



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Els liposomes com a model de membrana. Aplicació a l'estudi de les interaccions entre opiàcis i fosfolípids

Ma. Antonia Busquets i Viñas



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA
Facultat de Farmàcia
Unitat de Físico-Química

"ELS LIPOSOMES COM A MODEL DE MEMBRANA. APLICACIO A
L'ESTUDI DE LES INTERACCIONS ENTRE OPIACIS I FOSFOLIPIDS"

Memòria presentada per Ma. Antònia Busquets i Viñas per a
optar al grau de Doctor en Farmàcia.

LA DOCTORANDA

M. Busquets

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700081374

La present memòria per a optar al Grau de Doctor en Farmàcia ha sigut realitzada per Ma. Antònia Busquets i Viñas en la Unitat de Físico-Química Aplicada del Departament de Farmàcia de la Universitat de Barcelona i en el Laboratori de Pèptids del Departament de Química Orgànica Biològica, Centre d'Investigació i Desenvolupament, CSIC, de Barcelona, sota la direcció de les sotasignants que autoritzen la seva presentació.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ma. Asunción Alsina', with a large, sweeping flourish extending to the right.

Dra. Ma. Asunción Alsina

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Francesca Reig', with a large, circular flourish at the top.

Dra. Francesca Reig

Aquesta Tesi ha estat realitzada en el Laboratori de Pèptids del Departament de Química Orgànica Biològica, CSIC, de Barcelona i en la Unitat de Físico-Química de la Facultat de Farmàcia de Barcelona.

Al meu parer no hi ha quasibé cap tasca que hom pugui dur a terme completament sol. En el meu cas i en concret en aquest treball, em cal agrair l'ajut tant científic com moral d'una sèrie de persones. Primerament he de remarcar la col.laboració i recolçament de les meves directores de Tesi, Dra. M. Asunción Alsina i Dra. Francesca Reig.

Aixímateix, agraeixo profundament l'amistat, suport i comprensió en tot moment, dels meus companys del laboratori de Pèptids: María de la Sierra Osuna, Pilar Ruiz, Ana Cabanes, Yolanda Cajal, Francesc Rabanal, Eduard Bardají, Núria Xaus, Ana Ymbern, Cristina Colomé, Xavier Jorba i Emili Nogués, així com als Doctors: Isabel Haro, Gregori Valencia, José M. García Antón, Josep Lluís Torres i Pere Clapés.

Quant a la col.laboració estrictament científica, el meu reconeixement a la Dra. Raquel Rodríguez del Departament de Bioquímica de la Facultat de Medicina de la Universitat de Salamanca, pel temps que ha dedicat en la realització de les proves farmacològiques i al Dr. Francesco Castelli del Departament de Química de la Universitat de Catània (Sicília), pel assajos de DSC.

Deixant a part les persones professionalment relacionades amb el treball he d'agradir per una part, al meu oncle Ramon Viñas i Farré la seva confiança i ajut i, per una altra, als meus pares sense els quals m'hauria sigut impossible arribar on soc.

als meus pares

ABREVIATURES

Ac: Anticòs
ACN: Acetonitril
AcNH₄⁺: Acetat amònic
AcOH: Acid acètic
C.F.: Carboxifluoresceïna
Cl₃CH: Cloroform
DMPC: Dimiristoilfosfatidilcolina
DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina
DRV: Vesícules obtingudes per deshidratació i
rehidratació
DSC: Calorimetria Diferencial d'Escombrat
DSPC: Diestearoilfosfatidilcolina
GPI: Ileum de conill porquí
ΔH: Increment d'entalpia
HPLC: Cromatografia líquida d'alta eficàcia
IC: Inhibició de les contraccions de la
musculatura llisa
i.m.: intramuscular
i.p.: intraperitoneal
i.v. intravenós
LUV: Vesícules unilaminars grans
MeOH: Metanol
MLV: Vesícules multilaminars
PA: Acid fosfatídic
PBS: Solució amortidora de fosfats, pH: 7'4.
PC: Fosfatidilcolina
PE: Fosfafidiletanolamina
PG: Fosfatidilglicerol
PS: Fosfatidilserina
RPM: Revolucions per minut
SA: Estearilamina
SM: Esfingomielina
SNC: Sistema nerviós central
SRE: Sistema reticuloendotelial
t_{1/2}: Vida mitja
T_c: Temperatura de transició de fase de gel a
cristall líquid
TFA: Acid trifluoroacètic
TLC: Cromatografia en capa fina
TRIS: Trishidroximetilaminometà
U.V.: Ultraviolat
X: Fracció molar

INDEX

1.- INTRODUCCIO	
1.1.- LIPOSOMES.	2
1.1.1.- Lípids.	3
1.1.1.1.- Propietats físico-químiques.	5
a) Propietats de l'estat sòlid.	5
b) Comportament dels lípids en aigua.	5
c) Propietats termotròpiques dels lípids.	7
1.1.1.2.- Calorimetria Diferencial d'Escombrat.	11
1.1.2.- Mètodes d'obtenció.	14
1.1.2.1.- Liposomes Grans.	14
A) Liposomes Multilaminars (MLV).	14
B) Liposomes Unilaminars grans (LUV).	16
a) Evaporació en fase reversa.	16
b) Vaporització d'èter.	17
c) Fusió induïda pel calci.	17
d) Sonicació per sota de la T_c dels lípids.	18
C) Liposomes Oligolaminars (DRV).	18
1.1.2.2.- Liposomes Petits (SUV).	19
a) Dispersió ultrasònica.	20
b) Injecció d'etanol.	21
c) Extrussió per una French Press.	22
d) Dilució del detergent.	22
1.1.3.- Caracterització dels liposomes.	23
1.1.4.- Interaccions liposomes-cèl.lules "in vitro".	24
1.1.4.1.- Intercanvi lipídic.	25
1.1.4.2.- Fusió.	26
1.1.4.3.- Adsorció.	27
1.1.4.4.- Endocitosi.	27
1.1.5.- Farmacologia dels liposomes:	28
1.1.5.1.- Sistema de transport.	28
1.1.5.2.- Terapèutica.	30
1.1.5.3.- Toxicitat.	41
1.2.- Opiacis/ Receptor Opiaci.	42

2.- OBJECTIUS.	46
3.- MATERIALS I METODEDES.	
3.1.- MATERIALS.	48
3.1.1.- Instrumentació.	49
3.1.2.- Dissolvents i reactius.	50
3.1.3.- Suports cromatogràfics.	51
3.1.4.- Solucions.	52
3.2.- METODEDES.	54
3.2.1.- Mètodes de caracterització dels principis actius.	54
3.2.1.1.- Anàlisi elemental.	54
3.2.1.2.- Cromatografia en capa fina.	54
3.2.1.3.- Espectrefotometria de U.V.	54
3.2.1.4.- Cromatografia líquida d'alta eficàcia.	54
3.2.1.5.- Mètode de mesura de la hidrofobicitat.	56
3.2.1.6.- Obtenció del Clorhidrat de Codeïna.	56
3.2.2.- Mètodes de caracterització dels fosfolípids.	57
3.2.2.1.- Mètode de purificació de la fosfatidilcolina.	57
3.2.2.2.- Cromatografia en capa fina.	58
3.2.2.3.- Espectrefotometria de U.V.	58
3.2.2.4.- Cromatografia líquida d'alta eficàcia.	59
3.2.2.5.- Mètode de determinació quantitativa del fòsfor.	59
3.2.3.- Mètodes d'obtenció de liposomes.	60
3.2.3.1.- Mètode d'obtenció de Liposomes Multilaminars.	60
3.2.3.2.- Mètode d'obtenció de Liposomes Unilaminars.	60
3.2.3.3.- Mètode d'obtenció de liposomes per deshidratació i rehidratació.	61
3.2.4.- Mètodes de caracterització de liposomes: Microscòpia Electrònica.	62

3.2.5.- Mètodes de mesura de l'estabilitat dels liposomes.	63
3.2.5.1.- Estudi de la pèrdua del contingut en funció del temps.	63
3.2.5.2.- Estudi de l'agregació en funció del temps.	63
3.2.6.- Mètodes d'estudi de les interaccions lípid-principi actiu.	63
3.2.6.1.- Calorimetria diferencial d'escombrat.	63
3.2.6.2.- Mètode turbidimètric.	64
3.2.7.- Mètodes de determinació de l'activitat biològica.	64
3.2.7.1.- "In vitro": Bioassaig de l'íleum de conill porquí.	64
3.2.7.2.- "In vivo": Bioassaig de la immersió de la cua.	66
4.- RESULTATS I DISCUSSIO	
4.1.- Caracterització de principis actius.	68
4.1.1.- Obtenció del Clorhidrat de Codeïna.	68
4.1.2.- Anàlisi elemental.	68
4.1.3.- Cromatografia en capa fina.	69
4.1.4.- Quantificació del contingut en principi actiu del liposoma.	72
4.1.4.1.- Valoració del principi actiu encapsulat per trencament dels liposomes.	73
4.1.4.2.- Anàlisi per Cromatografia Líquida d'Alta Eficàcia.	74
4.1.5.- Mesura de la hidrofobicitat.	88
4.2.- Caracterització de fosfolípids.	92
4.2.1.- Purificació de la fosfatidilcolina.	92
4.2.2.- Control de puresa per cromatografia en capa fina.	92
4.2.3.- Control de peròxids.	93
4.2.4.- Control de puresa per Cromatografia Líquida d'Alta Eficàcia.	94
4.2.5.- Determinació quantitativa del fòsfor.	97

INDEX

4.3.- Capacitat d'encapsulació dels liposomes.	98
4.3.1.- Liposomes Multilaminars: MLV.	98
4.3.2.- Liposomes Unilaminars: SUV.	100
4.3.3.- Liposomes obtinguts per deshidratació i rehidratació: DRV.	103
4.3.3.1.- DRV no sonicats.	103
4.3.3.2.- DRV sonicats.	105
4.4.- Caracterització dels liposomes: Microscòpia Electrònica.	109
4.5.- Factors que influeixen en l'encapsulació de principis actius.	110
4.5.1.- Influència del tipus de liposoma.	110
4.5.2.- Influència de la composició lipídica.	112
4.5.3.- Influència del procés de sonicació.	115
4.6.- Comparació dels mètodes de separació dels liposomes del material no encapsulat.	118
4.7.- Estudi de l'estabilitat dels liposomes.	120
4.7.1.- Estudi de la pèrdua del material encapsulat en funció del temps.	120
4.7.2.- Estudi de l'agregació en funció del temps.	122
4.8.- Estudi de la interacció fosfolípid/principi actiu.	125
4.8.1.- Calorimetria Diferencial d'Escombrat.	125
4.8.2.- Turbidimetria.	144
4.9.- Activitat farmacològica dels liposomes.	146
4.9.1.- "In vitro": Bioassaig de l'íleum de conill porquí.	146
4.9.2.- "In vivo": Bioassaig de la immersió de la cua.	151
5.- CONCLUSIONS	153
6.- BIBLIOGRAFIA	156

INTRODUCCIO

1.-INTRODUCCIO

Els liposomes o vesícules lipídiques van ésser descrites per primera vegada als anys seixanta per Bangham i Horne (1962), després de l'observació per microscòpia electrònica d'una suspensió de fosfolípids d'origen cel.lular aïllats i purificats, com una sèrie de bicapes concèntriques de lípid que incloïen un espai aquós (Fig. 1).

Des del seu descobriment, els liposomes han sigut objecte d'estudi per part d'un gran número de laboratoris degut a la seva versatilitat en tamany, càrrega superficial, composició lipídica i varietat de principis actius que poden encapsular tant en la fase aquosa com en la lipídica. Aquest sistema lipídic s'ha emprat en multitud d'experiments de biologia cel.lular, farmacologia, immunologia, enginyeria genètica, terapèutica i medicina preventiva mitjançant la modulació o control dels paràmetres abans esmentats.

L'ús potencial dels liposomes com a portadors de fàrmacs s'ha vist afavorit per la disponibilitat d'anticossos, glicoproteïnes o glicolípidis reconeixadors de receptors ja que la unió d'aquestes entitats a la superfície dels liposomes ha permès controlar millor l'arribada de molècules actives encapsulades a les cèl.lules diana.

Aixímateix, la biodegradabilitat i l'absència de toxicitat dels seus components ha afavorit la difusió del seu ús i la contínua aparició de noves aplicacions.

En els apartats següents es comentarà amb detall els mètodes d'obtenció dels liposomes més usuals, les estructures cel.lulars amb què interaccionen, el seu destí quan són administrats per diferents vies i les seves aplicacions actuals i futures.

1.1.- LIPOSOMES

Totes les vesícules lipídiques formades per una o varies bicapes concèntriques que inclouen un espai aquós, es consideren liposomes. Es poden classificar segons varis criteris essent però, el que es basa en el seu tamany el més emprat. Així, es consideren dos grans grups, els grans amb un diàmetre comprès entre 100 nm i varis μm , i els petits que oscil·len entre 20 i 100 nm.

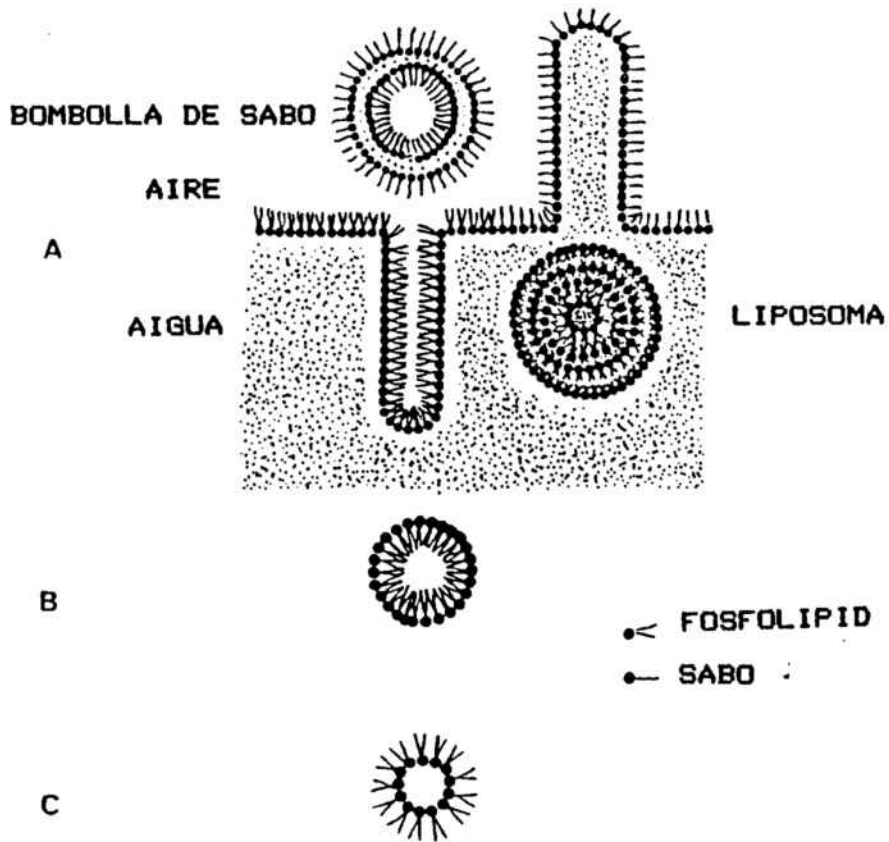


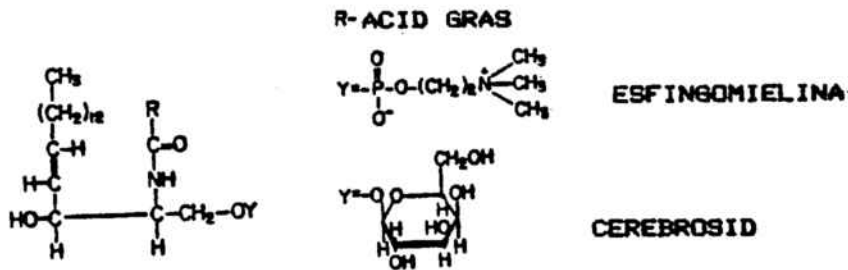
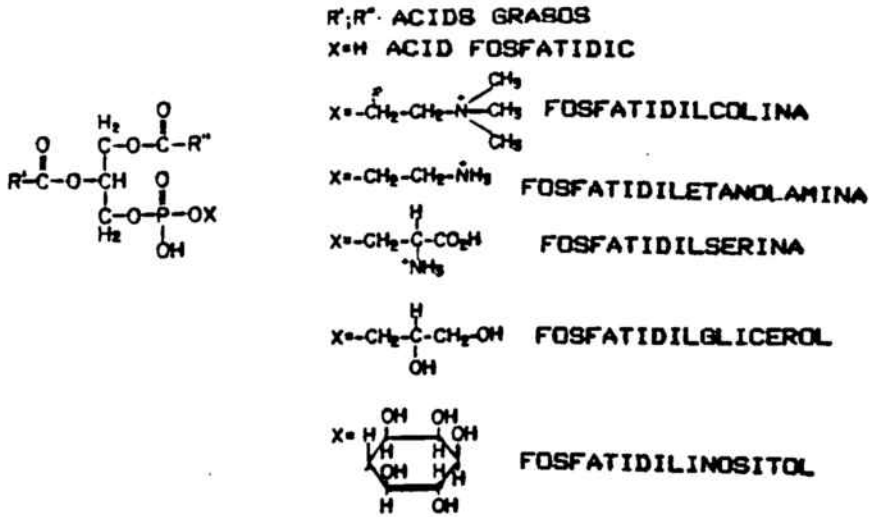
Figura 1.- Representació esquemàtica de les possibles formes d'ordenació de les molècules amfipàtiques en aigua, aire i interfase aire/aigua: A) Liposomes formats en excés de solució aquosa, B) Micels formades en excés de lípid i C) Micels inverses formades en excés de solvent orgànic.

Abans de centrar-nos en els mètodes d'obtenció convé fer unes consideracions generals sobre els lípids més emprats alhora de formar els liposomes i les seves propietats físico-químiques.

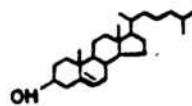
1.1.1.- LIPIDS

Els liposomes poden preparar-se a partir d'una gran varietat de lípids amfifílics o barreges de lípids, tant sintètics com d'origen natural sempre que s'hidratin amb un excés d'aigua. Els fosfolípids són els emprats més correntment en aquest tipus de preparacions donat que són els components majoritaris de les membranes biològiques.

També és usual incorporar una certa proporció de colesterol que els confereix estabilitat. Poden preparar-se àdhuc, amb una sola cadena amfipàtica, amb lisofosfàtids en presència de colesterol o amb dicetilfosfat (Figura 2).



$Y =$ OLIGOSACARID CONTENINT NEURAMINIC I GANGLIOSIDS



COLESTEROL

Figura 2.- Estructura química dels principals components de les membranes biològiques.

1.1.1.1.-Propietats físico-químiques.

Els lípids tenen una sèrie de propietats físiques poc corrents algunes de les quals, com les associades al seu estat sòlid, tenen gran importància tecnològica, mentre que d'altres, com el seu comportament en aigua, ho són en el seu aspecte biològic.

a) Propietats de l'estat sòlid.

En l'estat sòlid, àcids grassos, ceres i glicèrids presenten el fenomen de polimorfisme, conseqüència de les distintes formes amb que poden acoblar-se les cadenes hidrocarbonades. Així, existeix una gran varietat de formes cristal·lines. Les transformacions entre les diverses formes polimòrfiques poden fer-se per calefacció, refredament o recristal·lització amb solvents distintes. Les formes polimòrfiques produeixen patrons de difracció de ratjos X i espectres de IR diferents. Les propietats reològiques poden diferir bastant d'unes a altres.

b) Comportament dels lípids en aigua.

La forma com es disposen les molècules de lípid en una interfase aquosa depèn essencialment del seu caràcter polar o apolar. Aquesta característica permet classificar els lípids en dos grans grups, si bé la separació no és sempre massa clara.

Les molècules dels lípids no polars permaneixen associades i no s'orienten en l'interfase. Són insolubles en la fase aquosa i ni es suspenen ni s'emulsionen en aigua.

En presència d'aigua, els lípids polars (àcids grassos, fosfoglicèrids, esfingolípid) s'orienten espontàniament amb el grup polar cap a la superfície aquosa i la cadena hidrocarbonada allunyada d'ella. Sobre aquesta superfície es poden formar monocapes d'aquestes molècules.

El comportament dels lípids amb activitat superficial (polars) ve determinat pels dos caràcters oposats que tenen, una part de la molècula és hidròfila i l'altre hidròfoba. Aquests compostos s'anomenen amfipàtics o amfifílics.

Tots els fosfolípids són amfifílics i combinen una part polar i una d'apolar en la mateixa molècula. En un medi aquós poden adoptar diverses ordenacions. S'ha postulat que l'estructura d'una dispersió d'un fosfolípid en aigua depèn

principalment de la configuració dinàmica de les molècules individuals (Cullis, P.R., 1979). Això s'esquemmatitza en la fig.3. Molècules de lípid que presenten una forma de con amb un cap polar relativament petit, s'ajusten a una estructura hexagonal H_{11} . Pertanyen a aquest grup, per exemple, la Cardiolipina i P.A. en presència d'ions Calci i PE insaturada. Per una altra part, molècules amb un cap polar gran, com lisofosfolípids, pot considerar-se que presenten una forma de con invertit. Aquesta forma és compatible amb una estructura micel·lar. Finalment, les molècules lipídiques amb forma cilíndrica com PC, PS, PG, SM i PE saturada, adopten una disposició de bicapa.

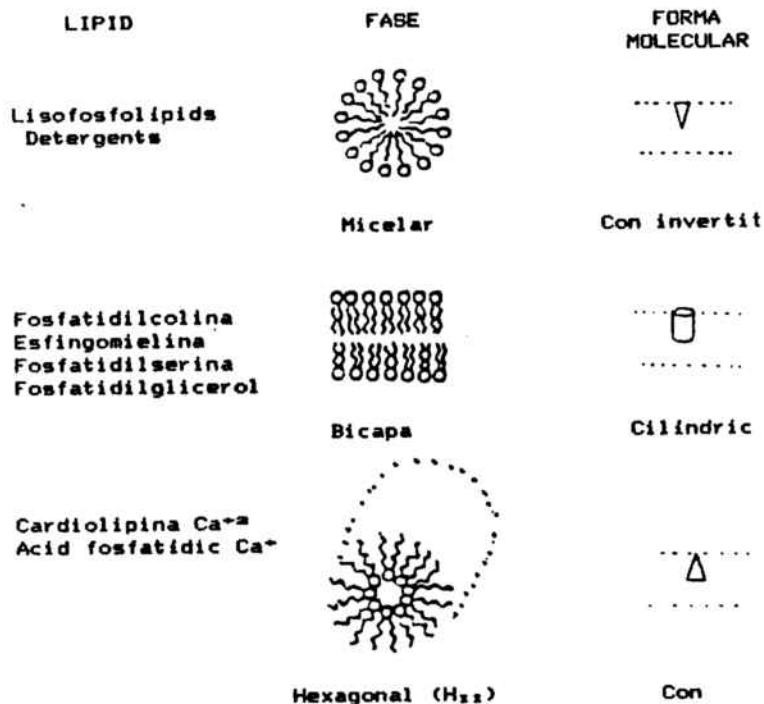


Figura 3.- Fases polimòrfiques i formes dinàmiques de les molècules lipídiques.

Només els lípids que presentin una ordenació en forma de bicapa formaran liposomes en contacte amb un medi aquós si bé, en la formulació dels liposomes, es poden incloure determinats percentatges de lípids que en estat pur no formen bicapes. Aquests no tenen perquè ésser necessàriament fosfolípids. Així, altres compostos amfifílics poden formar estructures vesiculars amb la condició de que la forma dinàmica de les molècules s'ajusti al model del cilindre. Els lípids micelars poden formar dispersions estables en

aigua però no delimiten cap espai aquós. Els lípids hexagonals formen grans agregats.

c) Propietats termotròpiques dels lípids.

Centrant-nos en les estructures laminars o bicapes que són les que tenen més interès en el tema que ens ocupa, s'ha observat que les seves propietats varien considerablement en funció de la temperatura. Una característica important dels lípids de membrana és que presenten transicions de fase reversibles depenents de la temperatura, en les que les cadenes hidrocarbonades del fosfolípid sofreixen una transformació des d'un estat ordenat anomenat gel fins a un més desordenat o fluid anomenat líquid cristallí (Lee, A.G., 1977).

La transició de gel a cristall líquid és un procés endotèrmic que ocorre en un interval estret de temperatures al voltant d'una temperatura característica, l'anomenada temperatura de transició (T_c).

