDACIÓ DELS MÈTODES D'ANÀLISI.	83-134
4.1.1	INTERFERÈNCIES EN LA QUANTIFICACIÓ DE FOSFOLÍPIDS.	84-85
4.1.2	INTERFERÈNCIES EN LA DETERMINACIÓ DE L'INDEX D'OXIDACIÓ.	85-87
4.1.3	INTERFERÈNCIES EN LA QUANTIFICACIÓ DE FÀRMACS PER HPLC.	88
4.1.4	QUANTIFICACIÓ DE FOSFOLÍPIDS MITJANÇANT LA DENSITAT ÒPTICA (DO) A L'UV-Vis.	88-92
4.1.4.1	Anàlisi de regressió.	
4.1.4.2	Correlació amb l'anàlisi amb ferrotiocianat amònic. Anàlisi amb la DO a 280 nm.	
4.1.4.3	Anàlisi de fosfolípids a les fraccions d'elució en columnes d'exclusió molecular.	
4.1.5	QUANTIFICACIÓ DEL DITRANOL PER ESPECTROSCÒPIA UV-Vis (VALIDACIÓ DE Q%).	92
4.1.6	QUANTIFICACIÓ DE LA RELACIÓ OLI DE BORRATGE/FOSFOLÍPID PER ESPECTROSCÒPIA D'INFRAROIG.	92-93

4.1.7 UTILITZACIÓ DE L'IÓ CROMAT COM A MARCADOR DEL VOLUM INTERN DELS LIPOSOMES.	94-97
4.1.8 MESURA DEL DIÀMETRE DE LIPOSOMES MITJANÇANT EL MICROTRACK UPA 150.	97-132
4.1.8.1 Variabilitat en la determinació del diàmetre i amplada.	97-103
4.1.8.2 Determinació de la tolerància en els canals de lectura.	103-109
4.1.8.3 Variabilitat global en els canals de lectura.	109-111
4.1.8.4 Efecte de la concentració en l'exactitud de les anàlisi.	111-121
4.1.8.5 Efecte creuat en la precisió de les lectures.	121-123
4.1.8.6 Determinació de l'exactitud en l'anàlisi de suspensions de liposomes.	123-128
4.1.8.7 Precisió i exactitud en l'anàlisi de poblacions bimodals.	128-132
4.1.9 AVALUACIÓ DELS PARÀMETRES DE LA VELOCIMETRIA DE LÀSER DOPPLER.	133-134
4.1.10 AVALUACIÓ DE L'ERROR DE L'ANALITZADOR D'IMATGES.	134
4.2 RESULTATS DELS MÈTODES PREPARATIUS.	135-152
4.2.1 PURIFICACIÓ DE LA FOSFATIDILCOLINA D'OU.	136-137
4.2.2 DETERMINACIÓ DELS DIÀMETRES DE PORUS DE LES MEMBRANES D'EXTRUSIÓ.	137-138
4.2.3 QUANTIFICACIÓ DE LA PÈRDUA DE FOSFOLIPID DURANT L'EXTRUSIÓ I DURANT EL PROCESSAMENT EN EL MICROFLUIDIZER 110S.	139-140
4.2.4 SEPARACIÓ DE SUBSTÀNCIES NO ENCAPSULADES.	140-152
4.2.4.1 Columnes d'exclusió molecular (Sephadex G-25).	140-141
4.2.4.2 Minicolumnes d'exclusió molecular (Sephadex G-50).	141-142
4.2.4.3 Centrifugació.	142-145
4.2.4.4 Ultracentrifugació.	145-149
4.2.4.5 Ultrafiltració.	149-152
4.2.5 OBTENCIÓ DE LIPOSOMES AMB EL MICROFLUIDIZER 110 S.	153-170
4.2.5.1 Variació de la grandària dels liposomes en funció de les condicions de processament i de la força iònica del medi.	153-155
4.2.5.2 Variació del volum encapsulat dels liposomes en funció de les condicions de processament.	155-159
4.2.5.3 Efecte de la concentració d'etanol en la grandària dels liposomes.	159-162
4.2.6 LIOFILITZACIÓ.	162-165
4.2.7 OBTENCIÓ DE LIPOSOMES EN HIDROGELS.	165-170
4.3 RESULTATS DE LES SUSPENSIONS DE LIPOSOMES I EMULSIONS OB/F.	171-225
4.3.1 LIPOSOMES OBTINGUTS AMB EL MICROFLUIDIZER 110S.	172-178
4.3.1.1 Suspensions aquoses.	172-174
4.3.1.2 Hidrogels amb liposomes.	175
4.3.1.3 Avaluació del grau d'hidratació i funció barrera de la pell.	176-178
4.3.2 LIPOSOMES AMB DITRANOL (DT).	179-187
4.3.2.1 Estabilitat química del ditranol.	179-180
4.3.2.2 Encapsulació de ditranol en liposomes de Pro-Lipo S.	180-185
4.3.2.2.1 Saturació dels liposomes.	181-182

4.3.2.2.2 Estabilitat de les suspensions.	182-183
4.3.2.2.3 Estabilitat dels liofilitzats.	183-184
4.3.2.2.4 Estabilitat de Pro-Lipo S amb ditranol.	184-185
4.3.2.3 Incorporació de ditranol en liposomes de Natipide II.	185
4.3.2.4 Incorporació de ditranol en MLVs i REVs.	186-187
4.3.2.5 Assaig d'irritació in vitro.	187
4.3.3 LIPOSOMES AMB HIDROCORTISONA (HC).	189-203
4.3.3.1 Encapsulació d'hidrocortisona en liposomes de Pro-Lipo S.	189-193
4.3.3.1.1 Saturació dels liposomes.	189-190
4.3.3.1.2 Encapsulació d'hidrocortisona en funció de la grandària dels liposomes.	190-191
4.3.3.1.3 Estabilitat de les suspensions.	191-193
4.3.3.2 Incorporació d'hidrocortisona en REVs i MLVs.	193-196
4.3.3.3 Anàlisi de la interacció HC-fosfolípid mitjançant FTIR.	196-203
4.3.4 LIPOSOMES AMB BUTIRAT-PROPIONAT D'HIDROCORTISONA (HBP).	204-217
4.3.4.1 Incorporació d'HBP en liposomes de Pro-Lipo S.	204-212
4.3.4.1.1 Saturació dels liposomes.	204-207
4.3.4.1.2 Encapsulació d'HBP en funció de la grandària dels liposomes.	207-208
4.3.4.1.3 Estabilitat de les suspensions.	208-209
4.3.4.1.4 Estabilitat dels hidrogels.	209-211
4.3.4.1.5 Estabilitat dels liofilitzats.	211-212
4.3.4.2 Anàlisi de la interacció HBP-fosfolípid mitjançant FTIR.	212-215
4.3.4.3 Capacitat vasoconstrictora de l'HBP en liposomes.	215-216
4.3.4.4 Capacitat atrofiant de l'HBP en liposomes.	216-217
4.3.5 EMULSIONS D'OLI DE BORRATGE (OB) ESTABILITZADES AMB FOSFOLÍPIDS (F).	218-225
4.3.5.1 Optimització de les emulsions.	218-220
4.3.5.2 Caracterització de l'emulsió OB/F=1 p/p.	220-222
4.3.5.3 Estabilitat de les emulsions OB/F.	222-225
5. DISCUSSIÓ.	227-260
5.1. VALIDACIÓ DE MÈTODES D'ANÀLISI.	229-241
5.1.1 DETERMINACIÓ DE L'ÍNDEX D'OXIDACIÓ.	229
5.1.2 QUANTIFICACIÓ DE FOSFOLÍPIDS MITJANÇANT LA DO UV-Vis.	230
5.1.3 VALIDACIÓ DEL CROMAT COM MARCADOR DEL VOLUM INTERN DELS LIPOSOMES.	230-232
5.1.4 VALIDACIÓ DEL MICROTRACK UPA 150 COM A ANALITZADOR DEL DIÀMETRE DE LIPOSOMES.	232-241
5.2 MÈTODES PREPARATIUS.	242-246
5.2.1 OBTENCIÓ DE LIPOSOMES AMB EL MICROFLUIDIZER 110S.	242-244
5.2.2 LIOFILITZACIÓ DE LIPOSOMES.	244-245
5.2.3 OBTENCIÓ D'HIDROGELS AMB LIPOSOMES.	245-246
5.3 AVALUACIÓ DE LES PREPARACIONS.	247-260
5.3.1 LIPOSOMES OBTINGUTS AMB EL MICROFLUIDIZER 110S.	247-249
5.3.2 ENCAPSULACIÓ DE DITRANOL EN LIPOSOMES.	249-252
5.3.3 ENCAPSULACIÓ D'HIDROCORTISONA EN LIPOSOMES.	252-256

5.3.4 ENCAPSULACIÓ DE BUTIRAT-PROPIONAT D'HIDROCORTISONA EN LIPOSOMES.	256-259
5.3.5 OBTENCIÓ D'EMULSIONS OB/F.	259-260
6. CONCLUSIONS.	261-264
7. REFERÈNCIES.	265-281
8. ANNEXES.	283-288
ANNEXE A / Abreviacions.	285
ANNEXE B / Fórmules i dades físico-químiques.	286-288

1. INTRODUCCIÓ

PRESENTACIÓ.

El terme liposomes ha assolit una difusió notable fora de l'àmbit científic des que, el 1986, la companyia Christian Dior va comercialitzar el primer producte cosmètic -Capture TM- que incorporava aquestes vesícules. Tot i que feia més de 20 anys que s'experimentava amb els liposomes, la seva aplicació no va ser viable fins que la mateixa companyia no va posar a punt mètodes de producció a gran escala (Redziniak G. i Meybeck A., 1985), ja que les patents contemporànies proposaven mètodes poc o gens transferibles a la indústria (Manibhai Patel H., 1985). Des d'ençà, la quantitat de productes que es poden trobar al mercat s'ha incrementat extenent-se fins al terreny farmacèutic. Aquesta variació d'aplicacions té el seu origen en l'evolució dels mètodes d'obtenció de liposomes, que, en funció de la seva finalitat, han deixat d'ésser vesícules constituïdes per una superfície lipídica que conté aigua en el seu interior, per arribar a ser, en un dels casos més complexos, vesícules on els lípids estan coberts d'uns polímers que fan que els liposomes no siguin eliminats pel sistema immunitari humà, que a més tenen anticossos enllaçats a la seva superfície externa que els fan interaccionar només amb cèl·lules molt concretes i, finalment, que contenen al seu interior aquós un fàrmac que actua sobre aquestes cèl·lules.

Fou en els anys 1960 quan Bangham et al. (1965) encetaren una sèrie d'estudis sistemàtics que permeteren caracteritzar la interacció entre els lípids i l'aigua. Però ja en el segle anterior, com a mínim el 1854, s'havien observat els fenòmens d'inflament que tenen lloc quan les lecitines es posen en contacte amb medis aquosos (Lassic D.D., 1993). A principis del segle XX, el 1911, apareixien publicats dibuixos detallant les estructures microscòpiques que es formen, i que foren batejades com a cèl·lules artificials. No fou fins que s'associà la formació d'aquestes estructures al fet de que l'aigua quedava inclosa en elles, que s'inicià la recerca científica que en pocs anys incrementà espectacularment el número de grups dedicats al seu estudi, i que portà a Bangham a difondre-les per televisió, encara per un públic reduït, dins la sèrie anglesa de divulgació científica Open University. Poc després el marketing faria la seva feina a un altre nivell.

Les característiques dels liposomes estan determinades pel tipus especial de lípids que els constitueixen ja que no tots els lípids, naturals o artificials, poden formar aquestes vesícules. És per això que a l'apartat 1.1 es descriuen els principals components de la superfície dels liposomes, els fosfolípids, i les propietats que fan d'ells els seus precursors. Els liposomes, però, no són les úniques estructures que poden originar-se en interaccionar els fosfolípids i l'aigua. Hi ha una gran varietat que depèn, entre altres factors, de la relació en pes entre ambdós components i de la temperatura. El comportament de les mescles fosfolípid-aigua (comportament liotrópic) a diferents temperatures (comportament termotrópic) es descriu a l'apartat 1.2, on principalment es mostren aquelles agrupacions de fosfolípids que estan

relacionades amb els liposomes.

La interacció dels lípids que no formen liposomes amb l'aigua sota determinades condicions permet obtenir sistemes més o menys estables que tenen diverses aplicacions. Les característiques d'aquestes mesclures d'oli en un excés d'aigua (emulsions o/w), en les que s'han inclòs fosfolípids per a estabilitzar-les, són el contingut de l'apartat 1.3.

La producció industrial de formulacions amb liposomes no va ser possible fins l'aparició de sistemes de producció a gran escala, de metodologia molt diferent a l'emprada en els laboratoris. Actualment existeixen tècniques que són aplicables en aquests dos entorns, fet que facilita el contacte entre la investigació bàsica i la seva aplicació. Dos d'aquests mètodes es presenten a l'apartat 1.4: l'un basat en el comportament de les mesclures ternàries fosfolípid-etanol-aigua, i l'altre en la interacció a gran pressió de mesclures fosfolípid-aigua.

Com ja s'ha comentat anteriorment, el camp d'aplicació dels liposomes s'ha diversificat en els darrers 20 anys: des del seu immediat ús com a sistemes model de les membranes biològiques, avui dia fins i tot s'ha arribat a les aplicacions tèxtils. A l'apartat 1.5 es fa una breu exposició dels variats camps en els que podem trobar referències de la seva utilització.

Finalment, donat que el present treball experimental ha estat dirigit cap a la preparació de formulacions basades en fosfolípids per a la seva aplicació tòpica, a l'apartat 1.6 es descriuen les característiques d'estructura, constitució i funció de la pell humana, i a l'apartat 1.7 la seva interacció amb preparacions amb liposomes.



Dibuixos que mostren l'inflament de lípids en aigua apareguts el 1911 en el llibre d'Otto Lehmann "Els cristalls fluidificats". Extret de "Liposomes" (Lasic D D., 1993)

1.1 LÍPIDS, TRIACILGLICÈRIDS, I FOSFOLÍPIDS.

Els lípids són molècules que es caracteritzen per la seva molt baixa o nul·la solubilitat en aigua degut, principalment, a que estan constituïdes en part o totalment per un esquelet hidrocarbonat. Entre els lípids complexos (aquells que inclouen àcids grassos en la seva estructura, Fig. 1) hi ha dos, els triacilglicèrids¹ i els glicerofosfolípids, que comparteixen un altre element estructural: el glicerol.

Els triacilglicèrids són els lípids més abundants en els organismes vius i constitueixen el que anomenem greix, quan a temperatura ambient es presenten en estat sòlid, i olis quan ho fan en estat líquid. Estructuralment estan compostos per un glicerol esterificat amb tres àcids grassos (Fig. 2a). Són la llargada i número d'insaturacions d'aquests els que caracteritzen el comportament del triacilglicèrid amb la temperatura: com més curta és la cadena de l'àcid gras i/o més insaturacions presenta, més baixa és la temperatura a la qual fon el triacilglicèrid.

S'anomenen lípids neutres ja que, degut a la seva composició, són totalment apolars i insolubles en aigua. En els ésser vius tenen funcions de reserva energètica i de transport. En aquest darrer cas són el component majoritari dels quilomicrons i de les lipoproteïnes de molt baixa densitat. Aquestes vesícules incorporen proteïnes i altres lípids a un nucli constituït pels triglicèrids, difonent-se per l'organisme mitjançant la sang. Els olis d'origen vegetal també tenen un interès nutricional en el cas dels mamífers: tots els àcids grassos que presenten dobles enllaços en posicions iguals o menors a la 7 respecte del grup metil terminal, són derivats de l'àcid linolèic i i de l'àcid linolènic incorporats a la dieta en lípids d'origen vegetal.

La possibilitat de formar emulsions unida a les seves característiques nutricionals, fan que els triacilglicèrids vegetals siguin els components majoritaris de nombroses preparacions per a ús parenteral (Aboofazeli et al., 1993; Redden P.R. et al., 1995; Rotenberg M. et al., 1991; Sjöström B. et al., 1993). Com a conseqüència de que els àcids grassos insaturats presents en

<u>NOM COMÚ</u>	<u>NOM SISTEMÀTIC</u>	<u>ABREVIACIÓ</u>	<u>NOM COMÚ</u>	<u>NOM SISTEMÀTIC</u>	<u>ABREVIACIÓ</u>
Làuric	Dodecanòic	C12:0	Esteàric	Octadecanòic	C18:0
Mirístic	Tetradecanòic	C14:0	Olèic	9-octadecanòic	C18:1
Palmític	Hexadecanòic	C16:0	Linolèic	9,12-octadecanòic	C18:2
Palmitoèic	9-Hexadecanòic	C16:1	α -Linolèic	9,12,15-octadecanòic	C18:3
			γ -Linolèic	6,9,12-octadecanòic	C18:3

Fig. 1 Àcid grassos naturals més freqüents.

¹Els triacilglicèrids també s'anomenen, de forma habitual, triglicèrids.

els olis vegetals resulten útils també en tractaments cutanis, també són presents en moltes formulacions d'aplicació tòpica en forma de cremes.

A la Fig. 2b es mostra l'estructura general dels fosfolípids o glicerofosfolípids. Aquestes molècules presenten, des del punt de vista estructural, tres dominis ben diferenciats: el primer constituït per dues cadenes d'àcid gras unides, en aquest cas mitjançant enllaços éster, al segon, format pel glicerol, que té, a la posició 3, un substituent polar que presenta un grup fosfat. A conseqüència de la seva estructura els fosfolípids són molècules polars amb caràcter amfifílic.

Les cadenes d'àcid gras constitueixen la part apolar dels fosfolípids. La seva composició i situació de l'enllaç amb el glicerol depenen del seu origen: per exemple, la meitat de les cadenes de la fosfatidilcolina d'ou són saturades, essent la del tipus 16:0 la més abundant i ocupant la posició sn-1, mentre que en la sn-2 abunden les cadenes 18:1 (Kuksis A., 1992; Lasic D.D, 1993; New R.R.C, 1990). Ara bé, la fosfatidilcolina de soja només presenta un 15% de cadenes saturades. A més, és possible trobar en un mateix organisme teixits rics en fosfolípids amb àcids grassos saturats i insaturats: els fosfolípids que formen part del fluid alveolar dels pulmons contenen majoritàriament àcids grassos 16:0. Gairebé totes les insaturacions presents en els lípids naturals són del tipus cis (o Z) i, pel que fa a la conformació dels enllaços simples C-C, depèn de la temperatura. Quan aquesta es baixa, la molècula no té prou energia com per que els enllaços simples rotin i adoptin una conformació *gauche*, en la qual els àtoms de carboni adjacent a l'enllaç estarien més propers entre ells (Fig. 3). En aquesta situació els enllaços simples C-C adopten una conformació trans (o anti), que minimitza les repulsions. En incrementar la temperatura poden superar la barrera energètica i, a través de les formes eclipsades, adoptar les conformacions *gauche*. Amb prou energia els enllaços giren lliurement assolint totes les conformacions.

La presència de dobles enllaços en els àcids grassos és un dels principals factors que

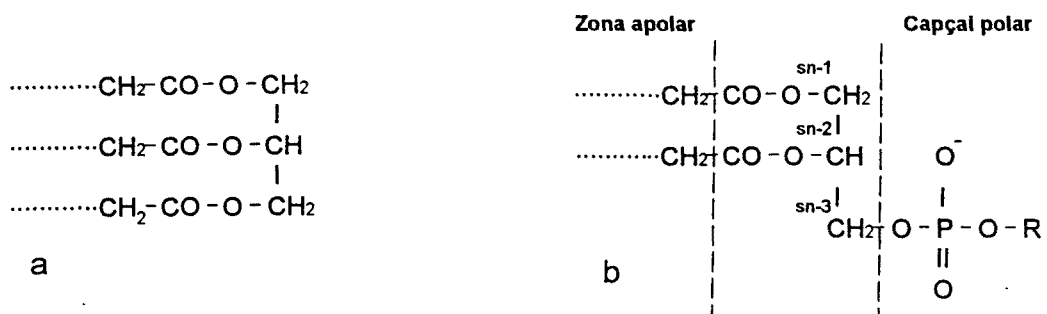


Fig. 2 a) Estructura dels triacilglicerols. b) Estructura dels fosfolípids.

afecten a l'estabilitat química dels fosfolípids. Els alquens són centres d'atracció electròfila susceptibles de reaccions d'addició i d'etapes d'iniciació de reaccions radicalàries. Aquestes darreres solen ser promogudes per radiacions electromagnètiques prou energètiques, com ara l'ultraviolat. L'etapa de propagació s'estèn ràpidament per les cadenes dels fosfolípids adjacents fins que té lloc l'etapa de terminació. En aquest estadi es poden donar diferents alteracions dels àcids grassos en funció de la quantitat d'oxígen present en el medi (Fig. 4): trencament de la cadena; formació de peròxids; i aparició de dobles enllaços conjugats (que no són presents en els fosfolípids d'origen natural). Les cadenes d'àcid gras saturades eviten aquest problemes, és per això que molts fabricants obtenen fosfolípids saturats a partir dels naturals, sobre els quals s'han realitzat hidrogenacions catalítiques.

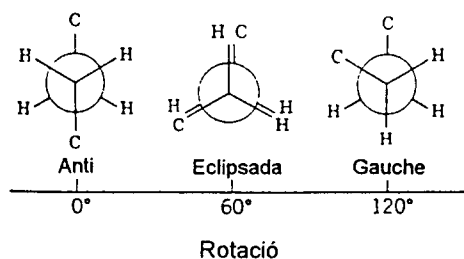


Fig. 3 Algunes de les conformacions possibles en la rotació dels enllaços simples C-C de les cadenes d'àcid gras dels fosfolípids.

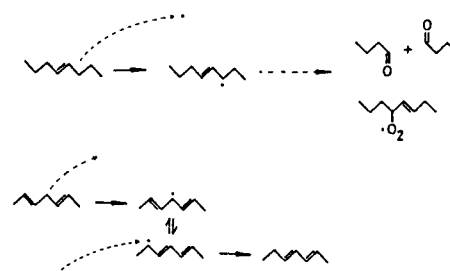


Fig. 4 Productes de degradació de les cadenes d'àcid gras com a conseqüència de reaccions radicalàries.

El grup glicerol actua com a zona de polaritat mitjana degut als enllaços éster amb els àcids grassos. Cal senyalar que no tots els fosfolípids presenten aquest enllaços: en els cas dels plasmalògens hi ha un éter α,β -insaturat en cis a la posició sn-1. Tots els enllaços amb el glicerol són susceptibles d'hidròlisi. Quan aquesta reacció té lloc s'originen el que s'anomena formes liso, mancades d'una cadena. En cas de que la hidròlisi sigui molt acusada pot produir-se la pèrdua de totes dues.

Pel que fa posició sn-3 de tots els fosfolípids, està ocupada sempre per l'enllaç amb el grup fosfat del cap polar. Aquest correpon a la zona més hidrofílica de la molècula. Els substituents enllaçats al grup fosfat (Fig. 5) condicionen la càrrega global del fosfolípid, la

<u>Grup R</u>	<u>Nom del fosfolípid</u>	<u>Abreviació</u>	<u>Càrrega</u>
-H	Àc. fosfatídic	PA	Negativa
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Fosfatidilcolina	PC	Zwiterió
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$	Fosfatidiletanolamina	PE	Zwiterió
$-\text{CH}_2\text{CHNH}_3^+\text{COO}^-$	Fosfatidilserina	PS	Negativa
$-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$	Fosfatidilglicerol	PG	Negativa
$-\text{HC}_6\text{H}_5(\text{OH})_5$	Fosfatidilinositol	PI	Negativa

Fig. 5 Caps polars més freqüents, nom i càrrega a pH fisiològic dels fosfolípids corresponents.

hidrofilicitat, i la possibilitat d'establir ponts d'hidrogen amb altres molècules. El substituent més abundant és el grup colina, de manera que s'origina la fosfatidilcolina, el fosfolípid més abundant en les membranes biològiques. Degut a la presència de l'amina quaternària, aquest fosfolípid resulta ser zwitteriònic a pH fisiològic.

Les característiques d'una molècula de fosfolípid depenen de les diferents combinacions possibles entre cadenes d'àcid gras i caps polars. La relació entre les àrees transversals d'aquestes zones proporciona el que s'anomena la forma del fosfolípid, un paràmetre que explica en part les diferents estructures que poden formar-se quan té lloc una agregació de fosfolípids². En el cas de la fosfatidilcolina (PC) les dues àrees són similars, de manera que la seva forma és la d'un cilindre. Per aquesta raó, quan té lloc l'agregació de varies molècules aquestes formen estructures lamelars (Fig. 6). Són aquestes estructures lamelars les que, en tancar-se pels extrems, constitueixen les bicapes que formen els liposomes. En el cas de la fosfatidiletanolamina (PE), si com a conseqüència de la temperatura els enllaços simples de les cadenes d'àcid gras poden girar lliurement, l'àrea transversal de la zona apolar resulta ser major que la de la zona polar, i el fosfolípid té una forma cònica que induïx agregacions de micel·les invertides o hexagonal II. El fenomen contrari és el que té lloc amb les formes lises dels fosfolípids, de manera que s'agreguen en estructures micel·lars (hexagonal I).

Però hi ha més factors que influeixen en els estats d'agregació possibles. Anteriorment s'han exposat les diferents conformacions dels enllaços simples C-C. Quan aquests es troben en una conformació tot-trans, el fosfolípid presenta un estat similar al sòlid, i que s'anomena gel. En estat gel la zona hidrofòbica té una àrea transversal menor de la que té quan tots els enllaços simples giren lliurement (estat de cristall líquid), de manera que, per exemple, la PE en estat gel

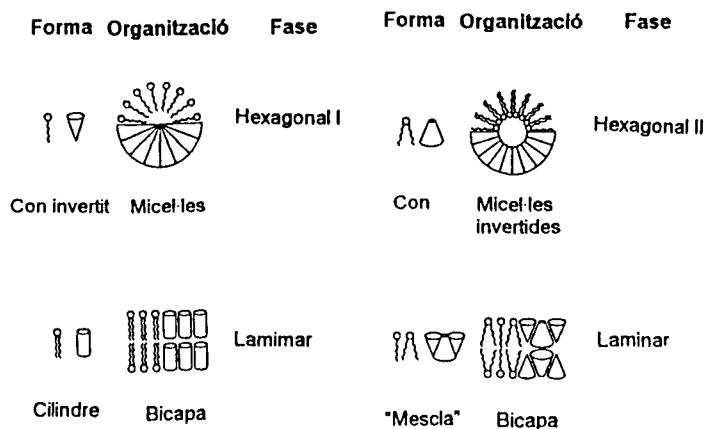


Fig. 6 Formes moleculars i estats d'agregació que originen.

forma estructures lamelars. La temperatura en la qual té lloc la transició des de l'estat gel al cristall líquid, temperatura de transició, és característica de cada fosfolípid, i el seu valor és inversament proporcional al nombre d'insaturacions de les cadenes d'àcid gras, i directament proporcional a la seva llargada i a la quantitat d'enllaços d'hidrogen que els

² Aquest paràmetre pot quantificar-se amb l'empaquetament, que val $P=V/(a.l)$, on V és el volum molecular, a és l'àrea del capçal polar, i l és la llargada de les cadenes d'àcid gras.

caps polars estableixen entre ells³. Aquestes variables són algunes de les que s'empren per dissenyar liposomes que, constituïts majoritàriament amb PE, alliberen el seu contingut en funció del pH o de la temperatura de l'entorn en el qual es troben (Collins D. et al., 1990; Hazemotó N. et al., 1993).

La temperatura de transició té un efecte directe sobre la permeabilitat de les bicapes dels liposomes per a diferents soluts. En estat gel la seva rigidesa dificulta la difusió passiva des d'un costat a altre, mentre que en estat líquid (cristall-líquid) la permeabilitat és major. A la temperatura de transició mostren una permeabilitat encara superior degut a la coexistència de dominis de les dues fases, de manera que les membranes presenten irregularitats estructurals que afavoreixen la circulació de molècules.

1.2 ELS SISTEMES BINARIS FOSFOLÍPID-AIGUA.

Els fosfolípids presenten una solubilitat màxima molt baixa en aigua, amb un valor una mica menor a 10^{-7} M (aprox. 0,75 µg/mL). Per sobre d'aquesta concentració les molècules s'agregen i formen estructures on la relació fosfolípid/aigua i la temperatura són els factors més determinants. A la Fig. 7a es mostren algunes de les diferents associacions possibles de fosfolípids (Sackmann E., 1982). Observis com en totes elles hi ha una ordenació de les molècules formant zones comuns hidrofòbiques amb les cadenes hidrocarbonades i hidrofíliques amb els caps polars. Cadascuna de les estructures anteriors presenta propietats diferents que tenen significació biològica en fenòmens com la fusió o la permeabilitat cel·lulars. La Fig. 7b és el diagrama de fases d'un fosfatidilcolina d'origen natural. Les diferents fases que hi apareixen estan constituïdes per algunes de les estructures anteriors. La més habitual en els sistemes biològics és la lamelar, en la qual les cadenes hidrofòbiques es situen en la zona interior de bicapes que presenten els caps polars en contacte amb el medi aquós. Quan el contingut d'aigua es situa entre, aproximadament, el 5 i el 45 % en pes, el resultat és una sèrie de bicapes apilades les unes sobre les altres. Quan la temperatura està per sobre de la temperatura de transició T_c , indicada amb una línia discontinua a la part inferior del gràfic, es coneix com a fase lamelar fluïda L_α , en cas contrari les bicapes esdevenen la fase lamelar gel L_β . Com s'observa, la T_c varia en funció del contingut d'aigua de la mescla. Per sobre del 45 % p/p d'aigua, les bicapes es tanquen i formen els liposomes, de manera que segresten o encapsulen part del medi aquós. El resultat és una suspensió de vesícules en un medi continu, l'aigua: el sistema està format per dues fases diferents.

Com a conseqüència de les insaturacions, la gran majoria de les membranes biològiques estan en fase L_α , al igual que tots els liposomes que s'obtinguin amb fosfatidilcolines

³L'efecte de les insaturacions i la llargada de les cadenes d'àcid gras explica el comportament dels triacilglicèrids amb la temperatura descrit anteriorment.

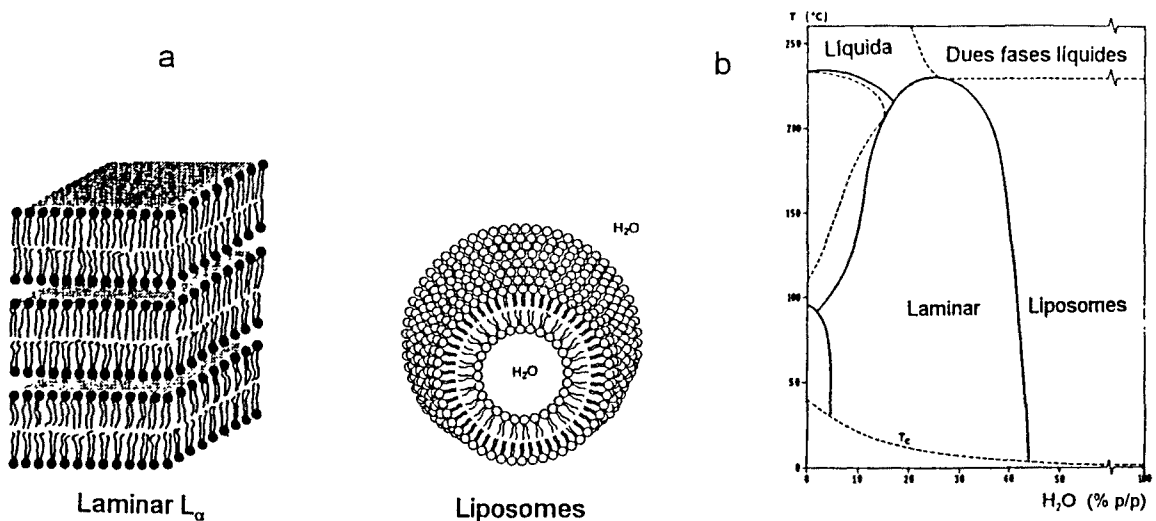


Fig. 7 a) Exemples d'estructures liotrópiques dels sistemes fosfolípid-aigua. **b)** Diagrama de fases de la fosfatidilcolina d'origen natural (adaptat de Lasic D.D., 1993).

insaturades. La T_c d'aquests tipus de membranes es situa entre -15 i -7°C .

Poden formar-se diferents tipus de liposomes atenent a la seva grandària i al número de bicapes que contenen. El rang de diàmetre de les vesícules es situa entre un valor mínim assolible d'aproximadament 15 nm , i els varis micròmetres. El límit inferior és degut a les restriccions estèriques que tenen lloc a la vesícula en tenir un radi de corvatura tan petit i una amplada mitjana de la bicapa de 4 nm . Els liposomes amb diàmetres iguals o menors a 100 nm reben el nom de SUVs (small unilamellar vesicles), però es poden trobar diferents criteris en l'establiment del rang superior dels SUVs. Com s'observa, el rang de grandàries dels liposomes abasta un ordre de magnitud, fet que els hi dona característiques molt diferents que permeten diferents aplicacions. És important tenir en compte que les preparacions estan formades per vesícules de radis diferents i que, en el millor dels casos, s'obtenen distribucions unimodals amb poca dispersió de grandàries. Segons la quantitat de bicapes s'acostuma a diferenciar entre liposomes unilaminars (amb una), oligolaminars (amb varies), i multilaminars (amb moltes). En ocasions també es parla de liposomes multivesiculars, els quals estan constituïts per varis liposomes envoltats per una bicapa.

L'obtenció de liposomes amb unes característiques de grandària i número de bicapes determinats està en relació amb el mètode de preparació. Ja s'ha descrit anteriorment que els primers estudis de les interaccions entre lípids i aigua posaren de manifest l'inflament i formació d'estructures visibles amb el microscopi òptic. Si un sistema com aquest és sotmés a agitació s'indueix la formació de liposomes multilaminars grans (MLVs). Aquestes suspensions acostumen a ser poc estables, produint-se agregacions, fusions i sedimentació de les vesícules. Com que és el mètode més simple d'obtenció de liposomes, amb freqüència és el primer pas de molts altres que impliquen tractaments posteriors. Altres mètodes més sofisticats permeten aconseguir liposomes de grandària definida amb un única bicapa.

El volum encapsulat pels liposomes és una funció directa de la seva grandària i del

número de bicapes. Per a una concentració determinada de fosfolípids, el percentatge de volum de la dispersió encapsulat en liposomes unilaminars és una funció directa del radi vesicular al cub. Si els liposomes incorporen més d'una bicapa disminueix l'eficàcia d'encapsulació, és a dir, la relació entre el volum encapsulat per mol de fosfolípid. Aquest fet es deu principalment a que diferents bicapes comparteixen part del volum encapsulat i, en menor grau, a que les bicapes de les vesícules interiors exclouen dissolvent.

La utilitat dels liposomes com a vehicles pel transport de substàncies està relacionada amb les dues fases que els constitueixen. L'interior aquós permet encapsular substàncies hidrosolubles, mentre que la part interna de la bicapa pot incorporar molècules hidrofòbiques com ho són altres lípids no formadors de bicapes (colesterol, α -tocoferol, etc) o fàrmacs difícils d'obtenir en dissolucions aquoses.

L'estabilitat física de les preparacions amb liposomes depèn, si no hi ha alteració química de la mostra, de la grandària i composició dels liposomes. Les vesícules de gran diàmetre constituïdes per fosfolípids neutres sedimenten, i les de diàmetre menor també poden fer-ho con a conseqüència de fenòmens d'agregació i fusió. En tots dos casos, la inclusió de fosfolípids carregats alenteix tots els processos com a resultat de les forces de repulsió que s'estableixen entre les bicapes. L'eficàcia d'aquesta mesura depèn de l'apantallament que tinguin les càrregues com a conseqüència de la naturalesa dels ions presents i de la seva concentració en el medi aquós. Pel que fa a la temperatura, en general es recomana la conservació a 4°C. Cal tenir en compte que, en el cas dels SUVs, l'emmagatzematge a temperatures per sota de la temperatura de transició afavoreix la fusió entre vesícules ja que, donada la rigidesa de les bicapes i el seu petit radi, tenen una tensió elevada que es minimitza en formar liposomes més grans.

Una altra mena de vesícules relacionada amb els liposomes són els niosomes. Aquests estan constituïts per molècules amfifíliques no iòniques (Fig. 8) que en medis aquosos formen els liposomes-no-iònics. Els mètodes de preparació són similars als dels liposomes, i al igual que aquests poden incorporar tant substàncies hidrofíliques com hidrofòbiques, fet pel qual en moltes ocasions el productes que els contenen incorporen colesterol.



Fig. 8 Molècules formadores de liposomes no iònics o niosomes. n oscil·la entre 3 i 8. R_1 i R_2 són cadenes hidrocarbonades que contenen entre 12 i 16 àtoms de carboni. (Adaptat de Lasic D.D., 1993).

1.3 EMULSIONS OLI/AIGUA (O/W).

El caràcter apolar dels triacilglicèrids causa que, en presència d'aigua, el sistema tendeixi a tenir la mínima superfície de contacte entre els dos líquids. Aquest fet origina que les dues fases esdevinguin immiscibles espontàniament, i que en el cas en que un aport energètic causi la dispersió d'una d'elles dins de l'altra (una emulsió), el sistema evolucioni de manera més o menys ràpida cap a l'estat inicial.

Per tal d'incrementar l'estabilitat de les emulsions, s'introdueix en una de les fases, o en totes dues, substàncies que són adsorbides a les interfases que es formen entre l'oli i l'aigua. Aquestes substàncies, conegudes com a emulsionants, permeten la divisió d'una de les fases (fase interna o dispersa) dins de l'altra (fase externa o contínua). El grup d'emulsionants més emprat correspon als tensoactius, que acostumen a estar constituïts per un grup polar enllaçat a una cadena hidrofòbica i són, per tant, són amfífils. Se'ls classifica segons la seva càrrega en: aniònics, catiònics, anfòters i no-iònics. En els no-iònics acostumen a tenir funcions alcohol i enllaços éter, els quals els hi proporcionen el caràcter polar.

Cal tenir en compte que quan un oli i l'aigua s'emulsionen, poden obtenir-se dos tipus de producte: una emulsió w/o o una emulsió o/w⁴. El resultat final és funció dels volums relatius de cada fase i dels emulsionants emprats. El caràcter mixte dels emulsionants es quantifica mitjançant el balanç hidròfil-lipòfil (HLB), un valor semi-empíric que es calcula de diferent manera segons la naturalesa de la molècula, i el valor del qual oscil·la entre 1 i 40. Per molècules amb pesos al voltant de 200 Da, els valors d'HLB entre 1 i 10 indiquen que són dispersables en olis, i entre 10 i 40 que ho són en medi aquós (Albiol M., 1973). Per mescles d'emulsionants, el valor d'HLB resultant és la mitjana proporcional als pesos de cadascun en la mescla:

$$HLB_{mescla} = \sum_{i=1}^n (\%)_i HLB_i \quad Eq. 1$$

on:

(%)_i indica el percentatge en pes de la substància en la mescla,
HLB_i indica l'HLB de la substància i.

A partir del balanç hidròfil-lipòfil i dels percentatges en pes de cada component, es pot determinar la mescla d'emulsionants òptima per que una emulsió amb una relació de volums concreta adopti la forma o/w o w/o (de Luca M. et al., 1991; Tadros T.F., 1992; Wilkinson J.B., 1973).

L'estabilitat de les emulsions durant el seu emmagatzemantge pot presentar tres tipus de problemes: la formació de crema, el trencament de l'emulsió, i la inversió de fase.

⁴També es poden formar les emulsions múltiples o/w/o i w/o/w.

Quan es forma la crema (l'emulsió es crema), té lloc la separació en dues o més fases cadascuna de les quals conté vesícules de diferent grandària. A les emulsions o/w, la fase oliosa sura, mentre que a les w/o l'aquosa sedimenta. Aquests processos són el resultat de la diferència de densitat entre les dues fases constituents, i es minimitza augmentant la viscositat de la fase contínua i disminuint la grandària de les vesícules de la fase dispersa. En la majoria de casos la fase dispersa encara existeix en forma de vesícules, de manera que l'agitació del producte el reverteix al seu estat original.

Una emulsió es trenca quan les fases constituents deixen d'estar disperses i l'agitació no aconsegueix dur el sistema a l'estat inicial. Aquest fenomen és la conseqüència de l'agregació (floculació) i posterior fusió (coalescència) de les vesícules de la fase dispersa formant altres de grandària major. Per tant, el número de vesícules de l'emulsió disminueix paral·lelament a l'àrea interfacial entre les dues fases. Aquests processos s'esdevenen consecutivament fins que el sistema bé forma dues fases separades, bé assoleix una grandària crítica de vesícules que esdevenen estables. Tant les altes com les baixes temperatures indueixen al trencament de les emulsions.

La reversió de fase es produeix quan la fase dispersa d'una emulsió passa a ser la contínua. Una de les causes d'aquest fenomen en les emulsions o/w és l'evaporació d'aigua, ja que té lloc un canvi en els volums relatius de cada fase. La reversió de fases no és sempre un fenomen a evitar, ja que en ocasions és emprada com a mètode de preparació d'emulsions.

Per a la determinació de l'estabilitat de les emulsions es realitzen proves d'envelliment accelerat a 40°C, realitzant controls de degradació química i d'estabilitat física. La resistència a la centrifugació (i ultracentrifugació) és un mètode molt útil, però tot i l'equivalència del producte $g \times t$, resulta ésser més un mètode comparatiu que un indicador absolut de l'estabilitat de les emulsions⁵.

1.4 PREPARACIÓ DE LIPOSOMES I D'EMULSIONS O/W A GRAN ESCALA.

La gran majoria de mètodes d'obtenció de liposomes a escala de laboratori són inviables per a l'obtenció de grans volums de mostra. Aquesta restricció fa que la producció a escala industrial per a ús amb humans estigui reduïda a poques variacions, les quals estan basades en els mateixos procediments: la mescla amb aigua de dissolucions etanòliques de fosfolípids, i la interacció sota condicions d'alta pressió de mescles poc elaborades de fosfolípids i aigua.

⁵ A baixes gravetats, els resultats d'una centrifugació a g gravetats durant un temps t , són comparables als d'altres condicions de gravetat i temps que tinguin el mateix valor del producte $g \times t$. Per tant, les centrifugacions poden, fins a cert punt, ésser representatives del comportament de les emulsions durant el seu enmagatzematge.

A principis de 1970 es proposà el primer mètode per obtenir liposomes a partir de dissolucions de fosfolípids en etanol (Batzri S. i Korn E., 1973). El procediment, conegut com a injecció etanòlica, consisteix en l'addició a un medi aquós en agitació d'una dissolució de fosfolípids en etanol a través d'una xeringa. En les noves condicions els fosfolípids s'hidraten i formen liposomes, quedant l'etanol formant part del medi hidròfil⁶. Les característiques de la suspensió de liposomes depenen de la velocitat d'injecció i de la concentració de

fosfolípids en la dissolució etanòlica (Pons M. et al., 1993). Per tal d'incorporar molècules als liposomes només cal que el medi aquós sigui una dissolució de la substància a encapsular. Aquest mètode presenta l'avantatge de que és escalable a nivell industrial, arribant a realitzar-se simplement mitjançant la mescla directa dels dos medis. El principals inconvenients són la relativament baixa solubilitat de la fosfatidilcolina en etanol (aproximadament 40 mM), que impedeix assolir concentracions elevades de liposomes, i el poc control que s'exerceix sobre la grandària de les vesícules.

La injecció etanòlica ha donat lloc a variacions. En una d'elles, l'etanol és substituït per éter, que solubilitza més quantitat de fosfolípids i es pot eliminar del medi aquós amb facilitat. Més recentment s'ha desenvolupat un mètode en el qual el feix que s'injecta és exposat a un buit parcial, de manera que el dissolvent orgànic s'evapora ràpidament i tot seguit el fosfolípid es resospèn en el medi aquós (Buboltz J.T. i Feigenson G.W., 1999).

Una altra variació que facilita la producció industrial està basada en l'ús de mescleres ternàries fosfolípid-etanol-aigua (Leigh S., 1985; Perret S. et al., 1991). A la Fig. 9 es mostra el diagrama de fases de dit sistema quan el fosfolípid emprat és la fosfatidilcolina. Les diferents relacions en pes entre els tres productes situen les mescleres en tres fases ben diferenciades: una dissolució del fosfolípid en un medi hidròfil constituït per l'aigua i l'etanol, una fase formada per bicapes de fosfolípid apilades i separades pel medi hidròfil, i una suspensió de liposomes. El mètode de producció de liposomes conegut com Pro-Lipo S es basa en aquest diagrama de fases. El sistema està format per una mescla homogènia de fosfolípids/etanol/glicerol/aigua en una proporció 30:20:10:40 p/p/p/p. El resultat és un conjunt de bicapes apilades. En diluir-les

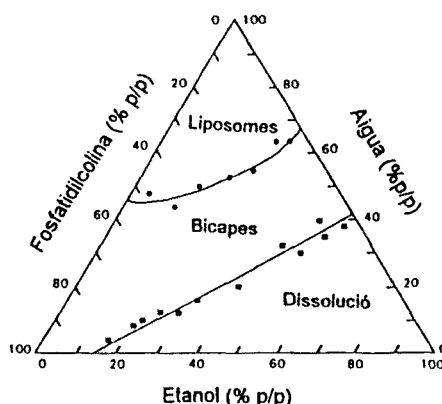


Fig. 9 Diagrama de fases ternari del sistema fosfatidilcolina-etanol-aigua a 20°C. (Adaptat de Perret S. et al., 1991).

⁶Estrictament, l'etanol es reparteix entre les dues fases: el medi aquós i les bicapes. La constant de repartiment ($K=0,522$ g etanol per g fosfolípid / g etanol per g d'aigua; Perret S. et al., 1991) i el fet de que la fase majoritària és l'aquosa, permet realitzar l'aproximació de que l'etanol forma part de la fase contínua.

amb aigua (o tampó) i amb agitació moderada s'indueix la formació dels liposomes, de manera que encapsulen el medi aquós i el que aquest contingui. Degut a que la fase lipídica està constituïda per una mescla de fosfolípids, un 20 % p/p d'ells amb càrrega, els liposomes són oligolaminars i d'un diàmetre aproximat d'1 μm . Si el que es pretén és encapsular molècules hidrofòbiques, només cal addicionar-les al producte i homogeneitzar la mescla abans de l'addició del medi aquós.