En la figura 4 s'han representat les ordenacions corresponents a la transició.

En l'estat de gel les cadenes hidrocarbonades d'àcid gras estan en una conformació estirada i estretament empaquetada anomenada configuració "trans" i la seva llibertat de moviment està restringida. A l'augmentar la temperatura ocorre una transició de fase endotèrmica durant la que es produeix una isomerització rotacional "trans-gauche" al llarg de les cadenes d'àcid gras que són més mòbils, fet que provoca una expansió lateral i una disminució en l'espessor de la bicapa ja que l'àrea per molècula de fosfolípid augmenta. Aquest fenomen es pot observar per Calorimetria Diferencial D'Escombrat (DSC) i mesurant canvis en la turbidesa de les preparacions de liposomes amb un espectrofotòmetre d'U.V.

La T_c ve determinada per la naturalesa de les cadenes d'àcid gras i del cap polar del fosfolípid (Chapman, D., 1975). En general es pot dir que a igualtat de cap polar, l'addició de dos grups metilè en la cadena acilant augmenta entre 14° i 17° la T_c . Per exemple, la T_c de DMPC, DPPC i DSPC és 23° , 41° i 58° respectivament (Hinz, H.J., 1972).

També s'ha observat que la presència d'insaturacions o ramificacions voluminoses com anells de ciclopropà, produeixen una disminució de la T_c .

INTRODUCCIO

La contribució del cap polar en aquest paràmetre es reflexa en el fet que a igualtat de cadenes laterals T_c PE > T_c PS > T_c PC.

En fosfolípids àcids, com Dicetilfosfat, PS, PG o PA, la presència de cations divalents, per exemple Ca^{+2} i Mg^{+2} a condicions fisiològiques (0'1 - 10 mM) així com canvis de pH, poden augmentar també la T_c (Hauser, H., 1983).

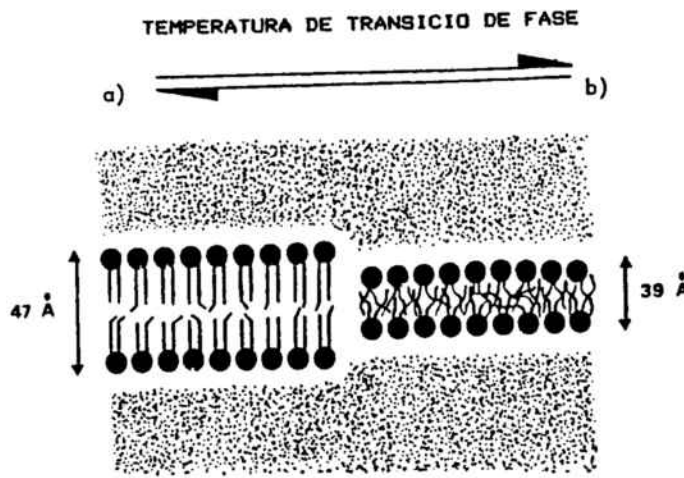


Figura 4.- Representació esquemàtica de l'estructura dels dos estats d'una bicapa fosfolipídica: a) fase de gel (sòlid), b) fase de cristall líquid (fluid); ●:residu polar; = cadenes d'àcid gras.

La presència d'impureses de qualsevol mena encara que sigui en petites quantitats, afecta notablement aquesta transició i es reflexa en canvis del valor de T_c , H i de l'aspecte del registre.

Les PC naturals estan formades normalment per barreges de diferents cadenes d'àcid gras raó que explica que la T_c sigui molt menys definida i més baixa en comparació amb les corresponents lecitines sintètiques tipus DPPC, DMPC o DSPC.

Altres factors intrínsecs com la polaritat dels lípids o factors extrínsecs com l'adsorció d'ions veïns o proteïnes també poden afectar el valor de T_c (Viniegra, S., 1984). Per exemple, l'addició d'ions H^+ l'eleva 17° en el cas de la DPPG (Watts, A., 1978) i de 6° a 8° en el cas de DMPA i DPPA

(Hunt, G.R.A., 1980). Similarment, el percentatge d'aigua de la preparació té una influència notable (Cevc, G. 1985).

Alhora de fer una preparació de liposomes és convenient saber la T_c dels lípids amb què es treballa i hidratar-los amb una solució aquosa a una temperatura superior a aquella.

L'estat físic de la bicapa afecta profundament la permeabilitat, velocitat de pèrdua i estabilitat general dels liposomes.

Es sap que la permeabilitat del liposomes respecte al solut encapsulat és relativament baixa quan la temperatura ambient està per sobre de la T_c . En la proximitat d'aquesta la membrana dels liposomes és molt permeable (De Gier, J., 1978).

El coneixement d'aquest paràmetre és molt interessant per l'aplicació dels liposomes en quimioteràpia, com es veurà més endavant, ja que tenint en compte els valors de la T_c els liposomes poden dissenyar-se per a fondre a una temperatura determinada. Aquesta estratègia s'ha utilitzat per a fer arribar el metotrexat a tumors sòlids que es calenten fins a la T_c dels lípids que formen el liposoma (Yatvin, M.B., 1978).

La T_c pot ésser modificada emprant barreges de fosfolípids o afegint colesterol.

En barreges de fosfolípids, la fase de transició s'extén a un interval de temperatura relativament ample (Lee, A.G. 1975) en el que es produeix una separació de fases coexistent l'estat sòlid i el fluid. Es evident que la separació de fases de lípids dins de dominis de distinta composició requereix una difusió lateral ràpida de les molècules. S'ha demostrat que en l'estat fluid, les molècules de fosfolípids es mouen molt ràpidament en el pla de la bicapa (Devaux, P., 1972). En contrast, el moviment de transbicapa o "flip-flop" és un procés extremadament lent (Roseman, M., 1975).

En barreges amb molècules no fosfolipídiques la T_c pot estar profundament afectada. El colesterol, un dels components més importants en les membranes eucariotes, és un compost d'aquest tipus ampliament emprat. Estudis fets amb liposomes que en contenen han sigut decisius alhora de demostrar la relació existent entre les propietats físico-

químiques degudes a les interaccions fosfolípid-colesterol i el possible paper fisiològic d'aquest últim en les membranes cel·lulars. Hi ha moltes referències sobre la influència del colesterol en les propietats de les membranes fosfolipídiques, com la condensació de la superfície ocupada per les molècules de fosfolípid, la inhibició del moviment de les cadenes acilades, l'increment de l'espessor de la bicapa per fosfolípids amb cadenes acilades curtes i un augment de l'orientació perpendicular de les mateixes (Olfield, E., 1972). Paral·lelament, s'ha vist que per damunt d'un 33 %, de la concentració molar, en colesterol, no es pot observar fase de transició (Szoka, F., 1980_a).

Per sota de la T_c (estat sòlid) el colesterol té un efecte fluiditzant feble, mentre que per damunt (estat fluid) disminueix la fluidesa. El resultat és una considerable reducció de la permeabilitat del liposomes vers els ions i molècules polars petites, quan s'arriba a la T_c (Allen, T., 1981). A més a més, redueix la possibilitat de penetració de certes proteïnes (HLD) en la bicapa lipídica, el que suposa un increment en l'estabilitat dels liposomes "in vitro" en presència de plasma sanguini (Damen, J.A., 1981) i "in vivo" després d'una injecció intravenosa (Senior, J., 1983). Encara no es coneix exactament com interacciona el colesterol amb els fosfolípids per a modular tots aquests paràmetres (Szoka, F., 1980_b). Es sap, no obstant, que augmenta el diàmetre de SUV aproximadament un 30 % quan és introduït a una concentració del 50 % respecte al total de fosfolípid. Per una altra part no té cap efecte en el seu tamany quan està a una relació molar del 20 % (Forge, A., 1978).

A més a més del mesomorfisme termotròpic, els lípids presenten mesomorfisme liotròpic que des d'un punt de vista biològic és molt més important. Quan es van addicionant quantitats creixents d'aigua a un fosfolípid sec, la T_c de gel a cristall-líquid disminueix fins arribar a un valor límit a aproximadament un 20% d'aigua (Chapman i col., 1967).

La quantitat d'aigua unida al fosfolípid depèn de la càrrega i del tipus de cap polar.

El interès en l'estudi de les transicions de fase dels fosfolípids resideix en que aquestes molècules formen l'estructura on estan submergides o incloses les proteïnes funcionals de la membrana. Així doncs, la possibilitat de

que l'entorn lipídic d'una proteïna funcional canviï en fluidesa, per exemple, pot explicar canvis en l'estructura global d'aquesta i pot conduir a modificacions en la seva activitat.

En el cas del Receptor Opiaci s'ha comprovat que modificacions en la fluidesa de la membrana afecten molt l'afinitat de les molècules opiàcies. Diversos autors han suggerit que el receptor podria ésser un proteolípid. Es per això, que en el present treball de Tesi Doctoral s'ha inclòs una part d'Anàlisi Tèrmica Diferencial que és una de les tècniques més sensibles per a detectar interaccions molècula-lípid.

1.1.1.2.- CALORIMETRIA DIFERENCIAL D'ESCOMBRAT (DSC)

L'anàlisi tèrmica diferencial es una tècnica molt emprada en l'estudi d'interaccions entre lípids i molècules fisiològicament actives. Aquestes interaccions s'estudien comparant les transicions de fase dels lípids purs i les de barreges dels mateixos amb les molècules desitjades (McElhaney, R.N., 1986).

Essencialment, la tècnica mesura els paràmetres termodinàmics associats a transicions de fase induïts tèrmicament. Per a dur-ho a terme s'escalfen simultaniament la mostra i un material inert col·locades cadascuna en una cèl.lula. Com que es suministra la mateixa quantitat de calor a ambdues la diferència de temperatures és zero. No obstant, si la mostra sofreix una transició de fase induïda per la temperatura, part del calor de la cèl.lula és absorbit o alliberat i la diferència de temperatures deixa d'ésser zero. El sistema de control de l'aparell es posa en funcionament i corregeix la desigualtat. Així doncs, el paràmetre que es registra en DSC és el diferencial o calor específic en excés com a funció de la temperatura de la mostra.

En la figura 5 s'ha representat un termograma típic de DSC en què s'indiquen els paràmetres més representatius per a una transició endotèrmica de primer ordre que és la que es produeix en el pas de gel a cristall líquid d'una dispersió aquosa d'un fosfolípid pur. T_m és la temperatura de transició de fase per la fusió de les cadenes hidrocarbonades. Si la corba és simètrica T_m representa la temperatura a la qual s'ha produït un 50% de la transició de gel a cristall líquid. Quan un fosfolípid és pur, la transició ve representada per pics molt aguts.

L'amplitud de la temperatura a la mitad d'alçada del pic ($\Delta T_{1/2}$) dóna una idea de la puresa del producte. Amb els aparells convencionals s'accepta de l'ordre d'un grau. Per a barreges complexes pot arribar a diferències de 10° a 20° .

Encara que la transició de gel a cristall líquid és la més important i millor estudiada, en els lípids purs es poden observar dues transicions menors dins l'estat laminar anomenades subtransició i pretransició. La primera és una transició des d'una fase laminar parcialment deshidratada (fase L_c) en que les cadenes hidrocarbonades estan molt ben ordenades i empaquetades, a una fase de gel molt més hidratada (fase L_B) en que les cadenes d'hidrocarbonades, tot i estar encara completament estirades, rotacionalment estan desordenades i menys empaquetades. En la pretransició la fase L_B passa a una altre fase laminar denominada P_B , en que les cadenes encara estan més exteses però les bicapes no són planes sino que presenten ondulacions amb una certa periodicitat. Finalment, la transició més energètica i cooperativa que és la principal en que la fase P_B passa a líquid cristal·lí, fase L_α , en que les cadenes hidrocarbonades estan molt desordenades però mantenen una orientació mitja perpendicular al pla de la bicapa. Segons els lípids i la seva puresa poden aparèixer aquestes fases i d'altres. No obstant, en membranes biològiques només s'ha trobat el pas de gel a cristall-líquid i per això és sempre el més estudiat.

Els efectes que molècules estranyes poden produir en la transició de fase dels lípids poden classificar-se en tres grans grups:

a) Si no varien o augmenten molt poc T_m i/o $\Delta T_{1/2}$ i apareix un increment apreciable i progressiu de ΔH en funció de la quantitat de molècula incorporada. Aquestes molècules no expandeixen les monocapes de fosfolípid ni alteren la premeabilitat de les vesícules en que estan encapsulades.

b) Si disminueix T_m , augmenta $\Delta T_{1/2}$ i disminueix progressivament ΔH , les molècules en qüestió expandeixen les monocapes i augmenten la permeabilitat dels liposomes.

c) Si tenen poc efecte sobre T_m o $\Delta T_{1/2}$ però ΔH disminueix linealment a mesura que augmenta la seva concentració, es comporten com en el cas anterior.

Aquest tercer tipus de molècules es creu que penetren profundament en la part hidròfoba de les bicapes de fosfolípid i interaccionen amb les cadenes alquíliques.

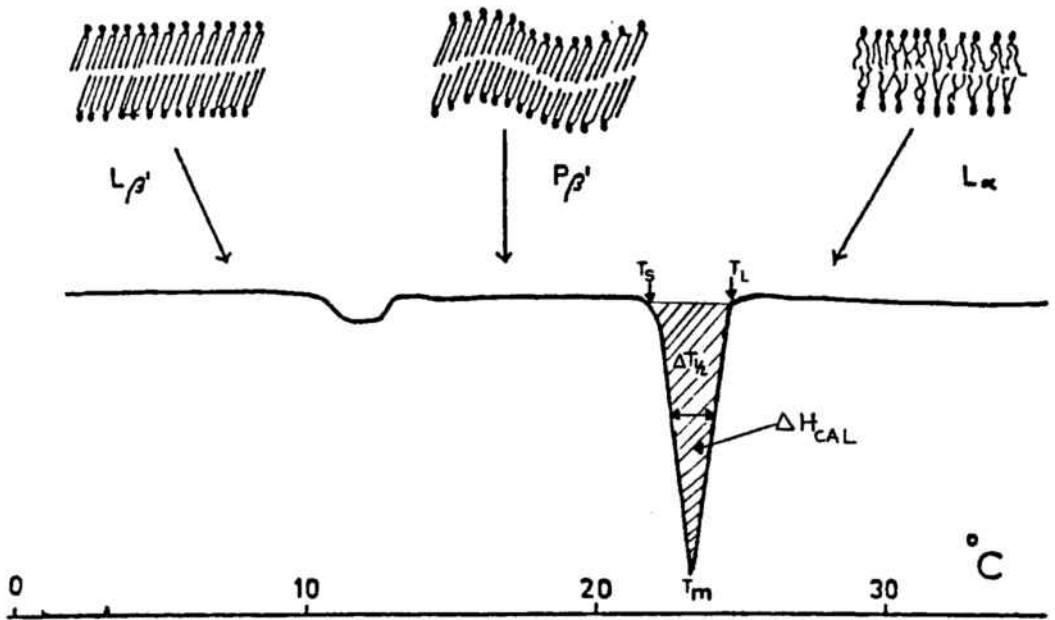


Figura 5.- Termograma de DSC corresponent a la DMPC (transició endotèrmica de primer ordre: gel \rightarrow cristall líquid). T_m : temperatura de transició, T_s : Temperatura a la que comença la transició, T_l : Temperatura a la que acaba la transició, $\Delta T_{1/2}$: diferència de temperatura entre els límits inferior i superior de la fase de transició ($T_s - T_l$) i ΔH_{CAL} : increment d'entalpia.

1.1.2.- METODES D'OBTENCIO

1.1.2.1.- LIPOSOMES GRANS

En aquest grup s'inclouen tres tipus de liposomes, els Multilaminars, els Unilaminars grans i els Oligolaminars.

A.-LIPOSOMES MULTILAMINARS (MLV).

Consisteixen en moltes bicapes fosfolipídiques ordenades en forma d'esferes concèntriques que alternen amb compartiments aquosos. Es formen espontaniament per hidratació d'un fosfolípid completament sec tal com van descriure Bangham i col. el 1965. El lípid o lípids es dissolen en un solvent orgànic, normalment cloroform o metanol, el qual s'evapora en un rotavapor de forma que quedin formant una fina pel·lícula en les parets del matrau. Es passa un corrent de nitrogen o d'argon per tal d'eliminar qualsevol traça de dissolvent i a continuació s'addiciona la solució aquosa que conté el material que es vol encapsular. La temperatura de la fase aquosa ha d'estar per sobre de la T_c del lípid o en el cas de que es tracti d'una barreja de lípids, per sobre de la T_c del component que la tingui més alta.

La dispersió del lípid es facilita barrejant amb un bany d'ultrasons, amb un vibromixer o addicionant boles de vidre. S'obté així, una suspensió lletosa de liposomes heterogenis respecte al tamany i nombre de bicapes. Els més grans arriben a tenir varies micres de diàmetre. Una agitació prolongada pot produir una reducció del seu tamany promig (Olson, F., 1979). El temps d'hidratació així com les condicions d'agitació són dos paràmetres a considerar per tal d'aconseguir la màxima encapsulació del material. Així, una agitació suau suposa un 50% més d'encapsulació respecte a una agitació feta durant 2 hores sota les mateixes condicions de concentració lipídica i composició. Si el temps d'hidratació es redueix a 30 minuts i s'agita vigorosament, el volum encapsulat és més baix i les vesícules tenen un diàmetre més petit (Ostro, M.J., 1983).

Les MLV presenten un grau d'encapsulació baix que depèn àdhuc d'un lot a un altre preparat a les mateixes condicions. Aquest desavantatge no suposa cap problema alhora de treballar amb material lipòfil donat que pot incorporar-se entre la bicapa dels liposomes (Knight, C.J., 1981).

El volum interlaminar, i en conseqüència el volum total encapsulat, pot incrementar-se incorporant d'un 10 a un 20% de mols de lípids carregats elèctricament (Bangham, A.D. 1965). Una agitació vigorosa, una sonicació breu o bé una filtració a través de filtres de policarbonat (Ostro, M.J., 1983) proporcionen vesícules més petites i preparacions de tamany més homogeni. El volum aquós encapsulat per aquests MLV varia de 1 a 4 l/mol de fosfolípid. Sota condicions apropiades, MLV poden encapsular inhibidors de proteases (Finkelstein, M.C., 1978), polinucleòtids (Kulpa, C.F., 1976), proteïnes de tamany variable (Adrian, G., 1979), fragments de DNA d'elevat pes molecular (Hoffman, R.M., 1978), enzims i molècules de baix pes molecular (Gregoriadis, G., 1976).

Com avantatges destaquen la facilitat en la seva preparació i la seva estabilitat relativa durant l'emmagatzematge i en presència de components sanguinis (Scherphof, G., 1981).

El material no encapsulat que està en la fase aquosa externa pot separar-se per centrifugació, diàlisi o cromatografia.

Els MLV responen als gradients osmòtics per inflament o contracció doncs es comporten com osmòmetres en contrast amb els SUV que no presenten aquest comportament. La seva permeabilitat en front a varis soluts ha sigut estudiada extensivament encara que no s'ha pogut fer una quantificació precisa donada la seva naturalesa multicompartimental i l'heterogeneïtat de tamany (Bangham, A.D., 1974).

Juliano i col. (1984) van caracteritzar MLV compostos per derivats polimeritzables de la PC que es formen per acció d'una radiació U.V. Es diferencien de les vesícules lipídiques convencionals per la seva estabilitat en front a alteracions mecàniques i químiques. Això suposa un avantatge en quan a la seva aplicació terapèutica "in vivo" i per estudis de reconstitució proteica "in vitro" (Wagner, N., 1981).

B.- LIPOSOMES UNILAMINARS GRANS (LUV).

Hi ha varies tècniques per a obtenir-los amb un marge de diàmetres comprès entre 100 nm i varies micres. Reeves i Dowben (1970) van descriure la preparació de LUV amb un diàmetre que oscil.lava entre 5 i 10 µm.

a) Evaporació en fase reversa.

Les LUV es formen a partir d'emulsions de fosfolípid en un medi aquós en presència d'un excès de solvent orgànic (Szoka, F., 1980_a). El lípid es dissol en un solvent orgànic, normalment dietilèter o isopropilèter al que s'hi addiciona la fase aquosa. La barreja es sonica breument en un bany d'ultrasons per tal de formar una emulsió estable, consistint en gotes d'aigua molt petites en èter, estabilitzades per monocapes de fosfolípid (miceles invertides). Després, s'elimina el solvent orgànic sota pressió reduïda formant-se així, un gel (miceles invertides empaquetades) i quan tot el solvent s'ha evaporat, una suspensió de LUV.

L'espai aquós en liposomes, de 7 a 11 l/mol, és també més elevat en comparació amb el de MLV i SUV (Szoka, F., 1980_a).

El tamany dels LUV oscil.la de 100 a 900 nm de diàmetre segons la composició lipídica. Per tal d'obtenir una població homogènia de LUV la preparació es sotmet a una extrussió a través de filtres de policarbonat (Szoka, F. 1980_b).

Com avantatges d'aquesta tècnica es pot esmentar l'elevada eficiència d'encapsulació (fins un 50%), la possibilitat de treballar amb una gran varietat de fosfolípids, l'obtenció d'una població homogènia i la reproduïbilitat en l'eficiència d'encapsulació a l'eliminar l'etapa de secar del lípid. Per una altra part, cal dir que és aplicable a gran escala i per a una gran nombre de substàncies, àdhuc material macromolecular. Com a desavantatges hi ha la necessitat de sonicar la solució orgànica que conté el lípid i la solució aquosa amb el principi actiu per tal d'obtenir una emulsió òptima, el contacte del solvent orgànic amb el material a encapsular, la temperatura que es requereix per a evaporar el solvent sota pressió reduïda, condicions excessivament severes per a encapsular material làbil.

b) Vaporització d'èter.

Mètode introduït per Deamer i Bangham (1976). El lípid es dissol en dietilèter o en una barreja d'aquest amb metanol i es injectat lentament dins de la fase aquosa que conté el solut a encapsular a 55°- 65°. La preparació es filtra a través d'un filtre milipore de 1'2 µm de diàmetre de porus o cromatografia de gel filtració a través de Sephadex G-50.

Aquest mètode pot aplicar-se a una barreja de lípids, però l'ús de solvents orgànics i la relativament elevada temperatura necessària per l'evaporació del dissolvent pot desnaturalitzar macromolècules o inactivar substàncies dissoltes. A més a més, els liposomes elèctricament neutres tendeixen a agregar-se (Szoka, F., 1980_b).

La distribució de tamany tendeix a ésser heterogènia i l'eficiència d'encapsulació baixa. No obstant, el volum encapsulat per mol de lípid és elevat i varia entre 8 i 17 l/mol (Deamer, D., 1976).

Una modificació d'aquesta tècnica ha reemplaçat el dietilèter per èter de petroli (Schieren, H., 1978). S'ha encapsulat seguint aquest mètode proteïnes (Deamer, D., 1976), RNA (Ostro, M.J., 1977) i DNA (Nicolau, C., 1982).

c) Fusió induïda pel calci.

Mètode únic per a preparar LUV amb fosfolípids àcids (Papahadjopoulos, D., 1977). Consisteix en l'addició de Ca⁺² a una solució de SUV. Així es formen per fusió, uns cilindres grans. Les estructures multilaminars es pleguen en una configuració espiral. L'addició d'EDTA a la preparació produeix vesícules unilaminars esfèriques grans.

Les LUV poden separar-se del material no encapsulat per centrifugació (48.000 x g, 20 minuts), cromatografia de gel filtració o àdhuc ultracentrifugació en un 5-20% gradient Ficoll (Wilson, T., 1977).

Malgrat que la preparació és fàcil i l'eficiència d'encapsulació és relativament gran, la presència d'ions calci i de l'agent quel.lant suposa una contaminació de la mostra, el que fa que aquest mètode no sigui massa bó. A més a més, com que està limitat a fosfolípids àcids, els liposomes obtinguts no han sigut gaire estudiats.

d) Sonicació per sota la T_c dels fosfolípids.

Es poden preparar liposomes unilaminars a partir d'una suspensió de MLV per sonicació a temperatura per sota la T_c dels fosfolípids. S'han trobat defectes en la bicapa lipídica (Bakouche, O., 1983) que poden eliminar-se per incubació dels liposomes a una temperatura per sota la T_c . Així es fusionen les SUV per a donar LUV (Lawaczeck, R., 1976) estables.

Aquest mètode només és aplicable a fosfolípids neutres que tinguin una elevada T_c com DPPC, DMPC i DSPC (Szoka, F., 1980 b).

Els liposomes obtinguts són heterogenis en tamany i alguns d'ells tenen un diàmetre superior a 1 μm . Sota condicions òptimes, poden incorporar d'un 15 a un 20% de sucrosa amb un volum d'encapsulació de 10 l/mol de fosfolípid. El procediment és simple, s'evita la sonicació i proporciona vesícules unilaminars grans estables. El principal desavantatge es que està limitat a uns determinats fosfolípids.

C. -LIPOSOMES OLIGOLAMINARS

Malgrat que totes les preparacions de liposomes es podrien considerar oligolaminars si no es segueix cap tècnica per aconseguir una població homogènia després de la seva obtenció, hi ha un tipus de liposomes (DRV) quina distribució de tamany fa que s'ajustin millor a aquesta denominació.

Liposomes obtinguts per deshidratació i rehidratació(DRV)

Mètode descrit per Kirby i Gregoriadis (1986) que es basa en la formació de liposomes per fusió d'uns preliposomes mitjançant una deshidratació i posterior rehidratació dels mateixos.

Les condicions de treball suaus permeten encapsular principis actius làbils així com substàncies de PM molt divers proporcionant un elevat percentatge d'encapsulació (27-72%).

Els DRV poden separar-se del material no encapsulat a una velocitat de centrifugació relativament baixa. Per a obtenir un tamany més homogeni es pot fer una filtració amb membranes de policarbonat combinada amb una diàlisi.

La interrupció del procés després de la deshidratació permet guardar els preliposomes durant un període indefinit de temps, podent-se fer servir quan es vulgui ja que la reconstitució de la preparació liofilitzada és molt ràpida.

Aquest mètode es diferencia dels altres en la gran proporció de liposomes oligo i multilaminars que es formen. Els segons presenten l'avantatge de que redueixen la pèrdua de soluts encapsulats difonibles en presència de plasma, com s'ha demostrat per l'elevada retenció de carboxifluoresceïna.

L'heterogeneïtat del seu tamany sembla no tenir importància en farmacologia, encara que si hi hauria d'haver una reproduïbilitat en la distribució de tamanyos alhora de replicar les preparacions.

L'elevada captació pel fetge i melsa després de l'administració i.v., degut al seu gran tamany suposa un avantatge per algunes aplicacions clíniques (Rao, L.S., 1983).

Hi ha altres tècniques basades en la congelació-descongelació de liposomes en presència de clorurs de metalls alcalins (Oku, N., 1983 ^a) o en presència de tricloroacetat sòdic, guanidina-HCl, urea, tiocianat potàssic o nitrat potàssic (Oku, N., 1983 ^b) seguit per diàlisi o eliminació del detergent dissolt en MeOH que porten a l'obtenció de vesícules unilaminars gegants (GUV) amb diàmetres que varien de 10 a 100 µm. Les condicions que es requereixen per la seva preparació, la seva fragilitat i tamany impedeixen el seu ús en teràpia.

1.1.2.2.- LIPOSOMES PETITS: SUV

Aquests tipus de liposomes consisteixen en una única bicapa de lípid que envolta un compartiment aquós (Huang, C. 1969). El seu tamany està comprès entre 20 i 50 nm de diàmetre segons el lípid i el mètode emprat per obtenir-los.

A part de la varietat de tamanyos, es diferencien dels MLV pels següents aspectes:

- no estan afectats per canvis osmòtics,
- un 70 % del lípid total està localitzat en la capa més externa de la bicapa,
- el radi de corbatura és petit, fet que provoca tensions en l'empaquetament de les molècules de lípid, facilitant els estudis de RMN

Els mètodes més usuals de preparació són:

a) Dispersió ultrasònica.

El mètode més emprat per a obtenir-les és la dispersió ultrasònica de MLV ja sigui amb una sonda o amb un bany d'ultrasons. En el primer cas, el procés és ràpid però la preparació queda contaminada amb partícules de titani que es desprenen de la sonda. Un altre desavantatge està en que els fosfolípids són susceptibles de degradar-se, i a més a més es poden generar aerosols que poden ser perillosos. En el segon cas s'eviten tots aquests problemes però el temps necessari per a obtenir una població homogènia de SUV és molt més gran. Depenent del temps de sonicació la preparació pot contenir una població heterogènia de vesícules: MLV i SUV que poden separar-se mitjançant una cromatografia sobre gel en Sepharosa 4B o 2B. Les MLV surten en el volum d'exclusió mentre que SUV queden més retenides (Figura 6).

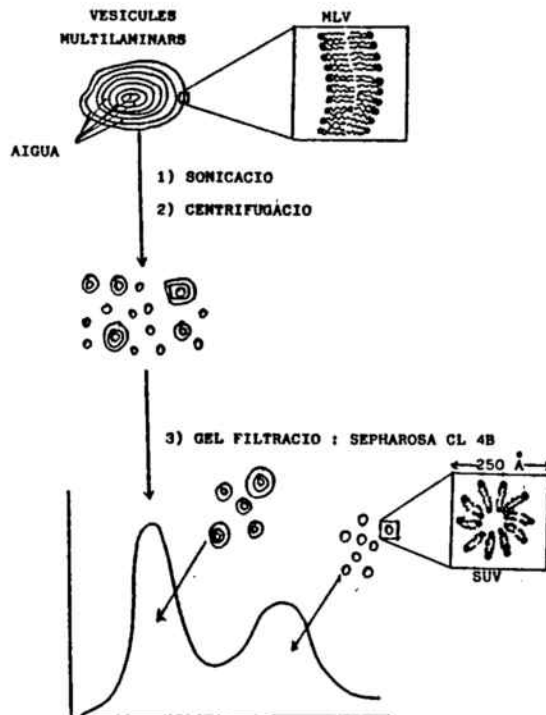


Figura 6.- Representació esquemàtica del procés complet d'obtenció de SUV.

La sonicació ha de fer-se per sobre de la T_c del lípid. Per sota de la T_c s'obtenen vesícules amb defectes estructurals en la bicapa (Lawaczek, R., 1976), són inestables i altament permeables.

La inclusió de fosfolípids carregats en la bicapa facilita la reducció del tamany de les vesícules, mentre que la presència de colesterol l'augmenta (Forge, A., 1978).

Huang (1969) va fer una estudi detallat de SUV fets amb PC d'ou, obtinguts per sonicació amb sonda d'ultrasons i posterior cromatografia en gel filtració. Així va descriure que les vesícules tenien un diàmetre de 25 nm i un pes de partícula de $2 \cdot 10^6$ daltons. El número de molècules de lípid per vesícula era d'unes 3000. Degut a l'elevat radi de corbatura, el nombre d'aquestes en la monocapa externa era aproximadament el doble que en la interna. Amb barreges de lípids això pot produir una distribució asimètrica dels components lipídics entre les dues unitats de la bicapa.

L'espai intern petit, la baixa eficiència d'encapsulació i la impossibilitat d'aplicació a gran escala va fer que es seguissin altres estratègies encaminades a l'obtenció de SUV.

b) Injecció d'etanol.

Mètode basat en la injecció d'una solució etanòlica de fosfolípid a una solució aquosa (Batzri, S., 1973). El tamany i grau d'heterogeneïtat dels liposomes depèn de la concentració dels lípids i dels volums relatius de les fases alcohòlica i aquosa.

Aquesta tècnica minimitza la possibilitat de degradació del lípid i elimina el problema de la formació d'aerosols. Com a desavantatges destaquen la baixa eficiència d'encapsulació dels soluts dissolts (en la fase aquosa), l'elevat grau de dilució i la necessitat de que els lípids siguin solubles en EtOH. Aquest s'elimina per diàlisi.

Una modificació d'aquest mètode (Kremer, J.M.H., 1977), variant la concentració de lípid en etanol de 3 a 36 mM, es va emprar per a produir vesícules amb un diàmetre promig entre 30 i 110 nm respectivament.

c) Extrussió per una "French press"

Mètode basat en la injecció d'una suspensió aquosa de fosfolípids sotmesa a una alta pressió a través del petit orifici d'una "French press" (Barenholz, Y., 1979). Una única extrussió de 20.000 psi proporciona una preparació heterogènia que conté aproximadament, un 60 % de SUV. El rendiment referent al número de SUV formades i el seu tamany depenen de la pressió aplicada. Extrussions múltiples a elevada pressió produeixen una població homogènia de SUV. El volum encapsulat per aquestes vesícules és limitat. Però és un mètode no destructiu, reproduïble i els liposomes es poden preparar amb una elevada concentració de lípid.

d) Eliminació del detergent

Tècnica introduïda per Kagawa (1971) que va emprar-la per a reconstituir proteïnes de membrana dins de bicapes artificials. El lípid (s) es solubilitza en un detergent. Es formen així unes mícels de fosfolípid i detergent. A mesura que s'elimina el darrer, les mícels esdevenen progressivament més riques en fosfolípid i finalment, coalesceixen per a formar vesícules d'una única bicapa lipídica.

Els detergents amb Concentració micelar crítica (CMC) relativament elevada poden ésser eliminats fàcilment contràriament als que la tenen baixa.

Els mètodes emprats més usualment per a obtenir-les són centrifugació (Warren, G.B., 1974), cromatografia sobre gel filtració (Enoch, H.C., 1979) o diàlisi ràpida controlada (Zumbuehl, O., 1981) encara que també han estat preparades a partir de mícels de lípid (Triton X-100) per adsorció del detergent o Bio-beads SM2 (Gerritsen, W.J., 1978).

Com avantatges destaquen l'obtenció d'una població homogènia, l'absència d'evaporació i de temperatures elevades el que suposa la possibilitat de treballar amb substàncies làbils.

Com a desavantatges cal esmentar el baix nivell d'encapsulació per pèrdua del material durant la diàlisi mentre s'estan formant els liposomes, excepte en el cas de compostos macromoleculars, i la presència de residus d'agent surfactant al final de la diàlisi.

1.1.3.- CARACTERITZACIO DELS LIPOSOMES

Malgrat el gran volum d'experimentació acumulada sobre els liposomes existeixen encara diferències notables entre els resultats obtinguts en distints laboratoris. La procedència dels lípids, el mètode d'obtenció dels liposomes, la temperatura ambient, la velocitat d'agitació, de centrifugació i d'homogeneització, entre d'altres paràmetres, fan necessari un control del percentatge d'encapsulació, l'estabilitat i tamany en cada lot de liposomes.

L'estabilitat, considerada com la pèrdua de producte encapsulat. Inicialment, es quantificava emprant la Carboxifluoresceïna. Aquest mètode es va imposar per la possibilitat d'aplicar-lo sense necessitat de separar el producte no encapsulat. Essencialment es basa en el fet de que aquest compost encapsulat, a una concentració 100 mM, no produeix fluorescència perquè presenta el fenomen de "quenching" o anul·lació. Si surt del liposoma i queda diluïda en l'espai aquós extern, la fluorescència es manifesta i es pot mesurar.

El principal desavantatge d'aquest procés és que presuposa que totes les molècules actives encapsulades s'alliberen a la mateixa velocitat i això no és cert. Així doncs, aquest procediment a efectes comparatius entre diferents composicions de liposomes, pot ésser útil però si es vol conèixer amb exactitud la cinètica d'alliberació d'una molècula concreta, és necessari fer l'estudi d'estabilitat amb la molècula encapsulada. En aquest cas el procediment a seguir requereix tal com es descriu amb detall en l'apartat de mètodes, la presa de mostres a temps variables, la separació del producte no encapsulat dels liposomes i la seva quantificació.

Es necessari també conèixer el tamany dels liposomes. Per això, s'han emprat diferents mètodes com la Microscòpia Electrònica (Szoka, 1980_b) i Dispersió de la Llum (Light Scattering) (Wu, P.S., 1981). La primera tècnica és la que proporciona una informació més directa de les mostres, que previament han estat tenyides amb la sal d'un metall pesat com l'acetat d'uranil. Per a saber el tamany promig d'una preparació amb fiabilitat, s'han d'observar de 300 a 400 vesícules.

1.1.4.-INTERACCIONS LIPOSOMES-CEL.LULES "IN VITRO"

L'estudi de la interacció liposoma/cèl.lula és un model que pot proporcionar molta informació sobre certs processos biològics (Margolis, L.B., 1979) i al mateix temps orientar sobre la seva aplicabilitat com a transportadors de fàrmacs. Malauradament, no s'ha arribat a cap acord per tal de determinar el tipus d'interacció i quin és el paper que hi juguen la composició i l'estructura del liposoma. Malgrat aquest desconeixement, hi ha suficients dades experimentals per a proposar 4 tipus de mecanismes: Intercanvi lipídic, Fusió, Adsorció i Endocitosi (Figura 7).

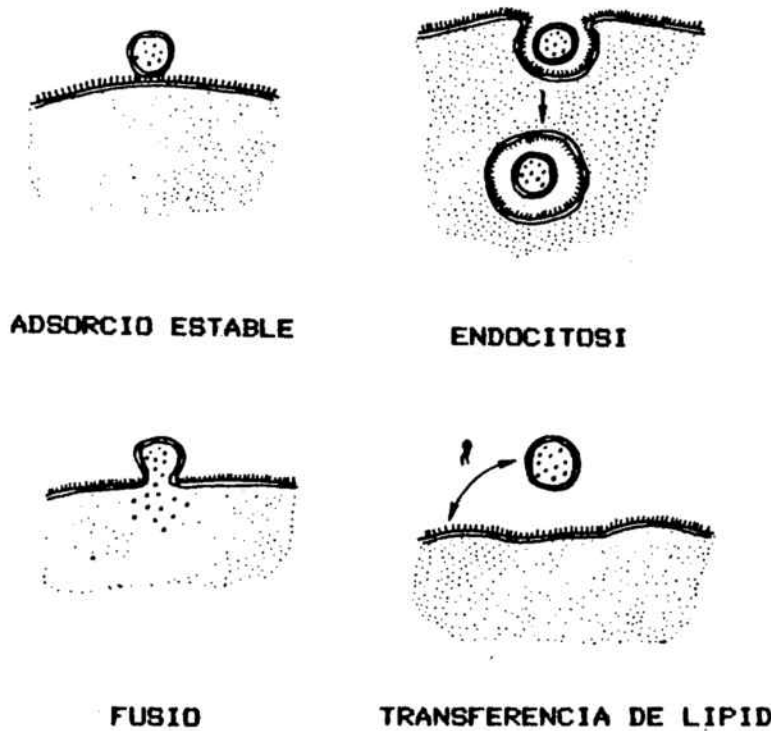


Figura 7.- Representació esquemàtica dels possibles mecanismes d'interacció entre SUV i la superfície cel·lular.

1.1.4.1.-Intercanvi lipídic

Es produeix una transferència entre les molècules lipídiques individuals dels liposomes i les de tota la superfície cèl.lular sense que hi hagi contacte cèl.lular/contingut liposomal.

Aquest fenomen va ésser observat per primera vegada emprant liposomes fets amb (^{14}C) dioleil PC que contenien com a marcador (^3H)-Inulina (Pagano i Huang, 1975). Durant la seva incubació amb fibroblasts a 2 $^{\circ}$ només era transferit el lípid marcat. El fet de que la (^3H)-Inulina no s'associés a la cèl.lula suposava un argument contra les propostes d'endocitosi, fusió i adsorció liposoma-cèl.lular, ja que aquests processos requereixen l'alliberació del marcador contingut en l'espai aquós de liposoma. A més a més, experiments fets emprant liposomes formats amb el mateix fosfolípid marcat i (^{14}C)-colesterol indicaren que les espècies lipídiques individuals podien ésser transferides de vesícules a cèl.lules en diferents proporcions durant incubacions a baixes temperatures.

L'intercanvi es redueix significativament quan les cèl.lules són tractades amb tripsina (Sandra i Pagano, 1979), el que suggereix que hi poden intervenir les proteïnes intercanviadores de la superfície cel.lular. Es sap que el colesterol dels liposomes s'intercanvia ràpidament amb el colesterol de les membranes plasmàtiques (Bruckdorfer i col., 1969).

La participació d'un lípid en el procés d'intercanvi lipídic pot dependre només de les seves propietats físiques (concentració micel.lar crítica, T_c). La longitud de la cadena d'àcid gras afecta la proporció de lípid transferit espontaniament entre bicapes artificials. Estudis posteriors (Nichols i Pagano, 1981) indicaren que la transferència vesícula-vesícula es produeix via monòmers de lípid lliure en solució. Si s'aplica aquest model al bescanvi vesícula-cèl.lular, llavors la relació i l'extensió de tal transferència dependrà tant de les constants de dissociació i d'associació monòmer-vesícula com de les de monòmer-cèl.lular. Donat que aquestes constants es veuen afectades per la composició de la membrana, l'absència de bescanvi observada en certs derivats lipídics pot reflexar unes constants d'equilibri desfavorables monòmer-vesícula i/o monòmer-membrana plasmàtica per a tals espècies.

El bescanvi vesícula-cèl.lula sembla ésser un procés saturable quan es monitoritza amb lípids radioactius o fluorescents (Struck i Pagano, 1980).

Fins el moment, el paper "in vitro" d'aquest fenomen és subjecte d'especulació. A nivell cel.lular s'ha suggerit que pot tenir una relació amb la biogènesi de les membranes. L'intercanvi lipoproteïna-lípid cel.lular podria servir per a transportar lípids i altres molècules lipofíliques entre cel.lules i teixits. Finalment, aquest procés podria contribuir també a l'asimetria lipídica de transbicapa de la membrana plasmàtica.

1.1.4.2.-Fusió

Consisteix en la unió dels liposomes i la bicapa de la membrana plasmàtica amb la subseqüent alliberació del contingut de les vesícules en l'espai citoplasmàtic.

Hi ha dos criteris per a explicar aquest procés, un es basa en la barreja del contingut aquós liposomal amb el citoplasma cel.lular i l'altre en la barreja dels lípids liposomals amb els de la membrana plasmàtica. Així, pot confirmar-se la fusió si el grau de captació pels lípids liposomals és el mateix que pel contingut aquós. Però això no és una prova directa de fusió ja que l'adsorció i l'endocitosi proporcionarien el mateix resultat (Huang, C.H., 1978). L'evidència més convincent que apoya aquest mecanisme és que substàncies biològicament actives i impermeables a les membranes cel.lulars, poden ésser introduïdes en el citoplasma cel.lular quan són encapsulades en liposomes.

El paper del tipus de cel.lula, tamany i composició dels liposomes i altres variables en la fusió cel.lula-liposoma no ha sigut investigat extensament, però cadascun d'aquests paràmetres s'ha vist és important en certs aspectes de la captació de liposomes. Poste i Papahadjopoulos (1976) van suggerir que pràcticament no hi havia fusió quan es treballava amb lípids neutres i que s'augmentava en presència de PS. Per una altra part, estudis fets per Weinstein i col. (1977), van demostrar que la fusió es produïa amb liposomes de PC neutres pel que no està clara la influència dels lípids carregats en aquests procés. En quan al tamany, s'ha suggerit que la fusió es veu afavorida al disminuir el tamany dels liposomes (Nir, S., 1980).

1.1.4.3- Adsorció.

Suposa l'associació estable de liposomes intactes amb la superfície cel.lular de forma que no poden ésser eliminats d'allí per rentats succesius. S'ha de senyalar que, depenent de les condicions d'incubació, poden ésser transportats als compartiments interns de la cel.lula per endocitosi. Es un dels mecanismes més senzills però és difícil de quantificar. Generalment ocorre a una temperatura pròxima o per sota de la T_c dels fosfolípids integrants dels liposomes. Emprant limfòcits de ratolí, Huang i col. (1978), van demostrar que l'adsorció màxima de liposomes de DPPC es produeix prop de la T_c d'aquests lípids.

Per les tècniques de radioiodinació de superfície cel.lular, electroforesi i autoradiografia s'ha suggerit que hi ha dos polipèptids de superfície cel.lular de PM 60.000 responsables de l'adsorció. El destí final dels liposomes adsorvits no està clar però es creu que poden penetrar en la cel.lula per fusió o endocitosi.

1.1.4.4.- Endocitosi

Consisteix en la ingestió de liposomes intactes en vesícules endocítiques, produint-se a continuació, la seva alliberació en l'aparell lisosomal. El nivell d'endocitosi depèn de la composició lipídica dels liposomes (Razt, A., 1981) així com de la presència de molècules marcadores ancorades a la superfície del liposoma.

1.1.5.- FARMACOLOGIA DELS LIPOSOMES

La recerca en el camp dels liposomes s'ha orientat en dos aspectes diferents però complementaris. Per una banda, la seva utilització com a sistemes de transport de molècules farmacològicament actives i per l'altre com a models de membrana per a estudiar interaccions lípid/molècula a nivell bioquímic.

1.1.5.1.- SISTEMES DE TRANSPORT

El comportament farmacocinètic d'un principi actiu és un determinant important de la seva utilitat terapèutica. Tant les accions beneficioses com els efectes secundaris no desitjats depenen, en gran part, de la concentració i persistència del principi actiu en varis subcompartiments del cos. Qualsevol teràpia comporta la presència del fàrmac en el seu lloc d'acció però es veu acompanyada, en més o menys grau, per una sèrie d'efectes secundaris conseqüència de la interacció no específica del principi actiu amb cèl.lules sanes. Aquest problema és usual en quimioteràpia, per exemple, en que els fàrmacs que estan destinats a actuar sobre un determinat tipus de cèl.lules malignes tenen un efecte perjudicial sobre les normals.

Per una altra part, és també conegut que la ruta d'administració condiciona el perfil farmacocinètic del principi actiu en la circulació. Entre els factors més importants a considerar hi ha la biodisponibilitat en el fetge i altres teixits, l'excreció via ronyó o bilis, la unió del principi actiu a cèl.lules o macromolècules fixes o circulants i el pas passiu o actiu de les molècules a través de les membranes cel.lulars.

En els darrers anys, hi ha hagut un gran interès en l'estudi de sistemes de transport naturals i sintètics (Taula 1) que poguessin influir en la distribució i metabolisme dels principis actius de manera beneficiosa. Aquests sistemes estarien dissenyats per a controlar una sèrie de paràmetres com la velocitat d'arribada de la molècula activa a un compartiment concret del cos, la seva distribució i localització, i la persistència o velocitat de metabolisme de la mateixa.

El que es busca en un transportador és que redueixi o eviti els efectes secundaris dels fàrmacs per disminució del seu nivell en sang, per la reducció de la dosi evitant la

inactivació i excreció prematura i per direcció dels mateixos vers zones anatòmiques o cèl.lulars concretes.

+ Transportadors Macromoleulars: Anticossos
+ Transportadors Cel.lulars: Eritròcits Plaquetes Neutròfils
+ Transportadors Sintètics: Liposomes Niosomes Microsferes d'alúmina Nanopartícules Polímers

Taula 1.- Diferents sistemes de transport de fàrmacs.

D'aquests sistemes, els Ac i els liposomes, per diferents raons són els millors. Els primers són molt específics i, des de l'aparició de la teoria del hibridoma han esdevingut disponibles en quantitats apreciables. Malgrat això, el seu ús està limitat per la necessitat d'Ag corresponents en les cèl.lules diana, la seva incapacitat de protegir les molècules que transporten del medi que pot inactivar-les, les alteracions que la unió química Ac/proteïna pot produir en l'estructura terciària de la mateixa, conduint així a una pèrdua total o parcial de la capacitat del lligam pel punt de reconeixement, i pel requeriment de mecanismes hidrolítics pels quals la cèl.lula diana és capaç de trencar la unió entre el lligam i la cèl.lula associada.

La possibilitat d'emprar els liposomes en teràpia i biologia cel.lular com a transportadors de principis actius ja siguin hidrosolubles (retinguts en la fase aquosa) o liposolubles (formant part de la membrana fosfolipídica) i per la transferència de gens de forma que s'incorporin en un tipus de cèl.lula concreta evitant els efectes secundaris indesitjables, ha suposat una nova i suggerent via de recerca.

1.1.5.2.- TERAPEUTICA

Els principals avantatges que presenta l'administració d'un principi actiu encapsulat en liposomes respecte el seu ús en forma convencional són:

a) Prolongació del seu efecte.

La prolongació de l'efecte d'un fàrmac encapsulat en liposomes pot produir-se per una permanència perllongada en el plasma, per la seva protecció de la degradació enzimàtica o hidrolítica i per la seva retenció o alliberació lenta ja en el lloc d'administració.

En general, els liposomes romanen en la circulació durant un temps molt més llarg que la majoria dels principis actius administrats en forma lliure. La seva vida mitja "in vivo" varia de pocs minuts a pocs dies. Els temps més elevats s'han aconseguit amb SUV formats per esfingomielina o diestearoilfosfatidilcolina amb quantitats equimoleculares de colesterol ($t_{1/2}$ superior a 20 h en ratolí) (Gregoriadis, G., 1984).