El mètode és simple i directament transferible a escala industrial, no implica cap etapa d'escalfament, permet assolir concentracions elevades de liposomes, i aquests presenten volums encapsulats acceptables (1,5-4,5 L dissolució/mol fosfolípid, en funció de la mescla de lípids).

L'altre gran grup de mètodes d'obtenció de liposomes està basat en aplicar altes pressions a mescles de fosfolípids en aigua, de manera que s'homogenitzen i formen vesícules de grandària menor a la inicial (Bachmann D. et al., 1993; Brandl M. et al., 1990; Mayhew E. et al., 1984). Aquesta metodologia també és útil per a la preparació d'emulsions (Lidgate D.M. et al., 1992; Sjöström B. i Bergenstahl B., 1992). En alguns casos els sistemes porten acoblades membranes amb porus de diàmetre definit, de manera que pot controlar-se amb molta precisió el diàmetre final de les vesícules (Schneider T. et al., 1994; Turánek J., 1994).

Un dels homogenitzadors a alta pressió que ofereix el mercat és el Microfluidizer. Aquest aparell (Fig. 10) consta d'un reservori on es deposita la mescla de fosfolípids en medi aquós, la qual és impulsada a alta pressió mitjançant una bomba pneumàtica a través d'un prefiltrat amb porus de 5 μm diàmetre i, posteriorment, entra en una cambra d'interacció on el flux és dividit en dues parts. A continuació els dos fluxos es junten a alta velocitat i pressió mentre circulen per

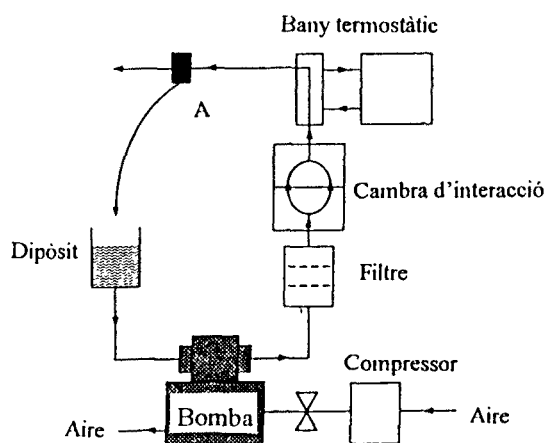


Fig. 10 Esquema del Microfluidizer 110S. La selecció de la posició de la vàlvula A permet operar recirculant la mostra processada al reservori de l'aparell o dipositant-la en un recipient extern.

microcanals ceràmics de grandària definida, on es donen fenòmens de cavitació. El flux final pot retornar al reservori inicial mesclant-se amb la resta de mostra inicial o, si es desitja, dirigir-se cap a un recipient extern. En el primer cas l'aparell funciona com un reactor de tanc agitad, mentre que en el segon ho fa de manera equivalent a un reactor de flux en pistó. L'aparell disposa d'una conducció que pot ser canviada per una altra en forma de serpenti per tal de termostatar la mostra. La pressió de treball és regulable: en el model 110S (d'escala laboratori) pot oscil·lar entre $1,35 \cdot 10^7$ Pa i $9,65 \cdot 10^7$ Pa. Aquests valors permeten tractar mostres

molt concentrades, de fins 225 mg fosfolípid/mL, de manera que la dilució posterior de la preparació rendeix grans volums de producte. El flux depèn de la viscositat de la mostra i de la pressió de treball. Amb suspensions diluïdes, de viscositat semblant a la de l'aigua, els seus valors mínim i màxim són 20 i 200 mL/min.

Les característiques dels liposomes que s'obtenen són en major grau depenents de la pressió de treball i del número de cicles que es processa la mostra. En augmentar aquests paràmetres disminueix el diàmetre dels liposomes, de manera que una suspensió inicial constituïda per MLVs pot esdevenir de SUVs. La majoria de suspensions que s'obtenen no són unimodals, sinó que presenten vesícules de diàmetres dissemblants. Per tant, en cas necessari, és precís ajustar molt bé les condicions de treball per aconseguir poblacions de diàmetre uniforme, i en ocasions, en funció de les característiques de la mostra, això pot no ser possible.

Hi ha dues característiques més molt importants que fan que el Microfluidizer sigui apte per a la producció industrial: d'una banda la possibilitat d'esterilitzar els components de l'aparell en contacte amb la mostra i, en segon lloc, el fet de que els models de laboratori són directament escalables a nivell industrial, ja que només difereixen en la capacitat de processament de mostra.

1.5 APLICACIONS DELS LIPOSOMES.

Els liposomes, o més estrictament els sistemes fosfolípid-aigua, s'utilitzen en nombroses disciplines científiques amb finalitats molt diferents, però que globalment poden ser agrupades en ciència bàsica i en aplicacions mèdiques. En el primer grup destaquen els estudis relacionats amb el seu ús com a models de membranes biològiques, amb aplicacions com la reconstitució de proteïnes de membrana, la determinació de permeabilitat, o els estudis de les formes de les vesícules. Però són les aplicacions mèdiques les que causen un major número de publicacions i les inversions econòmiques més importants.

El fet que els liposomes puguin encapsular tant molècules solubles en aigua com molècules hidrofòbiques, va fer pensar en ells, des de l'inici de la recerca científica, com a vehicle per a la dosificació de fàrmacs. L'efectivitat d'un fàrmac és un balanç entre els efectes terapèutics i els no desitjats. En moltes ocasions, els efectes secundaris nocius són una conseqüència de l'acció de la molècula administrada sobre òrgans o sistemes als quals no va dirigida. És per aquest motiu que el sistema amb el qual es fa arribar el fàrmac al seu objectiu resulta tant important com l'eficàcia de la pròpia molècula.

El que s'ha anomenat com a liposomes de primera generació, va constituir el primer intent per adreçar els fàrmacs de manera que augmentés la seva eficàcia terapèutica. L'endocitosi, o l'aproximació i posterior alliberament del material encapsulat vora les cèl·lules diana, eren els mecanismes previstos per a la millora terapèutica. En aquests liposomes, les

membranes estan constituïdes únicament per lípids i, en alguns casos, incorporen tensioactius. Són vesícules simples que encapsulen molècules hidrosolubles en el seu espai aquós intern, o hidrofòbiques a la membrana. Aquests vehicles són biodegradables, els seus subproductes de degradació no són tòxics, i, la gran majoria, no presenta efectes antigènics importants, de manera que són un medi inocu apte pel transport de fàrmacs.

Els primers obstacles que es van haver de superar foren que els liposomes tinguessin una capacitat d'encapsulació i de retenció del fàrmac elevades. Aquestes necessitats promogueren el desenvolupament d'un gran número de mètodes d'obtenció de liposomes, de manera que actualment es pot escollir entre un gran número de protocols que proporcionaran liposomes de diferent diàmetre, amb una, varies o moltes bicapes. La major part d'aquests mètodes, però, no són aplicables a escala industrial. A més del tipus de vesícula, també s'han desenvolupat mètodes molt diferents per a encapsular els fàrmacs. Les variacions en el grau de saturació de les cadenes d'àcid gras, en el cap polar dels fosfolípids, o entre el medi extern i el medi intern dels liposomes, per citar algunes, proporcionen diferents graus d'encapsulació que depenen de les característiques del fàrmac (Kulkarni S.B. et al., 1995). Moltes d'aquestes modificacions afecten a l'altre objectiu, la retenció del fàrmac. Per exemple, la inclusió de colesterol a les bicapes fa disminuir la seva permeabilitat, al igual que ho fan els fosfolípids saturats per sota de la temperatura de transició. La selecció de sistemes amb alguna d'aquestes modificacions ha fet possible formulacions amb liposomes que tenen per objectiu l'administració oral (Al-Meshal M.A. et al., 1998; Maitani Y. et al., 1996; Regnault C. et al., 1996).

L'administració endovenosa de liposomes amb fàrmacs va haver de salvar, en primer lloc, la seva desestabilització per part de les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL), fenòmen que s'eliminà en vesícules que inclogueren colesterol i/o fosfolípids que a la temperatura corporal estessin en la fase gel (Gregoriadis G., 1995). D'aquesta manera s'augmentà notablement el temps de residència dels liposomes en el torrent sanguini, factor que ha permès la creació i comercialització de formulacions fungicides amb amfotericina B (Krestchmar M. et al., 1996; Viviani M.A. et al., 1994). L'estabilitat front de les HDL no implica un temps de circulació ilimitat en el torrent sanguini, ja que el liposomes també són eliminats per acció dels macròfags del sistema del reticle endotelial, en especial del fetge i la melsa, com a conseqüència de la seva opsonització prèvia en la sang. Això permet tractaments que tinguin per objectiu aquest sistema. Però tot i que la cinètica d'aquesta eliminació s'ha mostrat dependent de la grandària dels liposomes, resultant les vesícules més petites les més estables (Harashima H. et al., 1995), ha estat necessari desenvolupar estratègies per tal d'eludir l'acció dels macròfags quan la diana biològica era una altra.

És aquesta necessitat la que originà els liposomes de segona generació, els quals, en un principi, contenien majoritàriament fosfolípids saturats, colesterol, i polietilenglicol d'un pes molecular aproximat de 2000 Da unit covalentment a fosfatidiletanolamina (Woodle M.C. i Lasic

D.D., 1992). Actualment s'empren diferents fosfolípids enllaçats al polietilenglicol, de manera que es poden obtenir liposomes neutres, amb càrrega positiva o negativa (Webb M.S. et al., 1998). En tots els casos els liposomes presenten el polímer exposat al medi aquós. Aquests liposomes tenen un temps de circulació en sang molt elevat en comparació amb el dels que careixen de polímer com a conseqüència de la reduïda adsorció d'opsonines. Els resultats han portat a la comercialització d'aquesta mena de suspensions de liposomes amb fàrmacs amb activitat citostàtica, preparacions que mostren, a més, una toxicitat reduïda (Gregoriadis G., 1995; Lasic D.D., 1996). L'ús de polímers no ha quedat limitat al camp dels liposomes, sinó que també s'han preparat micelles de polietilenglicol per transportar fàrmacs (Trubetskoy V.S. i Torchilin V.P., 1996).

La tercera generació de liposomes la constitueixen els immunoliposomes: liposomes que tenen associats anticossos monoclonals (Mori A. et al., 1993). Els mètodes d'unió dels anticossos van des de la simple adsorció per interacció amb la membrana, fins a l'enllaç covalent en un extrem de polietilenglicol que forma part del liposome (Blume G. et al., 1993). El llarg temps de circulació d'aquesta mena de vesícules unit a la presència dels anticossos fan que esdevengui un vehicle totalment dirigit cap a les cèl·lules diana (Allen T.M., 1998; Lasic D.D., 1998).

Dins del camp mèdic i veterinari, els liposomes de primera generació estan substituint a molts dels adjuvants clàssics de les vacunes, la majoria dels quals presenten cert grau de toxicitat (Gregoriadis G. et al., 1996; McElrath M.J., 1995). És precisament l'eliminació dels liposomes per part dels macròfags del sistema del reticle endotelial, el que ha possibilitat aquesta aplicació. L'eficàcia de les noves formulacions depèn, però, de l'antigen emprat. La mateixa suspensió de liposomes pot no mostrar-se efectiva amb diferents antigens tot i que s'inclouin modificacions generalment beneficioses com la inclusió de lipopolisacàrids i de lípids carregats positivament. Aquest comportament està lligat als mecanismes d'interacció entre les vesícules i els antigens, que determinen com aquests darrers són exposats al sistema immune. Segons es produeixi encapsulació a l'interior de la vesícula, o inclusió (o adsorció) a la membrana, el mecanisme d'activació serà diferent. És per això que en alguns casos s'associa l'efectivitat de les preparacions a un lent alliberament de l'antigen i en altres a la seva exposició al medi extern. En ocasions s'han preparat liposomes amb els antigens s'han enllaçat covalentment a les bicapes però, per les raons anteriors, aquestes tècniques no determinen l'efectivitat (Fortin A. et al., 1996; Thérien H.M. i Shahum E., 1996). Com a resultat més destacable troben la comercialització d'una vacuna per humans contra l'hepatitis A.

Una altra aplicació dels liposomes està situada dins del camp de l'enginyeria genètica. Des de finals de la dècada de 1980, quan es van comercialitzar amb aquest fi, s'empren com a vehicle per a la introducció de gens dins de cèl·lules en cultius (transfecció) i en viu, amb una eficiència major que altres mètodes basats en la desestabilització de les membranes cel·lulars

(Pinnaduwege P. et al., 1989). Les primeres composicions estaven basades en liposomes clàssics que encapsulaven petits fragments de DNA al seu interior. La poca capacitat de transfecció va fer incloure fosfolípids desestabilitzadors de bicapa com la fosfatidiletanolamina per tal que, després de l'endocitosi, els liposomes es desestabilitzessin abans de la fusió amb els lisosomes, orgànel on el DNA resulta malmés. D'altra banda, per tal de promoure la fusió amb la membrana plasmàtica s'incorporaren agents fusogènics com proteïnes virals o polietilenglicol amb pes aproximat de 12.000 Da. Però les millores més significants es produïren en incloure lípids carregats positivament i, posteriorment, en actuar conjuntament amb adenovirus deficients (Meunier-Durmort C. et al., 1996). En la majoria d'aquests casos, però, no es tracta de suspensions de liposomes amb DNA adsorbit, sinó que les vesícules s'han desestabilitzat i el resultat és un macro-complex format per lípids i DNA. Conseqüentment, les formulacions poden obtenir-se simplement per mescla dels segments de DNA amb lípids catiónics monomèrics o micel·lars (Harvie P. et al., 1998), però l'eficàcia *in vivo* augmenta si, juntament als complexos lípid-DNA, també hi ha liposomes catiónics (Song Y.K. i Liu D., 1998).

Tenint en compte les característiques pròpies del diferents tipus de liposomes de cada generació, s'han realitzat estudis amb animals per tal d'avaluar el seu ús com a vehicles per agents emprats en diagnòsi mèdica mitjançant imatge (Lasic D.D., 1993). Així, l'encapsulació de molècules iodades radioopagues (Schneider T. et al., 1995), de radionucleòtids amb quelants (en ocasions derivatitzats amb grups apolars), i de substàncies paramagnètiques permeten, respectivament, la millora de les imatges de tomografia, centelleig i resonància nuclear magnètica (Torchilin V.P., 1996). El cas més espectacular correspon, probablement, a l'encapsulació de gas per obtenir imatges per sonografia. En aquests casos s'aprofita la hidròlisi del bicarbonat encapsulat en liposomes per a obtenir *in situ* el gas. En els assajos realitzats en animals s'han obtingut imatges de bona qualitat, mostrant baixa toxicitat (Unger E. et al., 1994).

També s'està investigant la viabilitat dels liposomes com a eritròcits sintètics (Brandl M. i Gregoriadis G., 1994; Szebeni J. et al., 1999) i transportadors de porfirines (Maman N. i Brault D., 1998), o com a vehicles per a l'administració de fàrmacs per vies respiratòries (Ahn B.N. et al., 1995; Schreier H. et al., 1994a), expectatives que incrementen encara més les seves possibles aplicacions mèdiques.

Fora ja del camp mèdic, podem trobar referències i patents on els liposomes actuen com a agents que incrementen la capacitat de tinció de teixits disminuint alhora la concentració dels residus contaminants d'aquests processos industrials (de la Maza A. et al., 1998; Dueñas P. et al., 1997).

1.6 ESTRUCTURA DE LA PELL HUMANA.

La dosificació de liposomes amb o sense fàrmacs per via tòpica és una de les

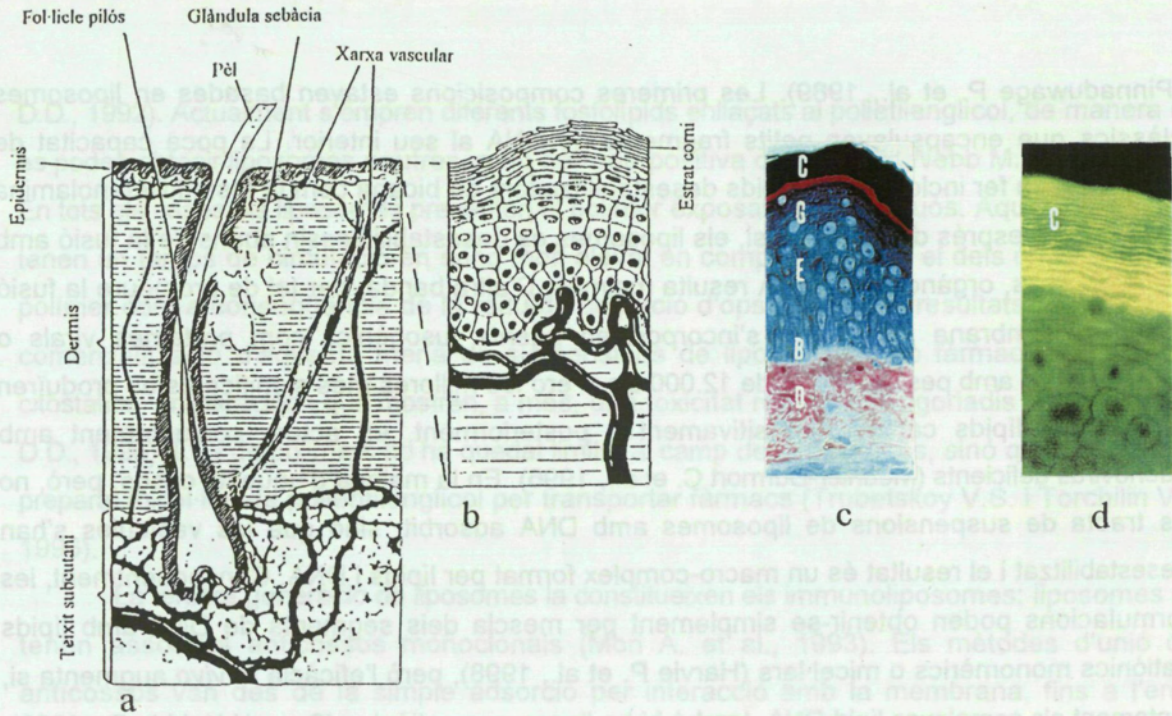


Fig. 11 a i b) Esquemes de l'estructura de la pell humana. **c)** Imatge de l'epidermis. **d)** Imatge de la part més externa de l'epidermis amb tinció fluorescent per tal de visualitzar l'estrat corni.
 D: dermis; B: estrat basal; C: estrat corni; E: estrat espinós; G: estrat granulós. (a i b adaptats de Potts R.O. et al., 1992; c i d adaptats de Berliner D. et al., 1991).

aplicacions més esteses d'aquestes vesícules. Abans de fer referència als resultats i mecanismes d'acció que es proposen, és necessari tenir en compte l'estructura i funció dels diferents estrats de la pell humana.

Des del punt de vista estructural la pell humana està formada per tres dominis diferents, que des del més extern al més intern són l'epidermis, la dermis i la hipodermis (Fig. 11). Les diferències són degudes a la composició particular de cadascuna d'elles i a la seva funció biològica.

L'epidermis és el teixit més extern de l'organisme, fet pel qual és el que en primera instància el protegeix de l'entorn. No conté circulació sanguínia, ni limfàtica, ni sistema nerviós i, en els aproximadament 120 μm de gruix que té podem trobar, com a cèl·lules més nombroses, els queratinòcits i els melanòcits.

Els queratinòcits constitueixen més del 90% de les cèl·lules presents a l'epidermis, i reben aquest nom per que durant el seu cicle vital produeixen una proteïna anomenada queratina. El pes molecular de la queratina depèn de l'estadi concret en el qual es troba el queratinòcit, però en tots els casos es tracta d'una proteïna amb una gran resistència química i física, insoluble, i amb ponts d'hidrògen i disulfur intramoleculares que li confereixen dos dominis d'hèlix alfa.

Les diferents etapes del cicle dels queratinòcits donen lloc a cadascun dels estrats amb que es diferencia l'epidermis que, des del més intern al més extern, són el basal, l'espinós, el

granulós, i el corni (Fig. 11).

L'estrat basal forma una filera en el límit amb la dermis. Els queratinòcits aquí es distribueixen paral·lels a la superfície de la pell, mostren una gran activitat mitòtica, i estan fixos a la unió dermo-epidèrmica, fet que els confereix una funció estructural.

L'estrat espinós el formen entre 5 i 10 files de cèl·lules poligonals en mosaic que s'aplanen en apropar-se a la superfície cutània. Reben el nom per l'aspecte espinós que presenten com a conseqüència d'unes unions entre cèl·lules adjacents (desmosomes).

Per sobre d'aquest trobem l'estrat granulós, amb 2 o 3 fileres de cèl·lules aplanades. Aquestes, en fusionar-se per formar part de les estructures l'estrat corni, alliberen uns corpuscles rics en lípids (corpuscles d'Odland).

L'estrat epidèrmic més extern correspon al corni, que és el que en major grau desenvolupa la funció barrera de la pell, evitant la pèrdua d'aigua corporal i protegint l'organisme del medi exterior. El component fonamental de l'estrat corni són els corneòcits que, pròpiament, no són cèl·lules, sinó estructures mortes anucleades completament plenes de queratina d'alt pes molecular. Tenen forma polihèdrica plana amb un gruix que oscil·la entre 0,5 i 1 μm , i una llargada mitjana de 30 μm , organitzant-se en capes parcialment solapades de fins a 20 unitats. Els corneòcits adjacents tenen unions mitjançant desmosomes modificats, i entre tots ells hi ha una matriu formada per aigua i lípids provinents de la fusió de les cèl·lules de l'estrat granulós. Aquests lípids són, bàsicament, ceramides, colesterol, àcids grassos lliures i sulfat de colesterol. La matriu que formen està ordenada en estructures laminars que alternen zones hidrofíliques i zones hidrofòbiques, amb una amplada total mitjana de 200 nm. Per tant, ens trobem amb un sistema liotrópic que necessita mantenir la relació entre els seus components per tal de preservar l'estructura i, consegüentment, les seves funcions. Una d'aquestes funcions és l'estructural, actuant com a lligant dels queratinòcits i regulant el seu desprendiment per exfoliació. En segon lloc, juntament amb els corneòcits, les estructures laminars regulen la pèrdua d'aigua del cos humà (pèrdua transepidèrmica), ja que constitueixen una sèrie de barreres que dificulten el seu pas.

En conjunt, l'epidermis constitueix un sistema en contínua renovació, en el qual les cèl·lules basals aporten les que, després d'un procés de migració i diferenciació, constituïran l'estrat corni i, finalment, es desprendran de la pell. En els humans el procés de renovació total dura entre 20 i 40 dies.

Moltes de les funcions i característiques de la pell depenen del bon estat i funcionament de la renovació cel·lular. Per exemple, la pell seca mostra una manca d'aigua a la part més externa de l'estrat corni, de manera que els lípids perden l'estructura laminar i es produeix una descamació anòmala. L'estructura laminar també depèn de la composició lipídica, per tant és important que no hi hagi alteracions en la seva proporció (Fig. 12).

El segon tipus de cèl·lula majoritària que hi ha a l'epidermis, el melanòcit, es troba en

menor quantitat que els queratinòcits. Els melanòcits estan situats entre els queratinòcits basals en una relació aproximada del 10 %, i fixats a la unió demoepidèmica. El seu nom es deu a que sintetitzen la melanina, substància que té, principalment, una activitat fotoprotectora de l'ultraviolat, tot i absorbir la radiació electromagnètica compresa entre els 200 i 2400 nm. La melanina, un cop sintetitzada, és transferida als queratinòcits que, en migrar, estenen l'activitat anti-radiació per tota l'epidermis.

Per sota de l'epidermis es troba la dermis, que té una amplada que oscil·la entre els 2000 i 3000 µm i comprèn el 90 % de la pell. Està formada per un teixit connectiu fibrós (col·lagen) i per mucopolisacàrids àcids que li confereixen una consistència de gel aquós. A diferència de l'epidermis, consta tant de xarxa nerviosa com de xarxa vascular amb arterioles, vècules i capilars.

Els fol·licles pilosos (conjunt d'estructures que acompanyen al pèl) travessen l'epidermis fins a l'exterior. Les glàndules sebàcies que en formen part, contenen els sebòcits, cèl·lules productores i alliberadores del seü. Els mecanismes de regulació impliquen a hormones sexuals i hipofisiàries. Entre les funcions del seü destaquen la de protecció cutània, la producció d'olor corporal, la regulació de l'absorció per via tòpica i la possibilitat d'actuar d'emulsionant formant part d'una emulsió que es situa per sobre de l'estrat corni.

Finalment arribem a la hipodermis, situada sota la dermis. Aquest teixit, a més d'aïllant tèrmic, actua com a reservori de matèria grassa, que és sintetitzada en forma de triacilglicèrids pels adipòcits, cèl·lules d'un diàmetre aproximat de 100 µm. Des d'un punt de vista estructural actua com a amortidor entre les capes externes de la pell i els músculs i ossos.

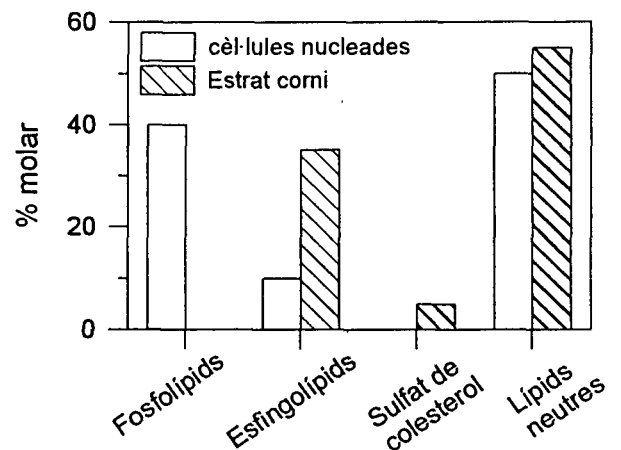
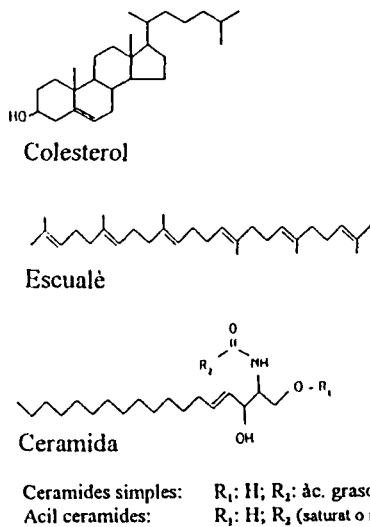


Fig. 12 Estructura dels lípids més abundants a l'epidermis (adaptat de Carbajo J.M. et al., 1993) i composició lipídica en diferents estrats (adaptat de Elias P.M., 1992).

1.7 VESÍCULES LIPÍDIQUES PER APLICACIÓ TÒPICA DE FÀRMACS.

Les característiques de l'epidermis, i més concretament l'estructura de l'estrat corni, fan de la pell humana un sistema molt eficient en l'aïllament del cos, tant pel que fa a mantenir les seves estructures internes com a evitar la penetració d'agents externs. Així, tot i l'accessibilitat que presenta, la funció barrera que desenvolupa constitueix un desavantatge a l'hora de realitzar tractaments per tal solucionar diverses patologies cutànies. Per tal de millorar l'alliberament de substàncies actives a la pell s'han desenvolupat productes que, a més de solubilitzar els fàrmacs, mantenen el producte aplicat a la zona de tractament i, en alguns casos, afavoreixen la seva absorció. Aquesta estratègia pot no resultar efectiva si els fàrmacs arriben amb massa facilitat a la dermis i resulten eliminats per sistema circulatori. A més, l'absorció percutània sistèmica pot representar un perill si les molècules que es difonen per l'organisme tenen efectes no desitjats sobre determinats òrgans o sistemes.

Les similituds entre l'estructura dels liposomes i la de l'espai laminar situat entre els corneòcits de l'estrat corni, juntament amb la capacitat d'encapsular-hi substàncies hidro i liposolubles, va fer que ràpidament s'estudiés la seva utilitat per a l'aplicació tòpica. Els primers assajos mostraren una disminució de l'absorció sistèmica dels fàrmacs i un increment de la seva concentració en els diferents estrats de la pell: corticoides marcats radioactivament, anestèsics, i citostàtics, s'acumulaven a l'epidermis i a la dermis (Egbaria K. i Weiner N., 1990), i en els pocs casos en els quals s'avaluava l'eficàcia, aquesta es veia incrementada. A més de la deposició local del fàrmac, també se'ls atribuï un efecte reservori, de manera que els liposomes alliberaven el fàrmac d'una manera més perllongada, incrementant-se així el temps d'acció. No s'assajaren només com transportadors de molècules relativament petites, sinó que també s'encapsularen proteïnes com la superòxid dismutasa. L'aplicació tòpica d'aquests proteo-liposomes va fer que es mantingués l'activitat de l'enzim quan la pell era exposada a radiació ultravioleta.

El prometedor panorama que projectaven els fets anteriors es pertorbà quan noves experiències amb altres fàrmacs en liposomes posaren de manifest que no totes les formulacions eren eficaços (Schreier H. i Bouwstra J., 1994b). De manera complementària altres assajos determinaren que els liposomes no penetraven fins a capes profundes de la pell. Com poden les substàncies encapsulades arribar a les zones internes de la pell si les vesícules que les contenen no ho fan?

Els factors que poden determinar l'efectivitat dels liposomes són molt nombrosos. A més a més dels relacionats directament amb les seves característiques, com ara la grandària, número de bicapes, temperatura de transició dels lípids, càrrega elèctrica, etc, cal tenir en compte el sistema en el qual es realitza l'experiment (origen de la pell, *in vivo/in vitro*) i el

d'aplicació de les mostres (oclusió/no oclusió⁷, líquida, gel, crema, etc) Tots aquests factors s'han revelat com a determinants en els resultats. Les múltiples combinacions d'aquestes variables, i els artefactes experimentals detectats temps després de la publicació dels treballs, han proporcionat en ocasions resultats contradictoris que, en aparença, no tenien justificació.

La majoria de resultats experimentals recollits fins el moment indiquen que els liposomes afavoreixen tant el transport de petites molècules hidrofíliques o hidrofòbiques (Gabrijelcic V. et al., 1994; Michel C. et al., 1992; Short S.M. et al., 1996; Touitou E. et al., 1994), com el de proteïnes (Yarosh D. et al., 1994). D'altra banda, als liposomes buits se'ls associen efectes hidratants i reestructurants de la pell (Boddé H.E. et al., 1992; Lasic D.D., 1993), que es relacionen amb l'aigua d'hidratació dels caps polars dels fosfolípids. Tots aquests efectes es donen sense que es produeixi una absorció sistèmica percutània, fet pel qual els liposomes esdevenen vehicles aptes pel tractament de malalties de la pell.

La bibliografia descriu resultats contradictoris pel que fa a estudis comparatius d'aplicacions realitzades amb o sense oclusió (Cevc G., 1995; van Kuijk-Meuwissen M.E.M.J. et al., 1998; Michel C. et al., 1992), fet important tenint present que la majoria de formulacions comercialitzades s'administren sense oclusió. Un cas especial el constitueixen els transfersomes, un tipus de liposoma que incorpora a les bicapes molècules formadores de micelles (Cevc G. i Blume G., 1992). La quantitat present d'aquestes molècules⁸ és tal que no provoca la destrucció de les bicapes i les hi proporciona una gran flexibilitat. En diversos articles es fa referència a que el transfersomes, en condicions de no oclusió, arriben a les capes internes de la pell i són objecte d'absorció sistèmica. En cas contrari, quan l'aplicació és en condicions d'oclusió, no es detecta una penetració important, i els resultats són equivalents als que proporcionen els liposomes amb qualsevol dels dos tipus d'aplicació.

Per explicar els resultats dels transfersomes es fa referència al gradient osmòtic que hi ha a la pell com a conseqüència del diferent grau d'hidratació dels seus estrats (Cevc G. i Blume G., 1992). En realitzar l'aplicació amb oclusió, el gradient desapareix i els transfersomes no penetren a la pell, mentre que en cas contrari, aquests es deformen i es difonen pel seu interior. Els liposomes, en tenir bicapes més rígides són incapaços de fer-ho inclús en presència del gradient. Aquesta interpretació és passada en dubte per altres autors que no troben diferències entre la penetració de liposomes i de transfersomes obtinguts amb altres tensoactius (van Kuijk-Meuwissen M.E.M.J. et al., 1998). En tots els casos, però, és la interacció de les

⁷ Aquests termes fan referència a com s'aplica la mostra a la pell, en cas de fer-ho amb un pegat, el mètode esdevé oclusiu, i la zona que rep el tractament no transpira. En cas contrari el sistema és no oclusiu.

⁸ Alguns articles indiquen que les vesícules estan constituïdes per un tensoactiu (colat sòdic) i fosfatidilcolina en una proporció en pes que oscil·la entre el 10 i 24 % de colat (Planas M.E. et al., 1992), mentre que en d'altres és l'àcid mirístic, en una relació molar que pot arribar al 50 %, la molècula que junt amb el fosfolípid forma la bicapa (Lasic D.D., 1993)

vesícules amb l'estrat corni i/o altres elements cutanis el que determina el pas dels liposomes o del seu contingut a través de la pell.

Així, amb liposomes que contenen un marcador fluorescent hidrosoluble, s'ha comprovat que té lloc la deposició a través dels folicles pilosos (Weiner N.D. et al., 1994), al igual que hi ha una relació entre el número de folicles i el grau de penetració del marcador. D'altra banda, varis treballs han comprovat les diferents variacions que experimenta l'estrat corni en presència de suspensions de liposomes en condicions d'oclusió i de no oclusió, proposant un deposició intercel·lular (a través dels espais lipídics de l'estrat corni). Aquestes interaccions s'han mostrat depenents de la composició en fosfolípids dels liposomes (Hofland H.E.J. et al., 1995) i del tipus d'aplicació (van Kuijk-Meuwissen M.E.M.J. et al., 1998; Zellmer S. et al., 1995), mostrant millors resultats les oclusives. El mecanisme implica, com a mínim, l'adsorció de liposomes a la interfase que formen l'estrat corni i l'aplicació, on poden tenir lloc fusions entre les vesícules. En cas de tenir lloc una interacció major, es detecten canvis a les regions lipídiques multilaminars que separen els comeòcits. Complementàriament, es proposa que els liposomes no mantenen la seva integritat física en interaccionar amb l'estrat corni, especialment donada l'estructura multilaminar del domini lipídic. La possibilitat d'obtenir in vitro aquestes estructures (Kuempel D. et al., 1998) pot aportar noves dades sobre aquest fet.

En qualsevol cas, el procés mitjançant el qual els liposomes afavoreixen la penetració de substàncies no està totalment clarificat, de manera que són necessaris nous assajos per determinar el mecanisme i poder millorar l'efectivitat.

2. OBJECTIUS

- 1.- Caracteritzar la producció de liposomes a gran escala emprant Pro-Lipo S com a matèria primera i el Microfluidizer 110S com a homogenitzador a alta pressió.
- 2.- Establir les condicions experimentals òptimes per a realitzar determinacions de la grandària de liposomes amb aparells d'anàlisi de l'espectre de freqüències (Microtrack UPA 150).
- 3.- Obtenir, mitjançant metodologies escalables a la indústria, suspensions de liposomes amb diferents fàrmacs encapsulats (ditanol al 0,1% p/p, hidro cortisona al 0,5% p/p i butirat-propionat d'hidrocortisona al 0,1% p/p) pel tractament de dermatopaties per via tòpica.
- 4.- Obtenir emulsions d'oli de borratge al 2 % p/p estabilitzades amb fosfolípids per a aplicació tòpica.
- 5.- Establir les metodologies d'anàlisi i control de les preparacions.
- 6.- Avaluar l'efectivitat de les formulacions viables.

3. MÈTODES

L'apartat està dividit en els següents temes:

3.1 Mètodes analítics

3.2 Mètodes preparatius

3.3 Mètodes matemàtics

3.1

MÈTODES ANALÍTICS.

Els mètodes analítics es presenten en tres subapartats. En el primer d'ells es mostren els mètodes de quantificació emprats (Ap. 3.1.1), en el segon s'esmenten els mètodes de caracterització dels fosfolípids, de fàrmacs, de les suspensions de liposomes i de les emulsions amb OB (Ap. 3.1.2), i en el tercer es detallen les tècniques d'avaluació de l'efectivitat d'aquestes preparacions (Ap. 3.1.3).

3.1.1 MÈTODES DE QUANTIFICACIÓ.

En aquest apartat es descriuen els mètodes de quantificació utilitzats en el present treball. En les ocasions en que el mètode està adaptat o és nou, la seva validació està descrita a l'apartat de Resultats. En alguns casos les anàlisi es realitzaren en serveis o departaments aliens, fet pel qual només es descriu de forma general el procés emprat.

3.1.1.1 QUANTIFICACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE FOSFOLÍPIDS PER COMPLEXACIÓ AMB FERROTIOCIANAT AMÒNIC.

El mètode seguit està basat en la determinació de l'absorbància d'un complex ferrotiocianat amònic-fosfolípid soluble en cloroform (Steward J.C.M., 1980). Presenta l'avantatge de la no interferència del fósfor inorgànic (moltes vegades present en els tampons aquosos), encara que la seva sensibilitat varia en funció del cap polar del fosfolípid analitzat.

Es verteixen en tubs de vidre amb tap de tefló 2 mL de cloroform i 2 mL del següent reactiu preparat en aigua que conté:

27,03 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

30,40 g/L NH_4SCN

A continuació s'addicionen alíquotes de les mostres a analitzar i s'agiten amb un vòrtex durant 30 segons, assegurant que les dues fases es mesclen totalment, afavorint així l'extracció dels fosfolípids a la fase orgànica. Quan es tornen a separar es retira la fase superior (aquosa) i es mesura l'absorbància a 470 nm de la fase clorofòmica. Els resultats s'interpolen a una recta patró realitzada d'igual forma.

Els patrons foren suspensions aquoses de liposomes o dissolucions de fosfolípid en cloroform de concentracions conegudes. Els patrons en cloroform s'addicionaren al tub en primer lloc, evaporant-se el dissolvent amb corrent de nitrogen abans de l'addició dels 2 mL de cloroform indicats anteriorment. Quan els volums d'aquests patrons a afegir foren iguals o superiors a 0.1 mL no s'evaporaren, sino que s'afegí cloroform fins a completar un volum de 2 mL.

Pel que fa a les alíquotes de les mostres i patrons aquosos, s'afegiren en un volum màxim de 0.1 mL, sense cap modificació del mètode.

Les quantitats de patrons i de mostres afegides es calcularen de tal forma que no es sobrepassessin els 0,1 mg/mL de fosfolípid en el cloroform dels tubs on es realitzà l'extracció (suposant que aquest es dissol només a la fase orgànica). El límit anterior té una absorbància aproximada d'1 UA a 470 nm. Quan les concentracions de fosfolípid foren massa grans per mesurar alíquotes amb un volum reproduïble, es realitzà un dilució prèvia o es doblà el volum de cloroform a tots els tubs (mostres i patrons).

3.1.1.2 QUANTIFICACIÓ DE FOSFOLÍPIDS MITJANÇANT LA DENSITAT ÒPTICA UV-Vis DE LES SUSPENSIONS DE LIPOSOMES.

El mètode s'emprà per calcular la concentració de totes aquelles suspensions de liposomes a les quals s'aplicà algun procés que només impliqués dilució, sense que hi hagués cap modificació de la distribució de grandàries dels liposomes.

Com a patró s'utilitza una alíquota de la suspensió mare de liposomes, de la qual es realitzen dilucions amb el medi aquós de la preparació. Aquestes s'ajusten de forma que proporcionen suspensions amb un rang de densitat òptica (DO) linial a la longitud d'ona escollida (entre 280 i 550 nm) emprant el medi aquós com a referència. L'ordre de les dilucions depèn de les concentracions inicials i de la distribució de grandàries dels liposomes de cada suspensió. Les suspensions problemes s'analitzen de la mateixa manera, realitzant dilucions quan les DO no són dins l'interval de la recta patró.

La validació del mètode està descrita a l'apartat 4.1.4, on s'avalua la correlació linial entre les concentracions i les DO i es compararen els resultats amb la quantificació dels fosfolípids pel mètode del ferrotiocianat amònic.

3.1.1.3 QUANTIFICACIÓ DE FÀRMACS PER CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA D'ALTA RESSOLUCIÓ (HPLC).

Les determinacions es realitzaren amb un HPLC Kontron T-414 o amb un HPLC Thermostepparation PC-1000. En tots els casos el gradient fou isocràtic i es treballà a temperatura ambient. Les característiques de les anàlisi per a cada molècula foren:

DITRANOL / DANTRONA.

Columna: Spherisorb W (gel de sílica) 25x0.46 cm, 10 µm.

Fase mòbil: n-hexà:diclormetà:àc. acètic glacial (82:12:6 v/v).

Cabal: 2 mL/min.

Detecció: Absorbància a 330 nm.

Temps de retenció (t_r): 2 min 5 seg.

Preparació de les mostres: aproximadament 0.2 g de mostra (0.1 % p/p ditranol) pesats amb

exactitud dissolts en 2 mL de diclometà, enrasant a 10 mL amb la fase mòbil. Les mostres i els patrons es protegiren de la llum.

Injecció: 20 μ L.

Aquestes mateixes condicions són aptes per a la detecció i la quantificació de la dantrona (t_r = 2 min 25 seg).

HIDROCORTISONA.

Columna: Spherisorb ODS-2 (C18) 25x0.46 cm, 10 μ m.

Fase mòbil: Metanol:Aigua (50:20 v/v).

Cabal: 1 mL/min.

Detecció: Absorbància a 254 nm.

Temps de retenció (t_r): 2 min 15 seg.

Preparació de les mostres: aproximadament 0,1 g de mostra (0.5 % p/p hidrocortisona) pesats amb exactitud i enrasats en 5 mL d'etanol.

Injecció: 20 μ L.

BUTIRAT-PROPIONAT D'HIDROCORTISONA.

Columna: Spherisorb ODS-2 (C18) 25x0.46 cm, 10 μ m.

Fase mòbil: Metanol:Aigua (70:30 v/v).

Cabal: 1,5 mL/min.

Detecció: Absorbància a 254 nm.

Temps de retenció (t_r): 8 min.

Preparació de les mostres: Aproximadament 0,1 g de mostra (0.1 % p/p butirat-propionat d'hidrocortisona) pesats amb exactitud i enrasats en 5 mL d'etanol.

Injecció: 20 μ L.

3.1.1.4 QUANTIFICACIÓ DEL DITRANOL PER ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis.

Per a la determinació ràpida de la riquesa en ditranol en diferents dissolvents i condicions d'il·luminació s'ha utilitzat el mètode descrit a la United States Pharmacopeia XX (USP XX). Com a mesura semi-quantitativa s'ha assajat una variació del mateix.

A la Fig.13 es mostren els espectres UV-Vis en cloroform del ditranol i del seu producte de degradació majoritari, la dantrona. Aquest procés pot induir-se amb la presència de petites quantitats d'àcid o de base. A la Fig. 14 s'aprecia l'evolució de l'espectre del ditranol en cloroform en afegir NaOH, resultant una concentració 0,5 mM de la base. Les modificacions de l'espectre durant la degradació són emprades per quantificar espectrofotomètricament i de forma ràpida la riquesa en ditranol (USP XX).

Per tal d'avaluar l'estabilitat del ditranol en funció del temps en els dissolvents emprats en els processos d'obtenció de liposomes s'ha calculat la relació d'absorbàncies descrita a la bibliografia.

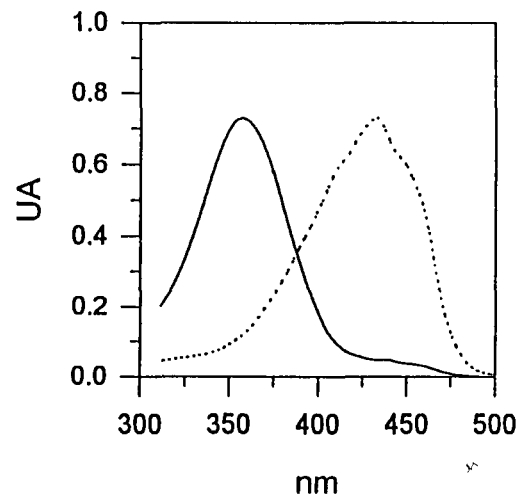


Fig. 13 Espectres UV-Vis del ditranol (—) i de la dantrona (----) en cloroform.

Així, es prepararen dissolucions de ditranol i de dantrona en diferents dissolvents de forma que les absorbàncies dels màxims respectius a 355 i 430 nm es situessin entre 0,5 i 1 UA. Els valors inicials foren emprats com a absorbàncies de referència (la de patrons en bon estat de conservació). El seguiment al llarg del temps de l'absorbància de les dissolucions de ditranol en diferents condicions d'il·luminació proporcionarà la riquesa en ditranol en cada instant. Operant d'aquesta forma les concentracions inicials de patró i mostra són les mateixes, ja que són la mateixa dissolució, i s'obté la següent expressió simplificada pel càlcul de la riquesa de ditranol:

$$R (\%) = \frac{A_{355}^m A_{430}^{da} - A_{430}^m A_{355}^{da}}{A_{355}^{di} A_{430}^{da} - A_{430}^{di} A_{355}^{da}} * 100 \quad Eq. 2$$

on:

R (%) expressa la riquesa de ditranol en %,

A_j^i indica l'absorbància a la longitud d'ona de "j" nm de dissolucions "i" de:

- ditranol:

di : valor per temps inicial. Correspon al valor de referència del ditranol (patró en bon estat de conservació),

m : valor per la dissolució anterior a diferents temps. Correspon, en l'equació no simplificada, a l'absorbància d'una mostra a analitzar.

- dantrona:

da : és constant, ja que correspon al valor del patró de dantrona en l'equació no simplificada.

Per calcular la riquesa de mostres amb l'expressió anterior no simplificada cal conèixer tant la concentració dels patrons, com el pes de mostra analitzada, de manera que s'introdueixen aquests valor a l'equació no simplificada (USP XX). El pes de mostra a analitzar, però, és difícil d'obtenir quan es volen analitzar alíquotes obtingudes en les diferents etapes de preparació dels liposomes amb el fàrmac (algunes alíquotes són d'éter, cloroform, ...). És per això que per tal de calcular valors de riquesa d'una forma ràpida en les diferents etapes d'obtenció de liposomes (MLV's i REV's) amb el fàrmac, s'ha definit un nou paràmetre (Q%). Aquest aprofita la ràpida variació dels màxims d'absorció que s'observa durant la degradació del ditranol per donar informació semi-quantitativa del percentatge de fàrmac no degradat. Es calcula com el quocient entre el quocient d'absorbàncies a 355 nm i 430 nm (que són els màxims del ditranol, A_{355}^m , i de la dantrona, A_{430}^m) d'una alíquota de la mostra diluïda en

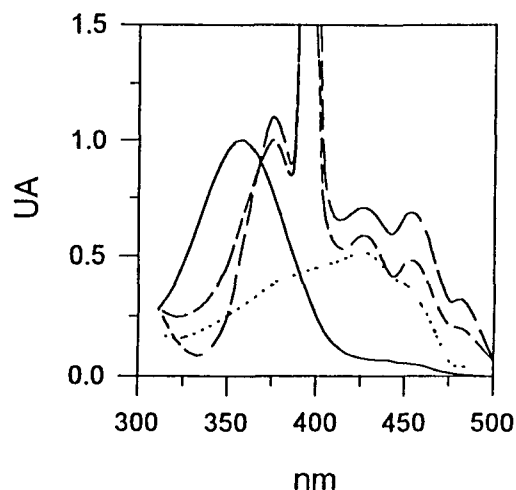


Fig. 14 Evolució amb el temps de l'espectre UV-Vis de ditranol 0,25 mM en cloroform (—) amb l'addició de NaOH fins a una concentració 0,5 mM: 1 minut (---), 45 minuts (----), 14 hores (.....).

cloroform i el valor que té aquest quocient per una dissolució de ditranol pur en cloroform preparada de nou ($A_{355}/A_{430} = 11,16 \pm 0,058$; $n=3$). S'ha expressat en tant per cent segons l'equació 3:

$$Q (\%) = \frac{(A_{355}^m/A_{430}^m)}{11,16} * 100 \quad Eq. 3$$

En l'apartat 4.1.5 es mostren els resultats de la utilització d'aquesta expressió, comparats amb el mètode de la USP XX.

3.1.1.5 QUANTIFICACIÓ DE CROM MITJANÇANT ABSORCIÓ ATÓMICA.

Les determinacions de crom pel càlcul del volum encapsulat en liposomes es realitzaren mitjançant aquesta tècnica al Servei d'Anàlisi Química de la UAB. La tècnica emprada fou la absorció atòmica en cambra de grafit.

3.1.1.6 QUANTIFICACIÓ DE LES CADENES D'ÀCID GRAS DE FOSFOLÍPIDS I OLI DE BORRATGE MITJANÇANT CROMATOGRÀFIA DE GASOS.

La composició d'àcids grassos de la fosfatidilcolina d'ou i de l'OB fou determinada obtenint els corresponents ésters metílics, emprant BF_3 com a catalitzador (New R.R.C., 1990). La quantificació es realitzà al laboratori d'anàlisi de Puig S.A.

3.1.1.7 MESURA DE L'OSMOLARITAT

La força iònica de les dissolucions es va determinar indirectament a partir l'osmolaritat, mesurada mitjançant la disminució del punt de congelació amb un Fiske One-ten (E.E.U.U.).

3.1.1.8 MESURA DE L'ÍNDEX DE REFRACCIÓ.

S'emprà un refractòmetre PZO Warszawa RL2 (Polònia), després de calibrar-lo amb aigua i etanol.

3.1.2 MÈTODES DE CARACTERITZACIÓ DE FOSFOLÍPIDS, FÀRMACS, SUSPENSIONS DE LIPOSOMES I EMULSIONS D'OLI DE BORRATGE.

En el present apartat es descriuen els mètodes analítics no quantitius que permeten determinar les característiques físiques i/o químiques de les molècules emprades així com les de les suspensions de liposomes i emulsions amb OB. En els casos en que la tècnica s'ha posat a punt es descriu el procés a l'apartat de Resultats.

3.1.2.1 ANÀLISI DE FOSFOLÍPIDS PER CROMATOGRAFIA EN CAPA PRIMA (TLC).

Es realitzà per a la identificació de fosfolípids. S'empraren plaques d'alumini 20x20 Silica Gel 60 F₂₅₄ (Merk KGaA, Alemanya). El medi d'elució fou, cloroform: metanol:aigua (65:25:4 v/v). Les quantitats de mostra aplicades estigueren compreses entre 30 i 100 µg de fosfolípid. S'empraren diferents reveladors (Stein J. i Smith G., 1982):

REACTIU DE FOSFATS.

S'utilitzà pel revelatge específic de fosfolípids (Dittmer J.C. i Lester R.C., 1964). Per obtenir-lo es dissolen 30 g de MoO₃ en 300 mL d'H₂SO₄ calent, dissolució que s'addiciona, una vegada freda, sobre 100 mL d'H₂O. Després de dissoldre-hi 0,9 g de Mo, la mescla es torna a escalfar durant 15 min. Un cop freda es decanta i s'addiciona sobre 450 mL d'H₂O. El reactiu es guarda a temperatura ambient.

El ruixat de les plaques dóna lloc, a temperatura ambient, a taques de color blau indicatives de la presència de fosfolípids.

IODE.

El revelatge de les plaques de cromatografia amb vapors de iode dóna taques grogues lípid-positiu.

REVELATGE GENERAL.

Per a la determinació de tot el material mitjançant carbonització, les plaques es col·loquen, després del revelatge amb el reactiu de fosfats, a 160°C durant 2 hores.

3.1.2.2 ÍNDEX D'OXIDACIÓ DE FOSFOLÍPIDS I D'OLI DE BORRATGE.

La degradació química dels fosfolípids i olis insaturats pot seguir-se espectroscòpicament detectant la formació i l'augment del número de dobles enllaços conjugats, els quals absorbeixen a 233 nm ($\epsilon_{233}=30.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Aquest fet és una conseqüència de la formació de radicals a les cadenes d'àcid gras, la qual cosa permet el desplaçament de dobles enllaços cap a posicions conjugades energèticament més afavorides. La reacció radicalària s'estén a altres cadenes de fosfolípids adjacents dins la bicapa fins a l'etapa de terminació. Donat que ni els fosfolípids naturals insaturats ni l'OB no presenten diens conjugats, el seu espectre UV presenta un únic pic centrat al voltant dels 200 nm originat pels grups C=O. Com que l'aparició dels dobles enllaços conjugats comporta uns increments d'absorbància a 233 nm, es pot seguir l'estat químic dels fosfolípids i OB mitjançant el quocient d'absorbàncies entre els pics anteriors (A_{233}/A_{200}). Per obtenir les lectures les mostres es dissolen en etanol, que és prou transparent en aquesta zona de l'espectre electromagnètic.

Com a desavantatges del mètode cal assenyalar les possibles interferències d'altres

molècules al realitzar lectures a longituds d'ona tan curtes, o l'aparició de terbolesa a les preparacions que pot causar la utilització de medis salins i de molècules poc solubles en etanol.

Totes les molècules amb les quals s'ha treballat produeixen interferències en la determinació d'aquest índex, fet pel qual només s'ha determinat en les mostres de liposomes sense fàrmacs i en les emulsions amb oli de borratge. En aquest darrer cas, l'índex avalua conjuntament les cadenes d'àcid gras de l'oli i dels fosfolípids presents.

L'adquisició dels espectres es realitzà diluint una alíquota de les mostres en etanol absolut de forma que la concentració màxima dels fosfolípids no superés els 0,46 mg/mL i la de l'oli de borratge els 0,13 mg/mL. S'utilitzaren cubetes de quars, i etanol absolut com a referència. Com a conseqüència de la gran intensitat del pic a 200 nm, el seguiment es realitzà mitjançant el quocient entre les absorbàncies a 233 nm i 215 nm (Klein R.A., 1970). Les absorbàncies, però, foren prèviament corregides, com es detalla més endavant, amb els valor dels blancs a les mateixes longituds d'ona:

$$\text{Índex d'oxidació} = \frac{A_{233}^{corr}}{A_{215}^{corr}} \quad \text{Eq. 4}$$

Aquest valor dóna una valoració qualitativa de l'estat de la mostra. Poden obtenir-se resultats quantitius calculant el percentatge d'oxidació segons l'expressió:

$$\% \text{ oxidació} = \frac{\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ diens}}{\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ fosfolípid}} * 100 \quad \text{Eq. 5}$$

emprant el valor de l' ϵ_{233} per obtenir la concentració de diens conjugats.

Per tal d'obtenir l'índex d'oxidació (Eq. 4) sense la interferència de la terbolesa del medi de cada tipus de mostra, es realitzaren les següents dilucions i tractaments (les validacions del mètode es mostren a l'apartat 4.1.2 dels resultats):

SUSPENSIONS DE LIPOSOMES.

Es determinaren les absorbàncies a 215, 233 i 500 nm de les mostres obtingudes a partir de Pro-Lipo S i de blancs (tampó de les suspensions de liposomes) preparats com s'indica tot seguit:

Composició de les mostres	Dilució (μL mostra/mL etanol)	Composició del blanc corresponent	Dilució (μL blanc/mL etanol)
5 mg F/mL	300 / 3,00	Tampó	297 / 3,003
15 mg F/mL	100 / 3,20	Tampó	97 / 3,203 *
50 mg F/mL	30 / 3,27	Tampó	27 / 3,273

* Volums calculats tenint en compte la composició dels Pro-Lipo S (F/Etanol/Aigua, 30/30/40 p/p). D'aquesta manera la relació aigua/etanol de les dilucions és la mateixa per mostres i blancs.

Prèviament a la determinació del índex d'oxidació cal realitzar una correcció per tal d'eliminar la terbolesa que ocasionen les sals. És per això que s'igualen les absorbàncies a 500 nm de les parelles de mostres i blancs i posteriorment es corregeixen les absorbàncies de les mostres a 215 nm i 233 nm restant la contribució dels blancs. Les dues operacions es resumeixen a la següent expressió:

$$A_j^{corr} = A_j^{mostra} - A_j^{blanc} - (A_{500}^{mostra} - A_{500}^{blanc}) \quad Eq. 6$$

on:

A_j^{corr} expressa l'absorbància corregida a la longitud d'ona de j nm (233 o 215).

A_j^{mostra} correspon a l'absorbància a la longitud d'ona de j nm de la dilució de la mostra.

A_j^{blanc} correspon a l'absorbància a la longitud d'ona de j nm de la dilució del blanc corresponent.

D'aquesta forma s'obtenen les absorbàncies corregides a partir de les quals es calcula l'índex d'oxidació (Eq. 4).

GELS AMB LIPOSOMES.

Es realitzà un blanc amb el tampó de la mostra que contingué Carbopol 940 a la mateixa concentració que la mostra. Les dilucions en etanol foren les següents:

Composició de la mostra	Dilució (mg mostra/mL etanol)	Composició del blanc corresponent	Dilució (mg blanc/mL etanol)
50 mg F/g ; 0,3 % p/p Carb. 940	30 / 3,27	0 mg F/g; 0,3 % p/p Carb. 940	30 / 3,27

Les dissolucions etanòliques de mostres i blancs es centrifuguen en microtubs durant 1 minut a 2.500xg i 4°C. Posteriorment es determinen les absorbàncies dels sobrenedants a 215, 233 i 500 nm. Per obtenir l'índex d'oxidació (Eq. 4) es realitza la mateixa correcció que en el cas de les suspensions de liposomes (Eq. 6).

EMULSIONS AMB OLI DE BORRATGE.

Es determinaren les absorbàncies a 215, 233 i 500 nm de les dilucions en etanol de les mostres i blancs (tampó de les mostres) preparats com s'indica tot seguit:

Composició de la mostra	Dilució (µL mostra/mL etanol)	Composició del blanc corresponent	Dilució (µL blanc/mL etanol)
20 mg F/mL; 2 % p/p OB	20 / 3	Tampó	20 / 3

Es determinà l'índex d'oxidació (Eq. 4) a partir dels valors de les absorbàncies corregides (Eq. 6).

GELS AMB OLI DE BORRATGE.

La preparació emprada com a blanc fou un gel de Carbopol 940 a la mateixa concentració que la mostra. Les dilucions en etanol foren:

Composició de la mostra	Dilució (mg mostra/mL etanol)	Composició del blanc corresponent	Dilució (mg blanc/mL etanol)
20 mg F/g; 2 % p/p OB; 0,3 % p/p Carb. 940	20 / 3	0 mg F/g 0 % p/p OB 0,3 % p/p Carb. 940	20 / 3

Les dissolucions etanòliques es centrifuguen en microtubs durant 1 minut a 12.500xg i 4°C. Posteriorment es determinen les absorbàncies dels sobrenedants a 215, 233 i 500 nm. L'índex d'oxidació (Eq. 4) s'obté a partir de les absorbàncies corregides (Eq. 6).

3.1.2.3 ESPECTROSCÒPIA D'INFRAROIG AMB TRANSFORMADA DE FOURIER.

Aquesta tècnica (FTIR) fou emprada per a la caracterització de la PC d'ou purificada (Ap. 4.2.1), per a l'estudi de les interaccions fosfolípid-fàrmac (Ap. 4.3.3.3 i 4.3.4.2), i per determinar la relació en pes d'oli de borratge i de fosfolípid en les diferents fases que constitueixen les emulsions que s'obtingueren amb aquestes dues substàncies (Ap. 4.3.5.2). Aquesta darrera aplicació va anar precedida per la posada a punt del mètode, els resultats de la qual es descriuen a l'apartat 4.1.6.

Els espectres d'infraroig s'obtingueren emprant finestres de AgCl en un espectròmetre Mattson Polaris. Per obtenir cada espectre es realitzaren 200 scans a una resolució de 2 cm⁻¹ (amb un punt cada 0,5 cm⁻¹). Els scans s'obtingueren en blocs de 10 per tal d'eliminar la contribució del vapor d'aigua present. Durant tota l'adquisició, que té una durada aproximada de 13,5 min, hi hagué una purga d'aire sec amb un punt de rosada igual o menor a -40°C. La determinació de la posició dels màxims dels pics d'absorció es realitzà de dues formes: directament a partir de l'espectre original per la caracterització de l'EPC i per l'estudi de les emulsions OB/F, i a partir de la quarta derivada per a la determinació de les interaccions fàrmac-fosfolípid. Aquest darrer mètode minimitza els desplaçaments dels màxims deguts als solapaments totals o parcials dels pics que es poden produir quan s'analitzen mesclades de diverses substàncies.

L'adquisició dels espectres es va realitzar de dues maneres, bé introduint a l'aparell una pel·lícula seca de la mostra (liposomes o emulsió OB/F), bé introduint-hi una mostra a alta concentració sense assecat prèviament (pel·lícula humida).

Per obtenir una pel·lícula seca es diposità sobre una finestra la quantitat necessària de mostra (EPC: màxim 4 mg, dissolts en cloroform; OB/F: ~20 µL d'emulsió al 2 % p/p) i s'assecà amb un corrent de nitrogen. Posteriorment es col·locà en un dessecador amb P₂O₅ durant un temps mínim d'1 h abans de realitzar els espectres.

Per obtenir una pel·lícula humida s'estengué la quantitat necessària de mostra de suspensió de liposomes a alta concentració sobre una finestra, de manera que es produí l'assecatment de la mostra durant l'anàlisi.

En dos mètodes de preparació es tingué en compte que la quantitat de mostra no originés absorbàncies majors de la unitat.

3.1.2.4 DETERMINACIÓ DE LA SEDIMENTACIÓ DE LIPOSOMES I DE L'ESTABILITAT FÍSICA DE LES PREPARACIONS MITJANÇANT ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis.

Les característiques òptiques de les suspensions de liposomes i emulsions d'OB estan relacionades, entre altres factors, amb la quantitat de vesícules i amb la seva distribució de grandàries (també depenen, per exemple, de la força iònica del medi). Les alteracions d'aquestes dues variables poden ser seguides per variacions de la densitat òptica (DO), la qual cosa implica una metodologia fàcil d'emprar i no necessitada d'instrumental especialitzat. La bibliografia descriu assaigs semblants per caracteritzar la capacitat de sedimentació dels liposomes (New RRC., 1990) i d'altres en els quals les variacions de la DO que tenen lloc quan s'addicionen quantitats determinades d'etanol, es relacionen amb l'estat fisico-químic de les bicapes de liposomes (Choi M.J. et al., 1992).

La relació entre la DO i la quantitat de vesícules presents a la suspensió, s'ha dut a terme per determinar de forma ràpida si durant l'eliminació per centrifugació dels fàrmacs hidrofòbics presents en excés en forma sòlida a les preparacions, té lloc una sedimentació dels liposomes. Només cal comparar els valors de la DO a la longitud d'ona escollida (generalment al voltant de 500 nm) de dilucions d'alíquotes de la mostra centrifugada i del sobrenedant corresponent (dilucions que situaren les DO per sota d'1 UA). Si els valors no són significativament diferents és deguda a que no té lloc cap sedimentació de les vesícules (les dilucions són prou grans com per que el sòlid, en sedimentar ràpidament, no interfereixi a les lectures).

Cal tenir present que el mètode descrit no és quantitatiu: no dóna informació sobre la concentració de fosfolípids al sobrenedant, ja que si es produeix sedimentació, la distribució de grandàries de liposomes al sobrenedant és diferent de la de la suspensió original. És per això que, en cas necessari, cal relitzar una quantificació dels fosfolípids per mètodes químics.

D'altra banda l'estabilitat amb el temps de les suspensions de liposomes i emulsions d'OB s'ha determinat mitjançant les DO a 500 nm (o 550 nm) de dilucions d'alíquotes de les mostres. Les dilucions es calcularen per cada preparació, de manera que proporcionaren unes DO a temps zero compreses entre 0,3 i 0,8 UA. El valor de la dilució trobat per cada suspensió es mantingué constant en les anàlisi realitzades al llarg del temps. El medi de dilució fou sempre

el medi aquós de la mostra analitzada. Els resultats s'expressen com el quocient entre la DO a un temps determinat i la DO a temps zero (DO_t / DO_0).

3.1.2.5 ESTABILITAT DE LES SUSPENSIONS D'OLI DE BORRATGE CENTRIFUGADES.

Per tal de realitzar un assaig accelerat d'estabilitat física de les emulsions d'OB, es centrifugaren alíquotes de 10 mL a 2000 x g durant 30 minuts a 4°C en un rotor d'angle fix. Es comprovà el comportament macroscòpic de preparacions amb diferents relacions OB/F, així com els diàmetres de les microgotetes constituents de les preparacions no centrifugades i les de les centrifugades i homogeneitzades posteriorment per agitació amb un vòrtex (Ap. 4.3.5.1).

3.1.2.6 MESURA DE LA VISCOSITAT DINÀMICA.

La determinació de la viscositat dinàmica de les suspensions de liposomes es va du a terme amb viscosímetres del tipus Cannon-Fenske per líquids transparent (Afora, Barcelona). En aquest tipus d'aparell es mesura el temps que triga un volum determinat de mostra en desplaçar-se, per acció de la gravetat, entre dues marques situades als extrems d'un bulb. El producte del temps mesurat per una constant pròpia de cada aparell proporciona el valor de la viscositat cinemàtica en cSt. Per tal d'obtenir la viscositat dinàmica en cP cal multiplicar el valor de la viscositat cinemàtica per la densitat del fluid, que en tots els casos estudiats, i donat que no s'ha superat mai un 3 % p/p d'alcohols (2% d'etanol i 1% de glicerol) s'ha considerat 1 g/cm³.

3.1.2.7 MICROSCÒPIA.

S'ha emprat la microscòpia òptica per detectar a les preparacions la vesícules més grans d'1 µm, la microscòpia electrònica de rastreig per a la caracterització de les membranes d'extrusió, i a la microscòpia electrònica de transmissió per mesurar el diàmetre dels liposomes.

MICROSCÒPIA ÒPTICA.

S'utilitzà un microscopi òptic invertit de contrast de fase Leica DMRB (Alemanya) acoblat a una càmera de CCD Hamamatsu C-5310. Les mostres es dipositaren directament per capilaritat en una cambra de Neubauer (Brand, Alemanya) tapada amb un cobreobjectes.

MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE RASTREIG.

Per tal de determinar amb exactitud el diàmetre dels porus de les membranes d'extrusió, es realitzà la seva anàlisi utilitzant la microscòpia de rastreig. Aquesta anàlisi resulta necessària per tal de comparar els resultats amb els valors nominals donats pel fabricant (Turánek J., 1994), ja que de la distribució de diàmetres depèn la grandària dels liposomes obtinguts per

extrusió.

Es retallaren fragments d'un quart de circumferència de les membranes i es col·locaren mitjançant cinta adhesiva damunt de suports d'alumini. Les mostres es cobriren d'or amb un metal·litzador E5000 Sputter Coater (Polaron Equipment Ltd., Anglaterra). Posteriorment s'obtingueren fotografies de les imatges proporcionades per un microscopi Hitachi S-570 (Hitachi Ltd., Japó). A partir d'elles es determinà la distribució de diàmetres de cada tipus de membrana de policarbonat. Els resultats es presenten a l'Ap.4.2.2.

MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISIÓ AMB TINCIÓ NEGATIVA.

Aquest tipus de microscòpia s'emprà per quantificar el diàmetre de les poblacions de liposomes. Les mostres es diluïren, en cas de necessitat, fins a una concentració situada entre 5 i 15 mg/mL. Es dipositaren 15 µL de les dilucions damunt reixetes de coure cobertes amb *formward* i s'esperà 2 minuts abans d'assecar-les, lateralment, amb paper de filtre, tot vigilant de no tocar la part interna de les reixetes. A continuació es dipositaren 15 µL de dissolució al 1 % d'òxid de molibdè (solubilitzat amb NaOH) a pH 7, esperant 1 min abans de retirar-los de la manera abans indicada. D'aquesta forma la sal de molibdè es diposita sobre la superfície de les reixetes, esdevenint opaca al feix d'electrons incident sobre la mostra, que s'analitzà amb un microscopi Hitachi H-7000 (Hitachi Ltd., Japó). Els liposomes, pel contrari, resulten transparents, ja que no queden coberts per la sal. Es realitzaren fotografies que s'empraren per determinar el diàmetre de les vesícules i el nombre de bicapes.

3.1.2.8 DETERMINACIÓ DEL DIÀMETRE DE VESÍCULES MITJANÇANT TÈCNiques ESPECTROSCÒPIQUES.

La mesura del diàmetre dels liposomes mitjançant mètodes espectroscòpics presenta l'avantatge de la petita manipulació de la mostra que aquestes tècniques impliquen. En general, la dilució en el medi en el qual es troben els liposomes és l'única operació que cal realitzar, no produint-se així alteracions de la distribució de diàmetres de la població⁹. Durant la realització del present treball s'han emprat dos tipus d'aparells, que difereixen en la disposició dels sistemes òptics i en el procés matemàtic que s'aplica a les dades que proporciona un feix de llum làser que ha interaccionat amb la mostra. A continuació es descriuen per cada tècnica (espectroscòpia de correlació fotònica i anàlisi de l'espectre de freqüències), les condicions en les quals es realitzaren les lectures. En el cas de l'espectroscòpia de correlació fotònica es fa una breu introducció teòrica, ja que el mètode ha estat àmpliament emprat per la determinació

⁹ Cal tenir en compte que no es treballi amb sistemes que poden variar la composició de fases en funció de la concentració, com ara la solubilització de liposomes amb tensioactius, o vora de la concentració micel·lar crítica dels fosfolípids.

diàmetre dels liposomes. En el cas de l'anàlisi de l'espectre de freqüències, donada la seva relativa novetat, es descriu amb més detall el seu funcionament. Com a tret comú, dir que les dues tècniques analitzen les característiques de la llum dispersada que s'origina quan un feix de llum monocromàtica interacciona amb una vesícula de determinada grandària en suspensió.

ESPECTROSCÒPIA DE CORRELACIÓ FOTÒNICA.

En aquest cas es mesura la variació de la intensitat de la llum dispersada a 90° del feix incident en la mostra en funció del temps (Fig. 15). La grandària de la partícula condiona, junt amb la viscositat a una temperatura determinada de la fase contínua (medi extern dels liposomes), la seva velocitat al si de la suspensió. D'aquesta forma la intensitat de la llum dispersada varia de forma diferent en funció de la distribució de grandàries de la població de la mostra analitzada. Un tractament matemàtic de les dades acumulades durant un cert període de temps permet relacionar-les amb una distribució de diàmetres concreta (Ostrowsky N., 1993). Les restriccions pròpies que imposa aquest tractament fan, però, que sigui necessari un paràmetre que avaluï si aquestes són aplicables al tipus de mostra analitzat. Aquest estimador qualitatiu és l'índex de polidispersió, que varia entre 0 i 1. La mesura és tan més correcta quan més petit és el seu valor, fet que està directament relacionat amb el caràcter unimodal de les vesícules. Per tal de d'obtenir anàlisi correctes amb qualsevol tipus de mostra, fins i tot amb les multimodals, han aparegut tècniques que convinen la separació de les vesícules constituents de les suspensions amb l'anàlisi per correlació fotònica (Giddings J.C., 1993; Korgel B.A. et al., 1998). Amb aquestes tècniques no són necessàries restriccions referents a la forma ni a la de distribució de diàmetres de les vesícules.

Les mesures es realitzaren amb un Autosizer IIc (Malvern, Anglaterra), equipat amb un làser heli-neó de 623,8 nm i una potència de 5 mW. En cas necessari, les mostres es diluïren en el medi aquós de les suspensions fins que proporcionaren una intensitat de llum dispersada vàlida per a realitzar les lectures (l'aparell avalua aquest paràmetre). Les condicions de les lectures foren:

Temps de lectura: ~ 1 minut.
 Viscositat del medi: 0,866 cP (25°C).
 Índex de refracció de l'aigua: 1,332.

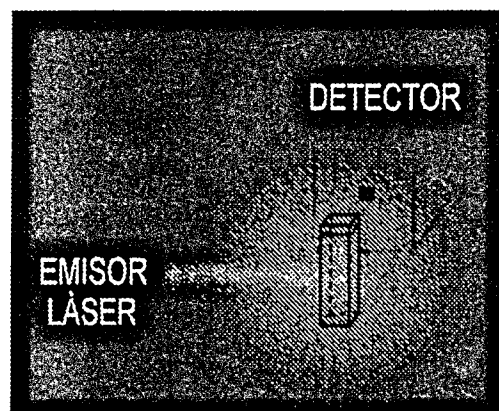


Fig. 15 Esquema d'un espectròmetre de correlació fotònica. S'analitza la llum dispersada a 90° respecte del feix incident.

Els resultats obtinguts pogueren expressar-se en diferents tipus de distribució: intensitat, quan es mostra el diàmetre de les vesícules que proporciona un determinat percentatge del senyal total; massa, si el que s'indica és el percentatge del volum total de vesícules que correspon a un diàmetre determinat; i número, quan es mostra la quantitat relativa de vesícules de cada grandària. Com paràmetres globals de l'anàlisi es proporciona un valor mitjà, la seva desviació standard (interval de diàmetres que inclou el 68% de la distribució de vesícules) i l'índex de polidispersió.

ANÀLISI DE L'ESPECTRE DE FREQUÈNCIES.

Aquesta tècnica també sol anomenar-se detecció heterodina. En els aparells que operen segons aquest mètode es compara la llum dispersada a 0° respecte del feix incident (Fig. 16) amb el propi feix incident. Com a conseqüència del moviment de les vesícules, la llum dispersada té un desplaçament de la freqüència original (desplaçament Doppler) que depèn de la velocitat de les vesícules. La diferència entre la freqüència de la llum incident i les de la dispersada són massa petites per ser mesurades directament, per la qual cosa el detector avalua la pulsació, és a dir, la interferència que té lloc quan interaccionen els dos feixos (Fig.17a). A partir dels parells de dades intensitat-temps es realitza el tractament matemàtic que, mitjançant la transformada de Fourier, permet obtenir els parells intensitat-freqüència (Fig. 17b), els quals es distribueixen segons una funció Lorentziana quan totes les vesícules són de la mateixa grandària, o una suma d'elles si la mostra conté vesícules de diàmetres diferents. És aquesta funció, o la deconvolució de la suma d'elles, la que es relaciona amb la distribució de diàmetres de les partícules de la suspensió.

Per a la realització de les lectures s'emprà un Microtrack UPA 150 (Honeywell, USA). Les mostres es diluïren amb el seu medi aquós fins a una concentració que proporcionà un índex de càrrega en l'aparell situat entre 0,1 i 0,2 (paràmetre que determina el nivell del senyal al detector). La viscositat del medi a 20 i 30°C i el seu índex de refracció s'introdueixen com a variables segons el tipus de mostra analitzada. Com a conseqüència de les dilucions realitzades per tal d'ajustar l'índex de càrrega, amb la majoria d'anàlisi es treballà amb els valors de l'aigua que s'indiquen tot seguit, interpolant l'aparell la viscositat en funció de la temperatura detectada a la cel·la de lectura:

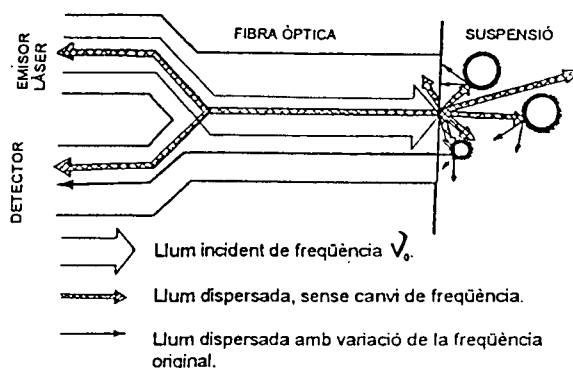


Fig. 16 Esquema d'un espectròmetre d'anàlisi de l'espectre de freqüències. S'analitza la llum dispersada a 0° respecte del feix incident.

Viscositat (25°C): 1,002 cP
 Viscositat (30°C): 0,797 cP
 Índex de refracció: 1,332

La resta de paràmetres es fixà en els següents valors:

Temps de lectura: 10 minuts (mínim)
 Índex de refracció dels fosfolípids: 1,49
 Índex de refracció de l'oli de borratge: 1,47
 Densitat dels liposomes: 1,01 g/cm³
 Densitat de les microgotes d'OB amb F: 0,898 g/cm³
 Tipus de partícules: esfèriques.

Com en el cas de la correlació fotònica, els resultats poden expressar-se en diferents tipus de distribució: intensitat; volum; àrea (indica el percentatge de l'àrea externa total de les vesícules que correspon a un diàmetre determinat) i número. Com a paràmetres globals de l'anàlisi es proporciona, entre d'altres, un valor mitjà, la seva desviació standard (interval de diàmetres que inclou el 68% de la distribució de vesícules) i els percentils.

Donat que la única restricció que imposa el tractament matemàtic és que les vesícules tinguin un moviment de tipus brownià (amb una distribució de velocitats de Maxwell-Boltzman), el fabricant indica que la desviació standard correspon a una mesura de l'autèntica amplada de la distribució de grandàries. Per tant no resulta necessari un paràmetre que avalui en quin grau les característiques de la mostra permeten les restriccions que imposa el tractament matemàtic (índex de polidispersió)

Per aquest motiu, i per a diferenciar-la de la desviació standard estadística que estima la dispersió de varies lectures experimentals, en el present treball la desviació standard del diàmetre mitjà d'una població de liposomes serà anomenada com a amplada.

A la Fig. 18 es mostra la taula de resultats d'una anàlisi d'una suspensió de liposomes

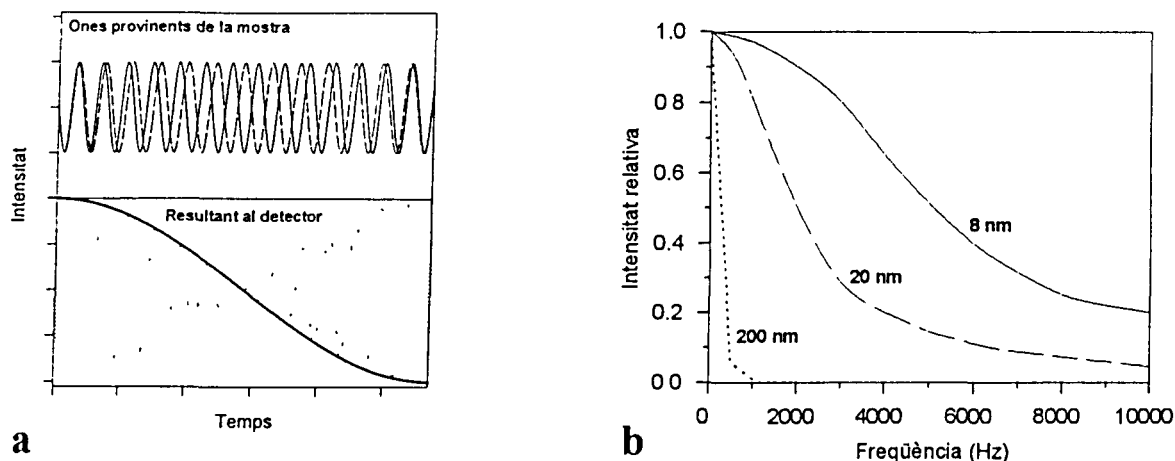


Fig. 17 a) El detector d'un espectròmetre d'anàlisi de freqüències mesura la polsació originada entre el senyal original i l'originat per les partícules de la suspensió, el qual presenta un desplaçament de la freqüència original. b) Les dades intensitat-temps acumulades es transformen mitjançant la transformada de Fourier en parells intensitat-freqüència (al gràfic es mostra el desplaçament Doppler, la diferència respecte a v_0), senyal que depèn de la velocitat, i per tant de la grandària, de les partícules en suspensió.

i el seu gràfic corresponent. La novetat en l'aplicació d'aquesta tècnica per a la determinació de diàmetre dels liposomes ha fet necessari un estudi per tal de validar l'aparell. Els resultats es presenten a l'apartat 4.1.8.

DATA BASE DISPLAY - MICROTRAC ULTRAFINE PARTICLE ANALYZER -			Ver 4.12		
- Custom Header Area -					
Meas/Pres #: 61 -		1 Param #2: 0.000		Lot Code:	
Param #1: 0.000		Param #3: 0.000		Account#:	
Id #1: HLY PC/PA 9/1 EXT400		Summary Data		Id #2: 15 LECT, 1 MIN	
Mode: Full Range		ci = 0.7385		Date: 11/14/94 Time: 15:47	
Distrib. Format: Volume		10t = 0.1406		Chan. Progression: Standard	
Run Time: 60 seconds		50t = 0.4254		Upper Channel Edge: 6.5406	
Run #: 1 of 15 runs		90t = 0.5472		Lower Channel Edge: 0.0032	
Loading Index: 0.23		mv = 0.3783		Number of Channels: 44	
Reflected Power: 215 mv		mn = 0.1631		Transparent Particles: Yes	
Cell Temperature: 22.4 C		ma = 0.2904		Spherical Particles: Yes	
Fluid Viscosity: 0.946 cp		cs = 20.7		Part. Refractive Index: 1.49	
Residuals: Disabled		sd = 0.1822		Part. Density: 1.01 gm/cc	
Above Residuals: 0.00		mw = 2.45E10		Fluid: water	
Below Residuals: 0.00				Fluid Refractive Index: 1.33	

ch top	%pass	%-chn	ch top	%pass	%-chn	ch top	%pass	%-chn	ch top	%pass	%-chn
6.5406	100.00	0.00	0.1445	11.29	7.32						
5.5000	100.00	0.00	0.1215	3.97	3.60						
4.6249	100.00	0.00	0.1022	0.37	0.37						
3.8891	100.00	0.00	0.0859	0.00	0.00						
3.2703	100.00	0.00	0.0723	0.00	0.00						
2.7500	100.00	0.00	0.0608	0.00	0.00						
2.3125	100.00	0.00	0.0511	0.00	0.00						
1.9445	100.00	0.00	0.0430	0.00	0.00						
1.6352	100.00	0.00	0.0361	0.00	0.00						
1.3750	100.00	0.00	0.0304	0.00	0.00						
1.1562	100.00	0.00	0.0255	0.00	0.00						
0.9723	100.00	0.00	0.0215	0.00	0.00						
0.8176	100.00	0.00	0.0181	0.00	0.00						
0.6875	100.00	4.15	0.0152	0.00	0.00						
0.5781	95.85	23.80	0.0128	0.00	0.00						
0.4861	72.05	27.41	0.0107	0.00	0.00						
0.4088	44.64	11.80	0.0090	0.00	0.00						
0.3437	32.84	3.94	0.0076	0.00	0.00						
0.2891	28.90	2.17	0.0064	0.00	0.00						
0.2431	26.73	2.63	0.0054	0.00	0.00						
0.2044	24.10	4.91	0.0045	0.00	0.00						
0.1719	19.19	7.90	0.0038	0.00	0.00						

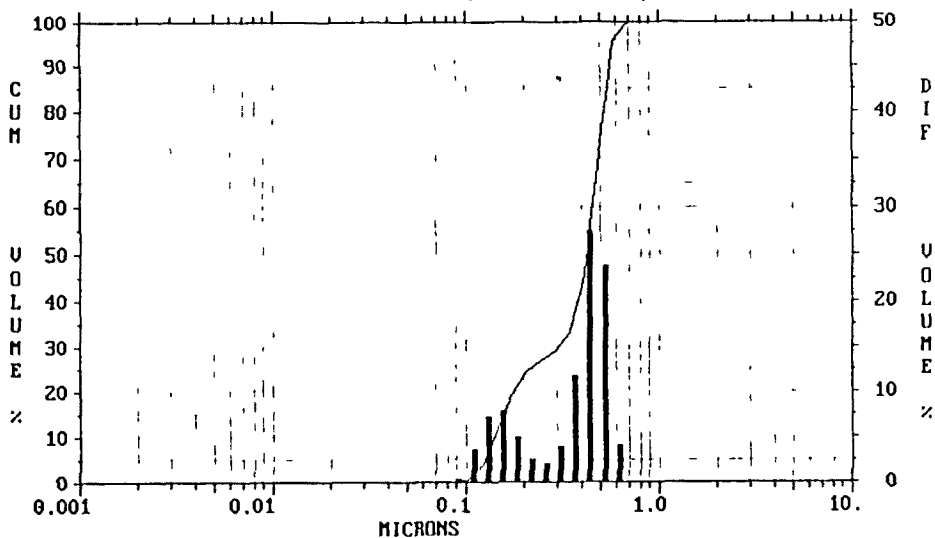


Fig. 18. Informe d'una anàlisi realitzada amb el Microtrack UPA 150. La taula mostra els diferents resultats proporcionats: *Distrib. Format*: indica el tipus de representació escollit (% vol, % àrea, % número, % intensitat), *Summary Data*: mostra el diàmetre mitjà pels diferents tipus de distribucions (*mv*: % vol; *ma*: % àrea; *mn*: % número) i l'amplada (*sd*) pel tipus de distribució escollida al *Distrib. Format*. La sèrie de números presentada a la part inferior mostra els límits superior dels canals de que consta l'anàlisi (*ch top*), el % de partícules per sobre o sota el canal considerat (*% pass*; o *% retn*) i el % de partícules dins del canal (*%-chn*). El gràfic representa les dades de cada canal a les abscises (expressat en micres), i dos eixos d'ordenades, un amb el % de partícules a cada canal, corresponent al *%-chn* (*DIF VOLUME %*), i l'altre amb el percentatge acumulat corresponent al *% pass* (*CUM VOLUME %*)

3.1.3 MÈTODES D'AVALUACIÓ DE L'EFECTIVITAT DE LES FORMULACIONS.

Des del punt de vista de l'agressivitat dels mètodes *in vivo* vers l'individu estudiat, s'han dut a terme dos tipus de mètodes per tal de quantificar l'efectivitat de diferents preparacions: no invasius i histològics. Les tècniques no invasives es basen en la mesura de paràmetres físics de la pell relacionats amb les seves qualitats i funcions (brillantor, hidratació, efecte barrera, etc). Aquestes tècniques no impliquen cap mena d'agressió al subjecte, la qual cosa presenta nombrosos avantatges, que arriben, fins i tot, als publicitaris i als comercials. Els mètodes d'aquesta mena emprats han estat les mesures de la pèrdua transepidermica d'aigua (Ap. 3.1.3.1), de la capacítancia (Ap. 3.1.3.2), i de la microcirculació cutània (Ap. 3.1.3.3). En tots aquests casos l'experimentació s'ha dut a terme en un laboratori climatitzat a una temperatura de 20°C i amb una humitat relativa situada entre el 40 i 50%, variables que tenen un efecte molt important sobre els paràmetres estudiats (Bircher A. et al., 1994). Pel que fa a l'avaluació histològica, s'ha realitzat per quantificar el poder atrofiant de l'HBP en crema i en liposomes, i es descriu a la secció 3.1.3.4.

D'altra banda, per l'estudi del grau d'irritació dels liposomes amb ditranol, s'ha emprat un mètode *in vitro*. Aquest es basa en la mesura el grau d'alliberament d'un colorant induït per la degradació d'una matriu de colàgen i queratina (Ap. 3.1.3.5).

3.1.3.1 MESURA DE LA PÈRDUDA TRANSEPIDÈRMICA D'AIGUA (TEWL)¹⁰.

La quantificació de la pèrdua d'aigua a través de la pell és l'objete de la mesura que es realitza amb una sonda especialment dissenyada per aquest fi. Els valors que s'obtenen són indicatius de l'estat de la funció barrera a l'aigua, és a dir, de la capacitat de retenció de l'aigua de l'organisme per part de la pell. Tot seguit es descriuen els principis físics de la mesura i la metodologia de l'estudi.

PRINCIPIS TEÒRICS DE LA MESURA DE LA PÈRDUDA TRANSEPIDÈRMICA D'AIGUA.

Des de l'interior del cos humà s'estableix un flux d'aigua que, a través de la pell, s'allibera al medi circumdant en estat vapor. Aquest fenomen és el que es coneix com a pèrdua transepidermica d'aigua. El flux total d'aigua està constituït pel que té lloc per difusió passiva, i per l'originat per sudoració, però només el primer és el que dona informació de la funció barrera de la pell. Com a conseqüència d'aquesta pèrdua d'aigua es forma una capa de vapor al voltant de la pell que, en absència de conveccions i/o corrents externs, té un gradient aproximadament constant de pressió de vapor d'aigua. En aquestes condicions el gradient es pot estendre fins

¹⁰ De l'anglès, *transepidermal water loss*.

els 10 o 14 mm (Serup J. i Jemec G.B.E, 1995), de manera que la mesura de la pressió de vapor en dos punts de la capa és la que proporciona les dades per calcular la TEWL. Els aparells que realitzen aquesta tasca disposen d'una sonda com la que es descriu a la Fig. 19. La sonda es col·loca sobre la pell, abarquant una àrea de lectura determinada. En aquells aparells en els quals la sonda és oberta

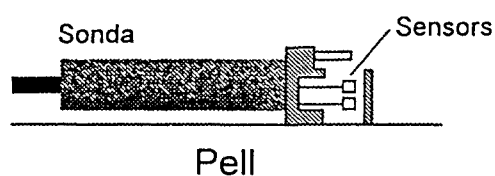


Fig. 19 Tall transversal d'una sonda per la mesura de la TEWL.

(no hi ha oclusió sobre l'àrea de lectura) el flux de vapor d'aigua transcorre per un conducte cilíndric on hi ha dos sensors. Cadascun dels dos sensors, separats per una distància L , estan constituïts per polímers que tenen constants dielèctriques que depenen de la humitat relativa, i per un component sensible a la temperatura. D'aquesta forma es calcula la pressió de vapor i , a partir d'aquí, la concentració d'aigua en el medi que envolta cada sensor:

$$TEWL (g/m^2h) = D \frac{C_2 - C_1}{L} \quad Eq. 7$$

on:

D és el coeficient de difusió de l'aigua en l'aire.

C_i és la concentració d'aigua detectada en cada sensor.

Com a conseqüència de les característiques de la tècnica cal extremer el control de les condicions en les quals s'han de realitzar les lectures per avaluar la funció barrera de la pell. Així és necessari remarcar que:

- El laboratori on es realitzin les lectures ha d'estar exent de corrents d'aire i, com ja s'ha indicat a la introducció del capítol, ha de tenir unes condicions de temperatura i humitat relativa constants.
- L'individu sobre el qual es realitza la lectura no ha de presentar sudoració, ja que això proporcionaria falsos valors de la TEWL. A més, prèviament a la lectura, cal que hagi passat per un període d'aclimatació a les condicions del laboratori.
- Cal esperar un mínim de 15 minuts abans de calibrar el zero de resposta de l'instrument i de realitzar la primera lectura amb ell.
- Una la sonda s'ha situat sobre la pell cal deixar transcórrer el temps necessari fins que el gradient de vapor d'aigua s'estabilitza.

MÈTODE OPERATORI.

S'engaxaren en avantbraços de voluntaris, i després de la lectura de la TEWL basal, pegats oclusius de 9 mm de diàmetre que contingueren 0,1 mL de mostra (crema, suspensió de liposomes o medi aquós). La disposició de cada mostra fou rotativa en cadascun dels llocs

possibles d'aplicació, evitant així possibles efectes anatòmics en els resultats. En cada individu es realitzà també un control (sense pegat). El tractament es dugué a terme durant 4 hores, després de les quals s'eliminaren les restes de la preparació netejant suaument la zona d'aplicació amb un paper absorbent fi.