Analogament, s'han emprat per a formular preparacions d'alliberació sostinguda d'anticancerígens (Sasaki, H., 1985), insulina (Patel, H.M., 1981), hormona del creixement (Weiner, A.L., 1985) i antibiòtics (Tokay, B.A., 1985).

b) Possibilitat de dirigir-los específicament al lloc d'acció.

La direcció d'un fàrmac vers una zona concreta de l'organisme (Targetting) ha sigut classificada segons dos conceptes, un anatòmic i un altre mecanístic (Poste, G., 1984).

Anatòmicament, la classificació es basa en el nivell de selectivitat i especificitat vers un òrgan (fetge), cèl.lula (cèl.lules de Kupffer) o lloc subcel.lular (lisosoma).

La mecanística es subdivideix en passiva i activa. Malgrat ésser la més corrent, és difícil diferenciar en la pràctica aquests dos tipus de direcció ja que hi ha aspectes que es poden incloure en ambdós.

b.1) Direcció passiva

Basada en la captació natural dels liposomes per les cèl.lules del Sistema Retícul Endotelial (SRE).

Després de la seva injecció i.v., els liposomes són eliminats principalment per cèl.lules fagocítiques mononuclears de SRE i per monòcits circulants. Així, els macròfags són el seu blanc natural. Els liposomes poden servir, d'aquesta manera, com a vehicles per a introduir el seu contingut dins dels macròfags en certs estats patològics.

La seva desaparició de la circulació suposa la retenció per part de teixits de varis òrgans. Es de suposar que la seva distribució en els mateixos "in vivo" està en funció de la seva composició lipídica, tamany, càrrega, interacció amb proteïnes endògenes o exògenes i la ruta d'administració emprada. No obstant, la consideració d'aquests paràmetres porta a l'observació de que els liposomes circulants es concentren predominantment en teixits rics en cèl.lules del (SRE) com el fetge i la melsa, i molt menys en els pulmons, medul.la espinal i ronyons (Wisse, E., 1976).

La velocitat de desaparició de la circulació sanguínia depèn del tamany i càrrega dels liposomes. Els petits són eliminats més lentament que els grans (Ostro, M.J., 1983). Així, per exemple, una població homogènia de SUV té una $t_{1/2}$ en sang de 80 minuts (Juliano, R.J., 1975).

Els MLV carregats negativament són eliminats molt més ràpidament que no pas els que ho estan positivament, mentre que els neutres tenen una $t_{1/2}$ intermitja (Gregoriadis, G., 1974). S'han obtingut valors similars amb SUV (Abraham, I., 1984). L'eliminació ràpida dels liposomes carregats negativament pot reflexar la seva agregació. Per una altra part, les anàlisis han mostrat que els liposomes interaccionen amb certs components del plasma, α -2-macroglobulina en l'home i α -1-macroglobulina en la rata, i adquireixen una càrrega negativa independentment de la que tenien inicialment (Juliano, R.L., 1978).

No es sap bé quin és l'efecte de la càrrega inicial, ni tampoc perquè cèl.lules amb càrrega negativa en les seves membranes poden atreure liposomes carregats negativament més ràpidament que no pas els carregats positivament. Per una altra part, la distribució de càrregues (-) en les cèl.lules no és homogènia (Weiss, L., 1972). Els liposomes (-)

interaccionen preferentment amb zones cel·lulars amb una baixa densitat de càrregues (-) (Poste, G., 1971).

Encara que el fetge sigui l'òrgan principal de captació de liposomes, la seva càrrega i tamany condicionen la seva orientació vers altres òrgans. Així, la proporció de MLV contenint (^{14}C) EDTA o (^{14}C) poli (I) poli (C) que s'acumula en la melsa, és molt més gran que quan s'empren liposomes carregats negativament. El mateix ocorre en la medul·la espinal mentre que en els pulmons i cervell succeeix a la inversa (Magee, W.E., 1976). Això contrasta amb el fet de que una càrrega (-) o (+) no influeixi en la seva retenció pel fetge. S'ha notat però que liposomes neutres són captats amb preferència (Jonah, M.M., 1975). Contràriament al que calia esperar, quan SUV contenint ($^{3\text{H}}$) Metotrexat són injectats i.v. a monos, els liposomes carregats (+) s'acumulen més en el cervell, melsa i medul·la espinal que els de càrrega (-), mentre que en els pulmons ocorre el contrari (Kimelberg, H.K., 1976).

Molts estudis han corroborat l'acumulació de MLV en els pulmons, probablement com a resultat de la filtració a través dels capilars. Senior i col. (1985) han afirmat que hi ha una acumulació més gran de SUV contenint Bleomicina marcada amb ^{125}In en la medul·la espinal quan els liposomes són petits i neutres, en contrast amb els (-) i més grans que són eliminats ràpidament de la circulació pel fetge.

Certs autors (Caride, V.J., 1984) han observat l'acumulació de MLV neutres i (+) en regions necròtiques del cor.

Hi ha també un estudi de la distribució dels liposomes en teixits de rates gestants. Així es va veure que SUV (-) s'acumulaven en l'úter i placenta, i que la interacció cel·lular/liposoma depenia de la càrrega (->neutre>+) i del tamany (33 nm>98 nm). A més a més semblava que la seva fluidesa era un paràmetre important per la localització placentar (liposomes fluids>liposomes sòlids). No es va observar cap diferència en l'úter. Aquests resultats van aportar una esperança en el seu ús per tractaments de malalties que afecten l'úter i placenta (Tuzel, S.N., 1980).

Altres anàlisis basades en observacions morfològiques han mostrat la presència d'una activitat enzimàtica comunicada pels liposomes (peroxidasa encapsulada en MLV) als lisosomes de cèl·lules sinusoidals, especialment cèl·lules de Kupffer (Roerdink, F.H., 1977).

Aprofitant el fet de que els liposomes es dirigeixen a zones riques en teixit del SRE s'han tractat certes malalties, com la Leishmaniosi i Tripanosomiasi, causades per paràsits que infesten les cèl.lules del SRE durant una part del seu cicle vital (Swenson, Ch. E., 1988). Els tractaments que s'havien fet fins ara amb els antimicrobians lliures eren ineficaços i tòxics per a totes les cèl.lules de l'organisme. S'ha obtingut una remarcable eficàcia, de 200 a 700 vegades superior quan s'administren derivats antimonial encapsulats que quan es donen en forma lliure (Alving, C.R., 1978).

Aquests resultats poden estendre's a altres malalties com la lepra, la brucel·losi i tracoma (Alving, C.R., 1982).

b.2) Direcció activa.

Suposa l'alteració dels liposomes per una unió amb Ac monoclonals, sucres, glicolípid, proteïnes o altres molècules, canviant la composició o tamany de forma que arribin a zones diferents a les que arriben normalment.

Liposomes sensibles al pH.

Yatvin i col. (1980) prepararen liposomes que contenien una palmitoilcisteïna quina estructura canviava entre una forma acíclica i una de tiolactama, al modificar el pH. Gràcies a aquest component, l'alliberació del principi actiu a 37° era més ràpida a pH: 6 que a pH fisiològic. Segons aquests autors, els liposomes fets d'aquesta manera haurien d'alliberar el seu contingut a nivell de teixits quin pH és inferior al valor fisiològic: tumors primaris, metàstasis i teixits infecciosos o inflamatoris.

Liposomes sensibles a la temperatura.

L'alliberació d'una substància a nivell d'un determinat teixit pot aconseguir-se per modificació de la composició lipídica escollint lípids quina T_c estigui per damunt de la temperatura fisiològica. Una vegada administrats els liposomes es produeix una hipertèrmia a nivell de la zona afectada fins arribar a la T_c dels lípids en la qual es produeix l'alliberació màxima de principi actiu. Així, s'han preparat liposomes amb barreges de DPPC i DSPC quina T_c és aproximadament 42°.

Basant-se en aquest fet, Weinstein i col. (1980) i Yatvin i col. (1981) van fer assajos amb metotrexat i

cisplatí en rates i van comprovar que la utilització combinada de liposomes i de la hipertèrmia local augmenta significativament la incorporació d'una substància antitumoral en els teixits afectats. En el cas del metotrexat, 4 h després de l'administració i.v., la seva incorporació en relació a la substància lliure sense hipertèrmia es quadriplica.

Direcció per unió a lligams

Un medi per a potenciar la selectivitat dels liposomes és la modificació de la seva superfície amb molècules que tinguin una afinitat específica pel lloc d'acció. Gregoriadis i col. (1977) van provar-ho amb Ac eficaços contra una gran varietat de tumors i glicoproteïnes que presentaven una gran afinitat per cèl.lules del parènquima hepàtic. Ambdós tipus de molècules es van associar als liposomes de forma que la regió F_{ab} dels Ac i les molècules terminals de galactosa de les glicoproteïnes responsables del reconeixement cel.lular, eren disponibles a la superfície liposomal.

Més tard es va veure que seguint el mètode clàssic d'encapsulació, era possible incorporar en els liposomes molècules d'Immunoglobulines que mantien la capacitat d'interaccionar amb els seus Ag. Aquesta propietat era abolida per la papaïna (separa les Ig dels fragments F_{ab} i F_c) implicant que les regions F_{ab} reconeixedores de l'Ag eren disponibles a la superfície liposomal (Gregoriadis, G., 1977). Així, es va comprovar que grups reconeixadors de certs receptors fixats a la superfície dels liposomes eren capaços de mediar la captació dels mateixos per part del receptor corresponent.

Magee i col. (1979) van aplicar "in vitro" el principi d'unió selectiva dels liposomes mediada per Ac a cèl.lules i van comprovar que liposomes amb Ac-antilimfòcit estimulaven la citotoxicitat dels limfòcits contra un determinat tipus de tumor.

Direcció en funció de la via d'administració

La via oral és la via més simple d'administració de fàrmacs (70% a 80% dels fàrmacs prescrits). No obstant, hi ha alguns principis actius com l'heparina, hormones, neuropèptids i molts antibiòtics que no poden administrar-se oralment perquè o bé són destruïts pels suc's gàstric o pancreàtic o bé són poc absorbits pel tracte

gastrointestinal.

En principi sembla que tots els tipus de liposomes puguin ésser eficients, tant si són grans com petits, neutres o amb càrrega. No obstant, és molt probable que els liposomes administrats oralment no arribin a la circulació perquè siguin destruïts per les sals biliars (Hashimoto, A., 1979) i fosfolipasa A pancreàtica o siguin digerits en l'interior de les cèl.lules intestinals després d'ésser absorbits (Patel, H.M., 1985). Una vegada alliberades en el budell, les substàncies encapsulades passen a la circulació després de la seva absorció per l'íleon i el jejú.

Si es considera la quantitat de material transportat els resultats no són sempre satisfactoris. El cas més típic és el de la insulina en que sols un 1% de la dosi escapa de la degradació proteolítica. Per una altra part, aquesta necessitat no és un desavantatge per a certes substàncies com el factor VIII en que petites quantitats són suficients per a modular l'efecte terapèutic.

Juliano i McCullough (1980) van proposar la via respiratòria pel tractament de metàstasis pulmonars. Així, van nebulitzar liposomes contenant citosina arabinosa directament a la zona afectada. Aquest fàrmac té una $t_{1/2}$ de 40 minuts en forma lliure ja que passa a la circulació sistèmica. Encapsulada en MLV (PC/COL/SA: 25/7/1) és superior a 8 h. En quan a la seva acció farmacològica, en el primer cas inhibeix la síntesi de DNA en totes les cèl.lules en divisió de l'organisme mentre que en el segon cas ho fa només a nivell de les cèl.lules tumorals del pulmó amb un efecte mínim sobre altres òrgans com el budell o medul·la espinal, normalment sensibles a aquest fàrmac.

La via subcutània és òptima per l'alliberació local i/o lenta de principis actius ja que molts liposomes són degradats lentament per l'activitat lipàsica i pels neutròfils en el mateix lloc d'administració.

La majoria dels SUV i alguns MLV (<100 nm) passen al sistema limfàtic i es localitzen intactes en els nòduls limfàtics (Patel i col., 1985) i alguns poden arribar a la circulació sanguínia (Stevenson i col., 1983). La captació limfàtica està en funció de la càrrega, tamany i composició lipídica dels liposomes. Els carregats (-) es localitzen en els nòduls limfàtics en molta més proporció que els (+).

S'ha estudiat l'administració de MLV (PC) de cisplatí per aquesta via en rates afectades per un hepatoma A o per adenocarcinoma pulmonar. El tractament condueix a una disminució de la freqüència i velocitat de creixement de les metàstasis limfàtiques. En forma lliure la substància és inactiva.

Aquesta via presenta un elevat potencial per l'alliberació de fàrmacs en el sistema limfàtic per la detecció i tractament del càncer i d'altres malalties dels nòduls limfàtics.

Mauk i col. (1980) mostraren que SUV injectats intradèrmicament permaneixen concentrats i intactes més de 600 h en el lloc d'injecció. Això indica que l'alliberació del fàrmac ocorre per degradació intracel·lular dels liposomes. Els que no són captats per les cèl·lules no són degradats. Aquesta via no s'ha utilitzat per cap forma de teràpia però podria ésser útil per vacunacions.

La via intraperitoneal malgrat no ésser massa apropiada per l'ús clínic degut a que és dolorosa, seria útil pel tractament de metàstasis dels canals limfàtics ja que s'acumulen en aquesta zona (Parker, R.J., 1981).

La via intramuscular s'ha utilitzat per a demostrar l'efecte adjuvant dels liposomes (Heath i col., 1976), pel que s'ha suggerit la seva possible aplicació per vacunacions.

La via intraarticular s'ha aplicat en certs casos de reumatisme. Així, Shaw i col. (1979) mostraren que liposomes contenant esteroids eren estables a 37° en presència de líquid sinovial. Tant la intensitat com la duració de l'activitat antiinflamatòria eren més elevades al començament de la fase aguda de la inflamació, el que faria aplicables els liposomes per l'artritis reumatoide.

Es sap que els liposomes no tenen accés al SNC després de la injecció i.v. (Kimelberg, H.K., 1978). Es molt difícil, potser impossible, per aquestes vesícules travessar la barrera endotelial contínua que separa el cervell de la circulació. Per aquesta raó s'han fet administracions intracerebroventriculars de fàrmacs en animals. Kimelberg (1978) senyalà que el nivell de metotrexat marcat és més elevat en el SNC i SN perifèric quan s'administra en SUV carregats positivament. Es va trobar una elevada concentració del mateix en el teixit nerviós de 24 a 96 h

després de la injecció en micos, rates i ratolins. Aquest resultat indica que el metotrexat resta encapsulat al menys 24 h conservant la seva activitat fins que és degradat o eliminat. Tal tipus d'estudis obren una perspectiva al tractament del càncer en casos de tumors cerebrals sòlids.

c) Possibilitat d'emprar-los com a vehicles de molècules poc solubles o que presentin problemes d'absorció

Es possible encapsular en liposomes principis actius que normalment no poden penetrar en la cèl.lula i què, conseqüentment tenen una activitat reduïda. Molts antimetabolits com els anàlegs de les bases purina i pirimidina són transformats en els seus derivats fosforilats que són els agents tòxics en el interior de les cèl.lules. Aquests derivats fosforilats són incapaços de penetrar en la cèl.lula i per tant no poden emprar-se directament en teràpia. Es possible solventar aquest problema transportant-los en liposomes. Aquest és el cas de la citosina arabinosa, més activa encapsulada que en forma lliure en cèl.lules tumorals "in vitro" (Richardson, V.J., 1982).

Hi ha un tipus de malalties que afecten el SRE causades per l'acúmulo intracèl.lular de metalls pesats que poden tractar-se amb liposomes contenint quelants aniónics. Aquests tenen un gran interès però són ineficaços per l'eliminació de l'excés de metall de les cèl.lules degut a la seva impossibilitat de travessar les membranes cel.lulars quan són administrats en forma lliure. S'ha emprat aquest tipus de teràpia per a tractar intoxicacions produïdes per Cd, Ca, Th, Hg, As i Au Coloidal (Rahman, Y.E., 1980).

De forma similar, els intents encaminats al disseny racional de nous fàrmacs basats en l'optimització de la seva interacció amb els seus suposats llocs d'acció (DNA, Tubulina), han proporcionat en molts casos, substàncies que malgrat ésser potencialment interessants, tenen dificultat en la penetració al interior de cèl.lules. La seva transferència mitjançant liposomes té un gran interès.

d) Protecció de substàncies làbils

S'han emprat els liposomes per estabilitzar fàrmacs làbils. Aquests s'han incorporat en les bicapes fosfolipídiques ja que el medi hidrocarbonat de la bicapa ofereix una protecció contra la hidròlisi catalítica de forma similar a l'aconseguida en sistemes micelars (Attwood,

D., 1983). En funció de la composició dels liposomes i de la naturalesa química del solut s'ha aconseguit un ampli rang d'estabilitats, des d'un 0% per la ciclocitidina fins a un 90% per l'halur de trimetilamoni. En el cas dels anestèsics locals, s'ha estudiat la Benzocaïna i Procaïna entre d'altres, aconseguint una notable estabilització dels mateixos (Habib, M.J., 1987).

Nacucchio i col. (1985) van comprovar que la Piperacillina encapsulada tenia activitat inhibidora contra la β -Lactamasa produïda per *Staphylococcus aureus* àdhuc en presència de β -Lactamasa exògena. Aquest fet suggereix que l'associació del fàrmac amb els liposomes el protegeix de la degradació enzimàtica a la vegada que li permet la interacció amb l'organisme sobre el que ha d'actuar.

Anàlogament i tal com s'ha esmentat d'antuvi, els liposomes protegeixen i permeten l'administració via oral de compostos làbils com l'heparina i la insulina.

Els enzims constitueixen un altre grup de substàncies sensibles. Els primers experiments encapsulant enzims estaven dirigits a corregir malalties produïdes per deficiències enzimàtiques (Gregoriadis, G., 1972) caracteritzades per un acúmulo de substrat en els lisosomes (malaltia hipertròpica) que ocasiona una hepatomegàlia o esplenomegàlia.

Altres autors (Freeman i col., 1983) van observar que la superòxid dismutasa, encapsulada en liposomes, facilitava la protecció de les cèl.lules endotelials porcines de la hiperoxidació (cèl.lules cultivades en atmosfera de O_2), cosa que no es podia observar amb l'enzim lliure. Així, aquestes cèl.lules resistien els efectes letals produïts pel O_2 , H_2O_2 i radicals OH.

Es possible estendre l'aplicació clínica dels liposomes a altres síndromes enzimàtics. Per exemple, es podrien utilitzar pel tractament d'immunodeficiència severa subministrant adenosina desaminasa i nucleòtid purina fosforilasa. No obstant, malgrat alguns resultats encoratjadors, aquest tipus de teràpia per les deficiències enzimàtiques té certes limitacions. De fet, en la pràctica, els liposomes són captats molt més ràpidament pel fetge i la melsa que no pas per altres òrgans com el cervell i els músculs els quals estan afectats més freqüentment per deficiències genètiques de naturalesa enzimàtica (Tyrrell, D.A., 1976). Per a solventar-ho s'ha proposat encapsular el

gen responsable de la síntesi de l'enzim en qüestió (Forssen, E.A., 1979). En aquest sentit, Nicolau i col. (1983) van assajar liposomes contenint el gen per la preproinsulina 1. Es va observar una reducció de la glicèmia després de la seva injecció.

e) Reducció de la toxicitat en els teixits

L'encapsulació pot protegir el contingut dels liposomes de l'acció immune o enzimàtica per part de l'hoste. Alternativament, els liposomes poden prevenir l'acció tòxica de certs fàrmacs abans no arribin al lloc d'acció. Redueixen les reaccions d'hipersensibilitat en individus immunitzats amb certes proteïnes. Tals reaccions, les quals presenten un problema més gran en el cas de leucèmies tractades amb L-asparaginasa, poden evitar-se amb l'ús dels liposomes (Neerunjun, E.D., 1976).

Tots els anticancerosos són menys tòxics administrats encapsulats en liposomes (Juliano, R.L., 1980). En aquest sentit, s'han emprat amb èxit liposomes contenint cis-diaminodiclorplatí (Steerenberg, P.A., 1988).

Els liposomes no s'acumulen en el cor sa i ronyons com fan certs fàrmacs (Adriamicina, Doxorubicina) o agents nefrotòxics (Amfotericina B) (López-Berestein, G., 1983).

Concretament, s'ha demostrat que l'Adriamicina (amfipàtica) que és incorporada en la membrana lipídica del liposoma és més tòxica quan s'administra via i.v. en el ratolí en SUV que quan es fa d'igual forma amb LUV (Gabizon, A., 1986). Aquesta diferència de toxicitat pot explicar-se pel fet que les apolipoproteïnes del sèrum són incorporades molt més fàcilment dins de la capa externa de SUV que no pas de LUV degut a que el radi de corbatura dels primers és molt més pronunciat (Wetterau, J.R., 1982). La desestabilització de la capa lipídica externa induïda així, pot conduir a l'alliberació de l'adriamicina als teixits veïns.

Anàlogament, s'ha vist que la Primaquina (Sinden, R.E., 1982) i els aminoglicòsids (Tadakuma, T., 1985), emprats en casos d'infeccions bacterials, encapsulats són significativament menys tòxics encapsulats que en forma lliure.

Recentment s'ha demostrat que l'amfotericina B encapsulada en MLV és 10 vegades menys nefrotòxica i hemotòxica (lisi dels eritròcits) "in vivo" i "in vitro"

(Metha, R., 1984) que quan s'administra en forma lliure. Els autors d'aquests experiments van demostrar que el tractament de candidiasis causades per *Candida albicans*, era molt eficient quan s'injectava l'antibiòtic via i.v. a ratolins (Lopez-Berestein, G., 1983).

f) Possibilitat d'emprar els liposomes com a mimetitzants de l'acció de certes estructures cel.lulars.

S'han emprat liposomes amb Hemoglobina encapsulada pel tractament de certs casos d'anèmia (Gaber, B.P., 1983).

g) Efecte adjuvant dels liposomes.

En la producció d'una vacuna, l'ús d'agents patògens provoca una resposta immune forta. Persones inoculades amb la mateixa emmalalteixen o sofreixen efectes secundaris. Per a evitar aquests problemes s'han obtingut Ag petits emprant la tècnica del DNA recombinant i la síntesi peptídica. Aquests Ag injectats a animals poden induir la gènesi d'Ac capaços d'actuar contra paràsits, bacteris o virus. No obstant, no acostumen a ésser captats pels macròfags circulants i no s'aconsegueix la resposta esperada. Per a produir Ac, l'agent patògen ha d'ésser captat pels macròfags que el digereixen i disposen l'Ag processat en la seva superfície. Les cèl.lules T s'uneixen a aquest Ag el que genera la producció d'Ac. Per a estimular una resposta immune forta amb Ag petits, s'han unit a adjuvant, però aquesta unió (Ag-Adjuvant) acostuma a produir efectes secundaris.

S'ha suggerit que els liposomes podrien evitar aquest problema emprant-los com a transportadors per la immunització. Quan els Ag s'incorporen en la configuració apropiada en la superfície dels liposomes, s'incrementa el seu poder antigènic i es produeix una resposta immune més gran. Substàncies amb propietats adjuvants poden unir-se a liposomes per a produir adjuvants efectius vers Ag. Això s'ha provat amb èxit pel tractament del còlera, l'hepatitis B i la malària (Gregoriadis, G., 1987).

El seu avantatge com a transportadors d'Ag està en que poden portar múltiples Ag en la seva superfície, els quals poden unir-se a múltiples receptors en cèl.lules B o ésser endocitats ràpidament per macròfags que indueixen una proliferació cel.lular i més producció d'Ac.

Paral·lelament, s'han desenvolupat assaigs immunològics basats en l'ús de liposomes com el LILA (Liposome Immunolysis Assay) en el que es produeix una interacció directa entre un Ac immobilitzat en els liposomes i un Ag en el sèrum (Umeda, M., 1986). Lingler i col. (1987) van dissenyar un immunoassaig específic per la Micotoxina T-2. Recentment s'ha aplicat el mètode ELISA per a verificar l'eficiència de la unió de liposomes conjugats a determinants antigènics en una superfície lligada amb glicoforina A (Hutchinson, F.J., 1988).

1.1.5.3.- TOXICITAT DELS LIPOSOMES

Pot ésser deguda als mateixos liposomes, a l'agent actiu que contenen o a l'acció sinèrgica d'ambdós.