Les lectures es realitzaren amb un Evaporimeter EP2 (ServoMed, Suècia). Les característiques de l'aparell i les condicions de les adquisicions foren:

Àrea de lectura: 1 cm².
 Distància dels sensors a la pell: 3 i 9 mm.
 Temps d'estabilització: 1 minut.
 Constant de temps: 0,5 segons.
 Lectura: 1 minut.
 Rang: 0 a 300 g/hm².

3.1.3.2 MESURA DE LA CAPACITÀNCIA.

L'estat d'hidratació de la pell, i en especial el contingut d'aigua de l'estrat corni, determina la oposició al pas d'un corrent elèctric altern. La mesura d'un dels components d'aquesta oposició, la capacítància, és una de les tècniques no invasives emprades en el present treball. A continuació es descriuen els fonaments de la tècnica, i es detalla la realització experimental.

PRINCIPIS TEÒRICS DE LA MESURA DE LA CAPACITÀNCIA.

La impedància (Z), és a dir, l'oposició al pas d'un corrent elèctric altern de freqüència f , està composta per la resistència (R) i per la capacítància (C). Des del punt de vista formal l'equació que descriu la relació és:

$$Z = [R^2 + (1/2\pi fC)^2]^{1/2} \quad \text{Eq. 8}$$

la qual, físicament i en un circuit elèctric, correspon a la impedància que presenten una resistència i un condensador connectats en sèrie amb un generador que té un voltatge variable. Com la capacítància depèn de la constant dielèctrica del medi, en un sistema biològic com la pell, n'és el contingut d'aigua el que condiciona el seu valor en les mesures que es realitzen. Això es deu a que l'aigua és una molècula amb un dipol elèctric constant, orientada a l'atzar, i que per tant afebleix el camp elèctric que s'origina entre les plaques d'un condensador (o el sistema que presenta un comportament assimilable a tal component electrònic). La disminució del camp implica una disminució de la diferència de potencial, fet pel qual la capacítància, que és inversament proporcional al voltatge, augmenta. Així, a major contingut d'aigua en la pell major valor de la capacítància.

A la pell, l'estrat corni és la zona que té un menor grau d'hidratació i presenta un gradient de la concentració d'aigua per efecte de la seva pèrdua cap al medi extern. Per tant, l'estrat corni és un medi dielèctric amb baixa conductivitat, el qual mostra un canvi sobtat de les seves propietats elèctriques quan s'hidrata (Leveque J.V., 1989). D'aquesta forma, les mesures de la

impedància, de la conductància (l'invers de la resistència), o de la capacitància de la pell, són en gran part el resultat de l'estat d'hidratació de l'estrat corni, estat que es relaciona directament amb les propietats mecàniques de la pell. En l'actualitat es disposa d'aparells que mesuren aquells paràmentres elèctrics de la pell mitjançant sondes amb les quals se li aplica un corrent elèctric d'alta freqüència (Tagami H., 1995). Durant la mesura s'estableix un corrent entre els elèctrodes de la sonda el qual travessa l'estrat corni fins la dermis (Rietchel R.L. i Spencer T.S., 1990). La mesura dura pocs segons, impedit-se així l'acumulació d'aigua entre la sonda i la pell com a conseqüència de la TEWL. Els valors de la capacitància que s'obtenen són convertits a valors relatius, en unitats arbitràries, i que es relacionen directament amb el grau d'hidratació de l'estrat corni i de l'epidermis.

MÈTODE OPERATORI.

Les condicions d'aplicació de les preparacions (pegats, aplicació, durada) són les mateixes que les descrites a la secció 3.1.3.1.

Les determinacions de la capacitància es realitzaren amb un Corneometer CM 820 PC (Courage-Khazaka Electronic GmbH, Alemanya). Es realitzà un mínim de 3 lectures de cada lloc d'aplicació. Les característiques de l'instrument i condicions de lectura foren:

Freqüència del corrent mesurat: de 40 a 75 kHz.

Pressió de l'electrode sobre la pell: 1,6 N/m² (s'aconsegueix amb una molla incorporada dins la sonda).

Fondària màxima de la lectura: fins 100 µm (capes superficials de l'epidermis).

Àrea de lectura: 7 x 7 mm.

Rang de lectura: de 20 fins a 150 unitats arbitràries (30-60: pell molt seca; 60-70: pell seca; 70-90: pell hidratada; >90 pell molt hidratada).

3.1.3.3 AVALUACIÓ DE LA CAPACITAT VASOCONSTRICTORA DEL BUTIRAT-PROPIONAT D'HIDROCORTISONA MITJANÇANT VELOCIMETRIA DE LÀSER DOPPLER (VLD).

Els corticoides aplicats tòpicament provoquen una disminució de la circulació sanguínia a la dermis (vasoconstricció) la magnitud de la qual depèn de la seva potència com a fàrmac. És la mesura d'aquesta variació la que indica l'efectivitat de les diferents formulacions amb corticoides. La circulació sanguínia pot mesurar-se mitjançant la velocimetria de làser Doppler (VLD), tècnica que es basa en la interacció d'un feix de llum monocromàtica amb les cèl·lules que circulen pels vasos i capilars de la pell. El butirat-propionat d'hidrocortisona (HBP), que se situa dins dels corticoides de potència mitjana (Taüber U., 1994), produeix una variació poc important de la microcirculació cutània respecte del nivell basal. És per això que l'avaluació de la seva acció s'ha fet mitjançant la mesura de la inhibició de la vasodilatació provocada per un agent aplicat posteriorment al fàrmac.

PRINCIPIS TEÒRICS DE LA MESURA DE LA VLD.

L'epidemis humana no presenta cap mena de vasos sanguinis, de forma que es nodreix des de la dermis per efectes de difusió. És en aquesta zona més profunda on hi ha una important xarxa de capilars. Els de la zona més externa són responsables d'alimentar entre 0,04 i 0,27 mm² de la superfície de la pell, mentre que els més interns tenen funcions de termoregulació. Tot aquest conjunt constitueix la microcirculació cutània, i són les seves variacions l'objecte de la lectura que es realitza mitjançant la velocimetria de làser Doppler. Per tal d'obtenir-la es col·loca en contacte amb la pell una sonda que, a través de fibra òptica, emet llum làser provinent d'una font emisora. La penetració del feix incident en la pell decreix exponencialment amb la distància, no estant determinat amb precisió el seu valor absolut, ja que es donen valors compresos entre els 0,14 i els 1,5 mm. Durant el seu trajecte la llum interacciona amb la matèria sigui per absorció o dispersió. En particular, quan la dispersió es originada per elements en moviment, la llum emergent presenta una freqüència diferent de la inicial, el valor de la qual depèn de la velocitat de les partícules amb les quals ha interaccionat (efecte Doppler). A la zona de lectura que abarca el feix incident són els capilars de la dermis els conductes per on discorren les cèl·lules del flux sanguini i per tant aquestes són les responsables del desplaçament de freqüència que presenta part de la llum dispersada (Fig. 20). Una fracció d'aquesta llum, amb i sense variació de la freqüència original, retorna a la sonda i és transportada per la fibra òptica cap al detector, que genera un senyal conseqüència de la interferència de tots els feixos que hi incideixen, senyal que és funció del producte del nombre de cèl·lules en moviment (generalment es considera que són només eritròcits) per la seva velocitat. El senyal és processat i finalment s'expressa en funció del temps. Un increment en la microcirculació es manifesta per un augment del senyal, i visualment, segons la magnitud de l'augment, es relaciona amb un augment de la vermellor de la pell. En funció de la penetració del feix incident el senyal, que és una mesura semiquantitativa, està afectat només pels capilars, que representen al voltant d'un 10% de la microcirculació total, o pels capilars i la xarxa vascular més interna de la dermis.

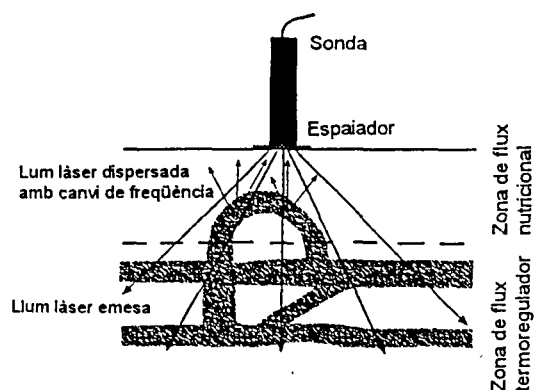


Fig. 20 La sonda de VLD emet un feix de llum làser que penetra a través de la pell i interacciona amb els elements mòbils que circulen pels capilars sanguinis, modificant-se així la seva freqüència original. La mesura d'aquesta alteració proporciona valors relatius de la microcirculació cutània.

PARÀMETRES DE LA VLD.

És habitual la determinació de l'efectivitat dels corticoides mitjançant la inhibició de la vasodilatació provocada per nicotinats d'alquil (generalment metil o hexil) aplicats a la pell

després de l'aplicació del fàrmac. L'agent escollit en el present treball per a provocar la urticària de contacte ha estat el nicotinat de metil, la resposta del qual es mostra a la Fig.21. A continuació es presenten els paràmetres més característics, mentre que a la secció 4.1.9 es mostren els resultats de l'anàlisi de les seves interrelacions.

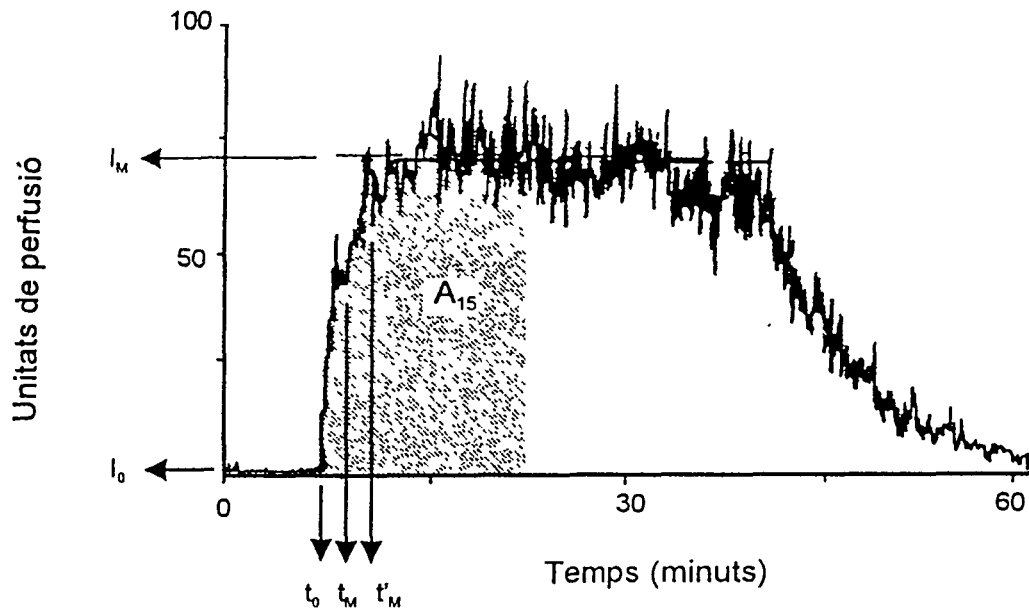


Fig. 21 Senyal de VLD originat per l'aplicació de nicotinat de metil i paràmetres representatius de la vasodilatació originada

- l_0 : correspon al valor de la microcirculació abans de produir-se l'augment del flux sanguini. Les unitats, arbitràries, s'anomenen unitats de perfusió.
- t_0 : és el temps de latència, és a dir, el temps transcorregut des de l'aplicació del nicotinat d'alquil fins a l'inici de la vasodilatació. En el present treball s'expressa en minuts.
- t_M : temps de resposta màxima. Aquest paràmetre és, en ocasions, equívoc, ja que la resposta pot presentar un pla seguit d'un nou increment del senyal. Els dos temps que proporciona aquest comportament són, però, proporcionals (Oestmann et al., 1993). Pel que fa al nostre estudi, en els casos on s'ha donat aquest fet s'ha escollit la primera estabilització del senyal com a valor de t_M .
- P: És el pendent de la recta ajustada entre t_0 i t_M .
- Δl : Correspon a l'increment del senyal d'unitats de perfusió calculat com la diferència entre el valor màxim assolit (l_M , calculat com a la mitjana en un interval estable) i l'inicial (l_0).
- A_{15} : És l'àrea compresa sota la corba en els 15 minuts següents a t_0 .

MÈTODE OPERATORI.

Prèviament a l'estudi del poder vasoconstrictor de l'HBP es realitzà un test per tal de seleccionar voluntaris que donessin resposta positiva en els avantbraços a una dissolució aquosa de nicotinat de metil 3 mM. Un cop escollits, se'ls hi aplicaren, amb diferències de 10 minuts, un màxim de 3 pegats oclusius (Leucotest) de 9 mm de diàmetre en cada avantbraç. Els pegats amb producte contingueren 0.1 g d'un dels següents actius i placebos:

Actius:

- Isdinium crema: 0.1 % HBP w/w.
- Liposomes amb HBP: 0.1 % w/w HBP; 30 mg/mL fosfolípids. (Es conservaren en la foscor i a 4°C).

Placebos:

- Liposomes, amb 30 mg F/mL. (Conservats en foscor a 4°C)
- Medi aquós dels liposomes (2 % EtOH, 1 % GlyOH).

El temps d'aplicació de cada pegat fou de 4 h. En cada individu es realitzà també, com a mínim, un control (sense pegat).

Passat el temps indicat es retirà el producte i es marcaren acuradament les zones d'aplicació, deixant transcórrer 30 minuts abans d'aplicar el nicotinat de metil. Durant aquest temps es realitzaren lectures del nivell basal en, al menys, tres zones diferents de cada avantbraç durant un temps mínim de dos minuts. No es realitzaren lectures a la zona d'aplicació degut a que, en quedar la sonda de VDL fixada a la pell mitjançant un plàstic adhesiu, en retirar-la es produïa vermellor a la pell.

Transcorreguts els 30 minuts anteriors, s'aplicaren a un paper de filtre de 9 mm de diàmetre 45 µL d'una dissolució aquosa 3 mM de nicotinat de metil. Després d'esperar pocs segons a que el paper quedés saturat del líquid, es col·locà damunt la zona de l'avantbraç en estudi durant 1 minut, procurant que el líquid mullés bé la pell, evitant alhora que s'escampés a altres zones. Transcorregut el minut, es retirà l'aplicació i s'eixugà la zona marcada amb un paper absorbent suau, col·locant la sonda als 45 segons i iniciant la lectura al complir-se el minut. D'acord amb aquest procediment, s'ha sumat un minut als paràmetres t_0 i t_M de les lectures.

Les condicions de l'enregistrament de la microcirculació cutània amb el Periflux PF3 (Perimed, Suècia) es detallen a continuació:

Temps d'adquisició: mínim 20 minuts, que comprenen t_0 i, com a mínim, els 15 minuts posteriors a l'inici de l'augment del senyal.

Rang de la mesura: 0-200 (resolució 0,78).

Unitats: Unitats relatives de perfusió.

Laser: Heli/Neó de 632,8 nm i 2 mW.

Constant de temps: 0,2 segons.

3.1.3.4 AVALUACIÓ HISTOLÒGICA DEL PODER ATROFIANT DEL BUTIRAT-PROPIONAT D'HIDROCORTISONA.

Els corticoides aplicats per via tòpica presenten efectes secundaris, el més freqüent dels quals és l'atrofia cutània. Aquest efecte no desitjat es caracteritza per la disminució del gruix de diferents teixits constituents de la pell, i per limitar el creixement d'algunes línies cel·lulars. És per això que la mesura del poder atrofiant de l'HBP en les diferents formes galèniques resulta una mesura indirecta de la capacitat del fàrmac per actuar a nivell cutani. Amb aquesta intenció es realitzà un estudi histològic comparatiu de la capacitat atrofiant del butirat propionat d'hidrocortisona encapsulat en liposomes i incorporat en una crema (Woodbury R., i Kligman A.M., 1992).

MÈTODE OPERATORI.

Es van emprar 14 ratolins *hairless* Skh-HR agrupats de la següent manera:

- 4 animals tractats amb Isdinium crema (0,1 % HBP),
- 4 animals tractats amb liposomes-HBP (0,1 % HBP),
- 6 animals no tractats (control).

Durant l'assaig, que durà tres setmanes, els animals es mantingueren a 20-22°C de temperatura, a una humitat relativa del 60-80 %, i reberen un cicle alternat de llum/fosc de 12 hores. L'alimentació fou una dieta estàndard, administrant-se "ad libitum". De dilluns a divendres s'aplicaren diàriament 0.1 ml de producte sobre l'esquena dels animals realitzant un lleuger massatge amb el dit dins un guà de làtex. La suspensió de liposomes es conservà en la foscor i a 4°C. A la següent taula es mostren els pesos dels animals al principi i al final dels tractaments.

Tractament	Pes inicial (g)	Pes final (g)
Isdinium crema	20,4 ± 2,0	21,6 ± 2,3
Liposomes-HBP	21,4 ± 3,3	22,5 ± 2,8
Control	23,9 ± 1,3	26,0 ± 3,1

Taula 1 Pesos del ratolins a l'inici i final dels tractaments.

S'obtingueren biopsies que, un cop fixades en formol tamponat (10 %), es van embeure en parafina per tal d'obtenir talls de 5 µm de gruix. Posteriorment es tenyiren amb hematoxilina-eosina per tal de realitzar l'anàlisi histomètrica. L'avaluació microscòpica es realitzà, en cec, amb un microscopi Bausch & Lomb i amb un analitzador d'imatges Olympus Cue-3.

Prèviament a les lectures es determinà l'error experimental de les mesures amb un micròmetre Wild (Heerburg, Suïssa) amb línies calibrades a 10, 100 i 500 µm realitzant un mínim de 10 lectures a diferents distàncies.

Els paràmetres quantificats a l'estudi histomètric foren:

- Atròfia epidèrmica: Es va determinar el nombre de capes cel·lulars i el gruix de l'epidermis excloent l'estrat corni. Es llegiren com a mínim 10 camps de cada tall histològic a 400 augments.
- Atròfia dèrmica: El gruix de la dermis es determinà en 10 camps diferents a 100 augments.
- Atròfia del teixit adipós. Es mesurà en 10 camps a 100 augments.
- Atròfia muscular. Es va quantificar com a mínim en 5 camps independents i a 200 augments.
- Regressió de les glàndules sebàcies. Es determinà el número de sebòcits visibles a les glàndules sebàcies en, com a mínim, 10 camps a 200 augments. El resultat s'expressa com el valor mitjà en un camp.

Un cop establertes les condicions òptimes d'exposició, es van prendre fotografies dels talls amb les diferències més significatives mitjançant una càmera fotogràfica acoblada al microscopi, emprant Kodak Ektachrome T 64 ISO com a material sensible.

3.1.3.5 TEST D'IRRITACIÓ *IN VITRO* (SKINTEX).

L'Skintex és un test *in vitro* emprat per predir la irritació dèrmica que poden produir diferents compostos. Aquest procés implica, entre altres fets, la desnaturalització de proteïnes, lisi cel·lular, i citotoxicitat. La predicció *in vitro* d'aquests fenòmens està basada en un model físico-químic que considera la pell constituïda per dos compartiments: l'estrat corni, que actua com a barrera principal front del medi extern, i la dermis. L'equivalent artificial a l'estrat corni és una matriu de queratina i colàgen enllaçada, amb glutaraldehid, a un suport de cel·lulosa. Aquesta matriu inclou, a més, un colorant, el Basic Red 2. Com a model del compartiment dèrmic s'empra un liofilitzat que conté globulines, colàgen, glicosaminoglicans, àcids grassos, aminoàcids, fosfolípids i sals. Una vegada hidratat, la suspensió resultant actua com a reactiu de les substàncies que s'assajen.

La mostra, en un volum comprés entre 30 i 100 μL , es diposita a la matriu, la qual es col·loca dins del medi reactiu durant 2 hores a temperatura ambient. En funció de la capacitat irritant de la mostra, es produeix un determinat grau d'interacció amb la matriu de queratina i colàgen que origina l'alliberament del colorant, el qual es quantifica amb l'absorbància a 450 nm. El fabricant presenta una relació entre les absorbàncies i l'índex d'irritació *in vivo* (PDII) que és el resultat de l'estudi de 200 productes. La interpolació dels resultats obtinguts proporciona el grau d'irritació previst.

Els paràmetres i condicions emprats en l'estudi han estat el següents:

- Escala d'avaluació de la irritació:

Valor PDII (Skintex)	0-0,5	0,5-2,05	2,05-4,75	>4,75
Tipus d'irritació	Mínim	Lleu	Moderat	Agut

- Volum d'aplicació de les mostres: 30, 50 i 100 µL.

3.2

MÈTODES PREPARATIUS.

Quatre són els apartats que constitueixen el present títol: La purificació de la fosfatidilcolina d'ou (Ap. 3.2.1), els mètodes generals per a l'obtenció de liposomes i microgotetes olives amb i sense fàrmacs (Ap. 3.2.2), els processos posteriors a que poden sotmetre's per tal de variar la seva mida o presentació (Ap. 3.2.3), i els mètodes utilitzats per separar liposomes o microgotetes olives amb substàncies encapsulades del medi que conté les substàncies no encapsulades (Ap. 3.2.4).

3.2.1 PURIFICACIÓ DE FOSFATIDILCOLINA D'OU.

El rovell d'ou és molt ric en lípids que actuen com a font d'energia i components estructurals pel desenvolupament de l'embrió. Està compost bàsicament per triacilglicerols, fosfolípids i colesterol en una relació que oscil·la al voltant de 70:25:5 p/p/p (Kuksis A, 1992). Per aquest motiu és una de les matèries primeres d'origen natural emprades amb més freqüència per a l'obtenció de lípids. El procés seguit per a la purificació de la fosfatidilcolina d'ou està basat en dues metodologies diferents. En la primera etapa es duen a terme extraccions i precipitacions en dissolvents orgànics, procediment perfeccionat del que ja va emprar Fourcroy el 1793 en els primers estudis científics dels fosfolípids (Levente P.A. i Rolf I.P., 1921). A la segona etapa es realitza una cromatografia en columna d'alúmina.

PRECIPITACIÓ EN ACETONA.

S'ajunten 12 rovells d'ou i es mesclen amb 500 mL d'acetona mantenint l'agitació durant 5 minuts. A continuació es deixa reposar la mescla durant 1 hora en atmosfera de nitrogen. Passat aquest temps s'agita i es filtra amb Büchner. El precipitat es renta amb 200 mL d'acetona freda (5-10°C).

DISSOLUCIÓ EN ETANOL.

A continuació es recupera el precipitat i s'extreuen els fosfolípids en 500 mL d'etanol del 95%, mantenint l'agitació durant 5 minuts, passats els quals es deixa la mescla de nou en repòs durant 1 hora en atmosfera de nitrogen. Una posterior filtració en Büchner permet obtenir un filtrat ric en fosfolípids. Es repeteix l'operació sobre les restes del precipitat dues vegades més, però ara amb 200 mL d'etanol, s'ajunten els tres filtrats i es rotavapora fins a màxima sequetat.

PRECIPITACIÓ EN ÉTER-ACETONA.

El residu anterior es dissol en 100 mL d'éter etílic, als quals s'hi afegeixen, a pleret, 500

mL d'acetona. La dissolució es manté en agitació durant tota l'addició, que en originar un canvi de polaritat del medi causa una precipitació dels fosfolípids. Es decanta i es renta el precipitat amb 100 mL d'acetona freda. El sòlid es torna a dissoldre en 100 mL d'éter i es repeteix la precipitació afegint-ne, de nou, 500 mL d'acetona en les mateixes condicions indicades anteriorment. Després d'un nou rentat amb acetona el precipitat, constituït bàsicament per fosfolípids i amb poca quantita de carotens, es dissol en uns 50 mL de cloroform.

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA D'ALÚMINA.

La dissolució clorofòrmica de fosfolípid s'aplica a una columna d'alúmina (27x3 cm, placa filtrant del nº 4, rentada prèviament amb 1 L de cloroform). L'elució (a flux lliure) s'inicia amb 300 mL de cloroform, que no es recullen com a fracció, i continua amb 700 mL de cloroform:metanol (9:1 v/v), recollint-se fraccions de 70 mL. La seva anàlisi per cromatografia en capa prima (Ap. 3.1.2.1) indica quines d'elles contenen la PC pura.

Una vegada s'ajunten les fraccions escollides es rotavaporen fins a pes constant del residuu sec, el qual s'enrasa amb cloroform fins a un volum predeterminat i es conserva a la foscor a -20°C.

3.2.2 MÈTODES DE PREPARACIÓ DE LIPOSOMES I D'EMULSIONS AMB OLI DE BORRATGE.

Les suspensions de liposomes utilitzades foren obtingudes per diferents mètodes en funció del tipus de vesícula amb que es vulgués treballar. En ocasions aquests mètodes inicials proporcionaren directament els liposomes desitjats, però en d'altres fou necessari un tractament posterior per tal de modificar-los (Ap. 3.2.3). Els mètodes generals es descriuen tot seguit (seccions 3.2.2.1 a 3.2.2.4). Pel que fa a les emulsions amb OB, aquestes s'obtingueren emprant el Microfluidizer 110S (Ap. 3.2.2.5).

3.2.2.1 OBTENCIÓ DE LIPOSOMES MULTILAMINARS GRANS (MLVs).

S'addiciona a un baló de vidre una dissolució de lípids en cloroform que es rotavapora a 40°C fins a obtenir una pel·lícula homogènia i seca que es deixa al buit, com a mínim, durant 2 hores. Posteriorment s'addiciona la quantitat necessària de medi aquós per obtenir la concentració desitjada de fosfolípid. El contingut s'agita vigorosament (vòrtex) realitzant escalfaments intermitents en un bany a 40°C fins a la desaparició de la pel·lícula i obtenció d'una suspensió opalescent que conté liposomes multilaminars grans (el seu diàmetre és de varies micres).

En el cas en que la matèria primera sigui sòlida, el procés s'inicia amb l'addició de la quantitat necessària el medi aquós a 50-60°C, mantenit-se la mescla a aquesta temperatura i

amb agitació constant fins a la desaparició del sòlid (aproximadament 20-30 min).

Si es volen obtenir liposomes amb molècules hidrofòbiques encapsulades, aquestes s'addicionen en la primera etapa del procediment mesclant-les amb els lípids en cloroform. Per l'encapsulació de molècules hidrofíliques, cal addicionar-les dissoltes en el medi aquós. La resta del mètode operatori és el descrit anteriorment.

Com a materies primeres es varen emprar PC d'ou purificada i dissolta en cloroform (Ap. 3.2.1) i PC de soja Emulmetik 930 en estat sòlid (Lucas Meyer France; 95 % p/p SPC, màxim 3 % p/p LPC).

3.2.2.2 EVAPORACIÓ EN FASE REVERSA.

S'afegeix a un baló de vidre la quantitat necessària de lípid per tal d'obtenir la concentració final desitjada, i no major de 50 mg/mL, en 5 mL finals de preparació¹¹. El lípid pot estar dissolt en un dissolvent orgànic volàtil o afegir-se sòlid. (En el primer cas, i abans de continuar, es procedeix a rotovaporar el dissolvent fins a obtenir una pel·lícula homogènia). Posteriorment s'afegeixen 9 mL d'éter dietílic exent de peròxids¹² i s'agita fins a la dissolució total del lípid. A continuació s'adicionen 3 mL del medi aquós escollit i es sonica amb una sonda de 3,5 mm de diàmetre (Dynatech, USA) durant 5 minuts a una potència relativa del 35%. Durant la sonicació el baló es manté en un bany de gel fonent per tal de d'evitar la degradació de la mostra. Una vegada s'ha obtingut la emulsió (w/o) es rotavapora a 25°C, a una pressió de 460 mm Hg, i a baixes revolucions. L'emulsió, amb l'evaporació progressiva de l'éter, es colapsa i forma un gel compacte que posteriorment reverteix a una fase fúida i viscosa (el procés pot durar fins 30 minuts) a la qual s'afegeix 1 mL del medi aquós. Aquesta suspensió es rotavapora a 25°C, al màxim buit i durant un mínim de 20 minuts (o fins la desaparició total de l'éter) a les màximes revolucions. Posteriorment s'enrasa a 5 mL. La suspensió així obtinguda conté liposomes REVs (acrònim de *reverse evaporation vesicles*) majoritàriament unilaminars, i de diferents mides (Szoka F. i Papahadjopoulos D., 1978): grans (LUVs) i petits (SUVs).

En la preparació de suspensions de major volum cal tenir present que la relació medi aquós/éter que ha de formar l'emulsió w/o ha d'ésser 1/3 v/v.

Per a la incorporació als liposomes de molècules hidrofòbiques, aquestes s'addicionen en la primera etapa, mesclant-se amb els lípids en la dissolució d'éter. Si les molècules són hidrofíliques, s'addicionen amb el medi aquós que es sonica per tal d'obtenir l'emulsió w/o.

Cal destacar que la bibliografia descriu la utilització d'altres dissolvents orgànics enlloc de l'éter dietílic. L'etanol, l'acetat d'etil o mescles d'ambdós, resulten medis més apropiats per obtenir formulacions amb liposomes REVs destinades als humans, ja que les traces presents

¹¹ Si la relació fosfolípid/aigua és massa elevada s'originen vesícules multilaminars.

¹² Per preparar-lo l'éter s'agita vigorosament amb un volum igual d'aigua.

a les suspensions finals resulten menys tòxiques (Cortesi R. et al., 1999).

Com a matèries primeres s'empraren PC d'ou purificada i dissolta en cloroform (Ap. 3.2.1) i EPA (Sigma, USA).

3.2.2.3 PRO-LIPO S.

Aquesta mescla d'alcohols (etanol i gicerol), fosfolípids (SPC/fosfolípids carregats negativament 80:20 p/p), i aigua en una relació 20:10:30:40 p/p, proporciona liposomes mitjançant la simple dilució en un medi aquós a temperatura ambient (Ap. 1.4). La rapidesa i simplicitat del procés el fa apte per a la producció a gran escala, i ha estat escollit com a mètode principal per a la incorporació de fàrmacs en el present treball. El fabricant del producte és Lucas Meyer France SA.

Es mesclen amb agitació i a temperatura ambient les quantitats de Pro-Lipo S i medi aquós necessàries per a obtenir la concentració de fosfolípid desitjada. La mescla pot realitzar-se en una única etapa, però és recomanable dur-la a terme amb addicions successives de dissolvent, de manera que s'evita totalment l'aparició de grumolls:

1^a.- Pro-Lipo S / medi aquós (1/0,5 p/p): s'obté una mescla A de 200 mg F/g,

2^a.- mescla A / medi aquós (1,5/0,5 p/p): s'obté una mescla B de 150 mg F/g,

3^a.- addició de la resta de medi aquós a la mescla B. Obtenint-se una suspensió de liposomes oligolaminars amb un diàmetre situat entre 1 i 2 µm (Perret S. et al., 1991).

Si es pretèn incorporar molècules hidrofòbiques subministrades en forma sòlida poden emprar-se dos sistemes:

a.- per mescla directa del sòlid amb Pro-Lipo S mitjançant agitació fins homogenitat, realitzant posteriorment l'addició del medi aquós,

b.- per mescla mitjançant agitació d'una dissolució etanòlica del fàrmac amb Pro-Lipo S i posterior addició del medi aquós.

En el cas de les molècules hidrofíliques, aquestes s'addicionen dissoltes en el medi aquós. En mesclar aquest amb el Pro-Lipo S, el procés de formació dels liposomes permet la seva incorporació dins el volum aquós intern.

3.2.2.4 NATIPIDE II.

Els gels de Natipide II estan constituïts per etanol, aigua i fosfolípids en una relació 16:64:20 p/p/p. Els fosfolípids majoritaris són SPC (76 % p/p), LPC (màxim 6 % p/p), PE (5 % p/p) i PA (8 % p/p). La composició d'aquest sistema ternari (Ap. 1.4) fa que els liposomes ja estiguin formats, per tant, només cal una dilució de la matèria primera per obenir les

suspensions a la concentració desitjada. El resultat és una preparació amb liposomes de 200 \pm 30 nm amb 4-6 bicapes. El fabricant del producte és Rhône-Poulenc Group (Naterman Phospholipid GMBH, Alemanya).

La incorporació de molècules hidrofòbiques pot fer-se de dues formes:

a.- per mescla directa del sòlid amb el gel Natipide II mitjançant agitació fins homogenitat,

b.- per mescla mitjançant agitació d'una dissolució etànolica del fàrmac amb gel Natipide II. La quantitat d'etanol afegida no ha de superar en cap cas el 20 % del pes del gel al que s'addiciona. Mentre es realitza l'addició s'aplica un corrent de nitrogen per tal d'evaporar l'etanol en excés. El procés es controla mitjançant el pes de la mescla, portant-la al pes inicial després de cada addició d'alcohol. D'aquesta forma s'evita un excés d'etanol que causaria el trencament del liposomes ja formats al gel comercial.

En el cas en que s'incorporin molècules hidrofíliques, aquestes s'addicionen dissoltes en el medi aquós. De la seva permeabilitat a través de les membranes depèn la seva incorporació als liposomes.

3.2.2.5 EMULSIONS D'OLI DE BORRATGE.

En la composició de les emulsions d'oli de borratge (OB) s'incloué Pro-Lipo S per tal d'estabilitzar les microgotetes d'oli amb una monocapa externa de fosfolípids. Així, inicialment es mesclaren amb agitació magnètica les quantitats predeterminades de Pro-Lipo S i OB (Gattefossé SA, França). A la mescla s'afegí el medi aquós escollit de forma que la preparació tingués un 2 % p/p d'OB, i posteriorment es processà en un Microfluidizer 110S, a temperatura ambient, a una pressió d'entrada de 4 bars, i sense recirculació. El número de cicles varià segons la preparació, i determinà la grandària de les vesícules obtingudes.

3.2.3 MÈTODES DE PROCESSAT DE LIPOSOMES I D'EMULSIONS D'OLI DE BORRATGE.

Els diferents tractaments a a que poden sotmetre's les suspensions de liposomes i les emulsions d'OB permeten obtenir vesícules amb característiques determinades (diàmetre, lameritat, volum encapsulat, ...) i en diversos estats físics (suspensions, gels o liofilitzats). A continuació es detallen les tècniques utilitzades i el tipus de vesícula i preparacions que proporcionaren.

3.2.3.1 SONICACIÓ.

Aquest mètode és un dels primers que es van emprar per a la preparació de SUVs

(Barenholz Y. et al., 1977). Es realitza amb sonda, la qual es submergeix en lots de 5 mL de suspensions de liposomes mantinguts en un bany de gel fonent. La potència relativa aplicada és del 35%, a intervals de 2 minuts fins a un total de 10 minuts, i amb una sonda de 3,5 mm de diàmetre (Dynatech, USA). El resultat és una suspensió opalescent translúcida característica dels SUVs.

Posteriorment a la sonicació cal eliminar les restes de titani que solen desprende's de la sonda, bé per centrifugació (12.500 x g, 12,5 min), bé per filtració a través de membranes de policarbonat amb porus de 400 nm de diàmetre (Nucleopore, Costar Scientific Corporation, USA).

3.2.3.2 EXTRUSIÓ.

Les suspensions de liposomes es fan passar a través de membranes de policarbonat de porus predeterminat (Nucleopore, Costar Scientific Corporation, USA). L'extrusió consecutiva a través de membranes de diàmetre decreixent aconseguix reduir el diàmetre dels liposomes en funció de la última membrana emprada i del número de vegades que es faci passar la suspensió. En tots els casos les mostres s'extrusionaren un mínim de 3 vegades per l'última membrana escollida i un mínim de 2 per les anteriors.

A la secció 4.2.3 es determinen les possibles pèrdues de fosfolípids durant l'extrusió, i a l'apartat 4.2.2 es realitza un estudi, per microscòpia electrònica, dels diàmetres reals de les membranes de policarbonat, comparant-los amb els nominals.

3.2.3.3 HOMOGENITZACIÓ A ALTA PRESSIÓ.

Les suspensions de liposomes es processaren a temperatura ambient amb un Microfluidizer 110S. La màxima pressió d'entrada emprada fou de 4 bars. No s'utilitzà la recirculació (Ap. 1.4), de forma que per caracteritzar una mostra s'ha emprat la pressió (p) i el número de vegades, o cicles (C), que ha passat per la cambra d'interacció.

Les característiques del liposomes que s'obtenen amb aquesta tècnica depenen de la naturalesa de la mostra (MLVs, Pro-Lipo S, medi aquós, ...), del número de cicles i de la pressió d'entrada emprada.

3.2.3.4 LIOFILITZACIÓ.

Les suspensions de liposomes que es van liofilitzar es prepararen emprant sacarosa com a crioprotector. Aquesta s'inclogué en el medi aquós afegit durant els processos d'obtenció. La relació sacarosa / fosfolípid fou sempre 1/1 p/p (Ap.4.2.6). Les mostres, en volums màxims de 5 mL, es congelaren per immersió en nitrogen líquid i es liofilitzaren durant 48 hores (Modulyo Edwards, Anglaterra). Per cada tipus de preparació es calculà, a partir del volum de mostra inicial i del pes de liofilitzat obtingut, la quantitat d'aigua que calia afegir al liofilitzat per

resospendre'l i obtenir una suspensió amb la mateixa concentració de fosfolípids que la inicial.

3.2.3.5 INCORPORACIÓ EN HIDROGELS.

L'agent gelificant emprat fou el Carbopol 940 (Goodrich Chemical Company, USA). Inicialment es preparà Carbopol 940 al 2% p/p en aigua (pH+2,6), i es neutralitzà amb NaOH al 10 % amb la proporció 1/ 0.055 p/p Carbopol 940 2 %:NaOH 10 %. A aquesta mescla neutralitzada (pH-6,5) s'ajuntà la quantitat adient de suspensió de liposomes o d'emulsió d'OB. La mescla es realitzà mitjançant agitació (vòtex) per volums de fins a 5 mL, i amb un agitador de pales RW20 (Janke & Kunkel GMBH and Co., Alemanya) a 150 rev/min durant 1 h. en el cas de preparacions de gran volum.

Per tal de determinar l'estabilitat física dels liposomes en els gels en el moment de la seva preparació, s'escolliren les quantitats de gel neutralitzat, de suspensió de liposomes, i la concentració d'aquestes suspensions, en funció de les concentracions de fosfolípid i de Carbopol 940 desitjades en els gels finals.

Pel que fa a la obtenció i seguiment de l'estabilitat a llarg termini de gels amb liposomes (amb o sense fàrmac) i a la de gels amb vesícules d'oli de borratge, les quantitats de Carbopol 940 al 2% neutralitzat i de suspensió emprades en la mescla foren, respectivament, 1/5,3 p/p. D'aquesta forma la concentració de Carbopol 940 al gel final fou sempre de 0,3 % p/p. Complementàriament, la concentració de les suspensions de liposomes o d'OB que s'empraren per la mescla foren tals que els gels finals tingueren la concentració de fosfolípids o de substància activa desitjada.

3.2.4 MÈTODES DE SEPARACIÓ EMPRATS EN LA QUANTIFICACIÓ DE LES SUBSTÀNCIES ASSOCIADES A LIPOSOMES I A MICROGOTES OLILOSES.

S'han emprat diferents tècniques per tal de determinar l'encapsulació de diferents molècules en els liposomes o per determinar la formació de microgotes d' OB estabilitzades amb fosfolípids. Per cada cas concret, s'ha estudiat si la tècnica era apropiada, mostrant-se les avaluacions a l'apartat de Resultats. Les característiques generals per a l'aplicació de cadascun d'ells es descien a continuació.

3.2.4.1 CROMATOGRAFIA D'EXCLUSIÓ MOLECULAR.

Es realitzà en columnes PD-10 de Sephadex G-25 medium (Amersham-Pharmacia, Suècia). Aquesta tècnica fou emprada majoritàriament per a la determinació de l'encapsulació de substàncies hidrosolubles. En el cas dels fàrmacs molt poc solubles en aigua, l'acumulació de sòlid en les columnes les feu útils per una única aplicació, fet pel qual només s'emprà en

comptades ocasions. La posta a punt de la tècnica per diferents molècules es descriu a l'apartat 4.2.4.1.

Per tal d'evitar que el gel retingués fosfolípid de les preparacions, s'aplicà a les columnes noves 1 mL de suspensió de liposomes (Pro-Lipo S, 20 mg fosfolípid/mL), eluint-se amb medi aquós abans d'aplicar qualsevol mostra. D'aquesta manera les columnes resultaren saturades amb fosfolípid, rentades, i es determinà alhora el seu volum mort (aproximadament 2 mL). S'aplicaren volums de mostra de 200 µL, realitzant-se l'elució a flux lliure amb el medi aquós de les preparacions incloent-hi, quant fou necessari, una sal per tal de minimitzar la diferència de pressió osmòtica entre el interior dels liposomes i el medi extern.

3.2.4.2 CENTRIFUGACIÓ DE MINICOLUMNES D'EXCLUSIÓ MOLECULAR.

Aquest tipus especial de cromatografia té un volum mort molt petit, la qual cosa permet obtenir els liposomes molt poc diluïts respecte de la concentració de l'aplicació, a diferència de la cromatografia d'exclusió molecular clàssica.

Es coloca a la sortida d'una xeringa de plàstic de 2 mL un tros del diàmetre escaient de filtre Whatman GF/B (Whatman International Ltd, Anglaterra). A continuació s'omple amb Sephadex G-50 coarse hidratat. La xeringa es coloca dins un tub i es centrifuga a 600xg durant 2 minuts en una centrífuga de sobretaula de rotor basculant. Així s'elimina l'excés de dissolvent (eluit al tub d'assaig) i s'obtenen columnes del gel compactes. A aquestes columnes així rentades se'ls apliquen 0,1 mL de suspensió de liposomes i es tornen a centrifugar en les mateixes condicions. D'aquesta forma en el primer eluït (~ 0,1 mL) apareixen liposomes amb el material encapsulat. Cada nova aplicació de tampó i posterior centrifugació permeten obtenir fraccions amb liposomes (les fraccions inicials) i, posteriorment, el material no encapsulat (les darreres fraccions).

La validesa del mètode per diferents substàncies es descriu als Ap. 4.2.4.2.

3.2.4.3 CENTRIFUGACIÓ.

La centrifugació a baixes o a altes gravitats (ultracentrifugació) fou funció de la grandària de les vesícules de les suspensions i de la finalitat de la tècnica: eliminar sòlid en excés, sedimentar liposomes, o separar les diferents fases de les emulsions d'OB amb fosfolípids.

BAIXES g.

La centrifugació a baixes g (com a màxim 12.500 x g) es portà a terme per l'eliminació del fàrmac no solubilitzat i present sòlid en les suspensions de liposomes. Les condicions de centrifugació depengueren del diàmetre de la població de liposomes de les suspensions.

Aquelles preparacions amb liposomes més grans d'1 µm es centrifugaren en un rotor d'angle fix en volums de 2 mL a 1.100 x g durant 10 minuts a 4°C (Centrikon H-401, Kontron,

Suïsa). L'avaluació del mètode es descriu a l'apartat 4.2.4.3.

Les al·lotes de suspensions de liposomes amb diàmetres inferiors a 1 µm, es centrifugaren en microtubs a 12.500 x g, durant 1 minut a 4°C. L'avaluació del mètode es descriu a l'apartat 4.2.4.3.

Pels dos tipus de vesícules, quan es volgueren obtenir grans volums de mostra sense l'excés de fàrmac sòlid, es centrifugà la suspensió en una centrífuga preparativa (Centrikon H-401, Kontron, Suïsa) en les condicions d'acceleració i temps determinades prèviament per cada cas, i en recipients escaients.

ULTRACENTRÍFUGACIÓ.

La centrifugació en alts camps gravitatoris s'emprà per sedimentar els liposomes amb un diàmetre aproximat de 200 nm i per a la separació de l'oli de borratge que constitueix microgotetes estabilitzades amb fosfolípids de l'oli que no les forma. En ambdós casos s'utilitzà una ultracentrífuga Sorvall Combi-Plus (Du Pont, USA).

Per tal d'obtenir la sedimentació dels liposomes d'aproximadament 200 nm de diàmetre la suspensions es centrifugaren a 140.000xg durant 15 hores a 4°C en un rotor d'angle fix T-865. La validació es descriu a l'apartat 4.2.4.4.

Les emulsions amb oli de borratge es centrifugaren, en volums de 30 mL, a 100.500 x g durant 120 minuts a 4°C en un rotor d'angle variable AH-629. La validació està descrita a l'apartat 4.2.4.4.

3.2.4.4 ULTRAFILTRACIÓ.

Es va emprar aquesta tècnica per quantificar la concentració d'hidrocortisona en el medi aquós no encapsulat de les suspensions de liposomes. S'utilitzà una cel·la d'ultrafiltració Amicon de 50 mL amb agitació magnètica. La pressió aplicada fou de 4 bars i s'obtingè insuflant nitrogen. Les membranes foren Nadir PA5 (Intersep Filtration Systems, Anglaterra) constituïdes per poliamida i polipropilè, amb un tall de 5000 Daltons (equivalent a un porus de 0,5-1 nm per a proteïnes globulars). Abans de la seva utilització es rentaren 4 vegades durant 15 minuts en medis aquosos saturats d'HC. La bibliografia descriu la utilització d'aquest mètode amb finalitats preparatives (Vemuri S., 1991) i analítiques (Müller K. i Schuster A., 1990) fent esment, en aquest darrer cas, de les interaccions que poden originar-se entre les membranes i les molècules constituents de la mostra. És per això que, en el nostre cas, ha estat necessària una validació del mètode, la qual es descriu a l'apartat 4.2.4.5.

3.3

MÈTODES MATEMÀTICS.

Per tal d'obtenir els màxims resultats amb els mínims experiments possibles, s'han emprat tècniques de disseny experimental i d'avaluació dels models de les respostes en la major part d'experiments. El procediment emprat està basat en el llibre de Deming S.N. i Morgan S.L. (1987). D'altra banda, per a la obtenció de la situació dels màxims dels espectres d'FT-IR s'ha emprat el procediment de la 4^a derivada.

Ambdós mètodes matemàtics es decriuen tot seguit.

3.3.1 DISSENY I AVALUACIÓ D'EXPERIMENTS.

MODELS EMPÍRICS.