Les reaccions adverses poden apareixer simplement com a resultat de certes característiques estructurals. Així, liposomes d'un determinat tamany poden bloquejar els capilars pulmonars (Rahman i col., 1974) i superfícies carregades (+) són capaces d'eliminar la α -macroglobulina circulant produint alteracions en la coagulació (Black i Gregoriadis, 1976).

Chen i Keehan (1977) van observar que liposomes constituïts per PC d'ou inhibien l'activació dels limfòcits i com a conseqüència disminueixen els nivells de colesterol cel·lular.

Els components lipídics dels liposomes poden ésser tòxics per se o degut a canvis metabòlics que indueixin. En aquest sentit, s'ha observat que després de la injecció intracerebral en ratolí de grans quantitats de liposomes formats per dicetilfosfat o estearilamina es produïa necrosi del teixit cerebral o aparició d'epilèpsia. Contràriament, altres autors van constatar que el tractament intraperitoneal a ratolins durant un període llarg amb liposomes formats per estearilamina no eren tòxics (Kimelberg, H.K., 1978).

Per una altra part, s'ha establert que la presència de PC d'ou, Colesterol i PA en proporció 7/2/1, o PC de soja no produïa toxicitat en rates (Gregoriadis, G., 1978).

Així doncs, com a resum de tot l'exposat fins ara, es pot assegurar que els liposomes no són en principi tòxics i que segons el tamany i composició lipídica es pot modular la seva estabilitat i acumulació preferent en teixits.

Les aplicacions més clares s'han presentat per molècules inestables, insolubles o tòxiques. No obstant, un altre aspecte menys considerat ha estat l'augment de l'afinitat, sobretot quan les molècules, farmacològicament actives, actuen sobre estructures fixes de la membrana cel·lular com són els receptors.

Hom pot fer la hipòtesi de que l'elecció adequada dels lípids pot influir en l'afinitat del liposoma per un receptor determinat i facilitar l'ancoratge selectiu respecte al cas de la molècula lliure. Aquest aspecte és especialment interesant en el cas dels opiàcis doncs hi ha evidència de que el receptor opiàci està químicament format per una lipoproteïna.

Es per això que en el present treball s'ha escollit essencialment la família de les molècules opiàcies com a font d'estudi. Per a justificar millor el treball, a continuació es descriuen els trets més importants del sistema Receptor opiàci/molècula opiàcia.

1.2.- OPIACIS - RECEPTOR OPIACI

Les característiques farmacològiques de les molècules opiàcies són conegudes desde fa molt temps i els seus efectes estan ben descrits i estandaritzats.

Es sap que existeixen varis tipus de receptors opiàcis μ , δ i k i que les diverses molècules opiàcies interaccionen amb tots ells presentant distints nivells de selectivitat i afinitat. La problemàtica que l'administració d'aquests principis actius ocasiona és la creació d'addicció i dependència.

El descobriment el 1975 de l'existència de pèptids amb activitat morfinomimètica va obrir l'esperança d'aconseguir noves molècules que no presentessin els inconvenients dels opiàcis clàssics. Aquestes substàncies però presenten el inconvenient d'ésser inestables en front a enzims proteolítics.

L'administració d'aquest tipus de principis actius en liposomes podria presentar un avantatge tant en la modificació de paràmetres farmacocinètics com en l'estabilitat dels pèptids.

La composició química del Receptor Opiàci no es coneix amb seguretat. Els intents duts a terme per aïllar-lo no han

donat fins ara bons resultats ja que en el procés d'aïllament s'inactiva el receptor i no és possible reconstituir-lo mantenint les seves característiques d'afinitat i activitat.

No obstant, sembla que es tracta d'una proteïna que conté associat un fosfo o glicolípid. D'entre tots els fosfolípids, es creu que la PS i els gangliòsids són els seus components majoritaris. El paper dels lípids en l'estructura del receptor és font de controvèrsia. Hi ha autors que creuen que formen part directament de la seva estructura química, d'altres creuen que la conformació òptima del receptor ve modulada per la microviscositat o fluïdesa de l'entorn lipídic. Totes aquestes hipòtesis venen complicades per l'existència de diferents tipus de receptors i la distinta distribució dels mateixos en distints teixits.

Tot i acceptant aquesta diversitat d'hipòtesis hom pot pensar que l'encapsulació d'opioides en liposomes de composició semblant al receptor opiàci podria modificar la seva afinitat i selectivitat en assajos "in vitro" i tenir alguna influència en la seva farmacocinètica "in vivo".

En aquest sentit s'han preparat liposomes encapsulant els opiàcis indicats en la figura 8.

La Morfina és un alcaloide fenantrènic que s'obté de l'adormidera (*Papaver somniferum*) i que s'empra com analgèsic. De la mateixa planta s'extreu, com a producte minoritari, la Codeïna que presenta un petit efecte analgèsic però que té un gran poder antitossiú.

Malgrat els efectes indesitjables de la Morfina, com depressió respiratòria, tolerància, dependència i restrenyiment, entre d'altres, segueix essent el fàrmac d'elecció en malalts terminals.

Per tal de resoldre els problemes derivats d'una teràpia amb aquest principi actiu, s'han fet nombroses recerques encaminades a l'obtenció d'altres analgèsics. Una de les vies que es va seguir en aquest sentit, fou la modificació de l'anell fenantrènic per introducció de radicals. Així s'obtingué la Naloxona que, contra el que calia esperar, tenia propietats farmacològiques oposades a les de la Morfina i opiàcis. Per això es va classificar com a antagonista pur de la Morfina i actualment s'utilitza en teràpies de deshabitució.

L'Etilmorfina en canvi, obtinguda segons la mateixa estratègia, presenta encara que en menor grau, efecte analgèsic i destaca pel seu gran poder antitossiú.

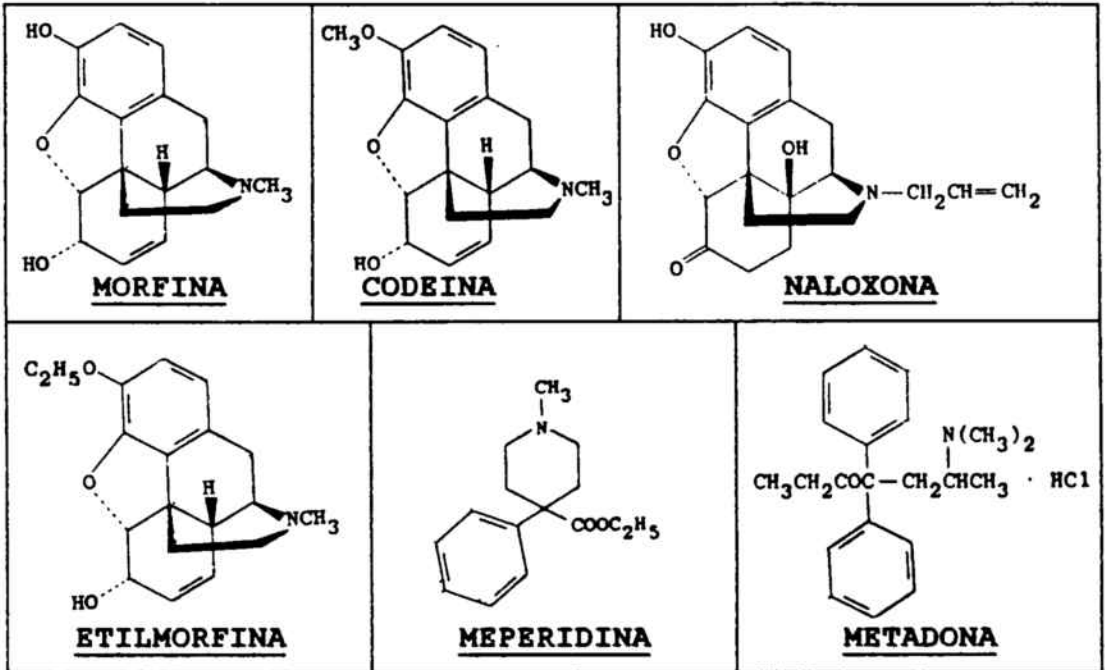


Figura 8.- Molècules opiàcies encapsulades en liposomes.

Paral·lelament, es van sintetitzar principis actius com la Meperidina i la Metadona que en major o menor grau presenten els mateixos efectes secundaris.

S'han dut a terme nombrosos estudis per tal de trobar relacions estructura-activitat que permetessin arribar al disseny de molècules més actives, no obstant, encara no està clar quins són els trets fonamentals que confereixen activitat farmacològica diferent i sovint contraposada a molècules amb estructures bastant semblants.

Com a complement del treball i amb el mateix objectiu, s'han fet servir el Levamisol i el Tiofanat, fàrmacs amb propietats antihelmíntiques (Fig. 9).

OBJECTIUS

2.- OBJECTIUS

Ateses les descripcions donades en la introducció, el present treball de Tesi es va planificar en funció de tres aspectes fonamentals relacionats amb els liposomes:

a) Fer un estudi sistemàtic de les variables que influeixen en l'encapsulació i estabilitat dels principis actius en liposomes tals com: característiques dels lípids, mètodes d'obtenció dels liposomes i hidrofobicitat dels fàrmacs encapsulats.

b) Fer un estudi sistemàtic i comparatiu de l'activitat farmacològica dels opioids en funció de la forma d'administració i de la composició lipídica dels liposomes.

c) Emprar els liposomes com a model de membrana, per a estudiar les interaccions de les molècules opioids amb lípids.

Per a dur a terme aquests objectius es va procedir segons els següent esquema:

1) Posta a punt de la metòdica analítica dels fàrmacs emprats per Cromatografia Líquida d'Alta Eficàcia i Espectrofotometria d'Ultraviolat.

2) Posta a punt del mètode d'anàlisi quantitatiu i qualitatiu per Colorimetria i Cromatografia Líquida d'Alta Eficàcia respectivament, dels fosfolípids emprats.

3) Determinació de la hidrofobicitat dels fàrmacs emprats mitjançant el càlcul dels coeficients de partició n-octanol/aigua.

4) Preparació de diversos tipus de liposomes i valoració dels principis actius encapsulats.

5) Fer estudis d'estabilitat d'aquests liposomes.

6) Posar a punt els assajos farmacològics "in vivo" i "in vitro" per a determinar l'activitat opioid dels fàrmacs lliures i encapsulats.

7) Dur a terme un estudi físico-químic de les interaccions fàrmacs-lípids en funció dels canvis en les Temperatures de Transició de fase de l'estat de gel a cristall líquid mitjançant les tècniques de Turbidimetria i Anàlisi Tèrmica Diferencial.

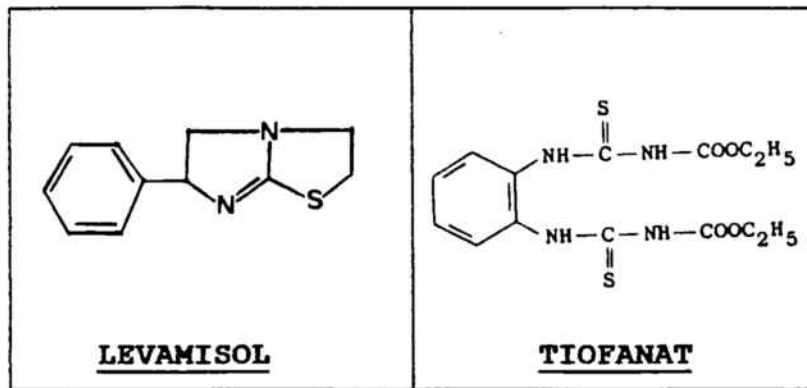


Figura 9.- Antihelmíntics encapsulats en liposomes.

El Levamisol és un derivat imidazotiazòlic i concretament, el L-isòmer d'un racèmic, el Tetramisol. Es un antihelmíntic d'ampli espectre contra paràsits gastrointestinals i pulmonars. A més a més, té efectes immunoestimulants ja que restitueix el número de limfòcits T als valors normals i intervé en la recuperació de varis paràmetres clínicament mesurables de l'estatus immune. S'empra preferentment en veterinària encara que donat el seu poder immunoestimulant ha sigut administrat a humans.

El Tiofanat és un precursor benzoimidazòlic que és metabolitzat a benzoimidazols en l'animal hoste. S'ha obtingut per modificació de les cadenes laterals del nucli del tiabendazol. Com l'anterior, és un antihelmíntic d'ampli espectre.

MATERIALS

3.-MATERIALS I METODES

3.1.-MATERIALS

3.1.1.-INSTRUMENTACIO

Les sonicacions es van dur a terme amb un bany d'ultrasons (Selecta) i amb una sonda d'ultrasons (Labsonic 1510) de 10 mm de diàmetre i una altra de 20 mm.

Les centrifugacions es van fer amb els següents models de centrífugues Beckman: L.5-65B (Ultracentrífuga), J.2-21 i TJ 6R dotades amb els rotors SW 60 Ti, SJ 10 i TH 4 respectivament. També es va utilitzar una centrífuga Eppendorf, model 5414 S i una Heraeus Christ GMBH.

Les mesures de pH es van fer amb un pHímetre Crison, model MicropH 2001.

La conductivitat es va mesurar en un Conductímetre 522 Crison.

La cromatografia d'exclusió molecular, es va dur a terme mitjançant un equip format per una Columna Pharmacia Fine Chemicals K-16/70 (60 cm x 1,5 cm); bomba peristàltica Gilson Minipuls II; detector de U.V. dotat d'un filtre de 228 nm LKB 2138 Uvicord-S; col·lector de fraccions LKB 2212 Helirac i registrador d'elució Lin Seis L 6512.

Pels assajos farmacològics d'organ aïllat d'íleum de conill perquè es va emprar un sistema equipat amb un bany d'organs Ugo Basile 4050 termostatitzat que disposava de dues cubetes (13 ml) connectades a una bombona subministradora de carbogen. Per a muntar la preparació es van fer servir dos electrodes de platí (un per a cada cambra). Els canvis de tensió de l'organ es van detectar mitjançant un transductor de força isomètric (Panlab). Tant les contraccions naturals com les induïdes per un estimulador Harward es van enregistrar amb un registrador Omni-Scribe Houston Instruments.

La Cromatografia Líquida d'Alta Eficàcia es va realitzar amb un aparell Kontron Analytic equipat amb dues bombes LC 414, barrejador i detector de U.V. Uvikon 740 LC connectat a un integrador Hitachi D-2000.

Les mesures espectrofotomètriques es van dur a terme mitjançant un espectrofotòmetre Shimadzu UV-240 que disposava de cubetes de quars Pye Unicam Ltd 10 mm connectat a un registrador Graphicord de la mateixa marca. Alhora de fer la mesura de les transicions de fase dels liposomes es va emprar un bany termostatitzat P.M.T Amson NV.

Les mesures de DSC es van fer amb un aparell Mettler TA 3000 dotat d'un processador TC 10 i una cel.la DSC 30 refredada amb nitrogen líquid.

La microscòpia electrònica es va efectuar amb un aparell Hitachi HU-12A.

Les diàlisis es van dur a terme amb membranes de diàlisi de cel.lulosa regenerada de radi de porus promig de 24 Å i amb límit d'exclusió de 8000-1500 daltons (Visking Dialysis Tubings subministrats per Serva).

Les liofilitzacions es van fer amb una liofilitzadora Telstar, model Lioalfa.

Tant l'aigua, que es va obtenir mitjançant un aparell Milli Q, com les solucions amortidores fetes servir van filtrar-se per membranes de 0'22 µm de diàmetre de porus promig de la casa Millipore.

3.1.2.-DISSOLVENTS I REACTIUS

Els productes químics d'ús general que es van fer servir eren tots per anàlisi i de la casa Panreac excepte que s'indiqui altra cosa: àcid acètic glacial, àcid ascòrbic, àcid clorhídric (1 N), àcid fosfòric, àcid perclòric (70%), àcid trifluoroacètic (Merck), cloroform, èter etílic, metanol, n-octanol (Fluka), acetat amònic (Fluka), bicarbonat sòdic, bisulfit sòdic, clorur càlcic, clorur sòdic, clorur potàssic, fosfat sòdic dibàsic dihidratat, fosfat sòdic monobàsic dihidratat, fosfat monopotàssic, glucosa, heptamolibdat amònic (Merck), Hidròxid sòdic, sulfat magnèsic heptahidratat, sulfit sòdic anhidre, trishidroximetiaminometà (TRIS).

Els dissolvents per HPLC de la casa Romil que es van emprar són acetonitril, isopropanol i metanol.

Es van fer servir els següents lípids: Lecitina d'ou (Merck i Lucas Meyer), purificada en el nostre laboratori segons el mètode descrit en l'apartat 2.1 de mètodes. Àcid lauric, àcid mirístic, L- α - Fosfatidil-L-Serina bovina (98% de puresa) (Sigma), DL- α -Dipalmitoilfosfatidilcolina (99% de puresa) (Sigma), colesterol (Panreac).

Els fàrmacs que es van assajar foren Codeïna Base lliure (Uquifa) a partir de la què es va obtenir el corresponent clorhidrat segons s'indica en l'apartat 3.2.1.6 de mètodes. Etilmorfina Clorhidrat (Uquifa), Meperidina Clorhidrat (Bayer), Metadona Clorhidrat (Esteve), Morfina Clorhidrat (Abelló) i Naloxona Clorhidrat (Abelló), Leu-Encefalina Acetat (Bachem Feinchemikalien AG), Tiofanat (Uriach) i Levamisol Clorhidrat (Uriach). Tots aquests productes, excepte la Leu-Encefalina, van ésser cedits gratuïtament per les Firmes esmentades.

Els gasos fets servir foren: Nitrogen i Carbogen (95% Oxigen i 5% Diòxid de carboni).

3.1.3.-SUPORTS CROMATOGRÀFICS

Com a suports cromatogràfics per a cromatografia d'exclusió molecular es va fer servir: Sepharosa Cl 4B (Farmacia); Oxid d'alumini (alúmina neutra) de tamany de porus 70-230 Mesh-Atsm (Merck). Per la cromatografia en capa fina: DC- Alufolien Kieselgel 60 (0'2 mm espessor) sense indicador de fluorescència (Merck) i per la cromatografia Líquida d'Alta Eficàcia (HPLC) una columna Spherisorb (ODS2) de 5 μ m de tamany de partícula (12'5 x 0'46 cm) i columna de Sílica Spherisorb (SiOW) (25 x 0'4 cm) ambdues farcides per Tecnokroma.

3.1.4.- SOLUCIONS

Es van preparar les següents solucions:

Solució nutritiva de Krebs modificada pels assajos d'íleon de conill porquí: Bicarbonat sòdic: 25 mM; Clorur càlcic anhidre: 2'76 mM; Clorur sòdic: 131'2 mM; Clorur potàssic: 2'53 mM; Glucosa: 11 mM; Fosfat monopotàssic: 1'29 mM i Sulfat magnèsic heptahidratat: 1'3 mM.

Solucions amortidores per a la preparació de liposomes : Trishidroximetilaminometà (5 mM)/HCl pH: 7'4. PBS: Clorur sòdic: 136 mM; Clorur potàssic: 2'68 mM; Fosfat bisòdic undecahidratat: 0'13 mM i Fosfat monosòdic dihidratat: 0'32 mM. El pH es va ajustar a 7'4 amb Hidròxid sòdic 0'1M.

Solucions amortidores per HPLC: Acetat amònic 13 mM; Acetat amònic, 13 mM/Acètic 0'1 N de pH:5'4 i Aigua bidestil.lada amb 0'05% TFA.

Solució fosfats per al càlcul del coeficient de partició: 81 ml d'una solució de Fosfat sòdic dibàsic 0'2 M més 19 ml d'una solució de Fosfat sòdic monobàsic 0'2 M, enrasat fins a 200 ml amb aigua bidestil.lada.

Solucions per la quantificació del fòsfor.
Solució A: 1 g d'heptamolibdat amònic més 8 ml d'àcid perclòric (70%) en 60 ml de H₂O. Solució B: 1 g àcid ascòrbic en 40 ml H₂O. Aquestes solucions es van barrejar equivolumetricament just abans de fer-se servir.

METODES

3.2.1.- METODES DE CARACTERITZACIO DE PRINCIPIIS ACTIUS

Com anàlisi prèvia a qualsevol assaig es va comprovar la puresa de tots els principis actius pels següents mètodes:

3.2.1.1.- ANALISI ELEMENTAL.

Duta a terme pel Servei de Microanàlisi del Departament de Química Orgànica Biològica del CID de Barcelona amb un analitzador Perkin Elmer 240.

3.2.1.2.- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC).

Com a eluient es va fer servir una barreja de $\text{Cl}_3\text{CH}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:25:4, v/v), revelant-se la placa per carbonització prèvia vaporització amb àcid perclòric al 40%.

3.2.1.3.- ESPECTREFOTOMETRIA DE U.V.

Es van fer espectres de solucions aquoses o clorofòrmiques, segons la solubilitat, 10 mM dels fàrmacs en qüestió des de $\lambda:800$ nm fins a $\lambda:190$ nm.

3.2.1.4.- CROMATOGRAFIA LIQUIDA D'ALTA EFICACIA (HPLC).

Mètode emprat tant per a realitzar una anàlisi qualitativa com quantitativa dels principis actius utilitzats en aquest treball experimental. Com a fase estacionària es va fer servir una columna de fase reversa empaquetada amb Octadesilsilà (ODS-2) de 5 μm de tamany de partícula. Sempre es va treballar amb precolumna, farcida amb el mateix component de la fase estacionària. Quant a la fase mòbil, l'eluient orgànic fou sempre Acetonitril (ACN) mentre que l'aquós va ésser molt variable, tal com s'explica en l'apartat de Resultats i Discussió, degut a la diferent naturalesa dels fàrmacs emprats. Aquest darrer component es va filtrar per una membrana de 0'22 μm de diàmetre de porus i desgasat.

Es va treballar generalment en condicions isocràtiques encara que en alguna ocasió va ésser necessari fer un gradient. El flux fou de 1 ml/min fent-se els assajos a temperatura ambient. El procés de la cromatografia es va seguir mitjançant un detector de U.V. a una $\lambda = 254$ nm.

Una vegada trobades les condicions d'elució òptimes per a cada principi actiu, es van calcular les seves característiques cromatogràfiques que són el temps de retenció corregit (t'_r) i el factor capacitat (K). El temps de retenció del solut o temps al que surt el pic en el cromatograma (t_r) pot dividir-se en dues parts, t_m o temps que necessiten les molècules de la fase mòbil per a

traslladar-se d'un extrem a un altre de la columna per a una cabal determinat i, t'_r o temps de retenció corregit que es defineix com el temps en que les molècules del solut estan interaccionant amb la fase estacionària. Aquest es calcula per la fórmula indicada a continuació.

$$t'_r = t_r - t_m$$

El factor capacitat (relació de capacitat) es relaciona també amb el temps de retenció i es calcula segons l'equació:

$$K = \frac{t'_r}{t_m} = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

En la figura 10 es representa un cromatograma típic de HPLC amb les característiques definides abans. El primer pic correspon al solut no retingut i el segon al de la mostra problema.

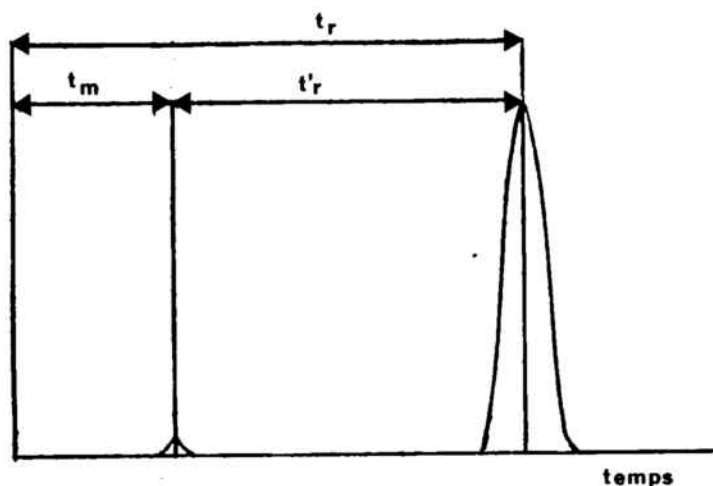


Figura 10.- Registre d'un cromatograma de HPLC amb els seus paràmetres característics.

3.2.1.5.- METODE DE MESURA DE LA HIDROFOBICITAT (P).

Aquest mètode es basa en la mesura del coeficient de repartiment en un sistema octanol/aigua i en un altre octanol/solució amortidora de fosfats.