En l'estudi del comportament de qualsevol sistema, podem emprar dos tipus de models per tal de descriure el seu comportament: el mecanicista, i l'empíric. En el primer cas, es proposa un procés amb el qual s'explica com unes variables afecten a la resposta del sistema. En funció de la seva complexitat, és possible establir una funció matemàtica que relaciona els factors. En l'àmbit de la ciència bàsica, aquest és el tipus de model predilecte, ja que permet conèixer íntimament el sistema i relaciona els aspectes teòrics amb els fets experimentals. Un exemple són les equacions que descriuen la velocitat de les reaccions químiques. Contràriament, en els models empírics el que es pretèn és assolir una aproximació prou bona que descriu el comportament del sistema. No interessa el per què del seu funcionament. El sistema és una caixa negra, i l'equació que es proposa conté uns paràmetres que s'han ajustat a partir de les dades experimentals en equacions generals.

Molts models empírics són de tipus lineal. El terme lineal fa referència a que les equacions estan compostes per termes additius, cadascun dels quals inclou només un paràmetre com a producte. Per exemple, en un sistema on s'estudii l'efecte del factor x sobre la resposta z , l'equació següent, on intervenen els paràmetres b_0 , b_1 , b_2 i b_3 és lineal:

$$z = b_0 + b_1x + b_210^x + b_3x^2$$

No passa el mateix amb b_1 a la següent equació:

$$z = b_0 \exp(-b_1x)$$

95

tot i que, en aquest cas, pot linealitzar-se mitjançant logaritmes.

Una de les equacions lineals més útils per descriure sistemes amb dues variables (x i

y) és la que correspon al model polinòmic complet de segon ordre¹³, i que correspon a l'expressió:

$$z = b_0 + b_{1x} x + b_{1y} y + b_{2x} x^2 + b_{2y} y^2 + b_{xy} xy \quad \text{Eq. 9}$$

on:

b_j indica que és el paràmetre i de la variable j .

Es pot considerar que cadascun dels termes de l'equació descriu diferents comportaments del sistema:

b_0 , correspon al nivell (valor) de z quan les variables x i y tenen nivell 0,

$b_{1x} x$, indica que les variacions de z són b_{1x} vegades proporcionals a les de x , aquest terme correspon al que s'anomena interacció de primer ordre,

$b_{1x} x^2$, indica que la influència de x en z depèn del propi valor de x . Aquest terme es pot expressar com $(b_{1x} x) x$, per tant, el pendent de x varia juntament amb el seu valor: quan x és petit el pendent també ho és, i a l'inrevés. És una interacció de segon ordre, o autointeracció,

$b_{xy} xy$, indica que l'efecte d'un factor sobre z depèn del nivell de l'altre. És una interacció creuada entre els factors x i y .

Cal incloure un altre terme per que l'equació 9 s'ajusti a la realitat. D'una banda, tota mesura té associat un error experimental, per tant és possible que els termes anteriors no proporcionin exactament els valors mesurats de z . A més, en tractar-se d'un model, és poc probable que el sumatori de termes proporcionin amb absoluta precisió el valor de z , de manera que hi haurà una manca d'ajust pròpia del model proposat. Aquestes desviacions constitueixen el que s'anomena el residual (r) de l'equació. No és un paràmetre a ajustar, sinó el terme que té en compte tant l'error experimental com la manca d'ajust del model. Per tant, l'equació completa és:

$$z = b_0 + b_{1x} x + b_{1y} y + b_{2x} x^2 + b_{2y} y^2 + b_{xy} xy + r \quad \text{Eq. 10}$$

La solució d'un sistema com l'anterior només necessita de prou equacions independents a partir de les quals es troben els valors dels paràmetres b_{ij} . Per tant, en estudiar un sistema, i una vegada escollits els factors que es volen variar, podem realitzar n experiments amb diferents combinacions de nivells de cada factor fins aconseguir una sèrie de relacions en les quals les incògnites són els paràmetres b_{ij} :

¹³ Des d'un punt de vista analític, es pot considerar com una sèrie de Taylor truncada i, per tant, una aproximació a la funció contínua que descriu el sistema.

$$\begin{aligned}
 b_0 + b_{1x} x_1 + b_{1y} y_1 + b_{2x} x_1^2 + b_{2y} y_1^2 + b_{xy} x_1 y_1 + r_1 &= z_1 \\
 b_0 + b_{1x} x_2 + b_{1y} y_2 + b_{2x} x_2^2 + b_{2y} y_2^2 + b_{xy} x_2 y_2 + r_2 &= z_2 \\
 \vdots & \\
 \vdots & \\
 b_0 + b_{1x} x_n + b_{1y} y_n + b_{2x} x_n^2 + b_{2y} y_n^2 + b_{xy} x_n y_n + r_n &= z_n
 \end{aligned}$$

El conjunt es pot expressar en forma matricial:

$$\begin{pmatrix} 1 & x_1 & y_1 & x_1^2 & y_1^2 & x_1 y_1 \\ 1 & x_2 & y_2 & x_2^2 & y_2^2 & x_2 y_2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & x_n & y_n & x_n^2 & y_n^2 & x_n y_n \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} b_0 \\ b_{1x} \\ \vdots \\ b_{xy} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} r_1 \\ r_2 \\ \vdots \\ r_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} z_1 \\ z_2 \\ \vdots \\ z_n \end{pmatrix}$$

que en forma resumida resulta: $XB+R=Z$

La solució algebraica d'aquest sistema té algunes restriccions. En primer lloc el producte de $X'X$ ha d'ésser invertible, per tant no són possibles qualsevol sèrie d'experiments. D'altra banda s'imposa que el sumatori dels residuals al quadrat tingui el mínim valor possible, la qual cosa afecta directament als valors de B . La matriu solució, \hat{B} , que compleix aquestes condicions val $\hat{B}=(X'X)^{-1}(X'Z)$, on X' indica la matriu transposta de X . L'obtenció d'aquests valors és ràpida mitjançant el programes informàtics que realitzen aquests càlculs.

Cal tenir en compte que no sempre és necessari treballar amb l'equació 10, sinó que eliminant diferents termes obtenim altres models més simples que poden ajustar-se al comportament del sistema. El següent pas és plantejar-se quins experiments realitzar per l'ajust que es vol fer, i determinar si aquest és prou bo.

DISSENY EXPERIMENTAL.

Quan es realitza una anàlisi empírica d'un sistema presumiblement afectat per varis factors (o variables), no és necessari mantenir un d'ells constant mentre es varia de forma sistemàtica el nivell de la resta, sinó que és possible variar tots ells alhora i, amb una anàlisi matemàtica adient, obtenir els paràmetres de cada terme a les equacions empíriques proposades. Aquest procediment és el que es coneix com a diseny factorial. En ell s'escullen les combinacions entre factors adients per obtenir la matriu \hat{B} , de manera que,

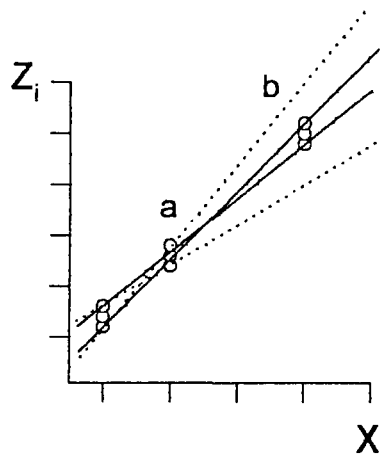


Fig. 22 Variació en l'error del pendent en funció de la distància entre els nivells d'un factor.

a més, cadascun dels paràmetres té el mínim error possible associat. La influència dels nivells de cada factor en la determinació dels paràmetres es pot posar de manifest amb uns exemples simples sense entrar en l'anàlisi matemàtica:

a) En el cas de l'ajust d'un model $z = b_1x + r$, la distància que separa els experiments realitzats a diferents nivells de x determina l'error associat a b_1 . Si es realitzen varis experiments a dos nivells x_1 i x_2 , el conjunt de replicats permet l'ajust de varies rectes, les pendents de les quals depenen de la distància entre x_1 i x_2 . Com s'aprecia a la Fig.22, com més a prop estiguin aquests nivells (a) més indeterminació hi haurà en el valor de b_1 . En allunyar x_1 i x_2 , i suposant que l'error experimental en cada cas és el mateix, el valor estimat de b_1 resulta ésser més precís (b).

b) A més de la distància entre factors, també és important la seva situació. En l'ajust d'un model $z = b_0 + b_1x + r$, la indeterminació en b_0 pot variar en funció d'on estiguin situats x_1 i x_2 . A la Fig. 23 s'observa que en situar els factors equidistants del nivell 0, l'error en b_0 ja no depèn de l'error de b_1 , sinó que únicament varia en funció de l'error experimental. Aquest exemple posa de manifest que la indeterminació en un paràmetre pot afectar a la d'un altre. És el que es coneix com a covariància.

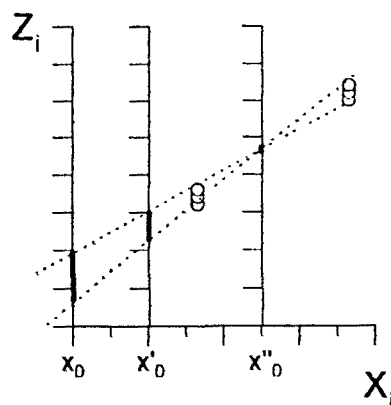


Fig. 23 Variació en l'error de l'ordenada a l'origen en funció de la posició dels nivells dels factors

Per minimitzar aquests efectes negatius,

els dissenys factorials situen els nivells entre factors en intervals equidistants i centrats amb l'origen. Els intervals queden establerts pel propi experimentador en dividir el rang estudiat en parts iguals on realitzar les mesures. La situació central de l'origen s'assoleix mitjançant un canvi de variables, obtenint valors codificats que, per simplificar els càlculs i poder identificar-los fàcilment, es normalitzen amb l'expressió:

$$x^* = \frac{x_i - x_c}{d} \quad \text{Eq. 11}$$

on

x^* indica el valor de x_i codificat

x_c indica el valor del factor que ocupa el centre en el rang estudiat,

d indica la distància entre nivells consecutius de la variable x .

Cada disseny factorial es caracteritza pel número mínim d'experiments independents (combinacions a diferents nivells entre factors) que permeten la resolució de la matriu B, és a dir, que fan que es compleixin les restriccions ja comentades de mínims quadrats i d'inversió de

matrius. Els dissenys més emprats són el de 2 nivells, el d'estrella, i el compost.

Com indica el seu nom, en els dissenys factorials de 2 nivells només es realitzen experiments a dos nivells en cada factor. El número mínim d'experiments (f) per obtenir \hat{B} està donat per la relació $f = m^k$, on m indica els nivells dels factors, i k el número de factors que s'estudien. Per exemple, en un sistema en el que s'estudiïn dos factors (x i y), calen $f=2^2=4$ combinacions de factors a diferents nivells (les combinacions entre x_1 i x_2 amb y_1 i y_2). Aquestes combinacions són les representades a la Fig. 24a (espai bidimensional de factors). El model lineal que amb més freqüència s'ajusta al conjunt de resultats obtinguts és

$$z = b_0 + b_{1x}x + b_{1y}y + b_{xy}xy + r$$

i, com s'aprecia, permet estimar els efectes de primer ordre i els creuats entre els factors. Amb altres models és possible que no es pugui invertir la matriu $X'X$. La mateixa figura mostra el disseny en el cas de treballar amb tres factors (espai tridimensional de factors).

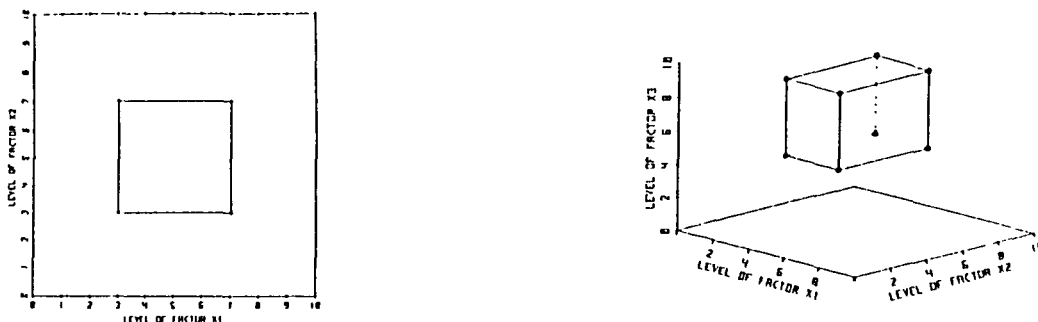


Fig. 24 Combinacions de factors en un disseny de 2 nivells amb 2 factors (a) i amb 3 factors (b).

Per estimar els efectes de segon orde en sistemes amb k factors, s'empren els dissenys en estrella, els quals proporcionen $f=2k+1$ combinacions de factors (Fig. 25a) i, per tant, els models poden contenir $2k+1$ paràmetres. Per exemple, amb 2 factors, el més emprat inclou termes de primer ordre i de segon:

$$z = b_0 + b_{1x}x + b_{1y}y + b_{2x}x^2 + b_{2y}y^2 + r_1$$

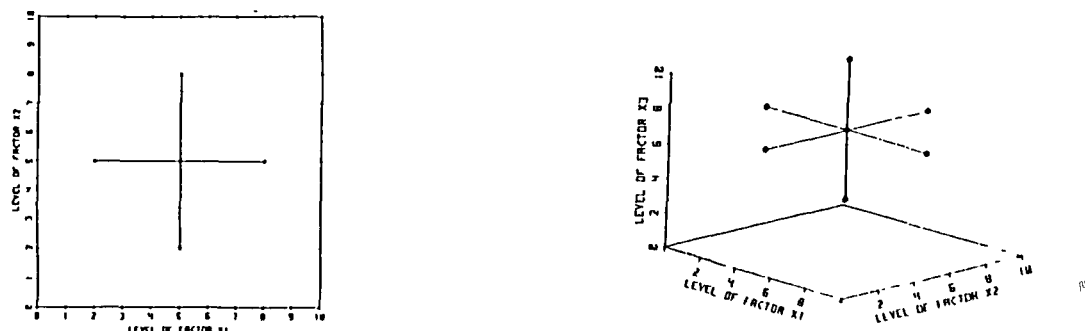


Fig. 25 Combinacions de factors en un disseny d'estrella amb 2 factors (a) i amb 3 factors (b).

El disseny compost és el resultat de la unió dels dos anteriors. En el cas en que els centres coincideixin s'anomena compost centrat. A la Fig. 26a es mostren les posicions dels experiments en el cas d'un sistema on variïn 2 factors. Aquests dissenys són els que permeten obtenir els paràmetres dels models polinòmics complets de segon ordre, els quals tenen $1/2(k+1)(k+2)$ paràmetres. Un exemple, pel cas de 2 factors, és l'Eq.10.

Una vegada establerts els models i les combinacions es fa necessari avaluar-los.

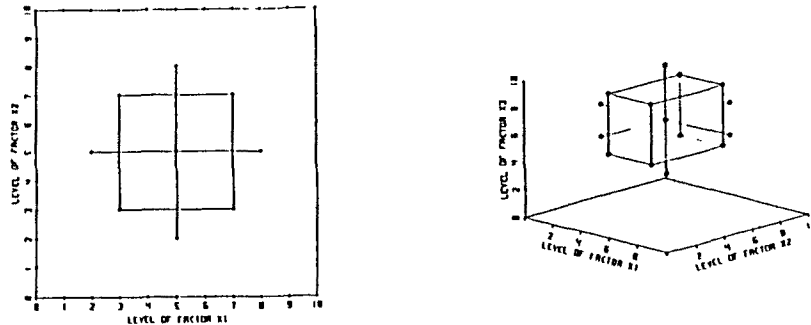


Fig. 26 Combinacions de factors en un disseny compost centrat amb 2 factors (a) i amb 3 factors (b).

AVALUACIÓ DELS MODELS.

Un cop escollit el disseny experimental, obtingudes les respostes del sistema, i determinats els paràmetres de l'equació empírica proposada, cal establir procediments que indiquin si els resultats són acceptables. Aquesta qualificació es basa, generalment, en la satisfacció de tres condicions. La primera és establir en quin grau els canvis que s'observen en la resposta del sistema són deguts als canvis intencionats que s'han realitzat sobre els factors estudiats. La segona condició avalua la manca d'ajust del model que s'ha escollit, comparant-la amb l'error experimental propi del sistema. La tercera es planteja per determinar quins termes del model proposat són els més significatius.

Per resoldre aquestes qüestions resulta imprescindible conèixer l'error experimental, acció que implica la realització de replicats en, com a mínim, una de les combinacions de factors, que acostuma a ser el nivell central codificat en el cas del model compost centrat. Davant la possibilitat que l'error no sigui igual a tot el rang estudiat, és recomanable realitzar els replicats a diferents nivells repartits per igual en el rang d'estudi dels factors.

El procediment que se segueix per solucionar el problema plantejat és conegut com a l'anàlisi de la varianza (Anova) per models lineals, i està fonamentat en la consideració de que cadascuna de les respostes d'un sistema poden considerar-se fomes per varies parts. Per a realitzar l'Anova s'obtenen les variacions associades a cadascun d'aquests intervals.

Quan s'ha obtingut una sèrie de respostes en l'estudi d'un sistema, la distància des de l'origen (nivell de resposta zero) fins la mitjana de tots els valors obtinguts se situa al punt mitjà

de totes les respostes experimentals¹⁴. Des d'aquest punt (Fig. 27), la distància fins el valor que prediu el model per cada nivell (z_i), és un paràmetre que indica si aquest és prou bo explicant les variacions en les

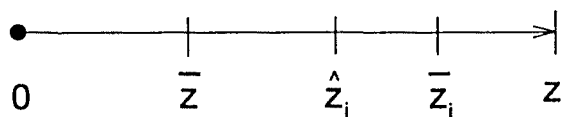


Fig. 27 Segments que descriuen el desplaçament des de l'origen, fins a una resposta concreta del sistema.

respostes. La distància des dels valors que prediu el model en cada nivell fins els valors de la mitjana en aquests nivells (si es que hi ha replicats) indica la manca d'ajust del model. Com més petita sigui més bones seran les previsions. Per últim, la distància entre les mitjanes experimentals i els valors individuals corresponents, mesuren l'error experimental

Per treballar i quantificar totes aquestes distàncies, es treballa amb sumatoris de termes al quadrat, els quals tenen associats uns graus de llibertat (GL) en funció de quines variables els componen. És a partir d'aquests sumatoris que s'analitzen les bondats del model.

El primer d'ells és el sumatori total de quadrats (SS_T), que s'obté elevar al quadrat totes les respostes experimentals i sumar-les (Taula 2). El nombre de graus de llibertat és la quantitat de lectures realitzades: n . Aquest sumatori es pot descomposar en dos en el cas de treballar amb models on hi ha ordenada a l'origen (b_0). El primer és el sumatori d' n vegades dels quadrats de la mitjana obtinguda amb totes les respostes (SS_m), que té un grau de llibertat; l'altre és el sumatori de quadrats ajustats amb la mitjana (SS_{aj}), que té $n-1$ graus de llibertat. Aquest darrer sumatori ens indica en quin grau s'allunyen els valors experimentals de la mitjana de tots ells. Es pot demostrar que $SS_T = SS_m + SS_{aj}$, i que passa el mateix amb els respectius graus de llibertat. Les relacions entre sumatoris es mostren a la Fig. 28. En el cas en que el model no incorpori b_0 , SS_T es descomposa directament en els següents.

En proposar un model empíric, la quantitat que els valors experimentals s'allunyen de la seva mitjana (SS_{aj}) es pretèn explicar amb els factors que hi participen. Per això es comparen les respostes que proporciona el model amb el valor de la mitjana dels punts experimentals, procés que dona lloc al sumatori de quadrats originats pels factors (SS_{fac}). Si els resultats del model expliquen bé l'allunyament de la mitjana experimental, les diferències entre ambdós faran que SS_{fac} també ho sigui, i serà del mateix ordre que SS_{aj} . Però cal avaluar en quin grau el model s'ajusta als punts experimentals, ja que el cas anterior el que mesura és la variació global respecte de la mitjana. Això es fa amb el sumatori dels quadrats dels residuals (SS_{res}). Els graus de llibertat de cada sumatori es mostren a la Taula 2, on p indica el número de paràmetres que inclou el model.

El darrer pas es determinar si els residuals anteriors són originats per que el model

¹⁴ Per això, quan es realitzen replicats, és convenient situar-los en l'origen de factors codificats en cas de realitzar-los en un sol nivell, o distribuir-los per igual si es realitzen a diferents nivells.

Sumatori	Operació	Graus de llibertat
SS_T	$\bar{z} = \sum z_i^2$	n
SS_m	$\sum \bar{z}^2$	1
SS_{aj}	$\sum (z_i - \bar{z})^2$	$n-1$
SS_{fac}	$\sum (\hat{z}_i - \bar{z})^2$	$p-1$
SS_{res}	$\sum (\hat{z}_i - z_i)^2$	$n-p$
SS_{lof}	$\sum (\hat{z}_i - \bar{z})^2$	$f-p$
SS_{exp}	$\sum (z_i - \bar{z})^2$	$n-f$

Taula 2 Relació entre els sumatoris quadràtics i graus de llibertat per models amb b_0 . En cas contrari no hi ha SS_m ni SS_{aj} , i SS_{fac} té p graus de llibertat.

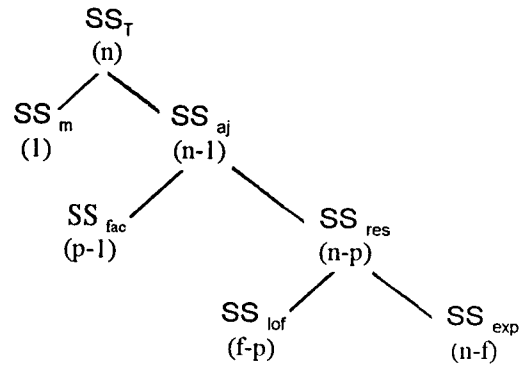


Fig. 28 Relacions additives entre els sumatoris de quadrats i els graus de llibertat per models amb b_0 .

s'allunya dels punts experimentals sense cap raó, o si, en cas de fer-ho, és per que el sistema té força error experimental, de manera que el model el que fa és apropar-se a la mitjana dels valors mesurats a cada nivell. El primer fet es quantifica amb el que s'anomena sumatori de quadrats de la manca d'ajust (SS_{lof}), en fer les diferències entre les mitjanes de cada nivell (si hi ha) i el valor previst pel model. Si s'han realitzat f combinacions de factors a diferents nivells, els graus de llibertat associats són $f-p$. Per últim, l'error experimental es mesura a partir de la diferència entre els valors obtinguts a cada nivell i les respectives mitjanes (SS_{exp}), i té $n-p$ graus de llibertat.

Els primers paràmetres que avaluen el model són els coeficient de determinació i de correlació. Si els factors estudiats tenen poca influència en les respostes del sistema, SS_{aj} serà molt més gran que SS_{fac} . En cas contrari els dos sumatoris seràn del mateix ordre. Per tant, el quocient entre els dos és una mesura relativa de en quin grau les variacions que s'observen amb els factors són explicades amb el model proposat. El quocient és el coeficient de determinació múltiple, R^2 , i val:

$$R^2 = \frac{SS_{fac}}{SS_{aj}} \quad Eq. 12$$

R^2 varia entre 0, quan els factors del model no expliquen la resposta, i 1, quan ho fan totalment. La seva arrel quadrada és el coeficient de correlació múltiple.

Per tal de completar l'estudi dels factors del model, cal realitzar la prova de significació de la regressió mitjançant el quocient de variances¹⁵ dels factors dels residuals. Les

¹⁵ Les variances s'obtenen amb el quocient dels sumatoris quadràtics entre els respectius graus de llibertat associats.

comparacions de variàncies es realitzen mitjançant els valors crítics de F de Fisher tabulades (F_{crit}) al grau de significació escollit. Si la variància dels factors és significativament més gran que la dels residuals, els termes del model expliquen bé les variacions del sistema. Per tant, es calcula la F amb les variàncies esmentades (F_{calc}) i es compara amb la F_{crit} tabulada. En models que contenen b_0 , l'expressió val:

$$F_{(p-1, n-p)} = \frac{SS_{fac} / (p-1)}{SS_{res} / (n-p)} = \frac{s_{fac}^2}{s_{res}^2} \quad Eq. 13$$

on:

($p-1$; $n-p$) indica els graus de llibertat n_1 i n_2 de la F_{crit} .

La determinació de la variància dels residuals permet calcular l'interval de confiança dins del qual, amb una probabilitat determinada, cal esperar una nova lectura. Per a una combinació de nivells de factors concreta, aquest interval ve donat per l'expressió:

$$\pm \sqrt{F_{(1, n-p)} \frac{SS_{res}}{(n-p)} [1 + X_0 (X'X)^{-1} X_0]} = \pm \sqrt{F_{(1, n-p)} s_{res}^2 [1 + X_0 (X'X)^{-1} X_0]} \quad Eq. 14$$

on:

$F_{(1, n-p)}$ correspon al valor tabulat de F amb 1 i $n-p$ graus de llibertat al valor de significació escollit, X_0 és una matriu amb una única filera que conté la combinació de nivells estudiada.

La segona prova s'efectua per determinar si hi ha una manca d'ajust significativa del model. En aquest cas les variàncies que es comparen són les de la manca d'ajust i la de l'error experimental segons l'expressió:

$$F_{(f-p, n-f)} = \frac{SS_{lof} / (f-p)}{SS_{exp} / (n-f)} = \frac{s_{lof}^2}{s_{exp}^2} \quad Eq. 15$$

on:

($f-p$; $n-f$) indica els graus de llibertat n_1 i n_2 de la F_{crit} .

Si la variància de la manca d'ajust resulta significativament major que la de l'error experimental ($F_{calc} > F_{crit}$) el model no és estadísticament correcte, ja que les diferències entre les respostes que proporciona i les mitjanes experimentals s'allunyen força més del que es pot justificar per l'error experimental.

En moltes ocasions, la prova de l'ajust del model indica que l'equació proposada no és estadísticament acceptable encara que comprovem que s'ajusta bé. Aquest fet té lloc

especialment en sistemes en els quals la mesura té molt poc error experimental associat. En aquests casos, encara que la manca d'ajust sigui molt petita i des del punt de vista experimental no sigui important, l'anàlisi estadística indica que s'hauria de rebutjar el model com a conseqüència de la seva imprecisió. És per això que, en el casos en que els residuals siguin prou petits com per poder considerar que no tenen una importància pràctica, no és necessari realitzar la prova de la manca d'ajust.

Per últim indicar que, en proposar un model, inicialment no s'accepten tots els paràmetres que conté, sinó que només en formaran part aquells que siguin significativament diferents de 0. El procés té lloc comparant els residuals que s'originen en incloure un nou paràmetre amb els que causava el model anterior, de manera que, un a un, només aquells que causen una millora del model hi són inclosos. Afortunadament, aquest procés es desenvolupa en els programes de tractament de dades addients a partir dels valors experimentals i del model complet que es proposa.

3.3.2 TRACTAMENT D'ESPECTRES MITJANÇANT LA 4ª DERIVADA.

L'absorció de la radiació infraroja per part de la matèria està determinada pels modus de vibració moleculars que presenten els enllaços entre els àtoms. En funció de l'energia de cada enllaç, la qual depèn tant dels àtoms implicats com del seu entorn, la radiació infraroja d'una determinada freqüència serà o no absorbida¹⁶. Per tant, a partir de l'espectre d'infraroig d'un compost es pot extreure informació de la seva estructura, ja que les diferents freqüències absorbides poden relacionar-se amb un tipus d'enllaç en un entorn concret.

A la pràctica, les absorcions no es donen a una freqüència única, sinó que s'obtenen bandes l'amplada de les quals depèn de la resolució instrumental, dels microentorns de cada grup excitat, i de la velocitat amb la qual es disipa l'energia absorbida. El resultat són bandes d'amplada variable que, en alguns casos, poden solapar-se parcialment o total, de manera

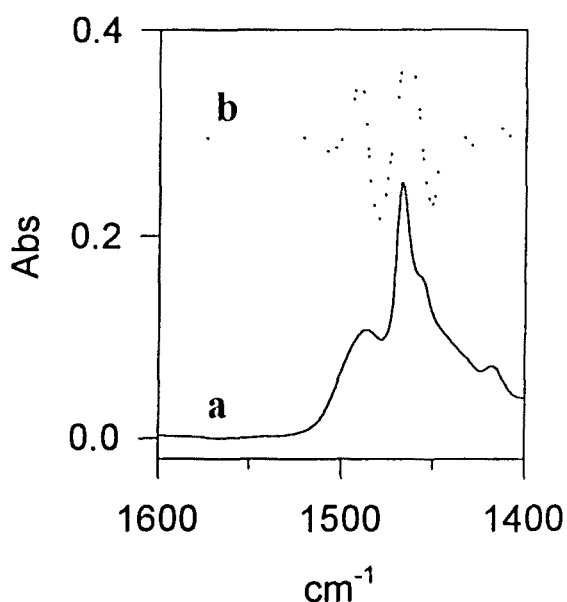


Fig 29 Fragment de l'espectre d'absorció a l'infraroig de la fosfatidilcolina (a) i 4ª derivada (b) de l'interval

¹⁶ Històricament, a l'espectroscòpia d'infraroig s'ha emprat el número d'ona ($\tilde{\nu}$) enlloc de la freqüència (ν) per caracteritzar la radiació. La relació entre ambdues és $\tilde{\nu} = \nu/c$, on c és la velocitat de la llum.

que l'assignació de la posició dels màxims pot resultar molt imprecissa (Fig. 29a).

Hi ha diversos procediments matemàtics de tractament d'espectres que permeten superar aquesta limitació. Un d'ells és l'obtenció de la 4^a derivada de l'espectre. En funció de l'interval amb el qual es deriva, aquesta tècnica ressol en major o menor grau les bandes components d'un conjunt solapat. La corva resultat presenta màxims la posició dels quals és la de les bandes de l'espectre original (Fig. 29b).

4. RESULTATS

L'apartat està dividit en els següents temes:

- 4.1 Validació dels mètodes d'anàlisi.
- 4.2 Resultats dels mètodes preparatius.
- 4.3 Resultats de suspensions i emulsions.

4.1

VALIDACIÓ DELS MÈTODES D'ANÀLISI.

En el present apartat es descriuen les determinacions d'interferències en els mètodes analítics emprats, i les validacions dels nous i dels d'ús freqüent al laboratori però utilitzats per primera vegada per al tipus de mostra analitzat.

Entre la detecció d'interferències cal destacar la que es produeix en la determinació de l'índex d'oxidació dels fosfolípids com a conseqüència de les sals del tampó de la suspensió (Ap. 4.1.2), i la del cromat i l'oli de borratge en la quantificació de fosfolípids mitjançant el ferrotiocianat amònic (Ap. 4.1.1).

La determinació de la grandària dels liposomes mitjançant l'anàlisi de l'espectre de freqüències ha resultat sotmesa a moltes més restriccions de les que indica el fabricant de l'aparell. A l'Ap. 4.1.8 es descriu l'estudi exhaustiu de les variables que afecten la seva precisió i exactitud, analitzant tant les característiques globals de la suspensió (diàmetre i amplada mitjanes) com els intervals de classe en que es divideix el rang d'anàlisi de l'aparell.

La resta d'apartats ha permès validar diversos mètodes d'anàlisi (volum encapsulat en liposomes, concentració de fosfolípids, etc) o establir quines variables recollir en estudis *in vivo* de l'eficàcia dels liposomes (Ap. 4.1.9).

4.1.1 INTERFERÈNCIES EN LA QUANTIFICACIÓ DE FOSFOLÍPIDS.

S'estudiaren les possibles interferències que les molècules a encapsular en liposomes podien originar en el mètode de quantificació de fosfolípids basat en la formació de complexos amb ferrotiocianat amònic. Amb aquesta finalitat es compararen els resultats de les anàlisi de diferents suspensions de liposomes (obtingudes a partir de Pro-Lipo S) que contingueren o no la molècula a encapsular, tenint totes elles la mateixa concentració de fosfolípids. En el cas dels fàrmacs hidrofòbics, la concentració total d'aquests a les mostres fou la que es pretenia aconseguir en els preparats amb finalitat farmacològica, sense considerar si estaven o no encapsulats (ditranol (DT): 0,1 % p/p; hidrocortisona (HC): 0,5 % p/p; butirat-propionat d'hidrocortisona (HBP): 0,1 % p/p; oli de borratge (OB): 2 % p/p). En el cas del cromat, emprat com a marcador del volum intern dels liposomes, la seva concentració fou de $1,04 \cdot 10^5$ ppb de crom total, que és la màxima concentració a la qual s'ha emprat com a marcador. Com a prova complementària per les molècules amb absorbància a 470 nm, també es determinà el seu coeficient d'extinció molar en cloroform a aquesta longitud d'ona i el seu espectre UV-Vis entre 380 i 520 nm. D'aquesta forma s'avaluà, per les mostres anteriors, si la concentració màxima que pot assolir el fàrmac en la fase orgànica en la qual es realitza l'extracció (Ap. 3.1.1.1) produeix una absorbància significativa que interfereixi en la quantificació dels fosfolípids..

Donada la inestabilitat química del ditranol, també es va comprovar si la dantrona (DA), que és el principal subproducte del seu procés de degradació, produïa alguna interferència en el mètode d'anàlisi. Es va suposar una estequiometria 1:1 mol/mol per aquest procés.

Els resultats es mostren a la Taula 3. En ella s'aprecia que, a les concentracions màximes de fàrmac a les que es pretenen obtenir les suspensions, no es produeixen absorbàncies significatives en la fase orgànica que interfereixin a la longitud d'ona del màxim d'absorció del complex que forma el ferrotiocianat amb els fosfolípids. Per altre costat, s'observa que en els casos del DT, DA, HC, i HBP, la quantificació dels fosfolípids no resulta afectada per la presència dels fàrmacs. Amb l'OB i el cromat, però, sí que hi ha una variació significativa de la concentració del complex fosfolípid-ferrotiocianat en la fase orgànica, produint-se una interferència que altera els resultats.

La bibliografia estableix la formació dels complexos amb diferents fosfolípids, i indica la no existència d'interferències dels àcids grassos lliures (Stewart J.Ch.M., 1980). Per aquesta raó els resultats obtinguts amb l'OB són destacables, ja que posen de manifest la formació d'un complex amb un lípid neutre, en el qual és possible que sigui necessària la participació dels fosfolípids.

D'altra banda, la interferència del cromat pot estar relacionada amb una competició d'aquesta molècula amb el ferrotiocianat per la unió als fosfolípids. Els resultats, en presentar una absorbància menor de la del control, indiquen que el complex resultant no és soluble en cloroform amb el qual es realitza l'extracció.

Molècula	ϵ_{470} L.mol ⁻¹ cm ⁻¹ (cloroform)	A_{470} UA (cloroform)	Espectre** 380-520 nm	% Fosfolípid*** mostra amb la molècula (mostra sense la molècula)
Ditranol	239 ± 10 (n=2)	< 0,001 (2,21.10 ⁻⁶ M)	NDt (2,21.10 ⁻⁶ M)	NS 99,4 ± 6; n=3 (100 ± 3; n=3)
Dantrona	3.170 ± 140 (n=2)	< 0,01 (2,21.10 ⁻⁶ M)	NDt (2,21.10 ⁻⁶ M)	NS 103 ± 2; n=2 (100 ± 3; n=3)
Hidro cortisona	NDt	NDt (4,61.10 ⁻⁶ M)	NDt (4,61.10 ⁻⁶ M)	NS 104 ± 7; n=6 (100 ± 6; n=5)
Butirat- propionat d'hidrocortisona	NDt	NDt (2,76.10 ⁻⁵ M)	NDt (2,76.10 ⁻⁵ M)	NS 100 ± 7; n=5 (100 ± 6; n=8)
Oli de borratge	NDt	NDt (2,25.10 ⁻³ M)	NDt (2,25.10 ⁻³ M)	S 230 ± 14; n=10 (100 ± 7; n=7)
Cromat	NDt	NDt	NDt	S 83,6 ± 6; n=4 (100 ± 6; n=3)

Taula 3 Determinació de la interferència de diferents molècules en la quantificació de fosfolípid.

Els resultats s'expressen com a mitjana ± desviació standard.

NS: No significatiu; S: Significatiu ($\alpha = 0.05$); NDt: No detectable.

*: Entre parèntesi s'indica la concentració a la qual s'ha calculat l'absorbància emprant el coeficient ϵ_{470} .

** : Entre parèntesi s'indica la concentració a la qual s'ha realitzat l'espectre.

***: Els resultats estan referits al valor de la mostra sense la molècula a encapsular.

4.1.2 INTERFERÈNCIES EN LA DETERMINACIÓ DE L'ÍNDEX D'OXIDACIÓ.

La determinació de l'índex d'oxidació de fosfolípids i oli de borratge mitjançant el quocient de les absorbàncies a 233 i 215 nm, està afectada per la terbolesa que causen les sals utilitzades per tamponar les suspensions i per la presència o no de gelificant a les preparacions. Aquest efecte origina que suspensions de liposomes de diferents concentracions acabades de preparar, i obtingudes amb la mateixa matèria primera, presentin índexs d'oxidació diferents. Per corregir aquesta interferència s'ha determinat, en primer lloc, l'efecte de la concentració de sals i de gelificant i, després, les correccions necessàries durant l'anàlisi rutinària dels fosfolípids. L'efecte de la concentració del tampó en la determinació de l'índex es mostra a la Fig. 30a, on apareixen els espectres UV-Vis de mescles d'etanol absolut amb tampons de diferents concentracions de fosfat sódic. La referència fou etanol absolut. Les proporcions de tampó i etanol són 0.1/3 v/v respectivament (New R.R.C., 1990). La terbolesa que s'observa fa que l'índex d'oxidació de les mostres depengui de la dilució que es faci a l'hora d'obtenir el seu

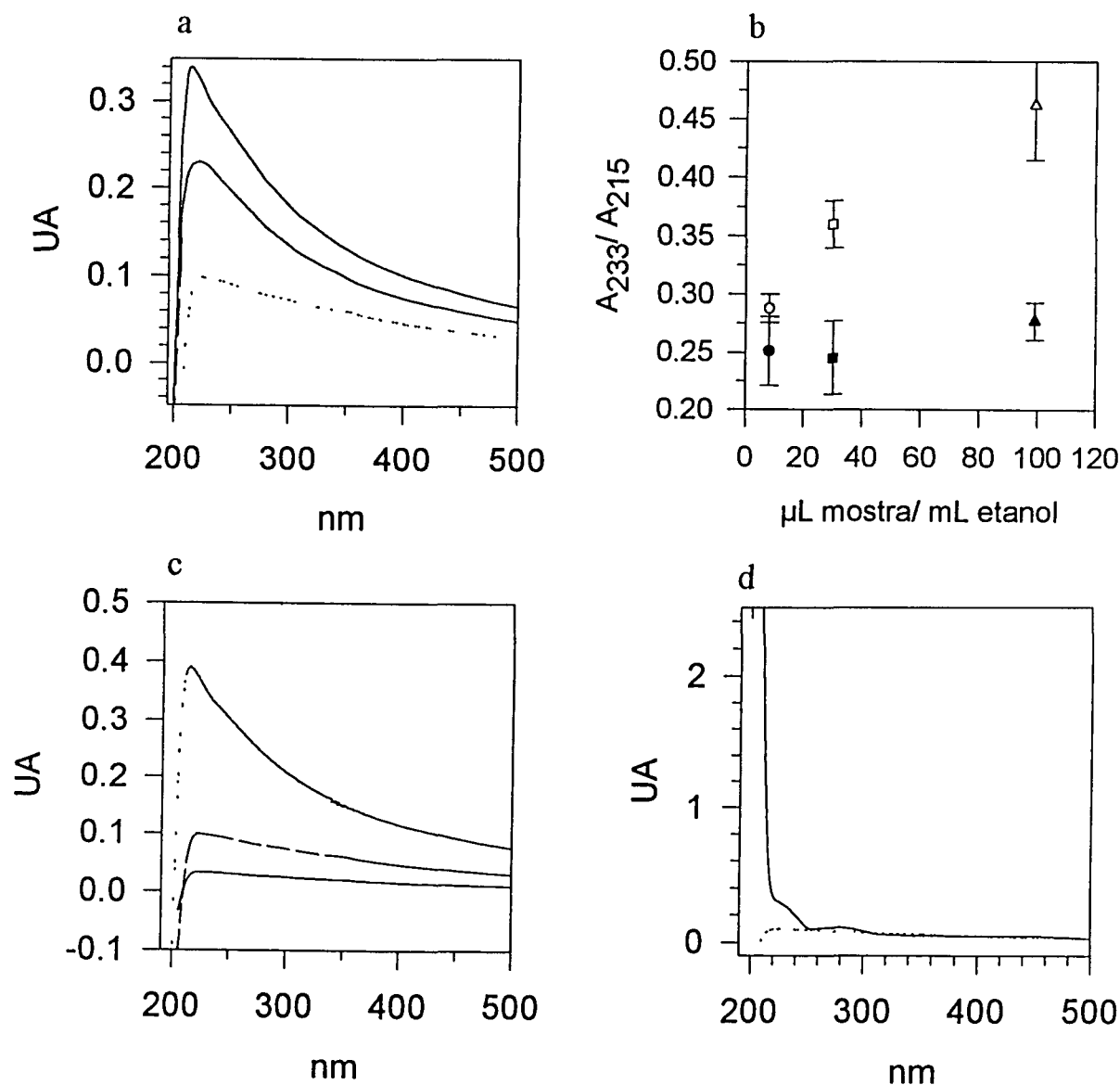


Fig. 30. Resultats de l'estudi de les interferències del tampó en la determinació de l'índex d'oxidació dels fosfolípids

- a) Espectres obtinguts afegint a 3 mL d'etanol absolut 100 μ L de tampó fosfat sódic de diferents concentracions 10 mM (.....), 25 mM (- - -); 50 mM (—).
- b) Índex d'oxidació de suspensions de liposomes de diferents concentracions (O: 50 mg F/mL; \square 15 mg F/mL, ∇ 5 mg F/mL) diluïdes en etanol absolut fins a una concentració de 0,45 mg F/mL. Els índexs d'oxidació directes (símbols buits) augmenten amb la quantitat de mostra diluïda en etanol, mentre que es mostren independents de la dilució si s'obtenen corregint la terbolesa (símbols negres).
- c) Espectres obtinguts diluint 30 μ L(—), 100 μ L (- - -) i 300 μ L (.....) de tampó fosfat sódic 10 mM pH 7,4 en 3 mL d'etanol absolut.
- d) Espectres corresponents a les dilucions de 100 μ L d'una suspensió de liposomes de 15 mg F/mL en tampó fosfat sódic 10 mM (—) i de 100 μ L de tampó fosfat sódic 10 mM (.....) en 3 mL d'etanol absolut

espectre. Això es posa de manifest a la Fig. 30b on amb símbols blancs es mostren els índexs d'oxidació de suspensions de liposomes (Pro-lipo S) de diferents concentracions, obtingudes per dilucions successives d'una suspensió mare, i analitzades segons es descriu a la bibliografia¹⁷ (New R.R.C., 1990). Com s'aprecia, aparentment hi ha un increment de l'índex d'oxidació, increment que és conseqüència de la quantitat de fase aquosa (i per tant de sals) afegida a l'etanol, ja que la concentració de fosfolípid en cubeta fou sempre la mateixa¹⁸. Això dóna lloc a un fals índex que no és representatiu de l'oxidació dels fosfolípids. Per evitar aquest artefacte es realitzaren blancs amb dilucions en etanol del tampó emprat en les suspensions (Fig. 30c). Aquests es restaren dels espectres de les mostres després d'igualar les absorbàncies a 550 nm (Fig. 30d), longitud d'ona prou allunyada dels cromòfors i on només cal esperar l'efecte de la terbolesa del medi. Els resultats corregits d'aquesta manera es mostren, en símbols negres, a la Fig. 1b. S'observa que d'aquesta forma l'índex és independent de la dilució de la mostra.

L'efecte del carbopol s'estudià per l'únic tipus de mostra preparada: 50 mg/g de fosfolípid i 0.3 % p/p Carbopol 940. Donades les característiques físiques de les mostres (gels), la dilució en etanol en aquest cas fou en pes volum, i del mateix ordre que les suspensions aquoses de liposomes: 30 mg mostra / 3 mL etanol. La Fig. 31 mostra l'espectre de blancs de Carbopol a aquesta dilució. S'aprecia una terbolesa major que en el cas dels blancs amb tampó, conseqüència de la baixa solubilitat del carbopol en etanol. Per tal de millorar la determinació de l'absorbància deguda només als fosfolípids, es centrifugaren les dissolucions etanòliques de carbopol en microtubs (1 min, 12.500xg). L'aparició d'un pellet permetè obtenir sobrenedants sense terbolesa, l'espectre dels quals és el del carbopol solubilitzat (Fig. 31). Així, per a l'anàlisi dels índexs de les mostres amb carbopol, les dilucions en etanol de totes les preparacions es centrifugaren en les condicions descrites anteriorment, de forma que la diferència entre els espectres del sobrenedant de la mostra i del sobrenedant del blanc corresponent proporcionà les absorbàncies a partir de les quals es calculà l'índex d'oxidació dels fosfolípids.

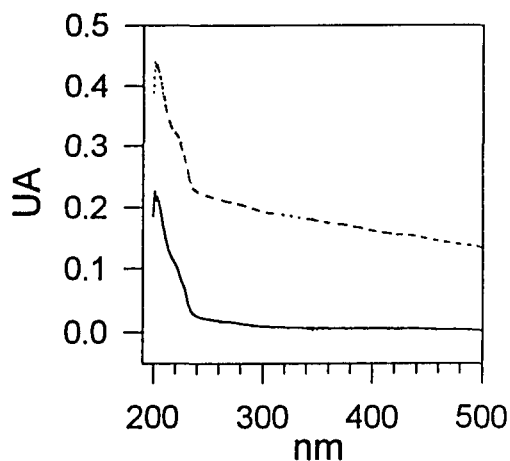


Fig. 31 Espectres resultants de la mescla de 30 mg de Carbopol 940 al 0,3 % p/p en tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4 amb 3 mL d'etanol. Mescla centrifugada (—); mescla no centrifugada (.....).

¹⁷ La concentració de fosfolípid de les dilucions en etanol es, en tots els casos, 0,45 mg/mL.

¹⁸ L'efecte de la contracció de volum és de l'ordre de l'1%, fet pel qual no s'ha tingut en compte.

4.1.3 INTERFERÈNCIES EN LA QUANTIFICACIÓ DE FÀRMACS PER HPLC.

Per tal de comprovar l'existència o no d'interferències causades pels fosfolípids i pel Carbopol 940 en la quantificació dels fàrmacs per HPLC, s'injectaren quantitats equivalents d'aquests compostos a les que proporcionen les dilucions per a l'anàlisi de les preparacions de liposomes amb fàrmacs. En cap dels mètodes emprats es detectà un pic significatiu amb mateix temps de retenció que el fàrmac analitzat.

4.1.4 QUANTIFICACIÓ DE FOSFOLÍPIDS MITJANÇANT LA DENSITAT ÒPTICA (DO) A L'UV-Vis.

La validació d'aquesta metodologia s'ha dut a terme en tres etapes. Inicialment, s'analitzà la relació entre la concentració de fosfolípids i la densitat òptica (DO) a 550 nm mitjançant la dilució de suspensions de liposomes de diferents diàmetres. En segon lloc es compararen els resultats proporcionats per aquesta metodologia amb els que s'obtingueren amb l'anàlisi amb ferrociocianat amònic (Ap. 3.1.1.1), que és el mètode de referència per a la quantificació de fosfolípids. Complementàriament, també es compararen amb aquest mètode els resultats de les quantificacions dutes a terme realitzant lectures de DO a 280 nm (enlloc de 550 nm). D'aquesta manera es comprovà que a aquesta longitud d'ona també s'obtenen resultats quantitius d'exactitud acceptable i es poden analitzar mostres més diluïdes i de liposomes més petits del que permet la quantificació de la DO a 550 nm.

En darrera instància es comprovà les possibilitats d'aplicar aquesta metodologia per determinar la concentració de fosfolípid en les fraccions d'elució de columnes d'exclusió molecular.

4.1.4.1 ANÀLISI DE REGRESSIÓ.

A partir d'una suspensió mare de liposomes en tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4 obtinguda amb Pro-Lipo S, es prepararen d'altres amb liposomes de diferents diàmetres bé mitjançant extrusió, bé per processat amb el Microfluidizer. S'estudiaren quatre tipus de preparacions i les característiques dels liposomes que contingueren foren: 1- No extrusionada (diàmetre (% vol): 958 ± 496 nm;

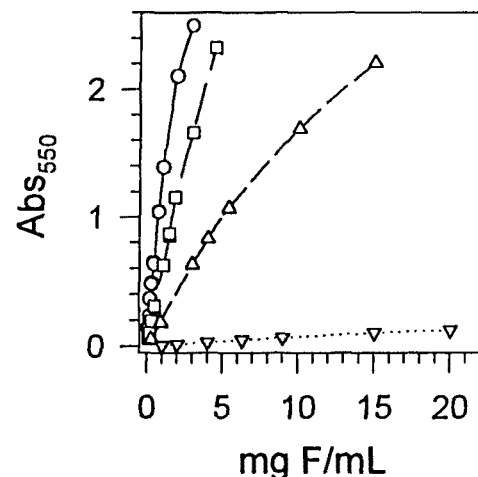


Fig. 32 Relació entre les densitats òptiques a 550 nm de suspensions de liposomes de diferents diàmetres i la seva concentració. (O: No extrusionats; □: Extr. 400; Δ: Extr 200; ∇: Microfluidizer C9p4).

15 mg F/mL), 2- Extrusionada fins 400 nm (479 ± 220 nm; 15 mg F/mL), 3- Extrusionada dins 200 nm (208 ± 79 nm; 15 mg F/mL), 4- Processada en el Microfluidizer ($31,0 \pm 10$ nm, 20 mg F/mL).

Es realitzaren lectures de DO a 550 nm d'alíquotes de diferent concentració d'aquestes suspensions inicials. Com s'observa a la Fig. 32, la DO depèn de la concentració de fosfolípids i de la grandària dels liposomes. En tots els casos presenta una zona susceptible d'ajustar-se a una línia recta (model linial de dos paràmetres directament proporcional al factor), la qual cosa permet realitzar rectes de calibratge amb suspensions de concentració coneguda i, d'aquesta manera, quantificar alíquotes seves sempre i quan no es produeixin variacions de la distribució de diàmetres. A la Taula 4 es mostra l'anàlisi estadística de les zones rectes de les representacions anteriors. Els nivells del factor compresos en l'interval estudiat es normalitzaren prèviament a l'anàlisi de la varianza:

Taula 4 Resultats de l'anàlisi de la varianza dels models lineals per la quantificació de suspensions de liposomes mitjançant la DO a 550 nm.

Agitats (No extrusionats)

	Totals	Mitjana	Ajustats	Factors	Residuals	Manca ajust	Err. Exp.
SS _i	4,405	3,198	1,207	1,203	$3,98 \cdot 10^{-3}$	$3,84 \cdot 10^{-3}$	$1,42 \cdot 10^{-4}$
GL	15	1	14	1	13	4	9

Coefficient de determinació (r^2): 0,9969

Coefficient de regressió (r): 0,9985

Test de significació de la regressió ($F_{1,13}$): 3928; ($F_{crit} = 4,67$)

Test de significació del model ($F_{4,9}$): 60,84; ($F_{crit} = 3,63$)

Error standard del model: 0,0175

Extr. 400 nm

	Totals	Mitjana	Ajustats	Factors	Residuals	Manca ajust	Err. Exp.
SS _i	7,002	4,166	2,836	2,822	0,0142	0,0139	$3,1 \cdot 10^{-4}$
GL	18	1	17	1	16	5	11

Coefficient de determinació (r^2): 0,9952

Coefficient de regressió (r): 0,9976

Test de significació de la regressió ($F_{1,16}$): 3178; ($F_{crit} = 4,49$)

Test de significació del model ($F_{5,11}$): 96,73; ($F_{crit} = 3,20$)

Error standard del model: 0,0298

Extr. 200 nm

	Totals	Mitjana	Ajustats	Factors	Residuals	Manca ajust	Err. Exp.
SS _i	6,038	4,056	1,983	1,981	2,46.10 ⁻³	2,38.10 ⁻³	8.10 ⁻⁵
GL	13	1	12	1	11	3	8

Coeficient de determinació (r^2): 0,9988

Coeficient de regressió (r): 0,9994

Test de significació de la regressió ($F_{1,11}$): 8848; ($F_{crit} = 4,84$)

Test de significació del model ($F_{3,8}$): 78,73; ($F_{crit} = 4,07$)

Error standard del model: 0,0153

Microfluidizer C9p4

	Totals	Mitjana	Ajustats	Factors	Residual	Manca ajust	Err. Exp.
SS _i	0,0102	7,38.10 ⁻³	2,86.10 ⁻³	2,86.10 ⁻³	3.10 ⁻⁶	2.10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
GL	8	1	7	1	6	3	3

Coeficient de determinació (r^2): 0,9999

Coeficient de regressió (r): 0,9999

Test de significació de la regressió ($F_{1,6}$): 4663; ($F_{crit} = 5,99$)

Test de significació del model ($F_{3,3}$): 2,155; ($F_{crit} = 9,29$)

Error standard del model: 8.10⁻⁴

Tots els resultats posen de manifest la possibilitat d'emprar aquest mètode per a la quantificació de suspensions de liposomes.

4.1.4.2 CORRELACIÓ AMB L'ANÀLISI AMB FERROTIOCIANT AMÒNIC. ANÀLISI AMB LA DENSITAT ÒPTICA A 280 nm.

Per tal de comprovar la validesa de la metodologia descrita anteriorment, s'han comparat els resultats que proporciona el mètode d'anàlisi mitjançant la DO a 550 nm amb els de proporcionen l'anàlisi amb ferrotiocianat amònic.

A més, amb l'objectiu d'assolir una major sensibilitat en la quantificació per densitat òptica, i degut a que dispersió de la llum és inversament proporcional a la quarta potència de la longitud d'ona (Harris D.A. i Bashford C.L., 1987), s'ha comprovat la possibilitat de realitzar quantificacions de fosfolípids realitzant lectures de DO a 280 nm.

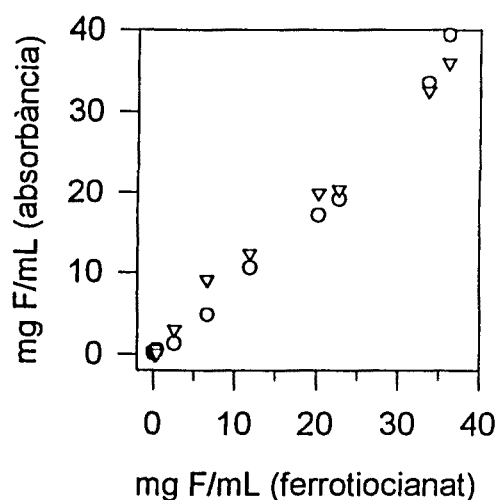


Fig. 33 Correlació entre la quantificació de fosfolípids mitjançant ferrotiocianat amònic i la densitat òptica a diferents longituds d'ona (○: DO₅₅₀; ▽: DO₂₈₀).

S'ha escollit aquesta longitud d'ona com a valor mínim per tal de que fos superior al màxim d'absorció dels triens conjugats que es formen durant la degradació dels fosfolípids. En cas d'emprar longituds d'ona menors, la lectura no correspondria únicament a la terbolesa de les mostres i la quantificació es veuria afectada pel seu grau d'oxidació. La validació d'aquesta metodologia s'ha realitzat, com en el cas de la DO a 550 nm, analitzant mostres de liposomes de diferents concentracions i comparant els resultats amb els que proporciona el mètode del ferrotiocianat.

Els resultats es mostren a la Fig. 33, on es representen els valors de la concentració de fosfolípids de diferents suspensions de liposomes en funció del mètode emprat. En comparar els mètodes de DO a 550 nm i 280 nm amb el del ferrotiocianat, s'aprecia una bona correlació entre les diferents metodologies. Els pendents de les rectes de correlació foren 1,000 per la DO₅₅₀ i 0,9657 per la DO₂₈₀. Per dur a terme l'anàlisi estadística es normalitzaren els valors de concentració determinats amb la formació del complex. Els resultats es mostren a la Taula 5.

Taula 5	Mètode	
	DO ₅₅₀ v ferrotiocianat	DO ₂₈₀ v ferrotiocianat
Coeficient de determinació (r ²)	0,9855	0,9924
Coeficient de regressió (r)	0,9927	0,9962
Test de significació de la correlació (F _{1,14}); (F _{crit} = 4,60)	947,9	1813
Error standard	1,60	1,11

Taula 5 Comparació de les quantificacions mitjançant la DO i el ferrotiocianat.

4.1.4.3 ANÀLISI DE FOSFOLIPID A LES FRACCIONS D'ELUCIÓ EN COLUMNES D'EXCLUSIÓ MOLECULAR.

El darrer assaig realitzat per tal de validar el mètode ha estat l'anàlisi del diàmetre dels liposomes presents en les diferents fraccions d'elució obtingudes amb una columna d'exclusió molecular (Sephadex G-25). En cas que les fraccions presentessin liposomes de diferents grandàries no es podria quantificar els fosfolípids emprant com a patró la suspensió original, ja que el pendent de les rectes que relacionen la concentració amb la DO depèn de la grandària dels liposomes (Fig. 32).

Amb aquesta finalitat s'aplicaren per

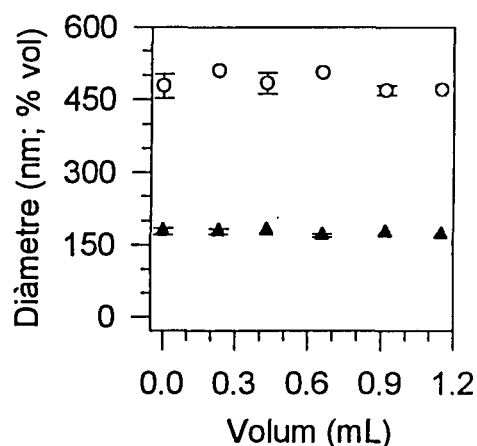


Fig. 34 Diàmetre dels liposomes presents a les fraccions d'elució de columnes d'exclusió molecular a les quals s'han aplicat alíquotes de suspensions amb liposomes de 200 nm (○) i de 400 nm (▲). Les fraccions mostren una distribució de grandàries equivalent a la que presenten les suspensions no eluïdes (fracció 0).

separat 0,2 mL de suspensions de liposomes de 200nm i de 400 nm a les columnes indicades, i es recolliren fraccions que s'analitzaren per espectroscòpia de correlació fotònica. Els resultats, que apareixen a la Fig. 34, mostren que totes les fraccions tenen liposomes amb una distribució de grandàries equivalent a la de les suspensions originals. Com a conseqüència d'aquests resultats, és possible realitzar quantificacions de fosfolípid a les fraccions d'elució mitjançant la DO.

4.1.5 QUANTIFICACIÓ DEL DITRANOL PER ESPECTROSCOPIA UV-Vis (VALIDACIÓ DE Q%).

Per determinar la validesa del quocient Q% (Ap. 3.1.1.4) en la determinació de l'estat de degradació del ditranol, s'han analitzat dissolucions del fàrmac en diferents disolvents exposades o no a la llum. Es realitzà la determinació de la riquesa segons el mètode adaptat (Eq. 2) que es descriu a la USP XX i es compararen els resultats amb els valors de Q%.

La Fig. 35 mostra la relació entre tots dos valors. S'observa que Q decreix ràpidament al disminuir la riquesa de ditranol, de forma que podem detectar fàcilment riqueses per sota del 90 % de ditranol. Es posa de manifest el caràcter semi-quantitatiu de Q% degut a la relació que té lloc a alts percentatges de riquesa de ditranol amb el mètode quantitatiu acceptat. Per tant, és factible la seva aplicació per avaluar l'estat del ditranol durant els diferents processos de preparació de liposomes, essent possible relacionar el seu valor amb la riquesa del fàrmac, en especial per sota del 90 %.

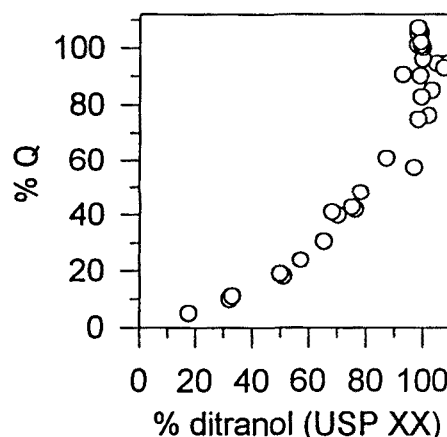


Fig. 35 Relació entre la riquesa en ditranol determinada segons la USP XX (adaptada) i el quocient Q%.

4.1.6 QUANTIFICACIÓ DE LA RELACIÓ OLI DE BORRATGE/FOSFOLÍPID PER ESPECTROSCÒPIA D'INFRAROIG.

Aquesta tècnica s'ha emprat per analitzar la relació en pes entre aquestes dues molècules en diferents preparacions. Les mostres analitzades foren les fraccions que s'obtingueren per centrifugació de les emulsions OB/F obtingudes amb el Microfluidizer. El mètode s'ha basat en les intensitats relatives entre els pics a 968 cm^{-1} i 1468 cm^{-1} . D'acord amb l'assignació dels pics de la fosfatidilcolina d'ou (Ap. 4.2.1), el pic a 968 cm^{-1} correspon a la tensió del grup colina de la molècula, grup que no està present al triglicèrid (Fig. 36). D'altra banda,

l'absorció a 1467 cm^{-1} correspon a les dues molècules a la deformació CH_2 . Així, s'ha estudiat la variació del quocient d'intensitats als número d'ona indicats en funció de la quantitat relativa de cada molècula. Els patrons es realitzaren amb mescles de oli de borratge i Pro-Lipo S, les quals s'assecaren sobre finestres de AgCl , segons el descrit a l'Ap. 3.1.2.3, per tal d'obtenir pel·lícules. Els resultats que es mostren a la Fig. 37 estan expressats en fració en pes d'oli de borratge al patró (m_{OB}). La relació amb el tant per u d'oli amb que es mostren els resultats de les emulsions vé donada per l'expressió:

$$\frac{p_{OB}}{p_F} = \frac{m_{OB}}{1 - m_{OB}} \quad \text{Eq. 16}$$

on:

p_i indica la quantitat de la substància i

m_{OB} indica la fració en pes d'oli de borratge a la mescla analitzada.

L'anàlisi de correlació proporciona els següents resultats:

Coefficient de determinació (r^2): 0,9946

Coefficient de regressió (r): 0,9973

Test de significació de la correlació: $F_{1,19} = 3469$; ($F_{\text{crit}} = 4,38$)

Error standard: 0,0214

Els resultats ens indiquen que es poden realitzar determinacions quantitatives amb una precisió del valor de m_{OB} de $\pm 0,03$. Cal esmentar que també es varen assajar altres quocients d'intensitats proporcionats per altres pics (1486 cm^{-1} , 1740 cm^{-1}), però fou l'indicat anteriorment el que mostrà uns resultats més precisos.

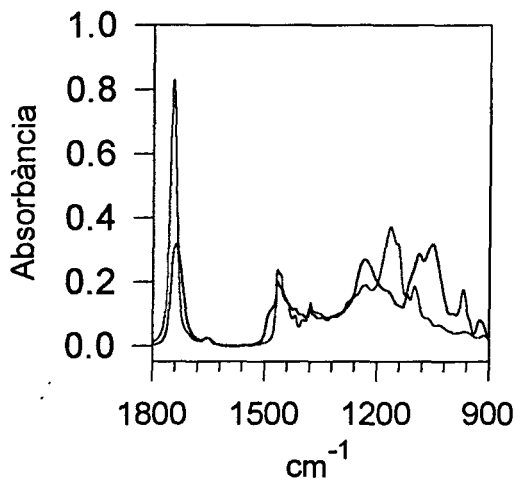


Fig. 36 Espectres d'absorció a l'infraroig de l'oli de borratge (vermell) i dels fosfolípids que constitueixen el Pro-Lipo S (negre).

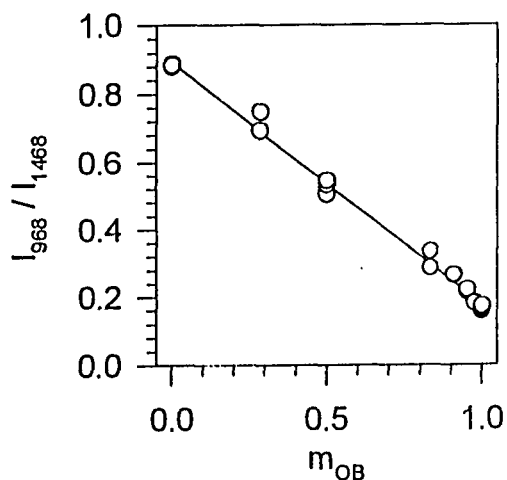


Fig. 37 Relació entre el quocient d'intensitats a 968 cm^{-1} i 1467 cm^{-1} i la fració en massa d'oli de borratge en una mescla amb Pro-Lipo S.

4.1.7 UTILITZACIÓ DE L'ÍO CROMAT COM A MARCADOR DEL VOLUM INTERN DELS LIPOSOMES.

L'ús del cromat per aquesta finalitat va anar precedida per l'estudi de la seva idoneïtat. Aquest procés es dugué a terme en diferents etapes:

- la determinació de l'estabilitat de l'anió en medis que continguessin els alcohols que presenten les mostres preparades a partir de Pro-Lipo S (els altres tipus de suspensions de liposomes no presenten cap altre disolvent diferent de l'aigua),
- la estabilitat química dels fosfolípids en presència de l'ió cromat,
- la detecció de les possibles variacions de la concentració de cromat al processar les mostres en el Microfluidizer,
- i la mesura de la fuga de l'anió encapsulat en liposomes que es pot produir durant la cromatografia per columnes d'exclusió molecular.

Donada la presència d'alcohols en la composició dels Pro-Lipo S, inicialment es va seguir l'estabilitat de l'anió en medis que els continguessin. Per a tal fi s'estudià l'evolució amb el temps de diferents dissolucions de cromat amb una concentració inicial de $1,04 \cdot 10^5$ ppb de crom (2 mM CrO_4^{2-}) en:

Mostra A: dissolució de tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4, etanol i glicerol, 95:3,3:1,67 (p/p/p). Aquesta relació és equivalent a la que proporciona una suspensió de liposomes de 50 mg de F/mL obtinguda a partir de Pro-Lipo S.

Mostra B: una dissolució d'etanol (33 %) i glicerol (16,7 %) en el tampó esmentat anteriorment. La mescla equival a la composició en alcohols dels Pro-Lipo S subministrats pel fabricant.

Mostra C: el tampó descrit anteriorment.

Les anteriors dissolucions de cromat es mantingueren a 4°C i en la foscor. A diferents intervals de temps es prengueren alíquotes. Aquestes es centrifugaren (12.500g , 5 minuts) i es mesurà l'absorbància a 274 i 370 nm de dilucions dels sobrenedants en tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4 ($150 \mu\text{L}$ sobrenedant / $850 \mu\text{L}$ tampó). Durant l'anàlisi, les dilucions dels sobrenedants corresponents a la mostra B (amb alt contingut d'alcohols) mostraren una variació de l'absorbància que s'estabilitzà a partir dels 3 minuts, fet pel qual s'esperà aquest temps per fer les lectures de totes les mostres.

Els resultats mostren, d'una banda, les variacions de la concentració del cromat. Aquesta s'ha expressat mitjançant el quocient entre l'absorbància a 370 nm en un temps determinat, i l'absorbància inicial a la mateixa longitud d'ona (Fig. 38). També mostren, encara que de forma qualitativa, les variacions en la composició de les mostres, expressant-se pel quocient entre les absorbàncies a 370 i 274 nm en un moment donat i el seu valor a temps zero (Fig. 39). Com s'aprecia, únicament la preparació amb alt contingut d'alcohols mostra un baixa estabilitat del

Cr⁶⁺ que es manifestà, a més de la disminució de l'absorbància a 370 nm i la variació del quocient d'asorbàncies, per l'aparició d'una coloració verdosa que origina un precipitat del mateix color (compostos de Cr³⁺).

Per determinar si l'anió cromat incrementa la hidròlisi dels fosfolípids fins el moment de la determinació del volum encapsulat, es realitzà una cromatografia en capa prima on es compararen les taques proporcionades per una suspensió de liposomes preparada en presència de l'anió (2 mM de cromat), amb les corresponents a una suspensió exempta d'ell, i a les d'una dissolució clorofòrmica del fosfolípid emprat com a matèria primera. Les suspensions foren de MLV i es prepararen a partir d'Emulmetik 930, fet pel qual calgué escalfar les mostres a 50-60°C durant la seva preparació. Les taques obtingudes a les capes primes foren les mateixes en tots els casos (SPC majoritària amb una petita quantitat de liso-SPC), pel que es pot afirmar que no hi ha una degradació apreciable dels fosfolípids. El fet de que no es detecti un increment de la quantitat de liso-SPC en un proces en el qual hi ha un escalfament important de la mostra, permet assegurar que tampoc no hi ha cap degradació en aquells mètodes que es realitzen a temperatura ambient (Pro-lipo S, sonicació, processament en el Microfluidizer,...).

Conegudes tant la estabilitat de l'ió cromat en medis amb alcohols, com l'estabilitat dels fosfolípids en presència d'aquest anió, es determinà si durant el processament en el Microfluidizer es produïen variacions de la concentració i composició de les dissolucions de cromat. Per això s'hi feren passar, fins un total de 15 cicles i a 4 bars de pressió d'entrada, 45

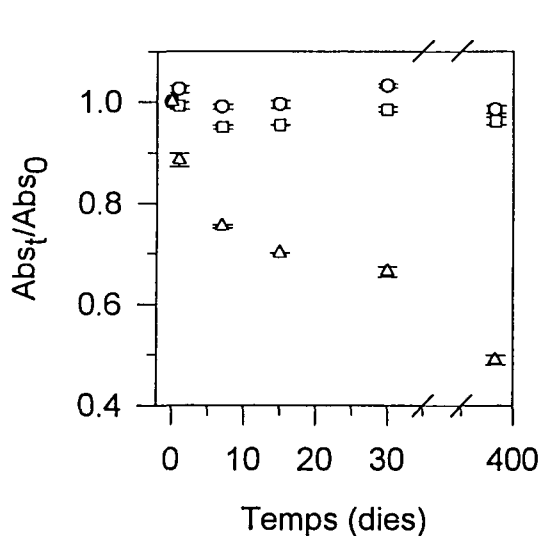


Fig. 38 Evolució de la concentració de cromat al llarg del temps en diferents dissolucions: Tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4: (○); Tampó amb quantitats d'etanol (3,3%) i glicerol (1,67%) equivalents a la que proporciona una suspensió de liposomes de 50 mg F/mL obtinguda a partir de Pro-Lipo S: (□); Tampó amb etanol al 33% i glicerol al 16,7%: (▽).

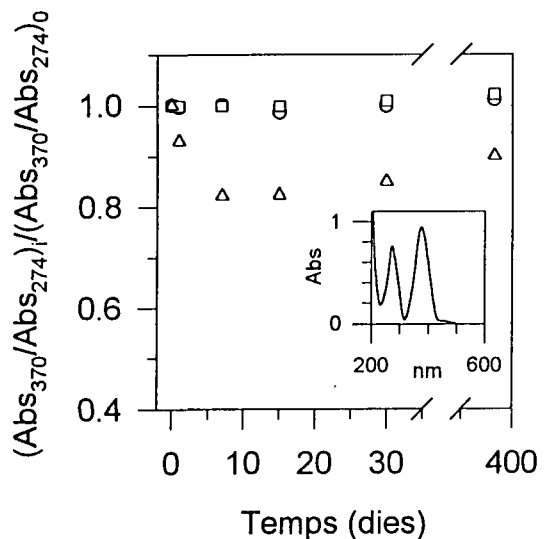


Fig. 39 L'evolució amb el temps de la relació dels pics a 274 i 370 nm s'ha emprat per seguir l'estabilitat del Cr⁶⁺. Els símbols es corresponen als de la Fig. 38. El gràfic insertat mostra l'espectre d'absorció del cromat.

mL de Mostra A, prenent-se alíquotes als 1, 3, 5, 7 i 9 cicles. Les anàlisi de les mostres no detectaren variacions significatives ni de la concentració de l'anió ni del quocient d'absorbàncies (Fig. 40).

El darrer assaig de la posta a punt del mètode consistí en determinar el grau de desencapsulació del cromat que té lloc durant l'elució en columnes d'exclusió molecular. Aquest fet cal tenir-lo present en el càlcul del volum encapsulat. Si la fuga del cromat des de l'interior dels liposomes durant la seva elució és massa gran, la hipòtesi de que la concentració al medi aquós intern dels liposomes acabats d'eluir és la mateixa que la del medi extern de la suspensió mare, serà falsa. En aquest cas els volums encapsulats que es calculin serien menors al reals. Tenint en compte que l'elució dels liposomes en les condicions descrites té lloc en uns 4 minuts (Ap. 3.2.4.1), i que els liposomes que més fuga poden mostrar son els SUVs, es va determinar la fuga en un interval de 30 minuts per suspensions compostes per aquest tipus de liposomes.

Així, a les columnes d'exclusió molecular s'aplicaren 200 μ L de suspensions de SUVs amb cromat ($1,04 \cdot 10^5$ ppb de crom) obtingudes a partir de Pro-Lipo S en el Microfluidizer. L'elució es realitzà amb el tampó del medi (fosfat sòdic 10 mM, pH 7,4) que contingué Na_2SO_4 2 mM per tal de minimitzar els canvis de pressió osmòtica. Un cop recollida la fracció amb liposomes (aprox. 2 mL) s'esperà 15 i 30 minuts per realitzar aplicacions d'alíquotes seves, de les quals es recollí de nou les fraccions amb SUVs. Les quantificacions de fosfolípid mitjançant la DO a 550 nm i la de crom per absorció atòmica, permeteren calcular el volum encapsulat en

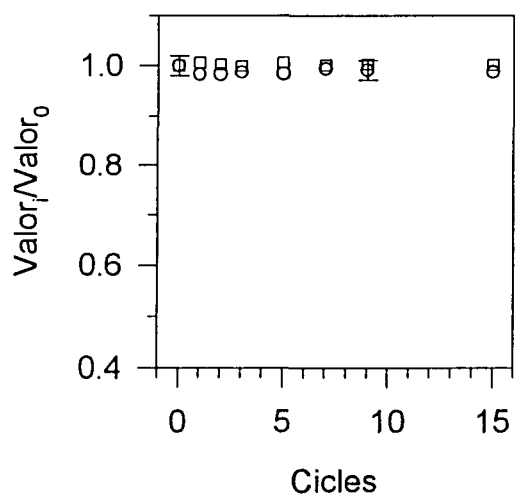


Fig. 40 El processament de dissolucions de cromat en el Microfluidizer no produeix variacions significatives de la concentració:(○), ni de l'estabilitat de l'anió: (□). El gràfic mostra, referits als valors inicials de la dissolució mare, l'evolució de la concentració i del quocient de les absorbàncies a 274 i 370 nm en funció del número de cicles.

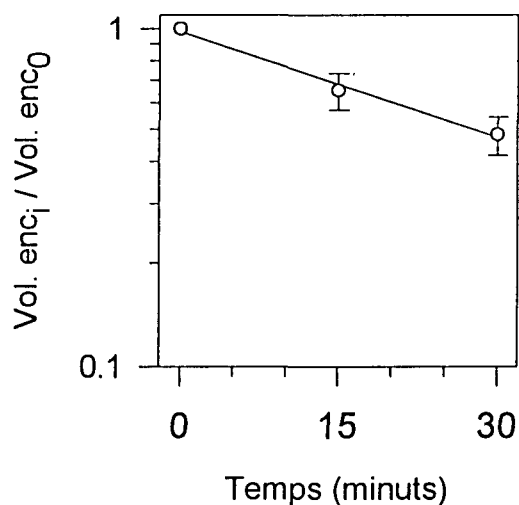


Fig. 41 Variació del volum encapsulat inicial en SUVs en funció del temps. A partir dels resultats ($n=3$) de la fuga del cromat s'aprecia que, en el temps d'elució en columnes PD-10 (uns 4 minuts), la disminució màxima del volum encapsulat inicial és del 10 %.

cada cas¹⁹. La seva variació és indicativa de la desencapsulació del cromat. A la Fig. 41 es mostren els resultats expressats com el quocient entre el volum encapsulat en un moment donat (i) i el valor inicial (0). S'observa que en el temps que dura l'elució dels liposomes (4 minuts) es produeix una desencapsulació màxima del 10 %. Aquest valor s'ha tingut en compte únicament per tal de corregir els volums encapsulats dels SUVs, ja que és especialment en aquest tipus de vesícula on la permeabilitat està incrementada com a conseqüència del petit radi de corvatura que presenten.

4.1.8 MESURA DEL DIÀMETRE DE LIPOSOMES MITJANÇANT EL MICROTRACK UPA 150.

Donada la novetat de la utilització d'analitzadors d'espectres de freqüències per a l'anàlisi de grandàries de partícules, s'ha dut a terme un estudi de la seva viabilitat per la determinació de diàmetres de liposomes, aplicació encara menys estesa. Aquest estudi s'ha realitzat en diferents apartats, de forma que en conjunt caracteritzen les variables que afecten a les lectures amb l'aparell. Així, les seccions i continguts dels quals es compona aquest apartat són:

- 4.1.8.1- L'anàlisi de la variabilitat en la determinació del diàmetre i l'amplada (dispersió de la població) de liposomes en funció del temps de lectura de l'aparell i en funció de la grandària de les vesícules analitzades.
- 4.1.8.2- L'anàlisi de la variabilitat en la determinació del percentatge de partícules en cada interval de classe (canal) en què està dividit el rang de lectura, en funció del temps de lectura del Microtrack UPA 150, i en funció de la grandària dels liposomes.
- 4.1.8.3- L'anàlisi de la variabilitat global en tots els canals en funció del temps de lectura i en funció de la grandària dels liposomes.
- 4.1.8.4- Estudi de l'exactitud del Microtrack UPA 150 en funció de la concentració de les mostres analitzades.
- 4.1.8.5- Anàlisi de l'efecte creuat entre el temps de lectura, el diàmetre i la concentració.
- 4.1.8.6- La determinació de l'exactitud del Microtrack UPA 150 mitjançant la comparació dels resultats obtinguts amb els que proporcionen altres mètodes.
- 4.1.8.7- La determinació de la precisió i exactitud en mostres bimodals.

4.1.8.1 VARIABILITAT EN LA DETERMINACIÓ DEL DIÀMETRE I AMPLADA.

Per realitzar aquest estudi s'obtingueren suspensions de liposomes de diferents diàmetres de forma que s'abarqués en el possible el rang de lectura de l'aparell. Així, d'una

¹⁹ A 550 nm no hi ha interferència del cromat en la quantificació dels fosfolípids mitjançant la densitat òptica, ja que a aquesta longitud d'ona i en el rang de concentració que es treballa, l'anió no presenta una absorbància mesurable. Observi's la Fig. 39.

banda, es prepararen MLVs amb EPC/PA 9:1 (mol/mol) en tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4 a una concentració de fosfolípids de 4 mg F/mL. Part de la preparació no s'extrusionà, part s'extrusionà, i la resta es sonicà (Ap. 3.2.3). D'aquesta forma, partint dels MLVs, es disposà de les següents 6 suspensions:

- | | |
|------------------------------------|------------------------------------|
| 1) No extrusionada (No extr.) | 2) Extrusionada fins 800 nm (E800) |
| 3) Extrusionada fins 400 nm (E400) | 4) Extrusionada fins 200 nm (E200) |
| 5) Extrusionada fins 100 nm (E100) | 6) Sonicada (Sonic.) |

D'altra banda, a partir de Pro-Lipo S i en el mateix tampó, es prepararen SUVs mitjançant el Microfluidizer, processant la mostra 9 vegades a 4 bar de pressió d'entrada (suspensió indicada com Microf. als gràfics).

De cadascuna d'aquestes 7 suspensions es diluí fins que el senyal al detector de l'aparell tingués un índex situat entre 0,1 i 0,15. Tot seguit es realitzaren lectures de diferent temps de durada amb el Microtrack UPA 150. Els temps escollits i els replicats foren:

Temps de lectura (min.)	1	3	7,5	15
Número de lectures	15	5	3	3

Taula 6 Durada i número de lectures realitzades amb totes les suspensions de liposomes.

Prèviament a les anàlisi dels MLVs no extrusionats, es comprovà que no es produís una sedimentació apreciable d'aquestes vesícules en 15 minuts, ja que aquest supòsit interferiria en els resultats del l'aparell, el qual fonamenta tots els càlculs en que les partícules de les suspensions analitzades tenen un moviment brownià. Per aquest motiu es determinà la densitat òptica a 780 nm i durant 15 minuts de dilucions d'aquesta preparació²⁰. La constància del valor inicial durant aquest temps permetè realitzar les anàlisi de 15 minuts, de forma que entre cadascuna de les 3 lectures de 15 minuts s'agità la mostra.

Els valors de diàmetres i amplades proporcionats per les lectures es mostren a la Fig. 42. Mitjançant el test de Kolmogorov-Smirnov es comprovà que per tots els temps de lectura els resultats de diàmetre i amplada s'ajusten a una distribució normal. Pel que fa a la comparació de les mitjanes de cada temps per cada tipus suspensió, no es trobaren diferències significatives ($\alpha=0,05$).

Per tal de determinar el temps mínim de lectura en l'anàlisi del diàmetre i amplada dels diferents tipus de liposomes, s'emprà la desviació standard i el coeficient de variació que proporcionaren cadascun dels temps d'anàlisi de la Taula 6. Prèviament, però, calguè caracteritzar cadascuna de les 7 preparacions segons la seva situació dins del rang de lectura de l'aparell. Això es realitzà amb el diàmetre obtingut com a mitjana de les mitjanes de cada

²⁰ El Microtrack UPA 150 realitza l'anàlisi mitjançant un feix làser de 780 nm de longitud d'ona, per aquest motiu s'excolli aquest valor per a la detecció de la possible sedimentació.

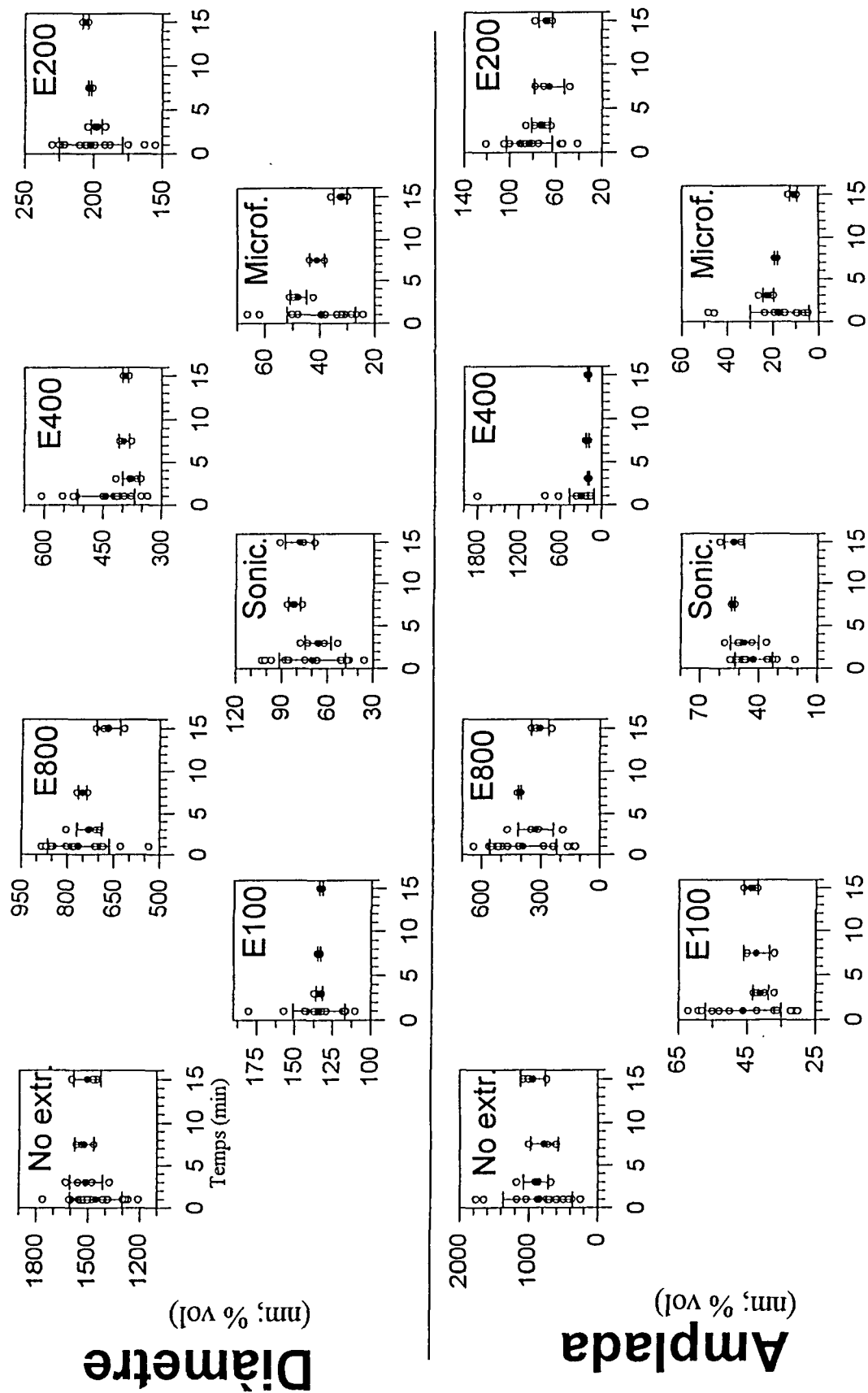


Fig. 42 Resultats de les anàlisi amb el Microtrack UPA 150 de diferents tipus de suspensions de liposomes. El diàmetre i l'amplada es representen en funció del temps de durada de cada lectura. Els símbols blancs corresponen als valors experimentals, els negres a les mitjanes, i les barres indiquen la desviació standard dels valors. Les unitats de tots els eixos d'abcises corresponen a TEMPS (min), i les dels d'ordenades a nm (% vol).

temps (Taula 7).

	Suspensió						
	No extr.	E800	E400	E200	E100	Sonic.	Microf
Diàmetre \pm std (nm, % vol) (n=4)	1498 \pm 30	728 \pm 42	403 \pm 28	202 \pm 3,3	134 \pm 0,5	74 \pm 25,7	40 \pm 23
Amplada \pm std (nm; % vol) (n=4)	871 \pm 67	357 \pm 48	221 \pm 47	72,8 \pm 7,4	43,3 \pm 2,2	49,0 \pm 5,1	17,1 \pm 4,6

Taula 7 Diàmetres i amplades dels liposomes cada tipus de suspensió obtinguts a partir de la mitjana de les mitjanes proporcionades per cada temps de lectura.

Els resultats es presenten a les Fig. 43 a i b, on es representa la desviació

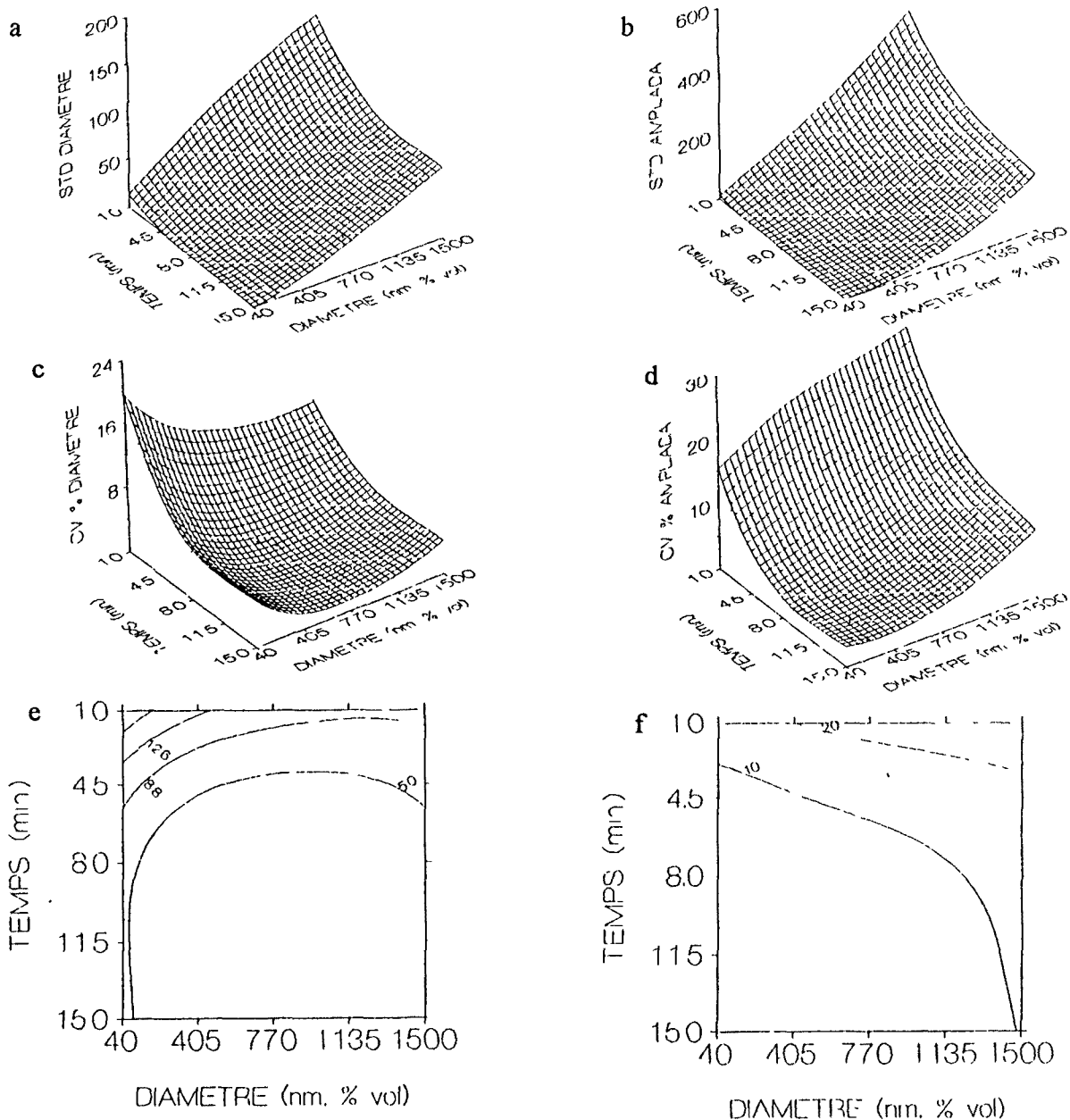


Fig. 43 (a,b,c,d): Desviacions standard i coeficients de variació del diàmetre i de l'amplada en funció del temps de durada de l'anàlisi i de la grandària de la població de liposomes analitzada. (e,f): Corbes de nivell dels coeficients de variació.

standard (STD) del diàmetre i de l'amplada dels liposomes de les suspensions analitzades en funció del temps de lectura i del diàmetre mitjà mostrat a la Taula 7. En els gràfics s'aprecia que la desviació standard del diàmetre i l'amplada depenen d'una manera directament proporcional a la grandària dels liposomes analitzats i inversament proporcional al temps de lectura. A partir d'aquestes dades obtenim els corresponents coeficients de variació (CV) i llurs corbes de nivell (Fig. 43 c,d,e i f). Com s'observa, el coeficient de variació presenta una marcada dependència del temps de lectura.