Es va preparar una solució del principi actiu 0'2 mM en aigua i una altra en solució amortidora de fosfats (pH: 7'4). Se'n van agafar 10 ml de cadascuna i es van barrejar amb 10 ml d'octanol. Després d'agitar-los durant 15 minuts, es van centrifugar a 3000 RPM durant 20 minuts (centrífuga Heraeus Christ GMBH), separant-se a continuació la fase orgànica, que es desprecià. Es valorà el contingut en principi actiu de la fase aquosa per HPLC.

La solució amortidora de fosfats es va preparar barrejant 81 ml d'una solució de fosfat sòdic dibàsic 0'2 M amb 19 ml d'una solució de fosfat sòdic monobàsic 0'2 M i enrasant fins a 200 ml amb aigua bidestil·lada.

El coeficient de partició es va calcular segons la fórmula següent:

$$P = \text{Log} \frac{\text{Concentració de principi actiu en octanol}}{\text{Concentració de principi actiu en fase aquosa}}$$

3.2.1.6.- OBTENCIO DEL CLORHIDRAT DE CODEINA.

Es va dissoldre la codeïna base lliure en metanol. S'hi addicionà una quantitat equimolecular del HCl 1 N. A continuació, es va afegir èter etílic gota a gota fins l'enterboliment de la solució. Es va deixar cristal·litzar durant tota una nit a la nevera. A continuació es va filtrar en un crisol del nº4. S'assecà i es va sotmetre a les anàlisis esmentades en els apartats anteriors.

3.2.2.-METODES DE CARACTERITZACIO DE FOSFOLIPIDS

3.2.2.1.- METODE DE PURIFICACIO DE LA FOSFATIDILCOLINA.

La fosfatidilcolina (PC), comunment coneguda com a lecitina és un fosfolípid neutre que s'aïlla de l'ou de gallina, de llavors de plantes i d'altres teixits d'animals. El seu color és pràcticament blanc quan la seva obtenció és recent, però amb el temps passa de groc a marron en presència de l'aire. Això és degut a la inestabilitat dels dobles enllaços de les seves cadenes hidrocarbonades en front a l'oxigen de l'aire. Es insoluble en aigua però s'emulsiona quan es posa en contacte amb ella. Tampoc és soluble en acetona, olis animals i vegetals. Ho és en canvi en cloroform, èter de petroli, èter etílic, olis minerals i àcids grassos.

La lecitina es va purificar per cromatografia en columna segons el mètode descrit per Singleton (1965) amb algunes modificacions. El suport cromatogràfic va ésser l'òxid d'alumini (Alúmina neutra) d'activitat 1. Se'n van pesar 100 g als que es van afegir 100 ml de Cl_3CH introduint-se, a continuació, en una columna de 25 cm de longitud per 2'8 cm de diàmetre. Es va anar eluint amb Cl_3CH fins la total compactació de l'alúmina. La velocitat de percolació fou de 7 ml/min. Una vegada preparada la columna es van seguir els passos següents:

a) Deposició de la mostra.

Es van dissoldre 5 g de lecitina d'ou impura en 10 ml de Cl_3CH . D'aquesta solució se'n van depositar lentament i evitant remoure l'alúmina, 6 ml (3 g). La penetració total de la mostra s'aconseguí rentant les parets de la columna amb petites quantitats de Cl_3CH dues o tres vegades.

b) Elució.

Quan tota la mostra es deposità en el llit de la columna es començà a eluir amb Cl_3CH que arrastra els lípids neutres. Es van recollir quatre fraccions de 50 ml. A continuació i una vegada es comprovà per capa fina que ja havien sortit els carotens i altres materials no adsorbits a la columna, es va eluir amb una barreja de $Cl_3CH/MeOH$ (9:1, v/v) que desadsorveix la lecitina. També es van recollir quatre fraccions de 50 ml. Aquestes condicions d'elució són crítiques doncs si s'augmenta la concentració de MeOH s'elueixen altres fosfolípids.

c) Detecció.

Es va fer per cromatografia en capa fina en placa de sílice segons el mètode descrit per Skipski (1962). Com a eluent es va fer servir una barreja de $\text{Cl}_3\text{CH}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65/25/4; v/v) revelat-se per carbonització de la placa prèvia vaporització amb àcid perclòric al 40%.

d) Conservació.

Es va evaporar el dissolvent de les fraccions que contenen lecitina i es guardà a 4° sota atmosfera de nitrogen.

3.2.2.2.-CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC)

Com assaig previ i de la mateixa forma que en el cas dels fàrmacs esmentats d'antuvi, és convenient fer una anàlisi de tots el lípids per capa fina per tal de comprovar la seva puresa.

Es van dissoldre els lípids en Cl_3CH i es va depositar una mostra en la placa. A continuació s'eluí amb una barreja de $\text{Cl}_3\text{CH}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65/25/4; v/v). El revelat es feu per carbonització de la placa prèvia vaporització amb HClO_4 al 40% (Skipski, U.P., 1962).

Degut al fet de no disposar d'un revelador específic per a la lecitina, abans de realitzar la cromatografia en capa fina, és necessari desenvolupar la placa una vegada en buit. Es retalla 1 cm de la part superior i així s'eliminen les taques degudes a impureses lipídiques del solvent o de la placa que interferirien en el revelat posterior.

3.2.2.3.- ESPECTREFOTOMETRIA DE U.V.

Una de les formes de degradació dels fosfolípids, especialment de la PC, és la deguda a l'oxidació de les cadenes hidrocarbonades insaturades. Els estadis pels que s'arriba a l'oxidació són els següents: transposició dels dobles enllaços fins l'obtenció d'un diè conjugat seguit per la formació del hidroperòxid. A continuació es forma un anell inestable que es trenca per a donar àcids i aldeïds de cadena curta. La reacció es desencadena per la pèrdua d'un àtom d'hidrogen α -metilè que dóna un radical lliure molt reactiu. Aquest fenomen es mesura pel increment de l'absorció a 235 nm originat per un augment de la conjugació del diè (Klein, R.A., 1970).

Per a mesurar l'oxidació de la PC es va preparar una solució clorofòrmica 10 mM fent-se una lectura de la mateixa entre 350 i 190 nm.

Aquesta degradació s'evita, en gran part, treballant amb preparacions purificades recentment i en atmosfera de nitrogen.

Com a norma general de treball, la lecitina va ésser purificada en petites quantitats de manera que sempre es va fer servir immediatament després de la seva purificació. No obstant, abans de qualsevol assaig es va comprovar la seva puresa per TLC, HPLC i espectrofotometria de U.V.

3.2.2.4.- CROMATOGRAFIA LIQUIDA D'ALTA EFICACIA (HPLC).

Tècnica emprada per analitzar la PC impura i la purificada. Com a fase estacionària es va utilitzar una columna de Sílica (Spherisorb SiOW, 25 x 0'4 cm) i com a fase mòbil una barreja de ACN/Isopropanol/MeOH/H₂O/TFA (135/20/10/6'7/0'85, v/v). Es va treballar en condicions isocràtiques, a temperatura ambient, a un flux de 1 ml/min i detecció a λ :206 nm.

3.2.2.5.-METODE DE DETERMINACIO QUANTITATIVA DEL FOSFOR

El mètode utilitzat (McClare, C.W., 1971) permet conèixer de forma indirecta el contingut de fosfolípid d'una preparació mitjançant una valoració colorimètrica que determina del seu contingut en fòsfor.

Es va preparar una solució patró de Na₂HPO₄ 40 μ M (5'67 μ g/ml Na₂HPO₄ que equivalen a 1'24 μ g/ml de P) previament pesat i desecat fins a pes constant, per a fer una recta de calibració. Es van separar alíquotes de 0'1 a 1 ml, se'ls va afegir 0'5 ml de HClO₄ (70%) i es carbonitzaren a reflux 30 minuts a 210°. Passat aquest temps s'arrefredaren i s'hi afegiren 9'5 ml del reactiu de fosfats. Una vegada ben agitat i escalfat a 50° durant 1 hora, es deixà refredar llegint-se, a continuació, l'absorbància a 825 nm. Es va fer també un blanc amb H₂O de la mateixa qualitat que l'emprada alhora de fer les dissolucions.

Per a valorar la PC es va preparar una solució clorofòrmica de concentració similar a la de la solució patró de fosfat inorgànic, s'evaporà el dissolvent i es procedí tal com s'ha descrit anteriorment.

3.2.3.- METODES D'OBTENCIO DE LIPOSOMES

3.2.3.1.- METODE D'OBTENCIO DE LIPOSOMES MULTILAMINARS (MLV)

Es va seguir essencialment el mètode descrit per Wilschut (1982). Normalment es van preparar dos lots de fosfolípids, un amb PC (25 mg) i l'altre amb PC/Colesterol (25 mg/4 mg). Es van barrejar amb una mescla de $Cl_3CH/MeOH$ (2:1, v/v) evaporant-se a continuació el dissolvent en un rotavapor durant 1 hora, de forma que els lípids quedessin disposats com una fina pel·lícula al voltant de les parets del baló. Una vegada assecades les mostres completament, es va passar N_2 durant 15 minuts a fi d'arrastrar les últimes traces de dissolvent orgànic. Seguidament, s'hidrataven amb 2 ml d'una solució de principi actiu de 1 mg/ml i s'homogeneïtzaren amb l'ajuda d'un bany d'ultrasons. Un lot de cada tipus de fosfolípid s'hidratà durant 2 hores i un altre durant 48 hores sota agitació suau. Així s'obtingué una població de MLV barrejada amb material no encapsulat.

Per tal de separar el material no encapsulat, es van addicionar 8 ml de PBS pH: 7'4 i es centrifugaren a 25.000 x g, durant 25 minuts a 4°. Aquest procés es va realitzar tres vegades més, canviant cada vegada les aigües de rentat. L'últim precipitat que estava format per liposomes contenint solsament producte encapsulat es va resuspendre i enrasar amb PBS fins a 5 ml. Una alíquota d'aquesta suspensió es valorà per HPLC.

Alhora d'encapsular un compost no hidrosoluble es va dissoldre en $Cl_3CH/MeOH$ (2:1, v/v) i s'addicionà directament a la barreja de lípids. A continuació s'hidratà amb 2 ml de PBS pH: 7'4 seguint-se el mateix procediment que s'ha indicat abans.

3.2.3.2.- METODE D'OBTENCIO DE LIPOSOMES UNILAMINARS (SUV).

Es va seguir, amb algunes modificacions, el mètode descrit per diferents autors (Huang, CH. 1969; Wilschut, J. 1982).

Es va preparar una suspensió de MLV de PC tal com s'ha indicat en l'apartat anterior (abans de centrifugar). Es va sonicar la preparació amb una sonda d'ultrasons de 10 mm de diàmetre a 100 W de potència, mantenint el tub que contenia la dispersió submergit en un bany de gel a 4°. El temps total de sonicació va ésser de 10 minuts fent-ho a intervals de 2 minuts i deixant un minut entre dues sonicacions

successives, durant el qual es passà un corrent de N_2 . A continuació es va centrifugar a $159.000 \times g$ durant 3 hores per tal d'eliminar les partícules de titani alliberades per la sonda i per a separar la fracció de MLV que hagués pogut quedar. 1 ml del sobrenedant es va sotmetre a una filtració sobre gel amb Sepharosa Cl 4B. L'elució es va fer amb una solució 5 mM de TRIS pH: 7'4. El flux d'elució va ésser de 32 ml/hora i es recolliren fraccions de 1'5 ml.

3.2.3.3.- METODE D'OBTENCIO DE LIPOSOMES PER DESHIDRATACIO I REHIDRATACIO (DRV).

Es va seguir el procediment descrit per Kirby i Gregoriadis (1986).

Es van preparar sempre per triplicat tres lots de fosfolípids de la següent composició: PC (25 mg), PC/COL (25 mg/4mg) i PC/COL/PS (25mg/4mg/5mg). Es va seguir el procés indicat en el punt 3.2.3.1 fins l'obtenció de MLV. A continuació es separà un lot de MLV de cada tipus de fosfolípid, es col·locà en un bany de gel a 4° i es sonicà amb una sonda d'ultrasons tal com s'ha indicat en l'apartat 3.2.3.2. però hidratant només amb 2 ml de H_2O (no amb la solució del principi actiu a encapsular). Les SUV així obtingudes es van centrifugar a $1700 \times g$, a 4° durant 15 minuts per tal de separar les partícules de titani que s'havien després de la sonda i les possibles MLV que haguessin pogut quedar. 1 ml del sobrenedant es va barrejar amb 0'5 ml de la solució de principi actiu a encapsular de concentració 2 mg/ml (aproximadament 5 mM). El mateix es va fer amb l'altre lot de MLV que s'havia reservat i que a partir d'aleshores va seguir un tractament comú.

Es va barrejar perfectament la dispersió de fosfolípid (s)/principi actiu amb l'ajuda d'un vibromixer, es congelà ràpidament amb una barreja de MeOH i neu carbònica (-50°) i es liofilitzà. Una vegada acabat aquest procés es va rehidratar el residu sec amb 1 ml de PBS agitant fins la completa homogeneïtzació.

Per a separar els DRV del material no encapsulat es van centrifugar a $25.000 \times g$ (14.000 RPM), a 4° durant 25 minuts. Passat aquest temps es va separar el sobrenedant i es va tornar a centrifugar segons les mateixes condicions. Finalment, i una vegada decantat el segon sobrenedant, s'obtingueren els DRV i determinant-se a continuació el contingut en principi actiu per HPLC.

Per tal de millorar l'eficàcia de l'encapsulació i mantenint la mateixa relació molar fosfolípid/principi actiu, es van fer DRV partint de solucions inicials més concentrades i seguint-se amb les modificacions que es senyalen a continuació, el protocol descrit anteriorment. Una vegada barrejats els lípids i evaporat el dissolvent, es van hidratar amb 40 ml d'aigua millipore. Es van sonicar amb una sonda d'ultrasons de 20 mm de diàmetre, essent el temps total de sonicació de 15 minuts. Es centrifugaren a 1700 x g durant 15 minuts a 4°, separant-se 20 ml del sobrenedant (PC/COL: 625 mg/100 mg) als què s'addicionaren 10 ml d'una solució de Morfina 14 mM (aproximadament 3 vegades més concentrada que en el cas anterior). Es va congelar i es liofilitzà tota una nit. Una vegada ben sec es va rehidratar amb la mínima quantitat de PBS possible (3 ml) per aconseguir una dispersió homogènia i es continuà fins l'obtenció de DRV tal com s'ha indicat anteriorment.

3.2.4.-CARACTERITZACIO DE LIPOSOMES: MICROSCOPIA ELECTRONICA

La Microscòpia Electrònica és una de les tècniques més emprades per a caracteritzar les preparacions liposòmiques ja que permet determinar de manera aproximada la lamelarietat (en funció de la proporció de lípid exposat al medi extern) (Zasadzin, J.A.N., 1986) i el tamany de les vesícules (Guiot, P., 1984).

En aquest camp existeixen dos mètodes d'observació possibles depenent del tipus de material en estudi: la Microscòpia Electrònica d'Escombrat i la de transmissió.

En aquest treball es va seguir el mètode de Transmissió basat en el bombardeig de la mostra per un feix d'electrons, de forma que les diferents regions es distingeixen entre sí segons la seva capacitat de difondre els electrons.

Es va emprar la tècnica de tinció negativa, molt senzilla i aplicable a l'estudi de membranes tal com indica Makowski (1983) ja que el seu límit de resolució és de 1'5 nm. Primerament es deposità una gota del colorant, fongsfotungstat sòdic al 1%, pH: 7, sobre la mostra a estudiar situada sobre una reixeta metàl·lica. Després de 10 minuts, temps necessari per la fixació del colorant, s'assecà l'excés d'aquest, es rentà i es procedí a l'observació.

Fou necessari treballar amb varies concentracions de liposomes sotmeses a diferents temps de tinció a fi de

trobar les condicions òptimes de treball per a cada lot de liposomes.

Aquesta tècnica presenta alguns inconvenients com la distorsió dels liposomes (Miyamoto, V.K., 1971) o errors en l'observació per penetració massiva del colorant.

3.2.5.- METODES DE MESURA DE L'ESTABILITAT DELS LIPOSOMES

3.2.5.1.- Estudi de la pèrdua del contingut en funció del temps.

Es va agafar una alíquota de la preparació de liposomes (0'1 ml) a la que es va addicionar PBS, pH:7'4 (0'9 ml). Es van centrifugar 10 minuts en una centrífuga Eppendorf a 14.000 RPM. A continuació, es va separar el sobrenedant i es valorà el seu contingut en principi actiu per HPLC. El procés es va repetir setmanalment durant 2 mesos.

3.2.5.2.- Estudi de l'agregació en funció del temps

Es va basar en l'estudi del canvi de turbidesa al llarg del temps, d'una dispersió de liposomes (Defrise-Quertain, 1985). Es va fer una dilució dels liposomes de forma que la lectura en un espectrofotòmetre de U.V. a λ : 550 nm, fós menor de 0'05. Les mostres es van preparar per duplicat, mantenint-se una a temperatura ambient i l'altra a 4°. Es van fer lectures setmanals durant 2 mesos.

3.2.6.- METODES D'ESTUDI DE LA INTERACCIO LIPID-PRINCIPI ACTIU.

Per tal de determinar el tipus d'interacció entre els opiacis i fosfolípids i així poder fer una extrapolació dels fenòmens que es produeixen a nivell de membrana, es van efectuar dos tipus d'assaigs basats fonamentalment en la mesura de les temperatures de transició de fase.

3.2.6.1.- CALORIMETRIA DIFERENCIAL D'ESCOMBRAT (DSC).

Es van preparar MLV de DPPC amb un pes fixe de lípid de 6 mg en cada mostra i diferents proporcions de Morfina, Metadona, Meperidina, Naloxona, Codeïna i Etilmorfina. El volum de cada mostra va ésser de 150 μ l. Previament a l'assaig dels MLV, es va calibrar l'aparell amb àcid lauric i àcid mirístic. Es va depositar 120 μ l de cada mostra en

unes càpsules d'alumini de 160 µl de capacitat que a continuació es van sellar. Les mesures calorimètriques es realitzaren en un rang de 10 °C a 55 °C (283-328 °K), a una velocitat d'escombrat de 2°min⁻¹ i una sensibilitat de 1716 mW. Com a referència es va emprar H₂O que es va sotmetre al mateix tractament que les altres mostres. Per a cadascuna d'elles es van fer al menys, quatre cicles d'esclafament i refredament. Els canvis d'entalpia es van calcular a partir del pic principal del registre de DSC.

3.2.6.2.- Mètode turbidimètric

Es basa en la mesura del canvi d'absorbància d'una dispersió de liposomes (MLV) sotmesos a escalfament mitjançant un bany termostatitzat. La lectura es va fer en un espectrefotòmetre de U.V. a λ:550 nm. Es van preparar MLV de PC i DPPC amb diferents molècules opioides. La concentració total de lípid fou 25 mM. Es va resuspendre en una solució amortidora de TRIS/HCl 5 mM. La quantitat de liposoma afegida va ésser la necessària per a donar una absorbància aproximada de 0'5 a λ:550 nm.

A continuació es va fer un escombrat de temperatures anotant la densitat òptica obtinguda per cadascuna d'elles. El control de la temperatura en el interior de la cubeta es va realitzar constantment mitjançant un termopar. Es va fer també un blanc per a cada tipus de fosfolípid.

3.2.7.- METODES DE DETERMINACIO DE L'ACTIVITAT BIOLOGICA

3.2.7.1.- "In vitro": Bioassaig de l'íleum de conill porquí (GPI)

Un dels assajos "in vitro" per la caracterització dels compostos opiacis és el del plexe mientèric de l'íleum de conill porquí (Kosterlitz, H.W. 1968). Aquest teixit és ric en receptors opioides del subtipus µ sobre els que actua tant la morfina (agonista) i els compostos derivats d'ella, com els pèptids opioides. La seva acció es caracteritza per una inhibició de les contraccions naturals o produïdes artificialment per l'estimulació elèctrica del teixit i posterior recuperació de l'amplitud de tals contraccions amb naloxona (antagonista).

L'activitat de l'agonista ve determinada pel paràmetre IC₅₀ que es defineix com la concentració de principi actiu que produeix el 50 % de la inhibició de les contraccions.

Per aquest bioassaig es van emprar conills porquins albins mascles de pes comprès entre 250 i 300 g. Es van matar per desnucació deixant-se desagnar. Se'ls va obrir l'abdomen extreient-se la proció terminal de l'íleum i despreciant-se els 15 cm més propers a la unió íleum-caecal. Es col·locà en una solució de Krebs modificada (en concentracions mM: NaCl: 131'2; NaHCO₃: 25; CaCl₂: 2'76; KCl: 2'68; Glucosa: 11; KH₂PO₄: 1'29 i MgSO₄ · 7 H₂O: 1'3) a 37°. Es va tallar un fragment d'aproximadament 5 cm separant-se el **Plexe Mientèric** (part muscular externa) de la resta del budell. Per un extrem es va lligar a un electrode de platí depositant-se en una cubeta (Volum:13 ml) que contenia solució de Krebs a 37° gasejada amb carbogen (95 % O₂ i 5 % CO₂). Per l'altre extrem es va lligar a un transductor de força isomètric que capta els canvis de tensió del múscul i es va sotmetre a una tensió de 400 mg. Es va deixar en aquestes condicions durant 20 minuts a fi de que el teixit s'adaptès al medi. Passat aquest temps es va fer un rentat de 10 segons i s'estimulà elèctricament segons els següents paràmetres: estímuls de 7 msec de duració, a un voltatge constant supramaximal de 40 V i a una freqüència de 0'1 Hz. El període entre dos estímuls succesius va ésser de 0'1 msec. Es va mantenir 20 minuts en aquestes noves condicions perquè s'equilibrès. Per tal de verificar la funcionalitat del teixit, s'addicionaren al bany 5 µl d'una solució de Morfina 10⁻⁴M, deixant-se actuar 5 segons. A continuació es van efectuar una sèrie de rentats de 5 segons de duració separats per un interval de 1 minut fins que el teixit va recuperar l'amplitud inicial de les contraccions. Passats 20 minuts s'aplicà el producte problema quin IC₅₀ es volia determinar, deixant-se actuar durant 5 minuts. Es va rentar de nou tal com s'ha indicat anteriorment. El període entre dues dosis succesives va ésser de 20 minuts.

Per a calcular el valor de IC₅₀ es va fer servir el Mètode de les Dosis Múltiples (Kosterlitz, H.W. 1968) basat en l'addició de dosis d'una mateixa substància a intervals de 15 a 20 minuts. Cada producte es va provar, al menys, en tres animals diferents.

3.2.7.2.-"In vivo": Bioassaig de la immersió de la cua.

Es va seguir una modificació del mètode descrit per D'Amour i Smith (1941).

S'utilitzaren rates "Sprague-Dawley" mascles de pes comprès entre 280 i 300 g. S'instalaren en una habitació climatitzada a 25° i es van sotmetre a un cicle de claror-foscor de 12 h amb lliure accés a menjar i aigua. Els experiments es van fer durant la fase de claror.

La temperatura de l'aigua fou de $54'5 \pm 0'5^\circ$ i el temps màxim de resposta en animals no tractats (lectura límit) de 10 minuts, aproximadament el doble del temps control (temps de resposta en animals no tractats). Els assajos es duren a terme per immersió de 10 cm de la cua tres vegades a intervals de 1 minut. Només es considerarà vàlida la darrera immersió de cada tres. El temps de control en animals no tractats fou de 1 a 4 segons.

L'administració de morfina, tant encapsulada en liposomes com en forma lliure, es va fer per injecció subcutània.

RESULTATS I DISCUSSIO

4.1.-CARACTERITZACIO DE PRINCIPIS ACTIUS

4.1.1.- Obtenció del Clorhidrat de Codeïna.

Es va partir de 245 mg de Codeïna Base Lliure i es van obtenir 280 mg de Codeïna HCl el que suposa un rendiment del 97'54%. Es va sotmetre a les anàlisis esmentades abans demostant, els resultats obtinguts, la puresa del producte.

4.1.2.- Anàlisi elemental.

En la taula 2 es mostren els percentatges de C, H, N i Cl trobats i els teòrics per tots els principis actius fets servir a posteriori.