En els gràfics anteriors és possible estimar el temps de lectura mínim que proporciona el menor coeficient de variació. En el cas del coeficient de variació del diàmetre, aquest fet té lloc a partir d'un temps que se situa entre els 4,5 i 8 minuts, interval en el que assoleix un valor mitjà del 5 %. Pel que fa al coeficient de variació de l'amplada, el seu valor mínim mitjà és del 10 %, el temps mínim necessari per assolir-lo és d'uns 8 minuts. Així, per a les anàlisi de preparacions que continguin liposomes de grandàries compreses entre els 40,2 i 1498 nm, aquests resultats posen de manifest que és necessari un temps mínim de lectura de 8 minuts per determinar el diàmetre i l'amplada amb les precisions indicades anteriorment.

Establert el temps de lectura mínim, per cada diàmetre s'ha calculat l'interval de confiança al 95 % de probabilitat en el qual cal esperar qualsevol lectura de 8 o més minuts de durada. Per cada diàmetre només es disposa de tres lectures que superin els 8 minuts, però com s'observa a la Fig. 43, l'error experimental és pràcticament constant a partir d'aquesta durada. És per això que les mitjanes i error experimentals presentats a la Taula 7 s'han emprat per determinar els paràmetres de l'Eq. 14. En aquest cas, la matriu X_0 de l'Eq. 14 consta únicament del valor de la mitjana, fet pel qual la varianza dels residuals és la mateixa que la varianza experimental (el model consta únicament de l'ordenada a l'origen). Per tant, l'interval de confiança al voltant de les mitjanes de la Taula 7 val:

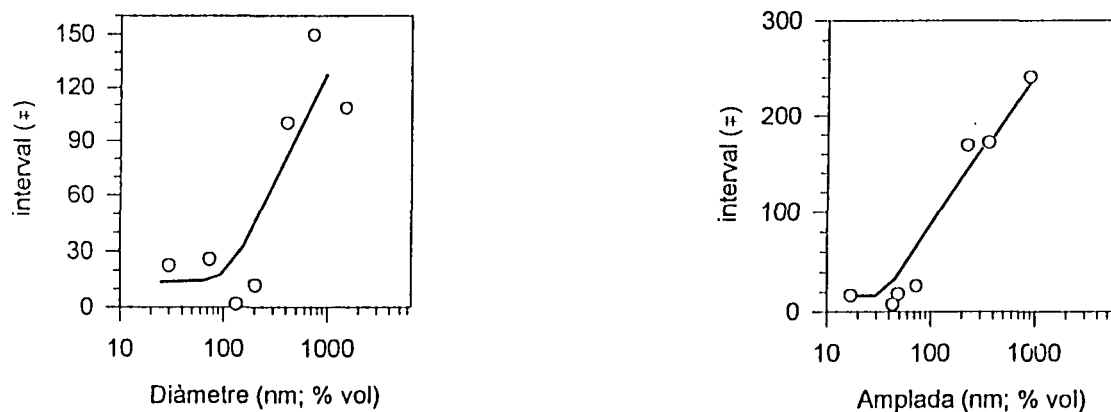


Fig. 44 Intervals de confiança del diàmetre i l'amplada (al 95 % de probabilitat) de les lectures realitzades en 8 o més minuts.

$$CI_{(95\%)} = \pm std \sqrt{1,25 F_{1,n-p}} = \pm 3,56 std \quad Eq. 17$$

on:

std: indica el valor de la desviació standard de la mitjana,

$F_{1,n-p}$: indica el valor de la F de Fisher, al 95 % de probabilitat, amb 1 grau de llibertat al numerador, i $n-p$ graus de llibertat al denominador. Com que $n = 4$ (la mitjana s'ha obtingut a partir de 4 valors) i $p = 1$ (el model està format per un únic paràmetre, que és la mitjana) el valor és $F_{1,3}=10,13$.

A la Fig. 44 es mostren els intervals de confiança al 95 % de probabilitat dins dels quals cal esperar una lectura realitzada durant 8 o més minuts. Els valors corresponents a l'amplada s'han calculat de la mateixa manera que els dels diàmetres: emprant les mitjanes i desviacions standard de la Taula 7 juntament amb l'Eq. 17.

Donat el funcionament acumulatiu de l'aparell (els resultats de diàmetre i amplada obtinguts amb un determinat temps de lectura són equivalents als que proporcionaria la mitjana d'altres anàlisi de temps inferior, però que sumessin un temps total equivalent), les mitjanes i error experimentals de la Taula 7 són equivalent a les que proporcionarien lectures d'un temps total de 1h 38 min. Això ha permès obtenir les distribucions de diàmetres de cada suspensió que originaria una anàlisi d'aquesta durada (Fig. 45). És per això que les mitjanes i errors experimentals en cada canal de lectura de les distribucions anteriors s'han pres com a model en els següents apartats de l'estudi.

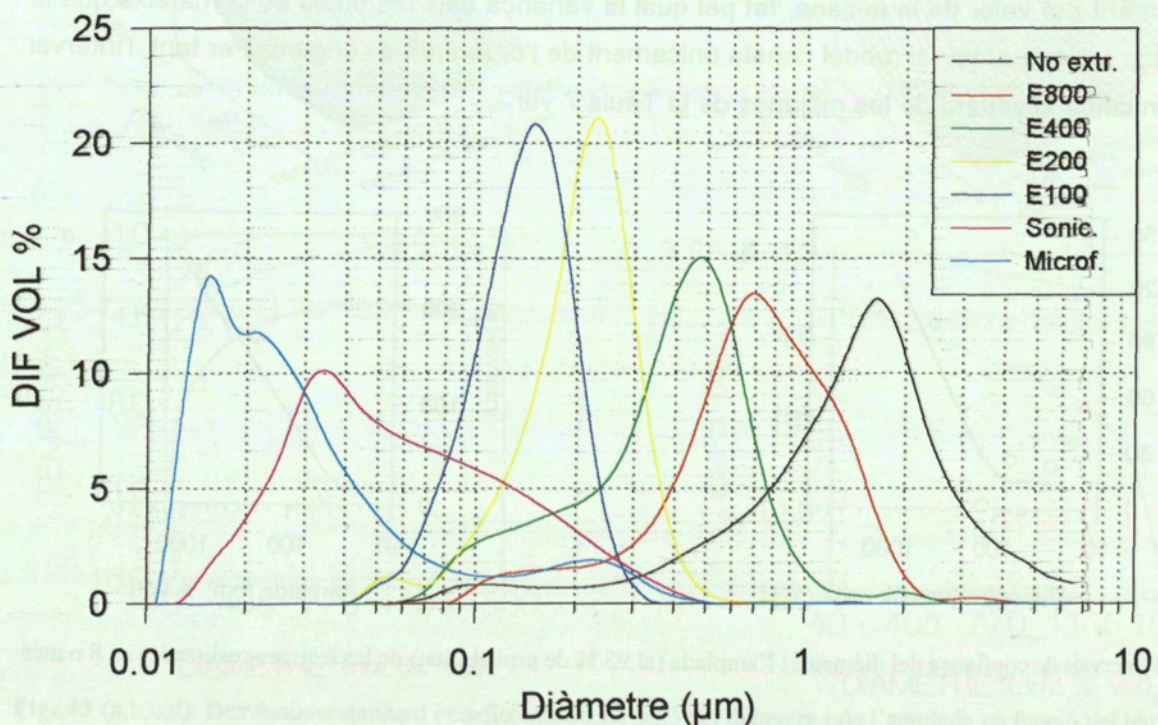


Fig. 45 Distribució de diàmetres dels liposomes emprats per a l'estudi de la precisió del Microtrack UPA 150. Cada gràfic s'ha obtingut com a mitjana de les mitjanes de cada temps d'anàlisi.

El comptatge del número de punts experimentals que cauen dins dels intervals de la Fig.44 permet avaluar el temps de lectura mínim que proporciona resultats que no són estadísticament diferents del que proporciona una lectura d'1h. 38min. Això és cert quan el percentatge de punts dins de l'interval és de l'ordre de la probabilitat que s'ha establert (95%). Per tant, s'ha seguit aquest criteri per tal de comprovar si el temps de lectura mínim escollit compleix aquesta condició. Els resultats es mostren a la Fig.46. Donat que les diferències entre els diferents tipus de liposomes no foren significatives, als gràfics es mostren els percentatges de punts experimentals que cauen dins dels intervals de confiança únicament en funció dels temps d'anàlisi. Les barres d'error corresponen a la desviació standard de cada mitjana obtinguda a partir dels set tipus de preparacions. Es confirma la necessitat de realitzar lectures amb un temps major o igual als 8 minuts.

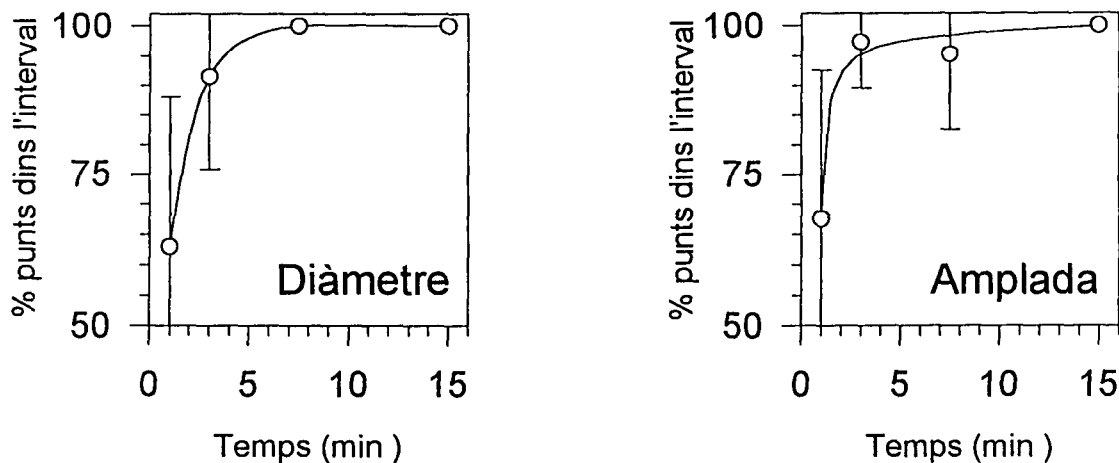


Fig. 46 Percentatge de punts experimentals de diàmetre (a) i amplada (b) que es situen dins l'interval de confiança al 95% de probabilitat establert al voltant del valor del model (equivalent a una lectura d'1h 38 min).

4.1.8.2 DETERMINACIÓ DE LA TOLERÀNCIA EN ELS CANALS DE LECTURA.

A partir de les anàlisi efectuades a la secció anterior es realitzà l'estudi de la precisió dels resultats en cada canal de mesura de l'aparell (intervals de classe amb els que el programa que governa l'aparell divideix el rang de lectura).

Per al present estudi es treballà en el que el fabricant anomena modus standard, és a dir, amb 45 intervals de classe, de forma que cadascun d'ells és 1,189 vegades (arrel quarta de 2) més gran que l'anterior. Aquest mètode és el resultat de la conversió directa de les dades obtingudes pel detector de l'aparell, ja que quan es treballa en progressió geomètrica de 1.091 (arrel vuitena de 2) es tenen 90 intervals de classe, i el que té lloc és una interpolació a partir de les dades originals.

Les anàlisi amb el Microtrack UPA 150 de cadascuna de les 7 suspensions emprades a l'apartat 4.1.8.1 durant els mateixos temps (15 lectures d'1 min, 5 lectures de 3 min, 3 lectures de 7,5 min, i 3 lectures de 15 min) mostren resultats similars als que es presenten a la Fig. 47 pel cas de l'E200. S'observa que per cada canal de lectura s'obté un núvol de punts. Cadascun d'aquests punts és el resultat, en un canal determinat, d'un dels replicats realitzats. És a partir d'aquests valors que es porta a terme l'estudi de la precisió en cada interval de classe.

Prèviament a l'anàlisi de la precisió en els canals de lectura es determinà si, per cada tipus de suspensió i per cada canal, els diferents valors que proporcionen les anàlisi durant un

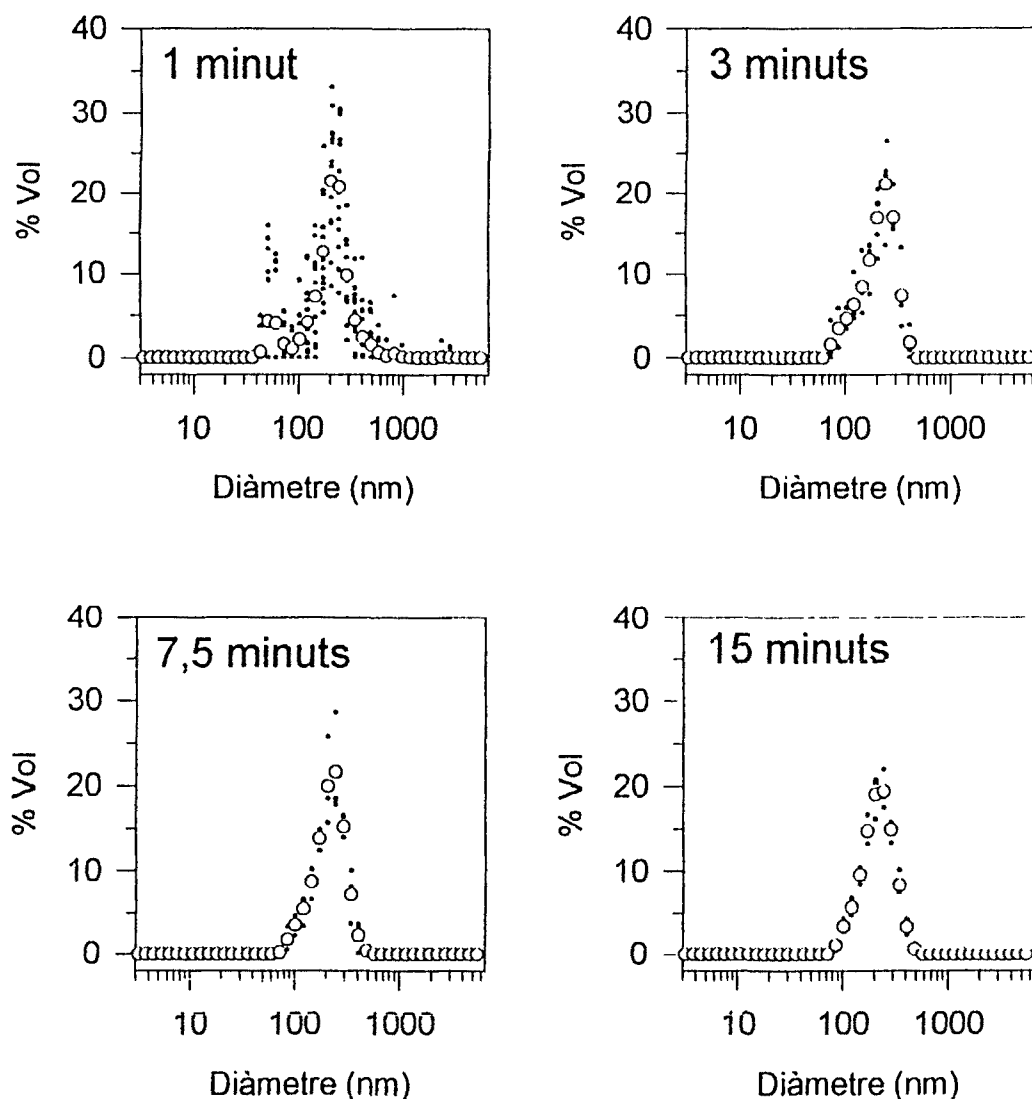


Fig. 47 Resultats de les anàlisi amb el Microtrack UPA 150 d'una suspensió de liposomes extrusionats fins a 200 nm. Cada gràfic correspon a varies lectures de diferent temps de durada. Els punts negres corresponen al percentatge de partícules en cada canal, i els punts blancs la mitjana dels anteriors.

temps determinat segueixen una distribució normal (test de Kolmogorov-Smirnov). Aquest estudi es dugué a terme només en aquells canals que donaren un resultat diferent del nul. La resta d'interval·ls de classe no fou considerada, ja que indiquen l'absència de resposta. Els resultats es mostren a la Taula 8. En ella es mostra, en funció del temps de lectura i per a cada un dels 7 tipus de preparacions de liposomes, el percentatge de canals que s'ajusta a una distribució normal.

	Temps de lectura (min.)			
	1 (n=15)	3 (n=5)	7,5 (n=3)	15 (n=3)
No extr.	100	100	100	100
E800	100	100	100	100
E400	90,9	100	100	100
E200	94,7	100	100	100
E100	92,9	100	100	100
Sonic.	95,2	100	100	100
Microf.	95,2	100	100	100
GLOBAL	95,6	100	100	100

Taula 8 Percentatges de canals que s'ajusten a una distribució normal segons el tipus de suspensió i el temps de lectura.

S'aprecia que només en el cas de les lectures d'1 minut una part del canals amb resposta no s'ajusten a la distribució gaussiana. Per aquests temps, els resultats globals, independents del tipus de suspensió, mostren que menys d'un 5% dels canals no ho fan, fet pel qual s'ha considerat que, per qualsevol dels temps estudiants, les diferències entre els valors experimentals sí que són conseqüència de fenòmens aleatoris.

Pel que fa a la comparació de les mitjanes de cada canal per cada tipus de suspensió, no es trobaren diferències significatives entre cap dels quatre temps de lectura ($\alpha=0,05$). La desviació standard de cada canal, per cada tipus de suspensió de liposomes, es mostra a les Fig. 48. S'aprecia un comportament similar al que s'obtingué quan, a la secció anterior, s'avaluà la precisió del diàmetre i amplada: la desviació standard disminueix amb el temps de lectura de la mostra. A la mateixa figura, la lletra *M* (*models*) indica les desviacions standard en cada canal de les corbes de la Fig. 45.

Per tal de quantificar els resultats que es mostren a les Fig. 48, on es posa de manifest l'augment de la precisió amb la durada de l'anàlisi, es calculà, per cada temps i per cada suspensió, la desviació standard mitjana per canal (Std_c). El procediment seguit ha estat el següent:

- 1.- A partir dels *t* replicats de cada temps, s'ha calculat SS_t (Ap. 3.3.1) en cadascun dels *p* canals que tenen una mitjana diferent de zero. El

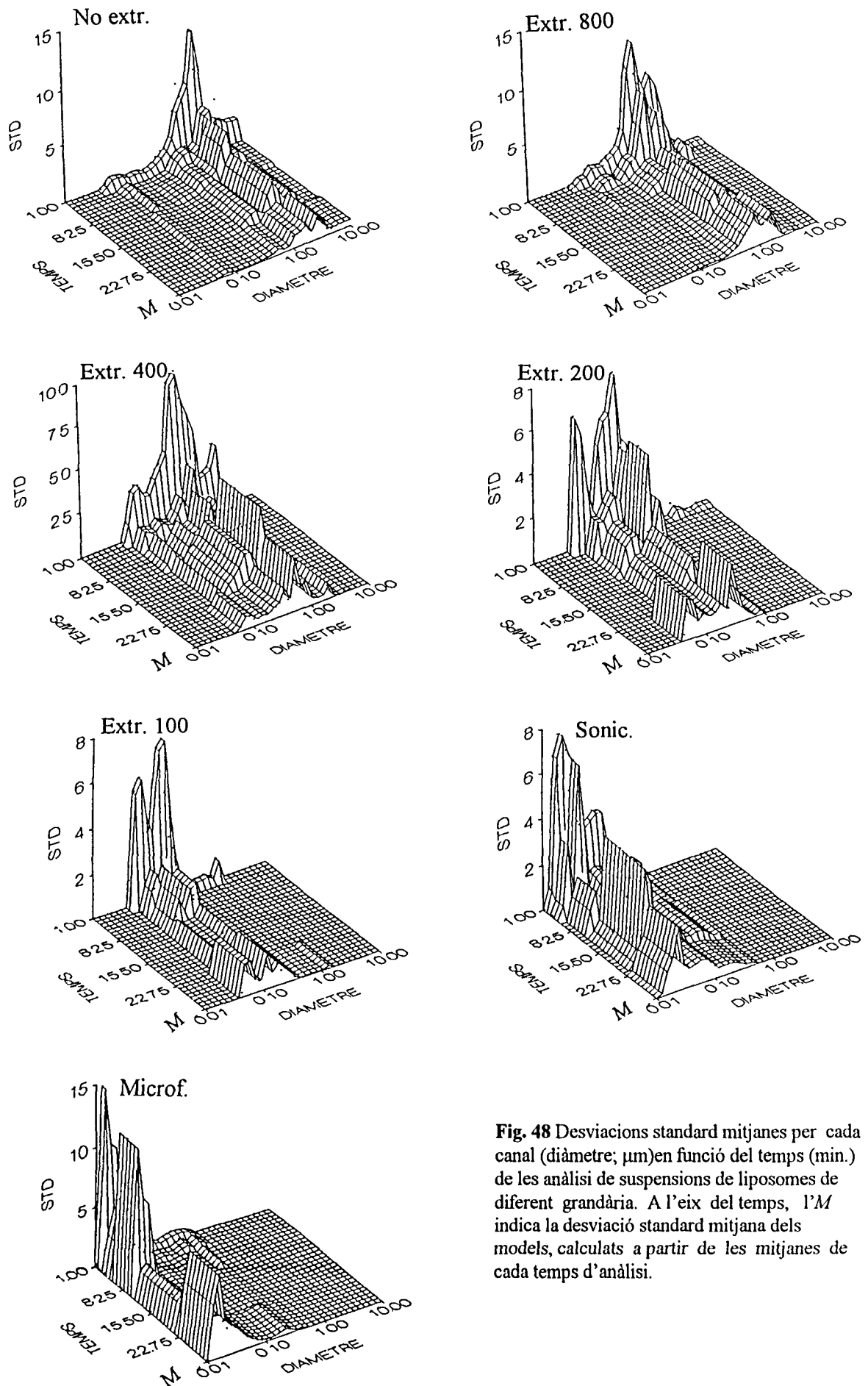


Fig. 48 Desviacions standard mitjanes per cada canal (diàmetre; μm) en funció del temps (min.) de les anàlisi de suspensions de liposomes de diferent grandària. A l'eix del temps, l'*M* indica la desviació standard mitjana dels models, calculats a partir de les mitjanes de cada temps d'anàlisi.

producte $p \times t$, on t és el número de replicats de cada temps, correspon al número total de lectures experimentals n .

2.- El sumatori de les variàncies anteriors ($\sum SS_r$) té associats $n-p$ graus de llibertat, ja que p és també el número de paràmetres (la mitjana de cada canal).

3.- L'arrel quadrada del quocient $\sum SS_r / n-p$ correspon a la desviació standard mitjana per canal.

Aquest procediment queda resumit a l'expressió següent:

$$Std_c = \frac{\sum_p \sum_t (c_{tp} - \bar{c}_p)^2}{p t - p} \quad Eq. 18$$

on:

c_p : correspon al valor de la lectura t en el canal p (només en canals amb mitjana diferent de zero).

\bar{c}_p : correspon a la mitjana en el canal p .

La Fig. 49 mostra els resultats per cada tipus de suspensió i en forma de diagrames de caixes. Els resultats mostren que és necessari un temps mínim de 7,5 min per realitzar qualsevol anàlisi que tingui una variació per canal mínima.

El resultat anterior, i el fet de que per cada tipus de liposoma les mitjanes en cada canal, i per cada temps d'anàlisi, no són significativament diferents, dugué a calcular amb els models

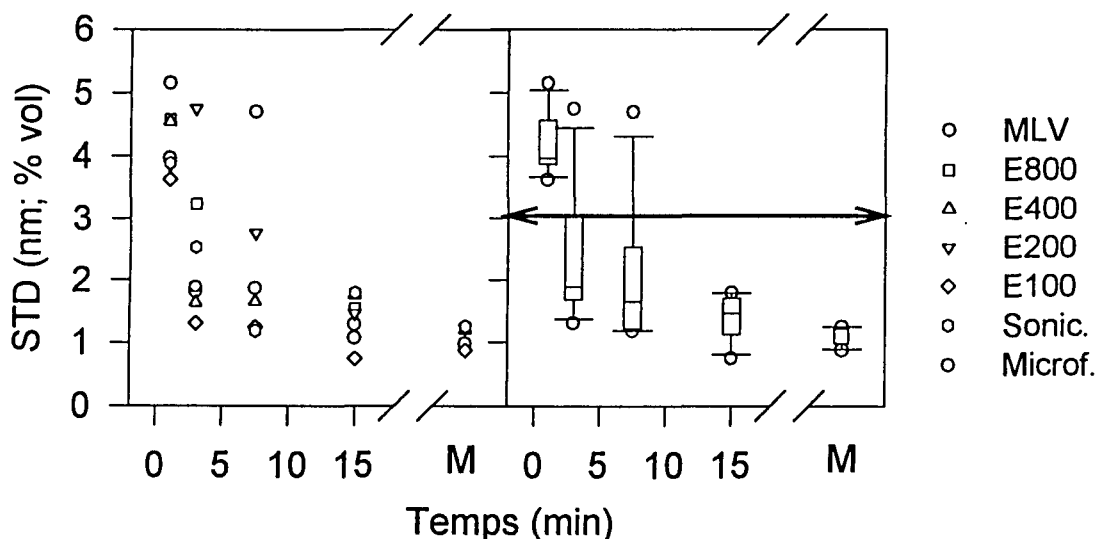


Fig. 49 Valors de la desviació standard per canal de les anàlisi de suspensions de liposomes amb el Microtrack UPA 150. Els diagrames de caixes mostren el valor mitjà d'aquest estadístic en funció del temps de lectura independentment del diàmetre dels liposomes. El valor M d'abcises correspon al del model obtingut a partir de les mitjanes de cada temps.

(Fig. 45) la desviació standard per canal. El resultat està indicat amb la lletra *M* a la Fig. 49. A partir de les dades de la Fig.49, s'ha calculat per cada temps d'anàlisi la desviació standard mitjana per canal independentment del tipus de liposoma analitzat. I amb aquests valors s'han obtingut els respectius intervals de confiança al 95% (Eq. 14), tenint en compte que en aquest cas la desviació s'ha obtingut a partir de 7 valors (Fig. 50). Aquests intervals s'han considerat com la tolerància màxima de les variacions entre lectures d'una mateixa mostra. Donat el comportament asimptòtic el temps de lectura òptim resulta ésser igual o major a 10 min, i en aquest casos el valor mitjà de l'interval és de $\pm 3,4\%$. Cal remarcar que, en aquest cas, i donat a que les unitats d'aquest interval corresponen a percentatge de partícules en volum en cada canal, el símbol de % indica el valor absolut de la població determinat per l'aparell, no un coeficient de variació.

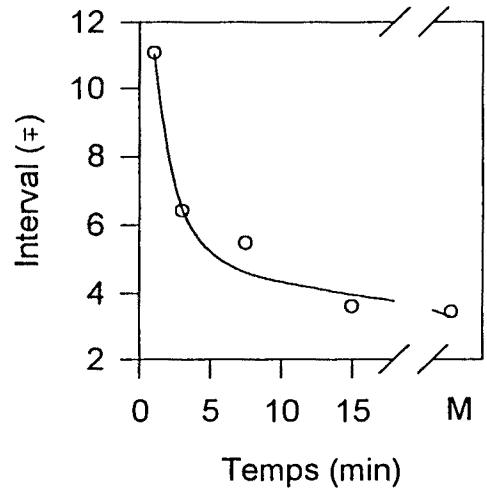


Fig. 50 Interval de confiança al 95% en funció del temps de lectura al voltant dels valors en cada canal.

D'aquesta manera, a les mesures dutes a terme en temps iguals o superiors als 10 min es pot representar, al voltant d'aquells canals amb lectura diferent de zero, un interval de

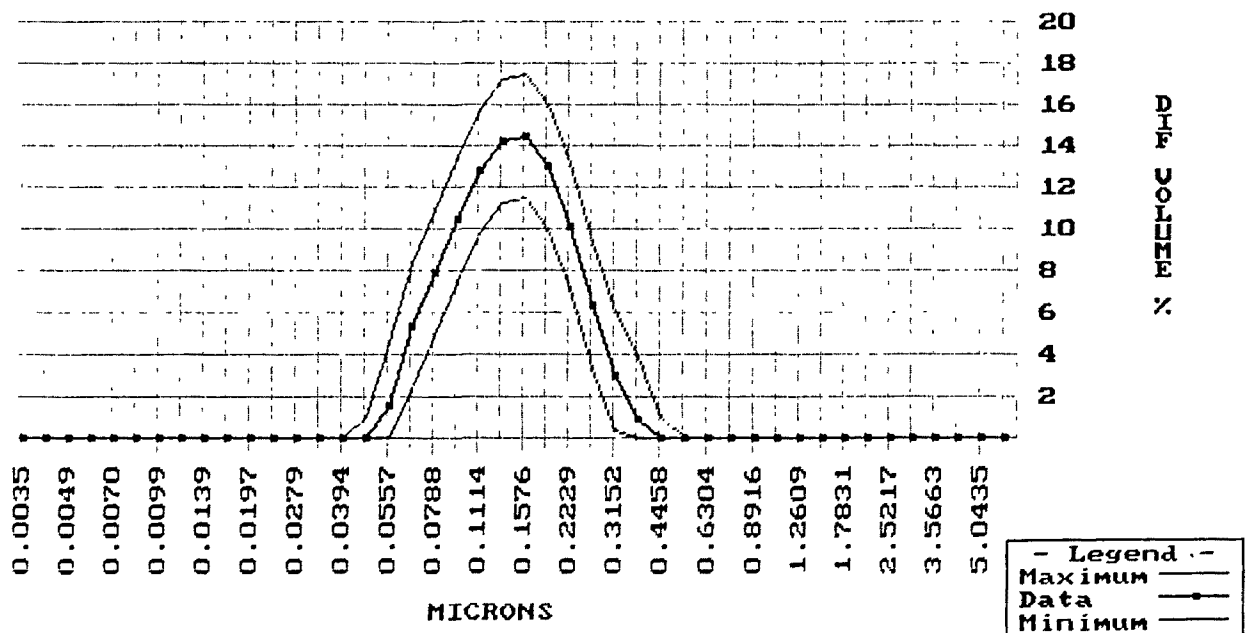


Fig. 51 Límits de tolerància per canal determinats per les mesures de 10 o més minuts realitzades amb el Microtack UPA 150. La mostra analitzada és una suspensió de liposomes extrusionats per membranes de 200 nm.

tolerància que s'ha arrodonit a $\pm 3\%$ (Fig. 51). Les desviacions d'aquesta previsió no poden ser interpretades, en la majoria dels casos, com efectes d'imprecisió de l'aparell, sino que cal considerar-les com variacions de la grandària de les vesícules estudiades.

Com a mètode de comprovació del temps d'anàlisi mínim s'ha emprat la mateixa metodologia que la descrit a l'apartat 4.1.8.1: a partir del percentatge de punts experimentals en cada canal que són dins l'interval de confiança al 95% de la mitjana emprada com a model (que correspon a una lectura d'1h i 38 min). Els resultats es mostren a la Fig. 51, on les corbes de nivell indiquen el percentatge de lectures que se situen dins l'interval. S'aprecia que a l'augmentar el diàmetre de les partícules analitzades és necessari un major temps de lectura perquè els resultats estiguin dins l'interval de confiança. A la vista d'aquests resultats es confirma treballar amb un temps mínim d'anàlisi de 10 minuts. En aquestes condicions els resultats són comparables amb el que proporcionen lectures de fins 1 h 38 min.

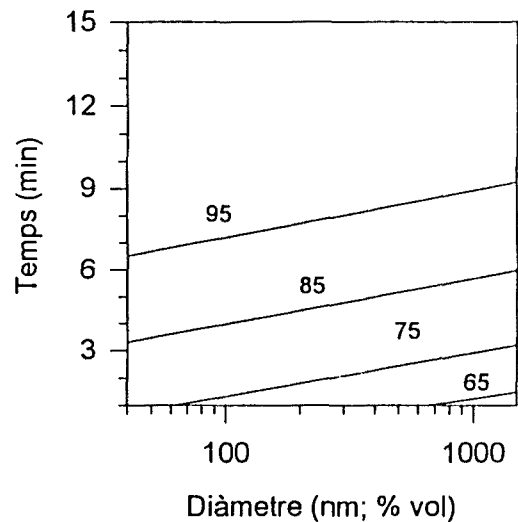


Fig. 52 Variació del percentatge d'anàlisi dins de l'interval de confiança del model amb el temps de lectura i el diàmetre dels liposomes

4.1.8.3 VARIABILITAT GLOBAL EN ELS CANALS DE LECTURA.

Fins el moment s'han determinat el temps mínim de lectura (10 min.) per obtenir resultats reproduïbles del diàmetre, amplada i composició en cada canal, i, per una altra banda, la tolerància en cadascun d'aquests canals ($\pm 3\%$). Qualsevol replicat que sobrepassi aquest límit, és susceptible d'ésser interpretat com una variació significativa en la distribució de diàmetres de liposomes respecte a una lectura de referència. Però resulta arriscat donar per diferents dues mesures que només superin el $\pm 3\%$ en 1 o pocs canals. D'altra banda, si es considera únicament la tolerància en cada canal, dues lectures que es diferenciessin en cadascun dels seus canals en, per exemple, el 2,7 %, no podrien considerar-se diferents, ja que en cap cas es supera el màxim del 3%.

Per tal d'establir un criteri general alhora de considerar que dues lectures diferents, s'ha determinat la variació conjunta de tots els canals de lectura (variació global). El procés es basa en la quantificació, per cada temps d'anàlisi, del valor absolut de la diferència entre varies lectures d'una mateixa mostra. A la Fig. 53 es mostra un exemple del procediment emprat: a partir de dues lectures d'una mateixa mostra (a i b) s'obté la diferència entre elles (d). El valor absolut de la diferència en cada canal és indicatiu de la precisió de les anàlisi.

L'estudi s'ha dut a terme realitzant aquest procediment entre els replicats de la Taula 6,

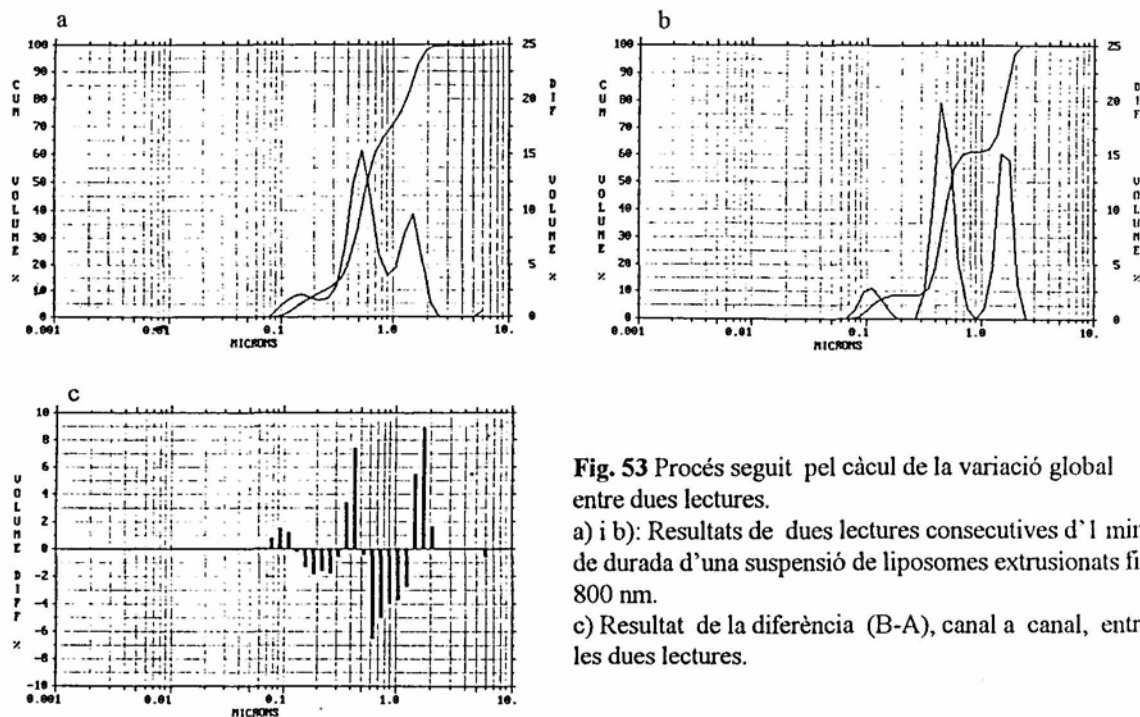


Fig. 53 Procés seguit pel càcul de la variació global entre dues lectures.
 a) i b): Resultats de dues lectures consecutives d'1 min. de durada d'una suspensió de liposomes extrusionats fins 800 nm.
 c) Resultat de la diferència (B-A), canal a canal, entre les dues lectures.

i amb les mitjanes de cada temps (Fig. 45), comparant les lectures dos a dos. No s'apreciaren diferències significatives entre les diferents suspensions per un temps d'anàlisi determinat, fet pel qual s'ha calculat la mitjana per cada temps d'anàlisi. Els resultats es mostren a la Fig. 54. La lletra *M* indica els valors trobats a partir de les mitjanes de cada temps. Com s'aprecia, en augmentar el temps d'anàlisi hi ha una disminució important de la diferència entre mesures que corresponen a una mateixa mostra. A partir d'aproximadament 7,5 minuts la diferència no disminueix en augmentar el temps de lectura, ja que la variació entre canals (variació global) segueix una assíptota horitzontal que val 25%. Aquest valor indica la variació mitjana que cal esperar entre dues lectures que corresponguin a una mateixa mostra que no ha patit cap variació en la seva distribució de grandàries. La diferència és una conseqüència de l'error experimental de l'aparell. Cal tenir en compte que el valor trobat correspon en realitat a una variació que val la meitat, ja que en variar el percentatge de partícules en un canal, s'ha de produir la mateixa variació, però de signe contrari, en un/s altre/s. Per tant, la variació global entre lectures pot oscil·lar entre el 0% i el 200%. Degut a que el programa de l'aparell té funcions que permeten realitzar la diferència entre dues lectures, s'ha optat per expressar la diferència entre elles en el rang total del 0 al 200%.

D'altra banda, com en els apartats anteriors,

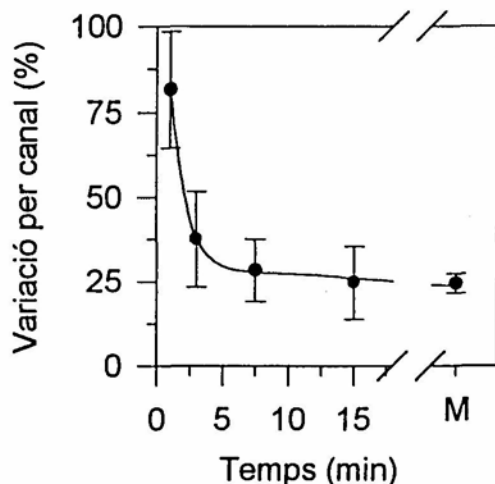


Fig. 54 Variació (global) per canal en funció del temps de mesura de suspensions de liposomes de diferent diàmetre. El cercle indica el valor mitjà pels 7 tipus de liposomes estudiats, i les barres corresponen a la seva desviació standard.

el gràfic posa de manifest la necessitat d'elecció d'un temps de lectura mínim. Aquest se situa novament entre els 7,5 i 15 minuts, confirmant-se de nou els 10 min com a període òptim.

4.1.8.4 EFECTE DE LA CONCENTRACIÓ EN L'EXATITUT DE LES ANÀLISI.

La quantitat de senyal que arriba al detector del Microtrack UPA 150 s'expressa en unitats arbitràries anomenades índex de càrrega. Els valors òptims per a les anàlisi se situen entre 0,1 i 1, de manera que cal ajustar la concentració de les mostres per que els índex que proporcionen estiguin dins de l'interval anterior. La Fig. 55 correspon a les anàlisi de 10 min de durada de dos tipus de suspensions de liposomes en aigua i extrusionades. Es realitzen dilucions successives per obtenir una sèrie d'anàlisi a diferents concentracions. En els dos casos s'observa que en diluir les mostres canvia el resultat de les anàlisi, convergint en un valor proper al dels porus de les membranes d'extrusió per sota d'una concentració crítica. En tots els casos, però, hi ha concentracions que proporcionen distribucions de diàmetres allunyades de l'esperada i que tenen uns índexs de càrrega situats entre 0,1 i 1. Aquest comportament anòmal s'ha detectat amb liposomes d'altres característiques de diàmetre i laminaritat que els mostrats a la Fig. 55. A la majoria de casos, el procés sempre té lloc de la mateixa manera si es té com a referència les mostres diluïdes que tenen un índex de càrrega lleugerament superior a 0,1: en augmentar la concentració, hi ha un valor crític a partir del qual es produeix un increment progressiu del diàmetre de la població i, en continuar augmentant-la, apareixen noves poblacions amb diàmetres menors de l'inicial. La magnitud de la variació depèn del tipus de mostra, de manera que en ocasions no s'arriba a produir l'aparició de vesícules petites.

El fet que la desviació sigui progressiva (tret dels SUVs, hi ha un desplaçament de tot el pic, no una aparició d'altres i disminució de l'original), i que en alguns casos apareguin poblacions de petit diàmetre en incrementar la concentració de les mostres, indica que la causa

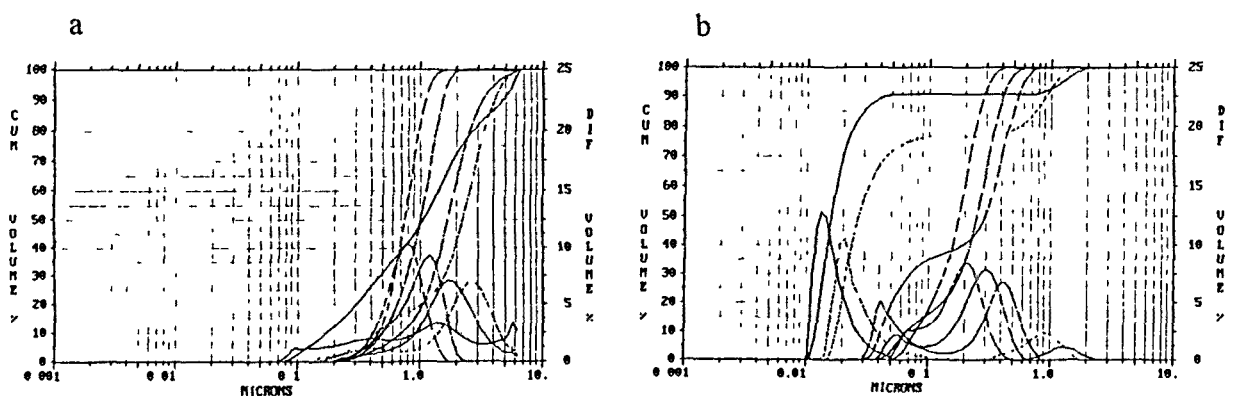


Fig. 55 Variació de les distribucions de grandàries de suspensions de liposomes en aigua en funció de la seva concentració. a) MLVs obtinguts amb Emulmetik 930 (SPC), extrusionats fins 800 nm. b) Pro-Lipo S extrusionats fins 200 nm.

d'aquesta anomalia no són les agregacions entre les vesícules. A més, en cap cas les absorbàncies a 780 nm no mostren un canvi del pendent a la zona on suposadament tindria lloc l'agregació dels liposomes (Fig. 56).

D'altra banda, les suspensions de concentració elevada mostren una major viscositat, fet que podria associar-se a l'increment del diàmetre observat (a major viscositat, menor velocitat de les vesícules, de manera que si no es corregeix el valor que figura en l'aparell, l'anàlisi mostrarà un augment del diàmetre). Aquest fet, però, no té per què afectar a les lectures, ja que tot i que es produeix i un augment de la viscositat de la suspensió, el medi on es troben els liposomes continua essent el mateix, i és la seva viscositat el que cal tenir en compte, no la viscositat macroscòpica aparent. En qualsevol cas, tampoc no explica l'aparició de poblacions de petit diàmetre, fet que va en sentit invers del que caldria esperar.

Per comprovar l'efecte de la viscositat, s'han obtingut les viscositats aparents de les diferents suspensions de liposomes en funció de la seva concentració (Fig. 57), i les dels medis aquosos emprats (Taula 7). Per tal de descartar qualsevol interferència del medi aquós de Pro-Lipo S, s'ultracentrifugà una suspensió de 30 mg F/mL obtinguda en aigua, i es mesurà la viscositat del sobrenedant exent de liposomes. El seu valor és equivalent al que proporciona una dissolució que conté etanol i glicerol (components del medi aquós de Pro-Lipo S) a la mateixa concentració que el sobrenedant, valor que sí que és tingut en compte alhora de fer les lectures.

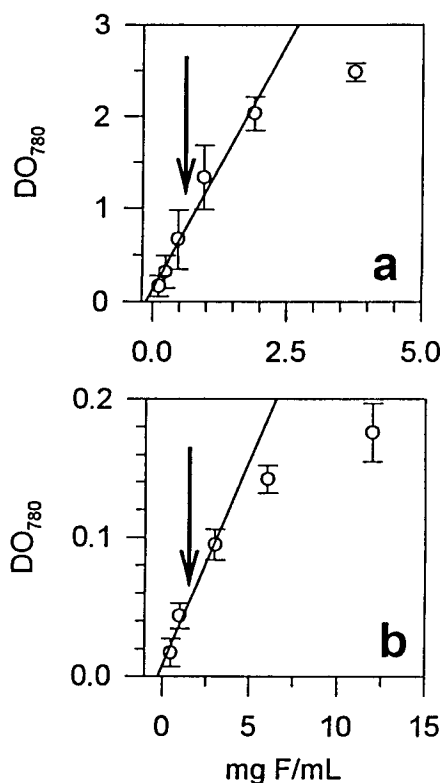


Fig. 56 Variació de DO a 780 nm de suspensions de liposomes en aigua en funció de la seva concentració. Les fletxes indiquen la concentració crítica per sota de la qual els resultats són convergents. a) MLVs obtinguts amb Emulmetik 930 (SPC), extrusionats fins 800 nm. b) Pro-Lipo S extrusionats fins 200 nm.