PRINCIPIS ACTIUS	% Teòrics				% Reals			
	C	H	N	Cl	C	H	N	Cl
Morfina HCl	63'39	6'21	4'35	10'87	63'40	6'20	4'39	10'86
Naloxona HCl	62'74	6'10	3'85	9'63	62'60	6'15	3'75	9'60
Meperidina HCl	63'42	7'75	4'90	12'33	63'45	7'70	4'80	12'40
Metadona HCl	72'91	8'16	4'05	10'25	72'75	8'12	4'10	10'30
Etilmorfina HCl	59'08	5'96	3'62	9'06	58'98	5'17	3'30	9'12
Codeïna HCl	64'37	6'60	4'17	10'56	64'30	6'45	4'20	10'60
Codeïna Base LL.	72'22	7'04	4'68	-----	72'00	7'06	4'75	-----
Leu-Encefalina	53'69	6'39	11'1	-----	53'80	6'29	11'7	-----
Levamisol HCl	54'83	4'98	11'6	14'53	54'75	4'80	11'9	15'00
Tiofanat	45'35	4'85	17'2	17'2(S)	44'75	4'9	17'3	17'20

Taula 2.- Valors teòrics i reals obtinguts al fer una anàlisi elemental.

4.1.3.- Cromatografia en capa fina. (TLC)

En la taula 3 estan indicats els Rf dels mateixos fàrmacs esmentats en l'apartat anterior. Per capa fina només va observar-se una taca per cadascun d'ells fet que ens confirmà la seva puresa.

FARMAC	Rf
Morfina HCl	0'23
Naloxona HCl	0'90
Meperidina HCl	0'55
Metadona HCl	0'50
Etilmorfina HCl	0'43
Codeïna HCl	0'43
Codeïna Base Lliure	0'43
Leu-Encefalina AcOH	0'12
Levamisol HCl	0'16
Tiofanat	0'82

Taula 3.- Valors de Rf per a cada Principi Actiu. Elució: $Cl_3CH/MeOH/H_2O$ (65/25/4). Revelat: 1) Vaporització amb $HClO_4$ i, 2) Carbonització.

4.1.4.- Quantificació del contingut en principi actiu del liposoma

Els mètodes de detecció del principi actiu encapsulat en els liposomes varien segons la naturalesa del mateix. En el cas concret que ens ocupa i seguint les dades de la bibliografia es podien seguir dos processos:

a) Tractar els liposomes amb cloroform de manera que el fàrmac a determinar quedés en la fase aquosa i es pogués quantificar per espectroscòpia de U.V.

b) Sotmetre els liposomes a una cromatografia líquida d'alta eficàcia i quantificar el contingut en principi actiu encapsulat per a aquesta mateixa tècnica.

A continuació es comenten els resultats obtinguts en ambdós casos.

Abans però, es va buscar la longitud d'ona on presentaven el màxim d'absorció, fixar-la per a cada fàrmac i així trobar les condicions en que la resposta era màxima. Per tal d'esbrinar-la es va fer un escombrat desde $\lambda=800$ nm fins a $\lambda=190$ nm. En la taula 4 s'indica la longitud d'ona màxima per a cadascun.

FARMAC	λ MAXIMA (nm)
Morfina HCl	285
Naloxona HCl	285
Meperidina HCl	257
Metadona HCl	292
Etilmorfina HCl	283
Codeïna HCl	285
Codeïna Base Lliure	285
Leu-Encefalina ACOH	208
Levamisol	212
Tiofanat	270

Taula 4.- Longituds d'ona on presenten el màxim d'absorció cadascun dels fàrmacs.

Es va fer una recta de calibrat per a cadascun per tal de determinar el límit inferior de detecció o concentració mínima detectable (Fig. 11). Per a obtenir-les es van agafar els punts que seguien la llei de Lambert-Beer, que són aquells quin valor d'absorbància està comprès entre 0'1 i 1'5 (Burgess, C., 1981). Excepte pel Levamisol i Tiofanat quin límit de detecció era de concentracions 10 μ M, per les altres era de solucions amb una concentració superior a 100 μ M. Això va suposar un problema alhora d'utilitzar aquesta tècnica per la identificació quali i quantitativa de tals principis actius atés que les quantitats de partida eren sempre molt petites.

RESULTATS I DISCUSSIO

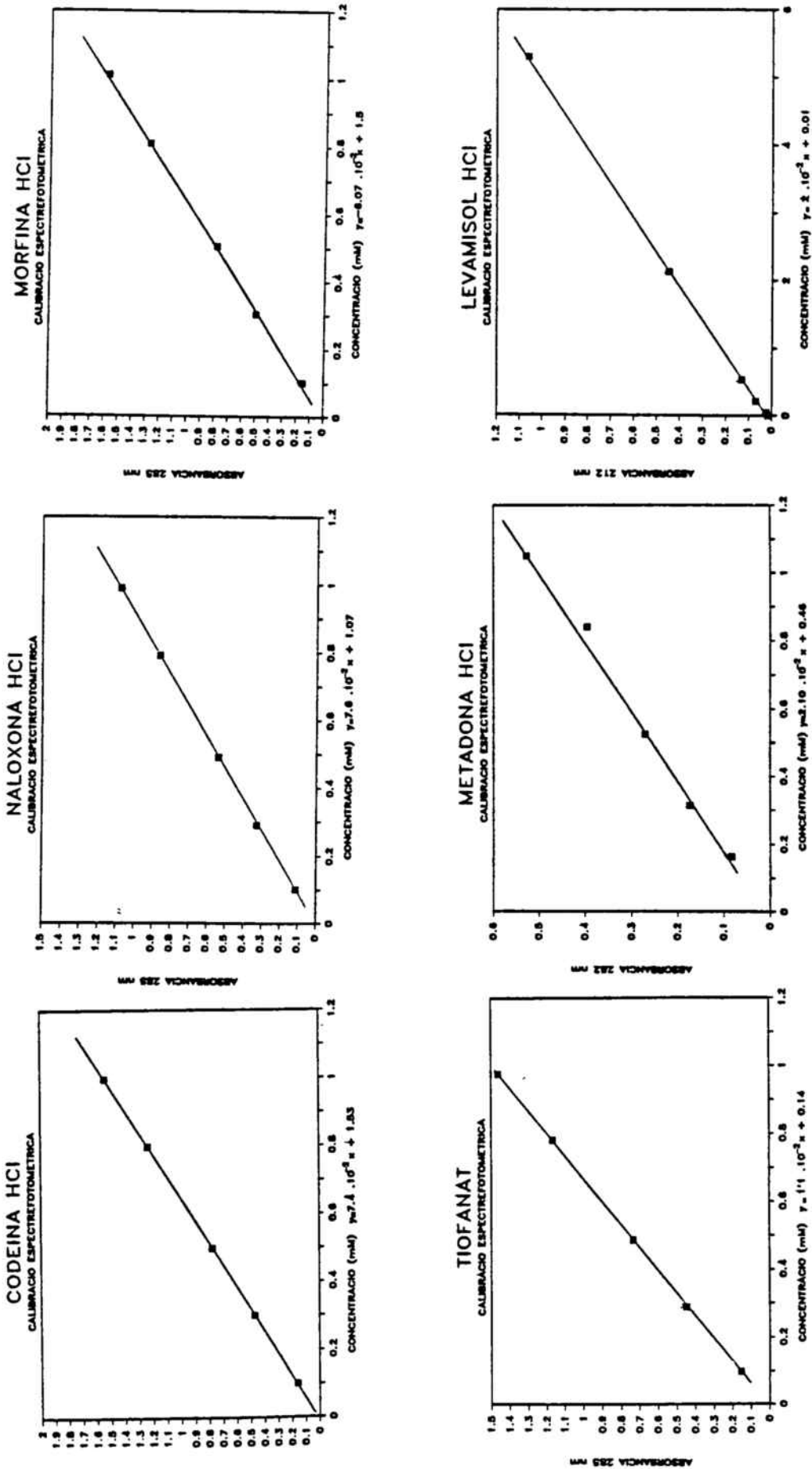


Figura 11.- Rectes de calibració espectrofotomètrica dels diferents fàrmacs a les longituds d'ona de màxima absorció.

4.1.4.1.-Valoració de principi actiu encapsulat per trencament de liposomes

Els liposomes obtinguts estaven en solucions no transparents i això feia impossible llegir-los directament en un espectrofotòmetre. Per a solventar aquest problema hi havia dues alternatives, una era la de diluir, però la dilució hauria hagut d'ésser tan gran que s'hauria treballat per sota del límit de detecció de l'aparell. L'altra consistia en fer l'extracció del fosfolípid amb un dissolvent orgànic com, per exemple, Cl_3CH . Aquesta alternativa però, presentava dos inconvenients, el primer era que estava limitat als fàrmacs hidrosolubles. El segon i més important, era que malgrat els dos dissolvents (Cl_3CH) eren immiscibles, la fase aquosa quedava sempre saturada de l'orgànica el que feia que les lectures fossin errònies, malgrat es fes un blanc amb H_2O sotmesa al mateix tractament que les mostres problema. En el nostre cas ho vam assajar, sense èxit, amb el Levamisol. Es va fer per triplicat una extracció amb Cl_3CH d'una mostra de DRV no sonicats (PC/COL/Levamisol) i dels sobrenedants de les centrifugacions. Tal com s'indica en la taula 5, el contingut total trobat era sempre superior al inicial (1mg).

MOSTRA	mg		
	1	2	3
DRV	0'79	0'98	0'82
1er Sob.	0'73	0'57	0'70
2n. Sob.	0'06	0'02	0'02

Taula 5.- Valors en mg dels sobrenedants i DRV de Levamisol obtinguts per valoració espectrofotomètrica de la fase aquosa després d'una extracció dels fosfolípids amb Cl_3CH .

Aquests inconvenients van fer que obtéssim per emprar la tècnica de Cromatografia Líquida d'Alta Eficàcia que es descriu a continuació.

4.1.4.2.- Anàlisi per Cromatografia Líquida d'Alta Eficàcia (HPLC).

A la vista del problema presentat per la tècnica d'espectrofotometria de U.V. alhora de fer una anàlisi qualitativa i quantitativa dels principis actius, es va recórrer a la tècnica de HPLC. Malgrat no ésser tan sensible com les tècniques basades en l'ús de material radioactiu que no estaven al nostre abast, va ésser el suficientment sensible com per a detectar, en la majoria dels casos, concentracions de l'ordre 10 µM de les substàncies emprades.

Quan es va iniciar el treball, les condicions cromatogràfiques per les molècules emprades, indicades en la bibliografia (Wilson, T.D., 1986), eren:

Morfina i Codeïna:

FASE ESTACIONARIA	FASE MOBIL	DETECCIO
Sílica	Hexà: Clorur de Metilè: EtOH: Dietilamina (300:30:40:0'5).	UV/285 nm
C ₁₈	H ₂ O: Acetonitril: Trietilamina (40:60:0'1).	UV/280 nm
Amino	0'025 KH ₂ PO ₄ : Acetonitril (25: 75).	UV/286 nm
Fenil	Acetonitril: H ₂ O: Acid Acètic: Dimetiloctilamina(50:950:1:0'4) gradient vers Acetonitril: H ₂ O: ACOH: Dimetiloctilamina (200:800:1:0'4).	UV/275 nm

Meperidina

FASE ESTACIONARIA	FASE MOBIL	DETECCIO
Cianopropil	Acetonitril: 15 mM KH ₂ PO ₄ , pH: 7: MeOH (55:25:20).	UV/205 nm

Metadona

FASE ESTACIONARIA	FASE MOBIL	DETECCIO
C ₁₈	MeOH: EtOH: 0'3 Dietilamino: H ₂ O (100:100:1'85:4).	Liquid Scintillation

Donada aquesta variabilitat ens vam veure obligats a buscar-ne de noves per varies raons. La primera, donat que feien servir com a fase mòbil sistemes de, al menys, tres solvents i vam considerar interessant i útil la possibilitat de simplificar-los. En segon lloc, per adequar el tipus de fase estacionària de què disposàvem ja que hauríem necessitat varis tipus de farciments de la columna, cosa que hauria encarit molt l'assaig, i finalment, perquè el sistema de detecció era distint del què tenia l'aparell d'HPLC emprat.

El nostre interès era, doncs, trobar les condicions cromatogràfiques d'anàlisi el més similar possible per a les molècules emprades, treballar en condicions d'elució simples que permetessin processar moltes mostres de rutina encapsulades en aparells no massa sofisticats, fer servir condicions d'elució suaus que no degradessin el farciment de la fase estacionària massa depresa i aconseguir tot això amb temps de retenció raonables.

Les longituds d'ona màximes trobades amb l'espectrefotòmetre van servir-nos per a seleccionar el filtre de U.V., dels que disposava el detector, més adient per a fer la lectura. Donat que les màx. d'aquestes molècules no eren gaire diferents entre elles, vam unificar-les alhora de fer les determinacions a 254 nm.

Cal destacar el fet de que sempre vam treballar amb precolumna farcida amb octadecilsilà.

La concentració de les mostres de partida va ésser de 1 mg/ml i la quantitat punxada de 20 µl.

El primer assaig es va fer emprant com a component orgànic de la fase mòbil Acetonitril (ACN) i com a component aquós aigua milipore filtrada per un filtre de 0'22 µm de diàmetre de porus. Es va treballar a un flux de 1 ml/minut, λ:254 nm, a temperatura ambient i en condicions isocràtiques (fase mòbil constant: ACN/H₂O: 50/50).

RESULTATS I DISCUSSIO

En aquestes condicions van detectar-se la Leu-Encefalina i el Tiofanat. Els altres fàrmacs van quedar retinguts en la fase estacionària i només s'eluiren, encara que amb mala resolució, al fer un gradient lent fins un 99% d'ACN (fig 12).

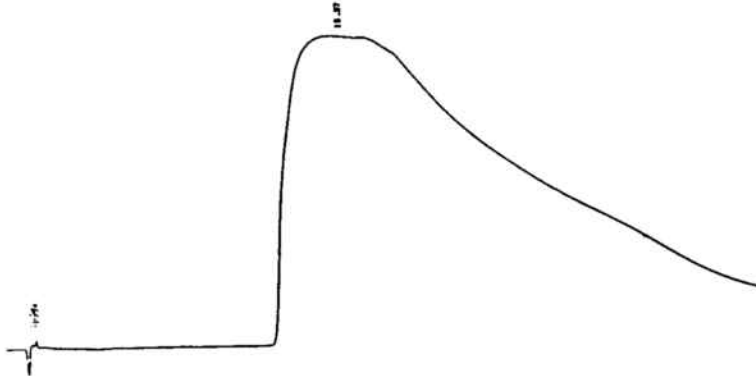


Figura 12.- Registre de HPLC de la Morfina HCl al fer un gradient des d'un 50% fins a un 99% d'ACN.

A continuació i com a nova estratègia d'elució es va addicionar a l'H₂O de la fase mòbil un 0'05% de TFA que s'ha demostrat millora les condicions cromatogràfiques (Olieman, C., 1984). Tal com s'indica en les fig. 13 i 14, s'obtingueren uns pics més estrets, es a dir, una millor resolució per la Leu-Encefalina i pel Tiofanat, però no per les altres.

Seguidament, es van assajar diferents proporcions de ACN/H₂O + 0'05% TFA (Fig.15 i 16) per tal de determinar les condicions d'elució i característiques cromatogràfiques òptimes d'aquests fàrmacs (Taula 6).

PRINCIPI ACTIU	ACN/H ₂ O +0'05% TFA	t'r	K
Leu-Encefalina	60/40	1'34	1'11
Tiofanat	50/50	3'25	2'80

Taula 6.- Condicions d'elució i característiques cromatogràfiques de la Leu-Encefalina i del Tiofanat.

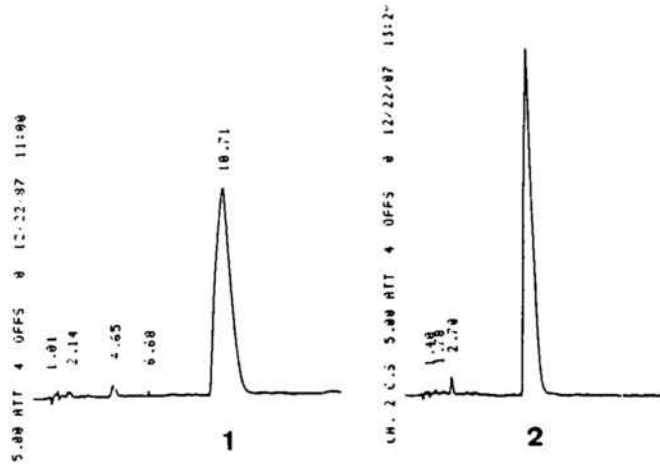


Figura 13.- Registres de HPLC de la Leu-Encefalina:
1) ACN/H₂O: 50/50, 2) ACN/H₂O + 0'05% TFA: 50/50.

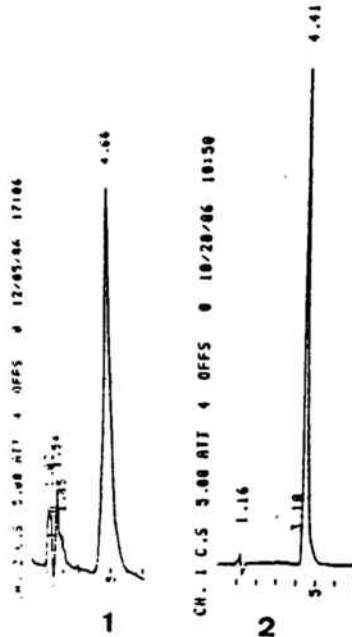


Figura 14.- Registres de HPLC pel Tiofanat:
1) ACN/H₂O: 50/50 i 2) ACN/H₂O + 0'05% TFA: 50/50.

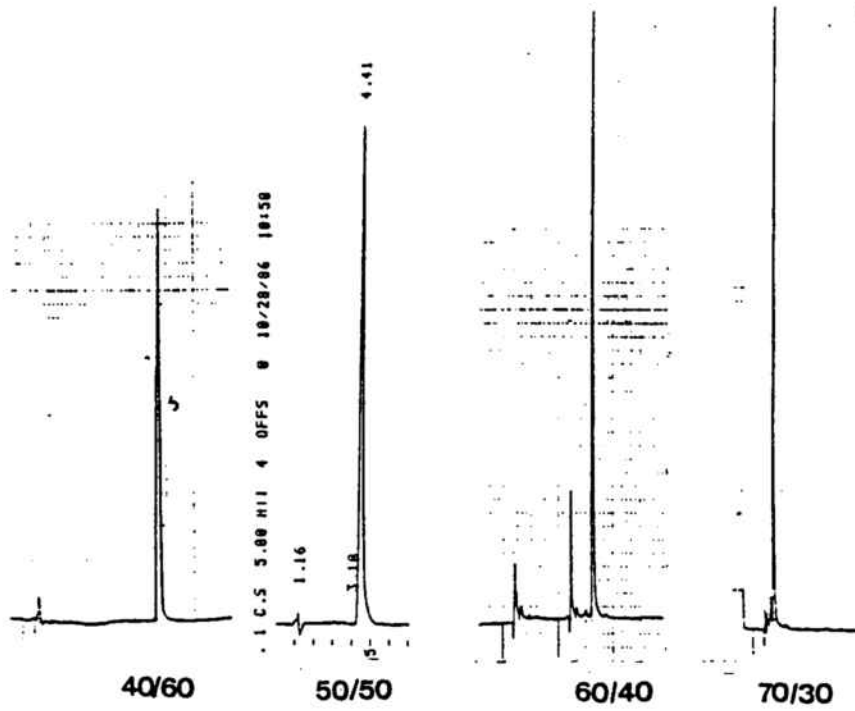


Figura 15.- Registres de HPLC d'una solució etanòlica de Tiofanat (0'1 mg/ml) a diferents proporcions de ACN/H₂O + 0'05% TFA.

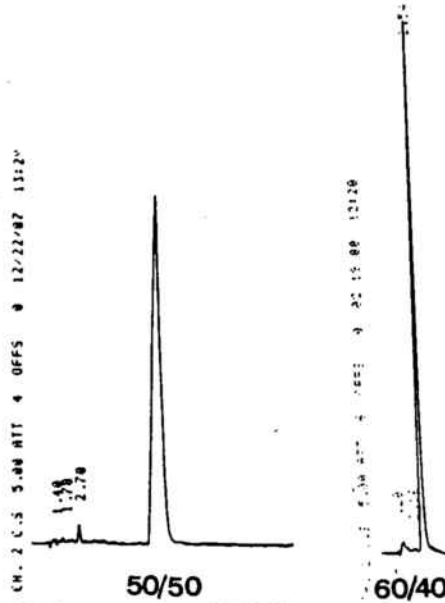


Figura 16.- Registres de HPLC per la Leu-Encefalina a diferents proporcions de ACN/H₂O + 0'05% TFA.

RESULTATS I DISCUSSIO

Pels altres fàrmacs es va pensar en emprar com a component aquós de la fase mòbil una solució amortidora. Es va partir d'una solució d'acetat amònic al 0'1 % (pH= 6'8). Es detectaren tots els fàrmacs encara que tant la Meperidina com la Metadona amb molt mala resolució. La Morfina, Codeïna, Naloxona, Etilmorfina i Levamisol presentaren uns pics d'aspecte similar però amb un cert eixamplament en la base fet que suposa una deficient resolució. Es van assajar diferents proporcions dels components de la fase mòbil per tal de millorar-los (fig.17 a 19). Com que no es va aconseguir, vam pensar en modificar el pH de la solució amortidora amb ACOH 1N. A pH: 5'4 es va lograr una sensible millora pels derivats de la Morfina (fig.20 a 21) mentre que per Levamisol va empitjorar (fig.23).

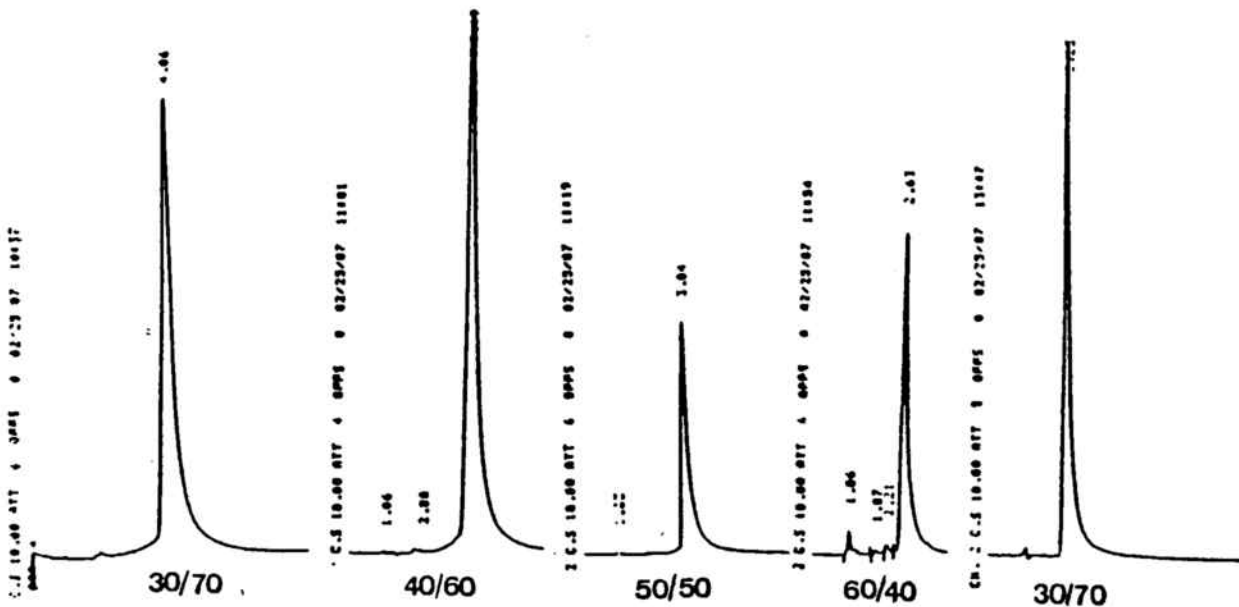


Figura 17.- Registres de HPLC per la Naloxona HCL. Elució a diferents proporcions de ACN/ACNH₄⁺ (0'1%), pH: 6'8.