	Medi				
	Aigua	Tampó fosfat sòdic 10 mM, pH 7,4	NaCl 0,9%	Medi Pro-Lipo S (30 mg F/mL)	Aigua/etanol/glicerol 97/2/1 p/p/p
Viscositat (cP)	0,901 ± 0,015 (n=2)	0,887 ± 0,011(n=3)	0,901 ± 0,022 (n=3)	0,975 ± 0,023 (n=2)	0,995 ± 0,005 (n=2)

Taula 7 Viscositat a 25°C dels medis aquosos en que s'han obtingut liposomes.

En recalculer les anàlisi de les mostres concentrades amb els valors de viscositat macroscòpica trobats (Fig. 57), no s'obtenen distribucions de diàmetres equivalents a les de les

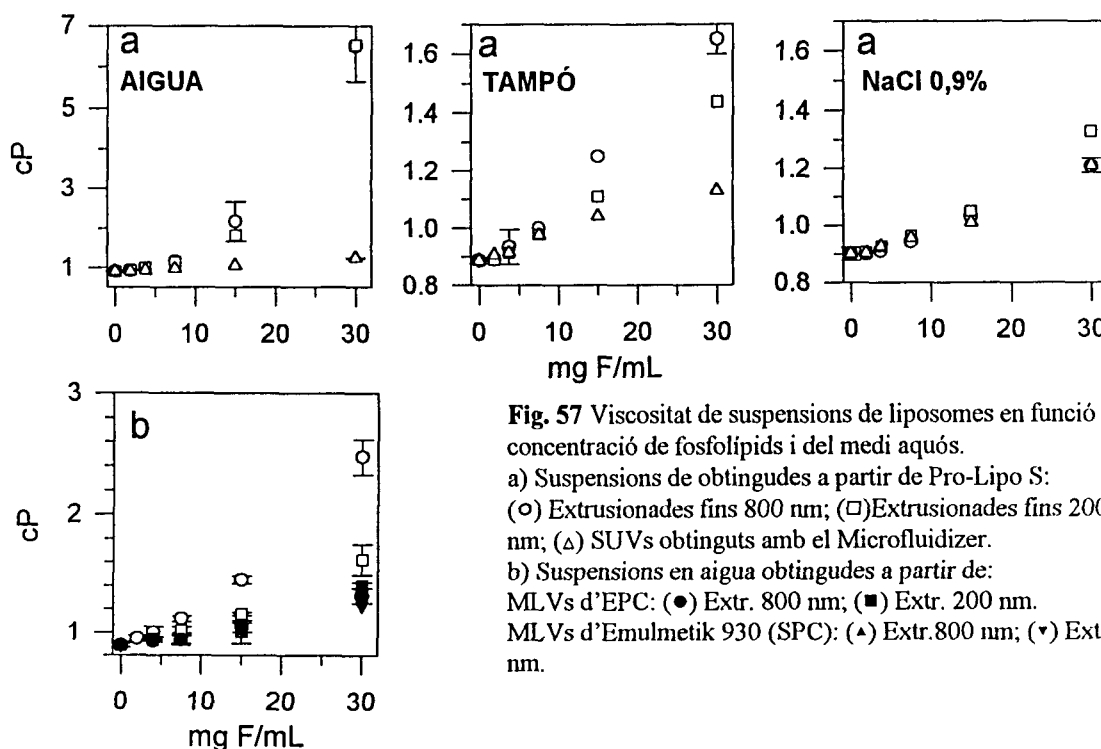


Fig. 57 Viscositat de suspensions de liposomes en funció de la concentració de fosfolípids i del medi aquós.
 a) Suspensions de obtingudes a partir de Pro-Lipo S: (○) Extrusionades fins 800 nm; (□) Extrusionades fins 200 nm; (Δ) SUVs obtinguts amb el Microfluidizer.
 b) Suspensions en aigua obtingudes a partir de: MLVs d'EPC: (●) Extr. 800 nm; (■) Extr. 200 nm. MLVs d'Emulmetik 930 (SPC): (▲) Extr.800 nm; (▼) Extr.200 nm.

mostres diluïdes. Això indica que la variació observada no és causada per un canvi en la viscositat del medi en el qual es troben els liposomes.

Un altre paràmetre que pot afectar als resultats de les lectures és l'índex de refracció de les mostres (Trainer M.N. et al., 1992). Com més s'apropa a zero la diferència entre l'índex de refracció de la finestra (1,76) per on el feix làser incideix amb la mostra i el d'una mostra que s'analitza, menys quantitat del feix incident es reflexa. Això causa una disminució del senyal de referència al detector, fet que distorsiona els resultats en incrementar-se la proporció de senyal homodí (senyal dispersat per la mostra). A la Taula 8 es mostren els índex de refracció de diferents suspensions de liposomes a una concentració de 30 mg/mL. Els valors obtinguts són propers als de l'aigua (1,333), per tant, fins i tot a aquesta concentració, la diferència amb l'índex de refracció de la finestra continua éssent elevada i no pot causar les variacions de grandària observades.

	Medi		
	Aigua	Tampó fosfat sòdic 10 mM, pH 7,4	NaCl 0,9%
MLVs (EPC)800 nm	1,339	1,339	1,342
MLVs (EPC)200 nm	1,339	1,359	1,341
SUVs (EPC) 30 nm	1,339	1,340	1,340
Pro-Lipo S 800 nm	1,334	1,334	1,334
Pro-Lipo S 200 nm	1,334	1,335	1,336
Pro-Lipo S SUVs 30 nm	1,336	1,336	1,338

Taula 8 Índex de refracció de suspensions de liposomes obtingudes a partir d'ECP i a partir de Pro-Lipo S, a 30 mg F/mL. Les suspensions s'extrusionaren fins 800 o 200 nm, o processaren en el Microfluidizer per tal d'obtenir SUVs.

Descartats els fenòmens d'agregació, canvi de viscositat i variació de l'índex de refracció, es realitzaren una sèrie d'anàlisi amb diferents tipus de liposomes i en diferents medis. Totes les anàlisi que es presenten en aquest apartat es dugueren a terme en un temps mínim de lectura de 10 min. A la Fig. 58 es mostra la variació de l'índex de càrrega en funció de la concentració de fosfolípids per diferents tipus de suspensions de liposomes. A conseqüència de les característiques dels SUVs, només s'indiquen els obtinguts a partir d'MLVs, que són equivalents als que es preparassin a partir de REVs. En tots els casos les vesícules estigueren constituïdes per fosfatidilcolina i el medi de la preparació fou aigua. En cada gràfic les línies discontinües indiquen la parella crítica de valors *índex de càrrega-concentració de fosfolípid* per sota de la qual les lectures són convergents. En el cas del SUVs, les fletxes indiquen el valor mínim que pot tenir aquest, ja que en tot el rang de concentracions estudiat les lectures han estat equivalents.

Els resultats posen de manifest que, a la majoria de casos, les suspensions de liposomes amb diàmetres grans (extrusionats fins 800 nm) i alta concentració no superen l'índex de càrrega de valor 1. Les barres d'error indiquen que en algunes mostres inclús té lloc un descens de l'índex un cop assolit el màxim a una concentració més baixa. Per tant, l'índex de càrrega no pot ser emprat com a referència única per determinar si la mostra es troba a una concentració addient per realitzar l'anàlisi. Exceptuant les mostres amb SUVs, en el rang estudiat la resta de suspensions presenta una relació no lineal entre la concentració i l'índex. En el cas dels liposomes multilaminars i dels SUVs, les concentracions que proporcionen anàlisi correctes se situen dins de la zona lineal de la relació anterior, tot i que en algun cas es pot trobar un valor màxim adjacent al límit superior d'aquest interval.

Els resultats anteriors indiquen que en el cas de MLV i SUVs constituïts per fosfolípids neutres i en aigua, és necessari que les lectures es realitzin dins de la zona lineal de les parelles de valors *índex de càrrega-concentració de les mostres*.

Com s'observa, aquesta premisa no es compleix en el cas del REVs. En aquest tipus de liposoma les concentracions crítiques estan situades per sota del màxim valor de l'interval lineal. Tot i que la relació índex-concentració té un comportament similar al de les altres mostres preparades a partir d'EPC, és necessari diluir-les força més per aconseguir lectures correctes. L'única diferència entre els REVs i els MLVs és el número de bicapes per liposoma, de manera que els unilaminars (REV) encapsulen una major quantitat del medi aquós que els conté. Per aquesta raó, s'han determinat els volums encapsulats en els diferents tipus de liposomes que s'empenen en aquest estudi, i que es mostren a la Taula 9.

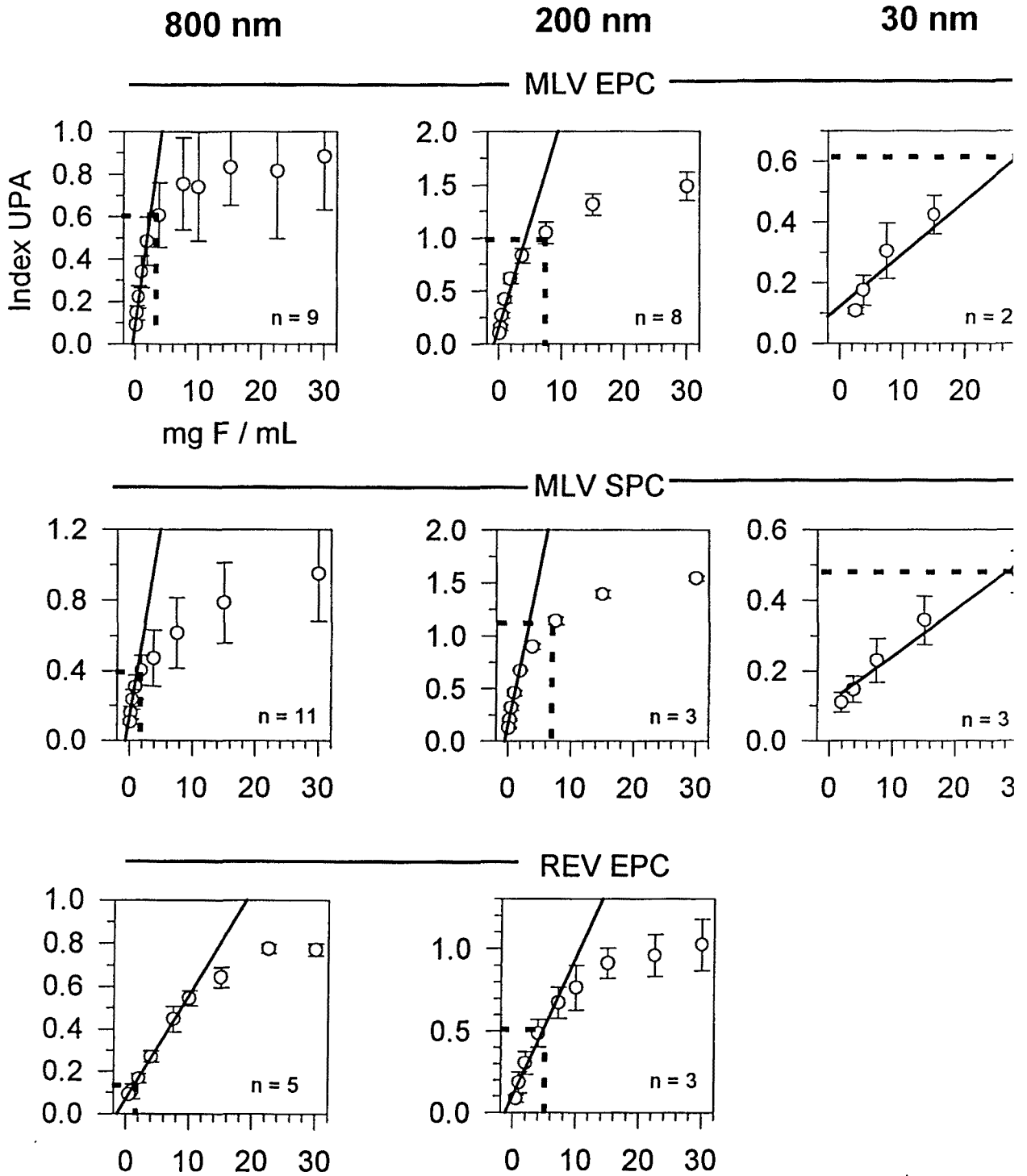


Fig. 58 Variació de l'índex de càrrega del Microtrack UPA 150 en funció de la concentració de fosfolípids. Les línies discontinües indiquen la concentració crítica per sota de la qual els resultats de les anàlisi foren convergents i iguals als esperats. Les rectes corresponen a les rectes de regressió de la zona lineal de cada conjunt de punts. MLV EPC: liposomes multilaminars obtinguts a partir d'EPC. MLV SPC: liposomes multilaminars obtinguts a partir d'Emulmetik 930; REV EPC: liposomes unilaminars obtinguts per evaporació en fase reversa a partir d'EPC. 800 nm: mostres extrusionades fins 800 nm; 200 nm: mostres extrusionades fins 200 nm; 30 nm: mostres de SUVs obtingudes amb el Microfluidizer.

Volum encapsulat (L / mol)	Tipus de suspensió		
	Extr. 800 nm	Extr. 200 nm	SUVs
MLV EPC	1,29 ± 0,14 (n=2)	1,69 ± 0,08 (n=3)	0,378 ± 0,035 (n=2)
MLV SPC	1,52 ± 0,21 (n=2)	1,50 ± 0,22 (n=2)	0,805 ± 0,094 (n=4)
REV EPC	7,98 ± 0,29 (n=3)	4,53 ± 0,35 (n=2)	ND

Taula 9 Volums encapsulats de diferents suspensions de liposomes.
ND: no determinat.

Aquets resultats permeten calcular la fracció en volum del medi aquós que realment actua com a dissolvent o fase contínua (FV_{Dis}) per cada tipus de liposoma i a cada concentració. Per obtenir-la cal conèixer la fracció de volum ocupada pels fosfolípids (FV_F) i la fracció de dissolvent encapsulat (FV_{En}). El volum ocupat pels fosfolípids s'ha calculat a partir de la concentració de fosfolípids (A mg F/mL) i de la densitat mitjana de les bicapes d'EPC, que és $\rho_F=1,0135$ g/mL. La fracció en volum encapsulat per cada tipus de liposoma s'ha obtingut a partir del volum encapsulat (X mL_{En} /mmol F) presentat a la Taula 9. Com a pes molecular mitjà de la fosfatidilcolina (EPC i SPC) s'ha emprat 750 g/mol. Per tant:

$$FV_F = A \text{ mg F/mL} \frac{1}{1013,5 \text{ mg F/mL F}}$$

$$FV_{En} = A \text{ mg F/mL} \frac{1 \text{ mmol F}}{750 \text{ mg F}} \frac{X \text{ mL}_{En}}{1 \text{ mmol F}}$$

i

$$FV_{Dis} = 1 - FV_F - FV_{En}$$

Els resultats es presenten a la Fig. 59. En ells s'aprecia que els REVs de 800 nm i de 200 nm presenten una fracció de dissolvent menor que els liposomes MLV d'igual grandària però amb menor volums encapsulat. En interpolar les concentracions crítiques experimentals dels REVs, s'obté un valor mitjà de fracció en volum de dissolvent de $0,97 \pm 0,013$.

Aquest fet proporciona una segona condició per tal d'obtenir anàlisi correctes amb el Microtrack UPA 150. A més de la realitzar les lectures dins de la relació lineal entre la concentració de mostra i el senyal al detector, és necessari que en els límits anteriors la fracció en volum de dissolvent sigui major a 0,97. Com s'aprecia, aquestes dues condicions es compleixen alhora pels MLV en tot l'interval lineal, mentre que en el cas dels REVs només té lloc en una petita porció. La condició anterior, però, no es compleix en el cas dels SUVs: malgrat presentar a 30 mg F/mL una fracció de dissolvent menor a 0,97, les anàlisis continuen essent correctes.

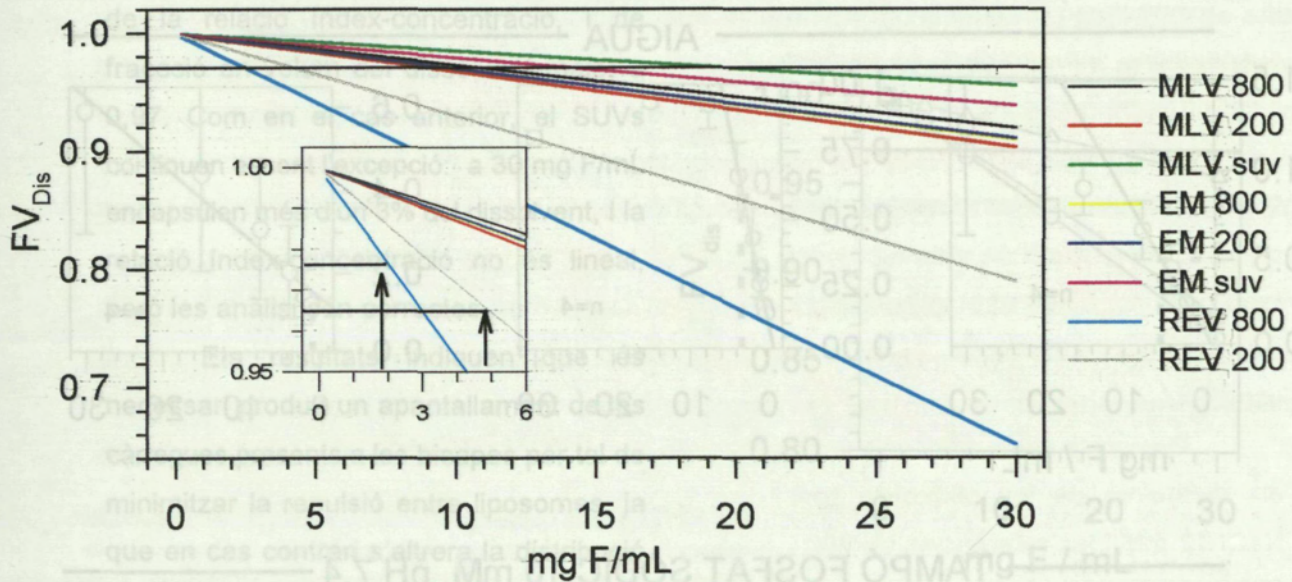


Fig. 59 Dependència de la fracció en volum de dissolvent en funció de la concentració i del volum encapsulat dels liposomes.

El següent sistema analitzat fou el constituït per liposomes carregats negativament i en aigua. Per a tal fi es preparen les suspensions a partir de Pro-Lipo S i s'extrusionaren fins 800 o 200 nm, o bé es processaren en el Microfluidizer per tal d'obtenir SUVs (aquestes suspensions foren translúcides a la concentració de 30 mg F/mL). A la Fig. 60 es mostra l'evolució de l'índex de càrrega en funció de la concentració de fosfolípids. Com en el cas dels REV's, les anàlisi no són correctes en tot el rang lineal de la relació anterior, però en aquest cas, no és degut a que presentin una fracció en volum del dissolvent menor a 0,97 (Fig. 61, Taula 10). Cal destacar que els SUVs només proporcionaren lectures correctes a concentracions que situaren l'índex de càrrega per sota de 0,1, valor que està fora del rang de lectura òptim proposat pel fabricant.

Volum encapsulat (L / mol)	Tipus de suspensió		
	Extr. 800 nm	Extr. 200 nm	SUVs
Pro-Lipo S	2,68± 0,19 (n=3)	2,36 ± 0,13 (n=3)	0,406 ± 0,037 (n=3)

Taula 10 Volums encapsulats en suspensions de liposomes obtingudes amb Pro-Lipo S.

Quan es preparen el mateix tipus de suspensions en tampó fosfats 10 mM pH 7,4 o en NaCl 0,9%, s'obtenen les relacions índex-concentració i les concentracions crítiques indicades a la Fig. 60. Les distribucions de diàmetres d'aquestes suspensions són equivalents a les que s'obtenen amb les suspensions en aigua per sota de la concentració crítica. Per aquest motiu s'han assignat els mateixos valors de volum encapsulat a totes elles. Contràriament al que succeeix amb les suspensions en aigua, les anàlisi de les suspensions en medis salins són correctes en tot el rang de concentracions en el qual es compleixen les condicions de linealitat

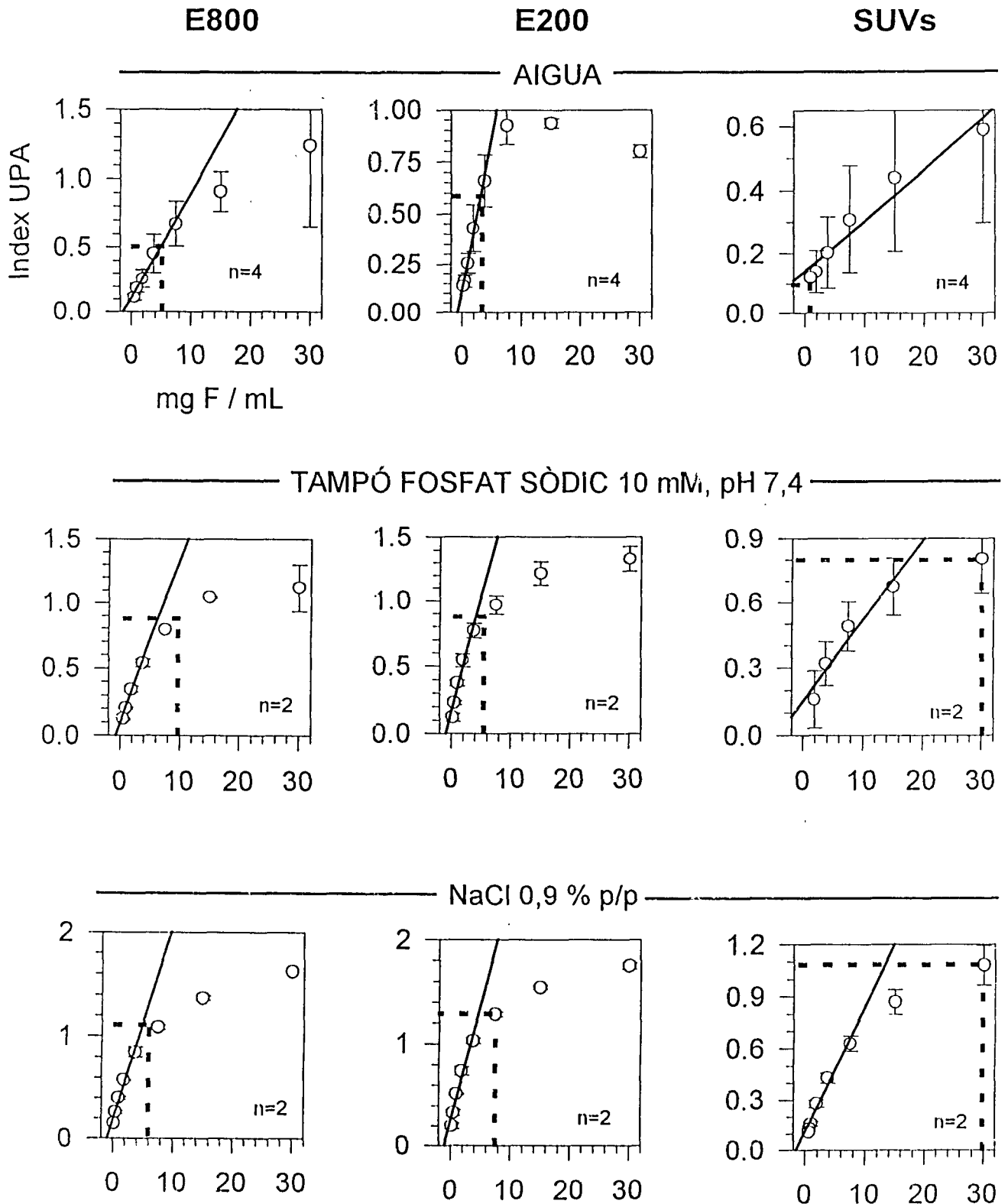


Fig. 60 Variació de l'índex de càrrega del Microtrack UPA 150 en funció de la concentració de fosfolípids de suspensions de liposomes carregats negativament (F neutres/F carregats 20% p/p). Les línies discontinues indiquen la concentració crítica per sota de la qual els resultats de les anàlisis foren convergents i iguals als esperats. Les rectes corresponen a les rectes de regressió de la zona lineal de cada conjunt de punts.

AIGUA: Suspensions preparades en aigua. TAMPÓ: Suspensions preparades en tampó fosfat sòdic 10 mM, pH 7,4. NaCl 0,9 %: Suspensions preparades en el medi indicat.

800 nm: mostres extrusionades fins 800 nm; 200 nm: mostres extrusionades fins 200 nm; SUVs: mostres de SUVs obtingudes amb el Microfluidizer.

de la relació índex-concentració, i de fracció en volum del dissolvent major a 0,97. Com en el cas anterior, el SUVs continuen essent l'excepció: a 30 mg F/mL encapsulen més d'un 3% del dissolvent, i la relació índex-concentració no és lineal, però les anàlisi són correctes.

Els resultats indiquen que és necessari produir un apantallament de les càrregues presents a les bicapes per tal de minimitzar la repulsió entre liposomes, ja que en cas contrari s'altera la distribució de velocitats de la població. La força iònica del tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4 és suficient per causar aquest efecte, ja que els resultats són equivalents als que s'obtenen amb les suspensions preparades en NaCl 0,9%.

Per tal de comprovar aquest fet es compararen els diàmetres dels liposomes en aigua abans i després d'afegir NaCl. A alíquotes de 3 mL de 3 tipus de suspensions diferents (extrusionades fins 800 nm, 200 nm, o SUVs obtinguts amb el Microfluidizer) preparades amb Pro-Lipo S en aigua, se'ls hi afegiren 9 µL de NaCl 4 M, resultant una concentració final de NaCl 12 mM. D'aquesta manera s'assoleixen dos objectius: la pressió osmòtica inicial entre l'interior i exterior vesicular és petita ($22,5 \text{ mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$), i les forces iòniques de les suspensions amb tampó fosfat 10 mM ($\text{FI}: 22,2 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) i de les alíquotes amb NaCl resulten comparables. Com a referència s'emprà el diàmetre de les suspensions en aigua i obtingut per sota de la concentració crítica. En el cas dels SUVs, degut a que la concentració crítica proporciona índex menors a 0,1, s'emprà el diàmetre de mostres diluïdes fins un índex proper i superior a 0,1, i que proporcionaren un diàmetre mitjà de 233 nm. A la Fig. 62 es mostren els resultats. Quan es comparen les referències amb les mateixes suspensions en aigua però a alta concentració de fosfolípids (indicades a la figura), s'observa que en el cas dels liposomes de 800 i 200 nm hi ha diferències superiors a les que estableix l'interval de tolerància de la Fig. 44 (línia de punts a la Fig. 62). En el cas dels SUVs no té lloc aquest fet, ja que no hi ha una concentració crítica amb índex superior a 0,1, i el diàmetre de la referència és erroni. En afegir NaCl fins una concentració de 12 mM, les anàlisi de liposomes de 800 nm i 200 nm són lleugerament inferiors de les respectives referències. En el cas del SUVs ho són en escriure com a conseqüència de que en aquestes condicions les lectures proporcionen diàmetres coherents per aquest tipus de preparació (al voltant de 30 nm), cosa que no succeeix amb les que estan en aigua. Per últim,

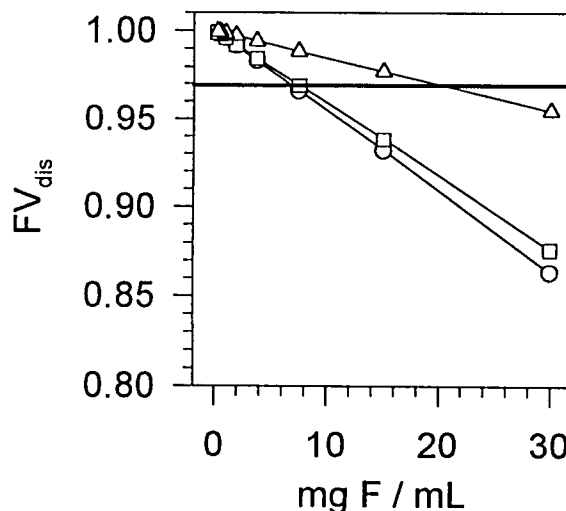


Fig. 61 Dependència de la fracció en volum de dissolvent en funció de la concentració i del volum encapsulat dels liposomes carregats negativament. (○) Extr. 800 nm.; (□) Extr. 200 nm; (Δ) SUVs.

la comparació amb diferents suspensions preparades en medis salins (tampó fosfat sòdic 10 mM, pH 7,4, o NaCl 0,9 %) permet comprovar que els diàmetres de les alíquotes a les que s'ha afegit NaCl se situen dins del rang dels que s'obtenen amb mostres que no tenen diferència de pressió osmòtica.

Donada la petita diferència entre els diàmetres de les alíquotes amb NaCl 12 mM i les referències de 800 i 200 nm, es realitzaren dos assajos per determinar si la diferència de pressió osmòtica causada amb l'addició de la sal podia induir canvis significatius en la distribució de grandàries de la població de liposomes.

En el primer es comprovà que en afegir 9 μ L de NaCl 4M a 3 mL de suspensions de SUVs de 30 mg F/mL preparats en tampó o en NaCl 0,9 %, no es produïen canvis de la distribució de grandàries (Taula 11). Aquest fet indica que en produir-se una diferència de concentracions entre l'interior i l'exterior vesicular de 12 mM de NaCl, els liposomes unilaminars no s'alteren, de manera que els canvis observats en les anàlisi de les suspensions en aigua (Taula 11) corresponen als efectes de l'apantallament de càrregues, i no a variacions de diàmetre.

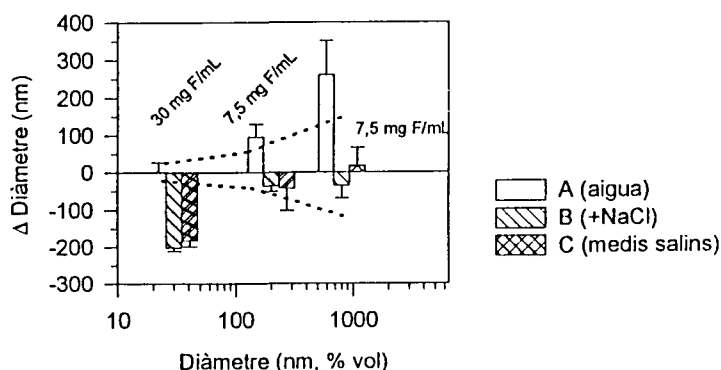


Fig. 62 Diferència de diàmetres entre suspensions de liposomes carregats negativament, en aigua, i diluïdes per sota de la concentració crítica i: (A) Les mateixes suspensions a la concentració indicada (n=3); (B) Les suspensions (A) després d'afegir-ne NaCl fins 12 mM (n=3); (C): Suspensions a la mateixa concentració que (A) però preparades en medis salins (tampó fosfat sòdic 10 mM, o NaCl 0,9 %, n=3).

	Medi					
	Tampó	Tampó +NaCl	NaCl 0,9%	NaCl 0,9% + NaCl	Aigua	Aigua + NaCl
Diàmetre \pm amplada (nm; % vol)	36,5 \pm 14 (n=3)	32,6 \pm 12 (n=1)	63,0 \pm 30 (n=3)	63,6 \pm 30 (n=1)	240 \pm 134 (n=3)	39,8 \pm 12 (n=2)

Taula 11 Diàmetres dels liposomes SUVs de 30 mg F/mL abans i després de l'addició de NaCl fins assolir una concentració de 12 mM.

En el segon assaig, a suspensions de liposomes en aigua s'afegiren quantitats creixents de NaCl i es realitzaren anàlisi de les poblacions i mesures de DO a 780 nm. Les concentracions de les mostres s'ajustaren de manera que proporcionaren DO menors a 1 UA. Els resultats es motren a la Fig. 63, en ella l'origen d'abcises correspon a anàlisi de mostres en aigua diluïdes per sota de la concentració crítica (excepte els SUVs, que no en tenen amb un índex superior a 0,1). S'observa que únicament en el cas dels liposomes de major grandària hi ha un efecte

apreciable de la concentració de sals al medi extern. En incrementar la quantitat de sals disminueix el diàmetre mitjà dels liposomes. Aquest efecte no té lloc en les mostres de la mateixa naturalesa però de concentració 7,5 mg F/mL (Fig. 62), de manera que pot ser atribuïble a la menor concentració. A la resta de suspensions, les desviacions són dins de l'error experimental. Els canvis en la DO s'han expressat com l'increment respecte de la suspensió aquosa, corregint en cada cas pel factor de dilució causat en afegir el NaCl. Les variacions observades mostren que els ions provoquen un canvi en la dispersió de la llum, canvi que arriba al màxim entre 12 i 60 mM de NaCl. Les concentracions de sal superiors no causen increments majors de DO, fet que indica que la població de liposomes no experimenta variacions notables de volum ni d'eficiència de dispersió de la llum.

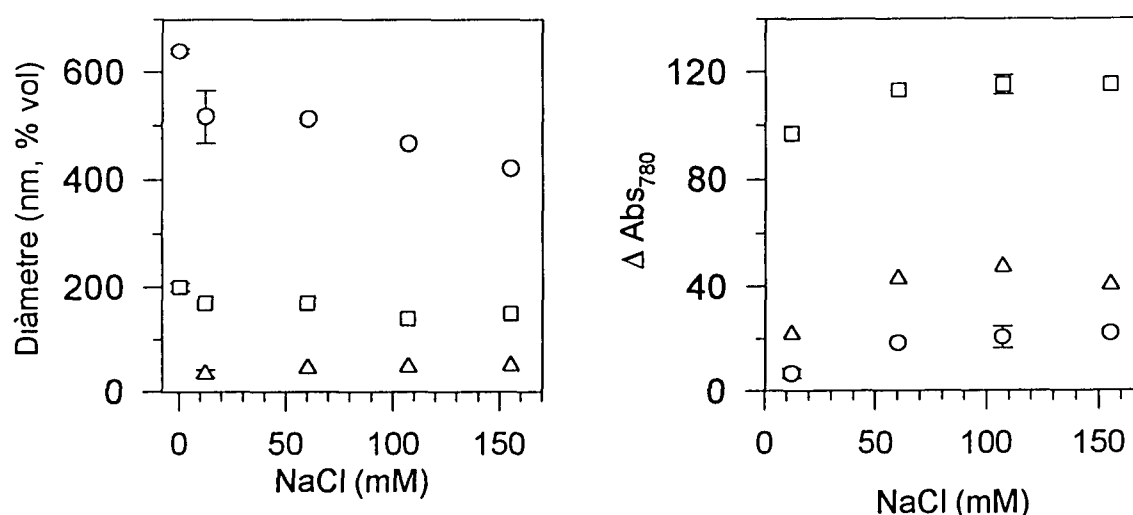


Fig. 63 Variació del diàmetre i de la densitat òptica a 780 nm de suspensions de liposomes amb fosfolípids negatius, en funció de la concentració de NaCl resultant en afegir volums variables de la sal. L'origen d'abcises correspon a les mostres en aigua. (○) Liposomes extrusionats fins 800 nm, 1,61 mg F/mL, (□) Liposomes extrusionats fins 200 nm, 7,5 mg F/mL, (△) SUVs obtinguts amb un Microfluidizer, 30 mg F/mL.

4.1.8.5 EFECTE CREUAT EN LA PRECISIÓ DE LES LECTURES.

Per determinar l'existència o no d'interaccions creuades entre diferents paràmetres, s'ha dut a terme un estudi de la variabilitat en la resposta seguint un disseny aproximadament²¹ de cub centrat amb estel emprant com a factors el temps de lectura, l'índex de càrrega, i el diàmetre dels liposomes (Taula 12). De forma complementària s'incloueren les convinanacions en disseny d'estel per liposomes extrusionats fins 200 nm. Com a matèria primera s'utilitzaren Pro-Lipo S, obtenint-se les suspensions en tampó fosfat i processant-les amb diferents tècniques per tal

²¹ L'aproximació al disseny de cub centrat amb estel és deguda a la dificultat d'obtenir poblacions de liposomes monodisperses amb diàmetres que es corresponguin exactament als nivells que demana el disseny experimental escollit.

d'obtenir els diàmetres desitjats (agitats, extrusionats o tractats en el Microfluidizer). Cada suspensió s'analitzà segons la combinació de factors que li pertoca, i es calculà el coeficient de variació pel diàmetre i per l'amplada dels liposomes. En els resultats presentats a la Taula 12 es mostra només la mitjana dels coeficients de variació, obtinguda a partir de l'anàlisi de suspensions independents de liposomes.

Índex de càrrega	Temps de lectura (t) (seg)	Diàmetre (D) (nm; % vol)	n	Coef. variació diàmetre (%)	Coef. variació amplada (%)
0,55 (0)	480 (0)	400 (0)	3	6,02	8,65
0,55 (0)	480 (0)	1150 (1,88)	3	2,59	17,63
0,55 (0)	480 (0)	40 (-0,9)	3	2,83	6,04
0,55 (0)	900 (2)	400 (0)	3	4,48	11,20
0,55 (0)	60 (-2)	400 (0)	3	15,1	59,57
1,0 (2)	480 (0)	400 (0)	3	5,31	3,50
0,1 (-2)	480 (0)	400 (0)	3	4,39	8,69
0,78 (1)	690 (1)	800 (1)	2	1,90	15,40
0,78 (1)	690 (1)	200 (-0,5)	2	3,29	13,80
0,78 (1)	270 (-1)	800 (1)	2	2,55	29,47
0,78 (1)	270 (-1)	200 (-0,5)	2	5,09	15,50
0,33 (-1)	690 (1)	800 (1)	2	4,34	10,52
0,33 (-1)	690 (1)	200 (-0,5)	2	3,86	11,30
0,33 (-1)	270 (-1)	800 (1)	2	7,32	26,35
0,33 (-1)	270 (-1)	200 (-0,5)	2	5,35	8,88
1,0 (2)	900 (2)	200 (-0,5)	3	3,50	2,27
1,0 (2)	480 (0)	200 (-0,5)	3	4,43	4,24
0,55 (0)	60 (-2)	200 (-0,5)	3	21,64	19,43
0,55 (0)	480 (0)	200 (-0,5)	3	8,34	6,56
0,55 (0)	900 (2)	200 (-0,5)	3	2,57	7,06
0,1 (-2)	480 (0)	200 (-0,5)	3	2,82	5,83

Taula 12 Combinacions de nivells dels factors (normalitzats entre parèntesi) emprades per a l'estudi de l'efecte creuat entre el temps d'anàlisi i l'índex de càrrega en el Microtrack UPA 150. Els resultats corresponen a les mitjanes dels coeficients de variació del diàmetre i de l'amplada trobats en cada experiment independent.

A partir dels valors dels coeficients de variació de cada replicat es realitzà l'anàlisi estadística ajustant els resultats a partir d'una equació lineal completa. Tant en l'ajust del coeficient de variació del diàmetre com en el de l'amplada, les equacions resultants no contingueren cap terme on l'índex de càrrega fos un factor. Aquest fet indica que l'índex de càrrega no té cap efecte en la precisió de les anàlisi amb el Microtrack UPA 150.

A la Taula 13 s'indiquen els resultats de l'anàlisi, i a les Fig. 64 i 65 es mostren les superfícies de resposta que s'obtenen en fixar el diàmetre del liposomes i el temps de lectura. Com s'observa, no hi ha cap efecte de l'índex de càrrega sobre la precisió de les lectures en el

rang estudiat.

	Variable	
	Coef. var. diàmetre	Coef. var. amplada
Coeficients dels factors	Ctnt: 4,00; D': -1; t': -2,78 t ² : 1,6; D't': 1,81	Ctnt: 8,75; D':6,91; t': -6,90; t ² : 4,46; D't': -4,37
Coef. de determinació (r ²)	0,598	0,679
Coef. de regressió (r)	0,773	0,824
Test de significació de la correlació (F _{4/51}); 2,52 < F _{crit} < 2,61	18,93	24,30
Error standard	3,34	7,99

Taula 13 Resultat de l'anàlisi de l'efecte creuat de l'índex de càrrega en la precissió del Microtrack UPA 150.

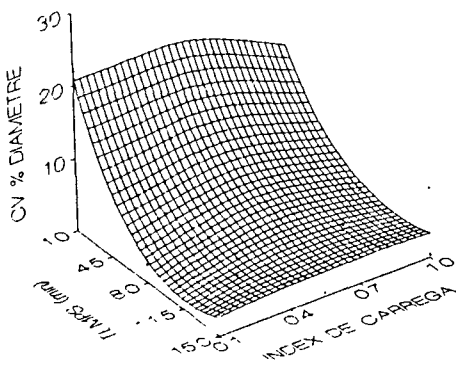


Fig. 64 Dependència, amb l'índex de càrrega i amb el temps de lectura, del coeficient de variació en l'anàlisi del diàmetre de liposomes extrusionats fins 200 nm

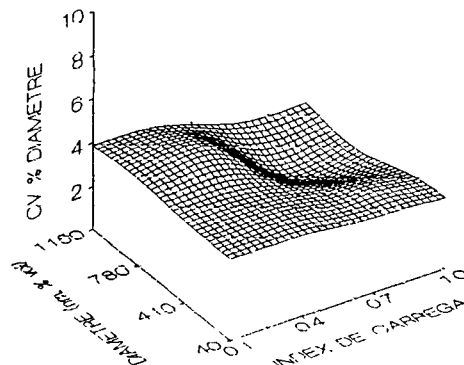


Fig. 65 Dependència, amb l'índex de càrrega i amb el diàmetre dels liposomes, del coeficient de variació en l'anàlisi del diàmetre de liposomes amb lectures de 690 segons de durada.

4.1.8.6 DETERMINACIÓ DE L'EXACTITUT EN L'ANÀLISI DE SUSPENSIONS DE LIPOSOMES.

Per realitzar aquest estudi s'han comparat els resultats proporcionats per diferents tècniques amb els obtinguts amb el Microtrack UPA 150. Les tècniques de referència emprades han estat: l'espectroscòpia de correlació fotònica, la microscòpia electrònica de transmissió amb tinví negatiu, la determinació dels volums encapsulats de liposomes unilaminars de diferent diàmetre, i l'extrusió de suspensions de liposomes per membranes de policarbonat amb diferents grandàries de porus. A continuació es descriuen el resultats de cadascun d'aquests apartats.

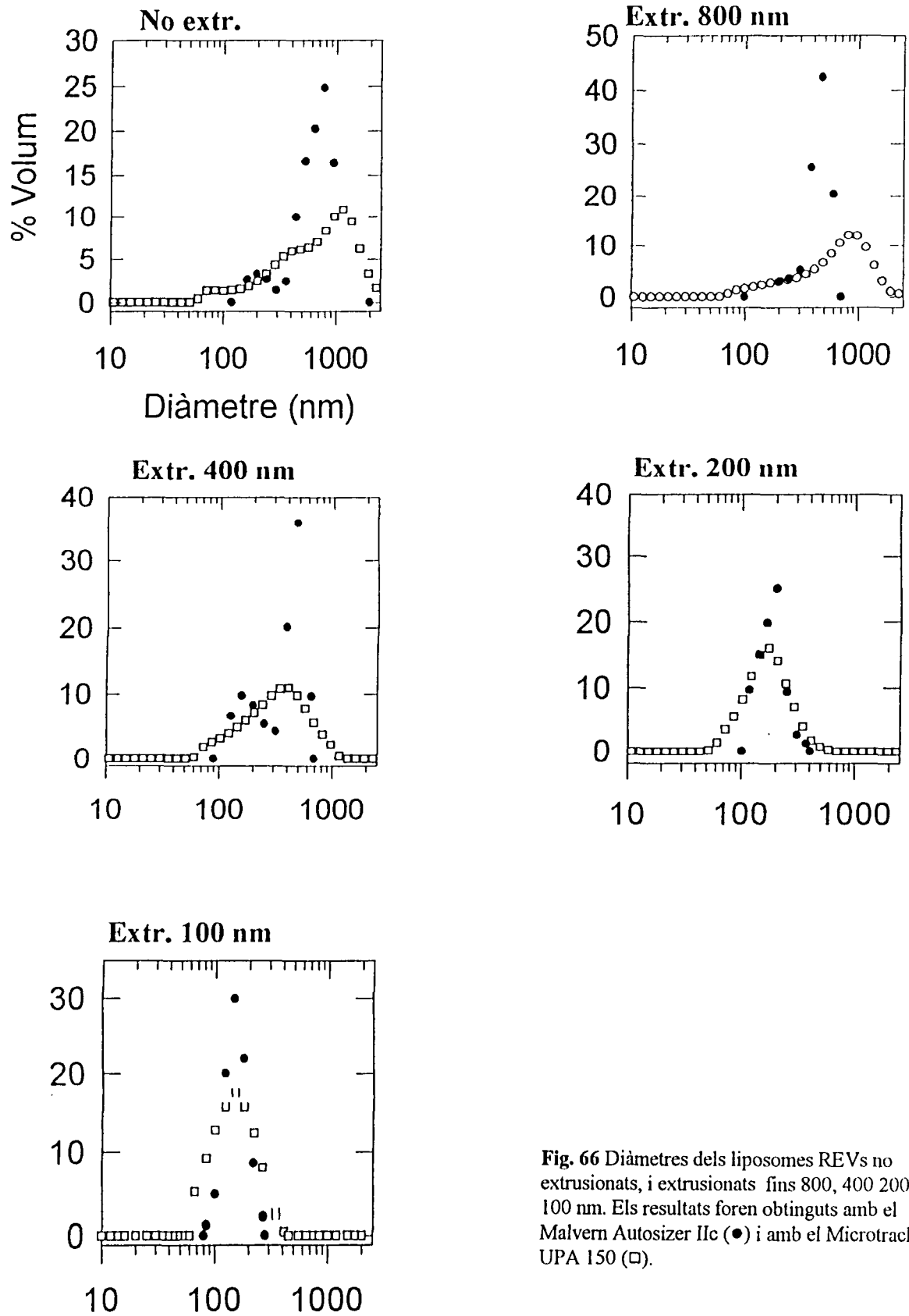


Fig. 66 Diàmetres dels liposomes REV's no extrusionats, i extrusionats fins 800, 400 200 i 100 nm. Els resultats foren obtinguts amb el Malvern Autosizer IIc (●) i amb el Microtrack UPA 150 (□).