RESULTATS I DISCUSSIO

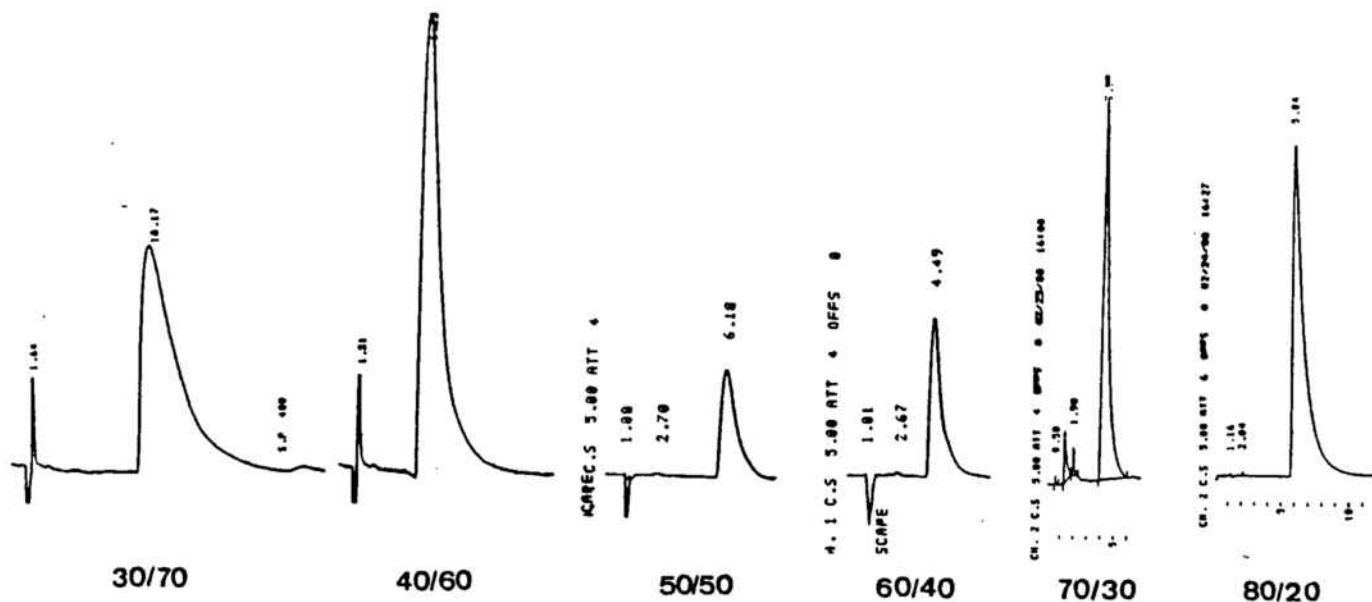


Figura 18.- Registres de HPLC del Levamisol HCl. Elució a diferents proporcions de ACN/AcNH₄⁺ (0'1%), pH: 6'8.

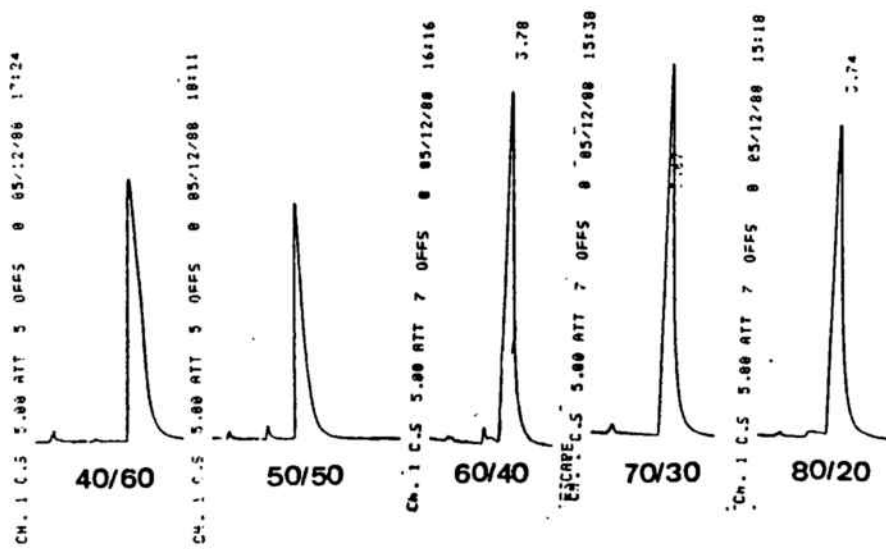


Figura 19.- Registres de HPLC per la Morfina HCl. Elució a diferents proporcions de ACN/AcNH₄⁺ (0'1%), pH: 6'8.

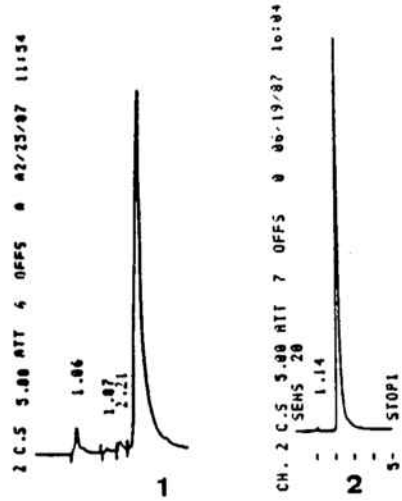


Figura 20.- Registres de HPLC per la Naloxona HCl. Elució: ACN/AcNH₄⁺ (0'1%):60/40; 1)pH: 6'8 i, 2) pH: 5'4

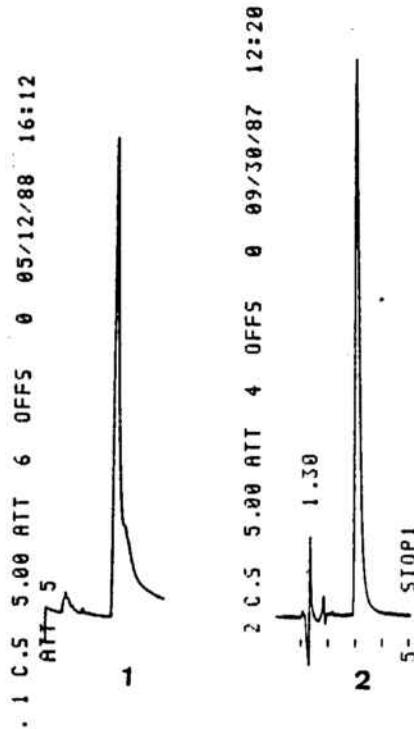


Figura 21.- Registres de HPLC per la Morfina HCl. Elució: ACN/AcNH₄⁺ (0'1%): 60/40; 1) pH:6'8 i, 2) pH:5'4

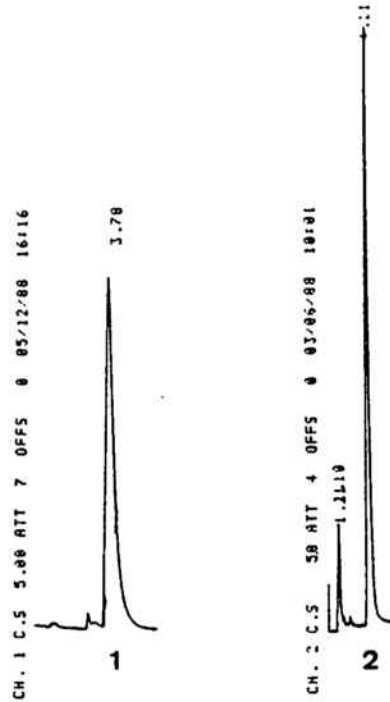


Figura 22.- Registres de HPLC de la Codeina HCl. Elució: ACN/AcNH₄⁺ (0'1%): 60/40; 1) pH: 6'8 2) pH: 5'4.

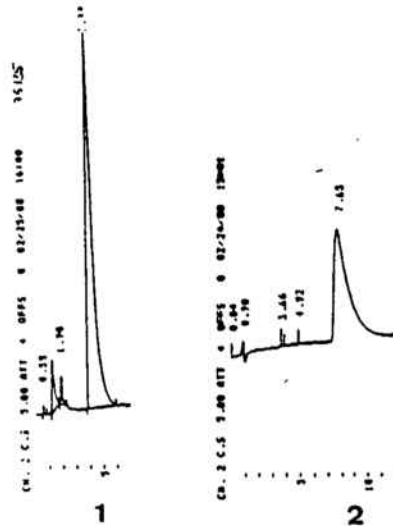


Figura 23.- Registres de HPLC del Levamisol HCl. Elució: ACN/AcNH₄⁺ (0'1%):70/30;1) pH: 6'8 i, 2) pH: 5'4

RESULTATS I DISCUSSIO

En el cas de l'Etilmorfina van detectar-se dos pics, possiblement degut a la presència de dos isòmers. Eluint amb ACN/AcNH₄⁺ 0'1% a diferents proporcions no vam aconseguir separar-los mentre que si ho fèrem al modificar el pH fins a 5'4 (Fig.24).

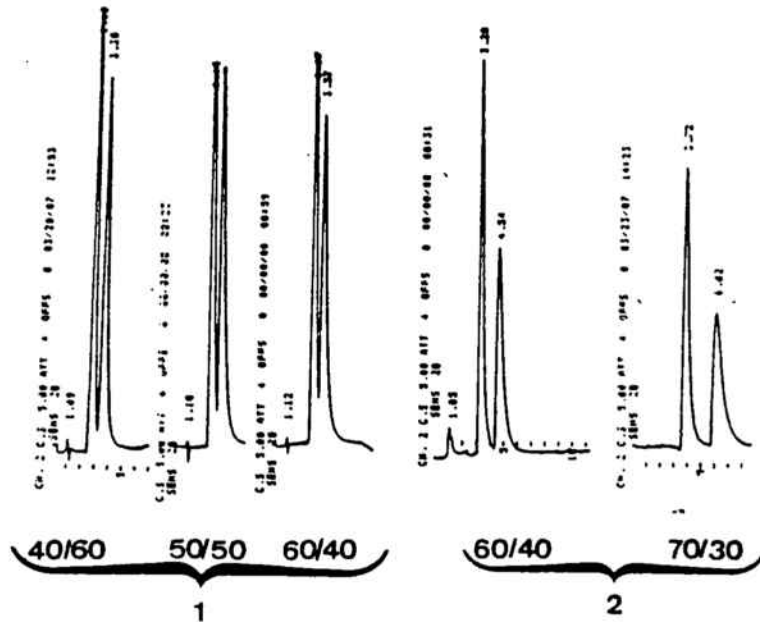


Figura 24.- Registres de HPLC per l'Etilmorfina HCl. Elució a diferents proporcions de ACN/AcNH₄⁺ (0'1%): 70/30; 1) pH: 6'8, 2) pH: 5'4.

En tots els casos es va seguir la mateixa estratègia d'elució que s'ha indicat pel Tiofanat i la Leu-Encefalina (Fig. 15 i 16) fins a definir les condicions i característiques òptimes per a cadascuna (Taula 7).

RESULTATS I DISCUSSIO

PRINCIPI ACTIU	t'r	K
Codeïna Base Lliure	3'17	3'17
Codeïna HCl	3'29	3'22
Etilmorfina HCl	2'15 3'49	2'04 3'22
Morfina HCl	2'10	2'44
Naloxona HCl	2'01	1'97

Taula 7.- Característiques d'elució per HPLC dels derivats de la Morfina emprant com a fase mòbil ACN/AcNH₄⁺-AcOH, pH: 5'4: 60/40 per a tots ells excepte per l'Etilmorfina que va ésser de 70/30.

ACN/AcNH ₄ ⁺ (0'1%)	t'r	K
70/30	3'41	5'87

Taula 8.- Característiques d'elució del Levamisol.

Finalment ens vam centrar en l'estudi de la Meperidina i de la Metadona. Es van assajar diferents solucions amortidores a distints pH tal com s'indica a continuació:

- 1.- ACN/KH₂PO₄-K₂HPO₄, pH:7'8; 7'4 i 7'13 (Fig.25).
- 2.- MeOH/Octanosulfonat (1%) pH: 7'1 (Fig. 26).
- 3.- ACN/AcNH₄⁺(0'1%). pH:6'8; 5'8; 5'4 i 4'4 (Fig.27 i 28).
- 4.- ACN/AcNa⁺ (0'1%). pH: 4 (Fig. 29).
- 5.- ACN/KH₂PO₄ (0'1%)-H₃PO₄. pH:3. (Fig. 30).

A les últimes condicions es va aconseguir un registre acceptable per ambdós fàrmacs (Fig.30) el que va fer que les consideréssim com a bones. En la Taula 9 s'esmenten les condicions a les que es va treballar per a cadascun.

RESULTATS I DISCUSSIO

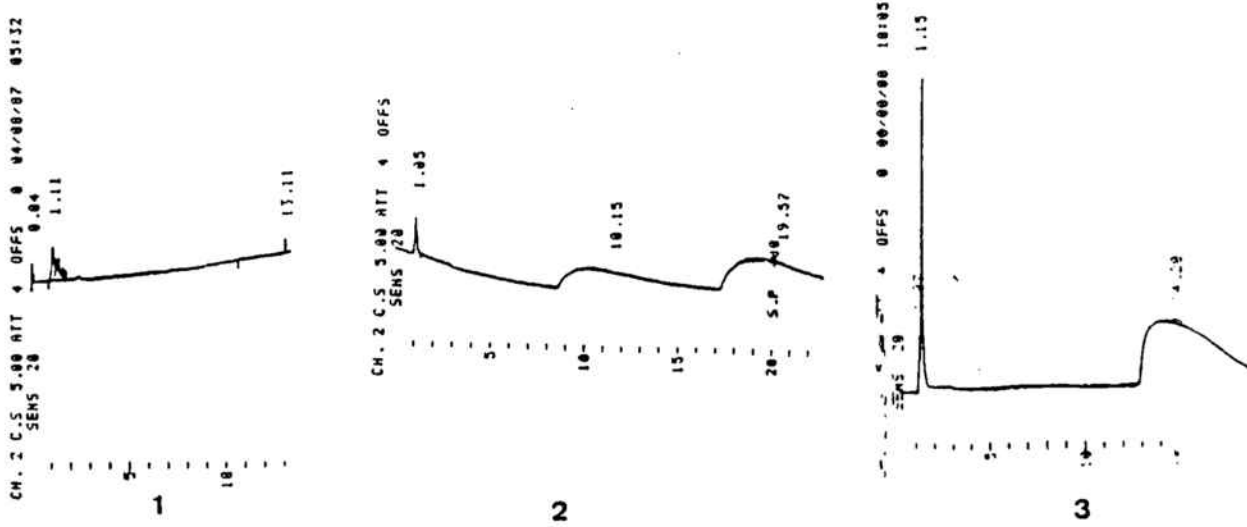


Figura 25.- Registres de HPLC de la Meperidina HCl. Elució: ACN/KH₂PO₄ (0'1%):50/50, 1) pH: 7'8,2) pH: 7'4 i, 3) pH: 7'1.

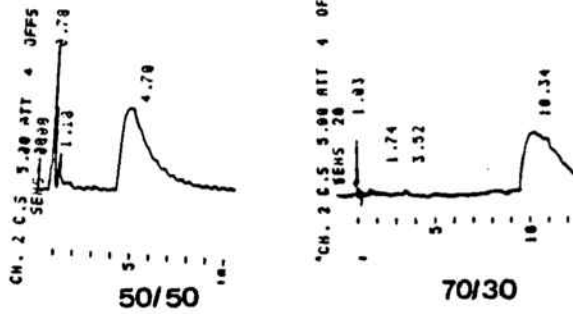


Figura 26.- Registre de HPLC de la Meperidina HCl. Elució: MeOH/Octanosulfonat (1%): 50/50, pH: 7'1

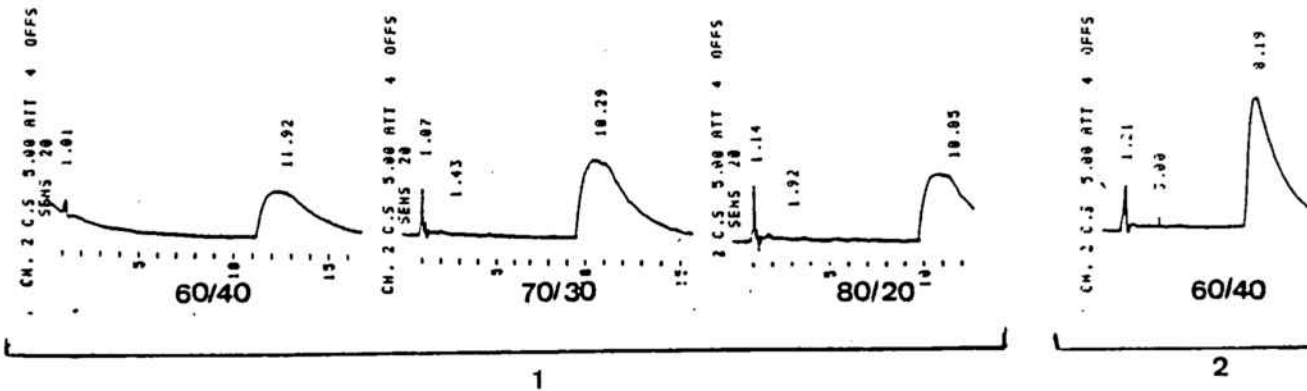


Figura 27.- Registres de HPLC de la Meperidina HCl. Elució: ACN/AcNH₄⁺ (0'1%): 1) pH: 6'8 i, 2) pH: 5'8.

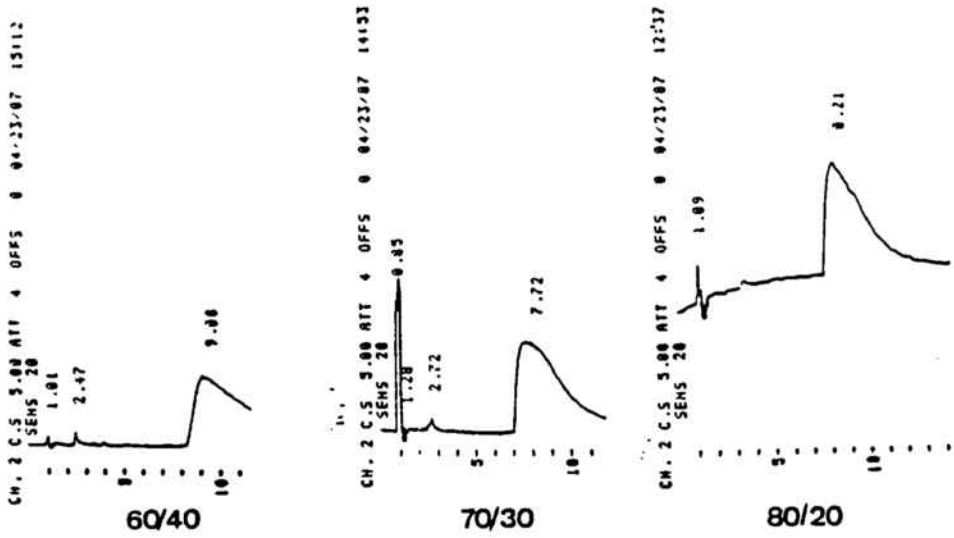


Figura 28.- Registres de HPLC per la Meperidina HCl. Elució: ACN/AcNH₄⁺ (0'1%), pH: 5'4.

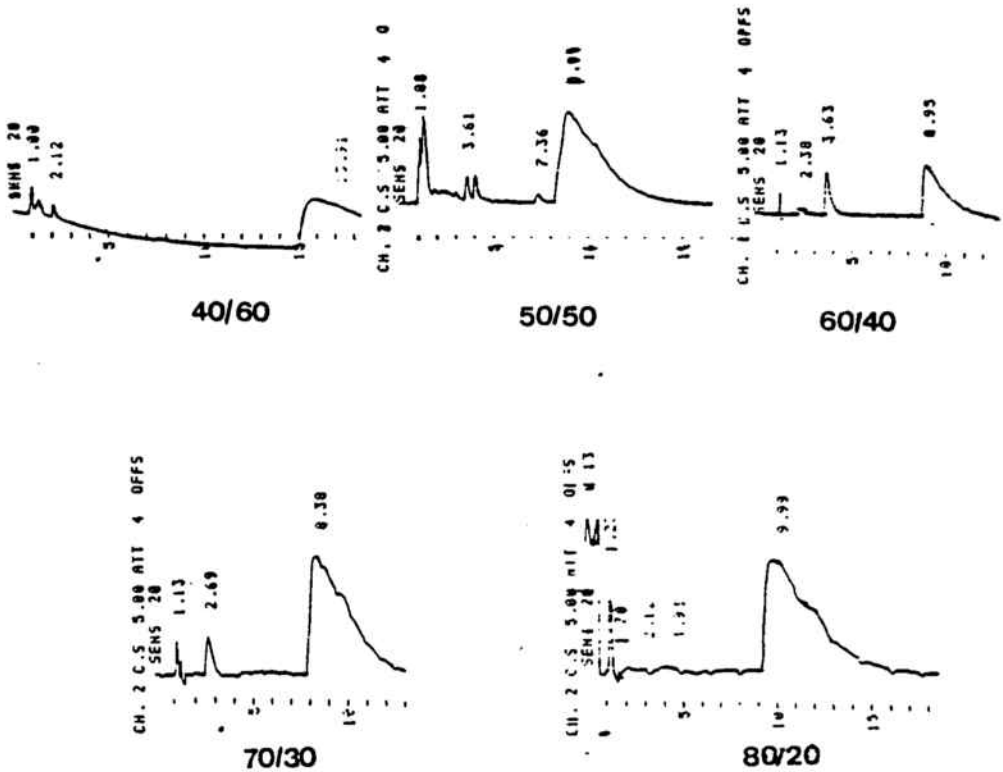


Figura 29.- Registres de HPLC de la Meperidina HCl. Elució a diferents proporcions de ACN/AcNa⁺(0'1%), pH:4.

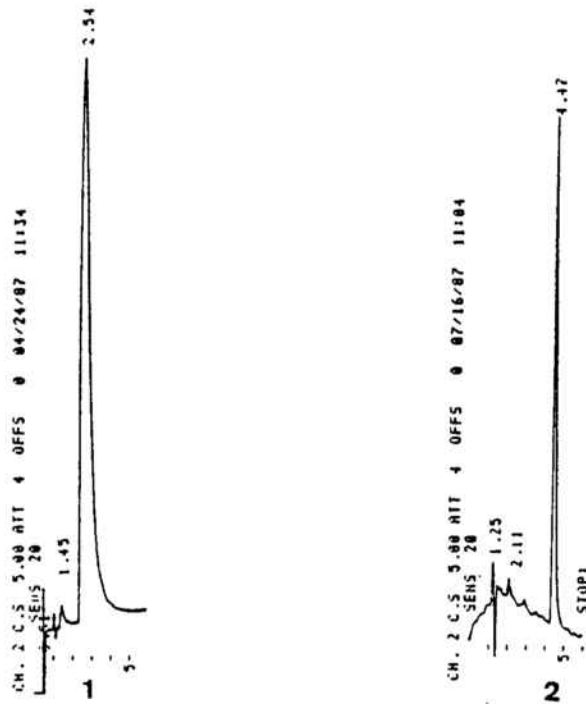


Figura 30.- Registres de HPLC de: 1) Meperidina HCl i, 2) Metadona HCl. Elució amb ACN/KH₂PO₄, pH: 3, (1) 70/30 i (2) 60/40 respectivament.

PRINCIPI ACTIU	ACN/KH ₂ PO ₄ (0'1%)-H ₃ PO ₄	t'r	K
Meperidina	70/30	2'03	4'06
Metadona	60/40	3'22	2'57

Taula 9.- Condicions d'elució i característiques cromatogràfiques de la Meperidina i Metadona.

RESULTATS I DISCUSSIO

Vam considerar el límit de detecció inferior per una solució valorada per HPLC aquell que presentava el llindar més baix en la reproduïbilitat d'integració de, al menys, tres aplicacions consecutives. Cal dir que aquest límit es pot dividir en un referit a la vessant qualitativa i un altre a la quantitativa doncs hi ha pics que es veuen però no són integrables.

En la taula 10 s'indica el límit de detecció per a cada fàrmac.

PRINCIPI ACTIU	Límit inferior de detecció (concentració: μM)
Morfina	10
Naloxona	20
Etilmorfina	40
Meperidina	125
Metadona	140
Codeïna	25
Leu-Encefalina	30
Levamisol	5
Tiofanat	2

Taula 10.- Límit de detecció quantitativ inferior determinat per HPLC (segons les condicions òptimes) per a cadascun dels Principis Actius.

Com es pot apreciar, tots els fàrmacs presenten un valor del mateix ordre de concentracions mínimes quantificables excepte la Meperidina i la Metadona per les que és unes 10 vegades superior i només es detecten en concentracions superiors a 100 μM .

4.1.5.- Mesura de la hidrofobicitat.

Atés que la hidrofobicitat de les molècules pot ésser un factor determinant en la seva incorporació en liposomes i la seva permanència en ells una vegada formats, vam creure necessari determinar els coeficients de partició dels opioïds. Una búsqueda bibliogràfica exhaustiva ens posà de manifest la diversitat de condicions i en conseqüència de resultats existents en la manera de determinar els coeficients de partició solvent orgànic/aigua per als opioïds estudiats (Morfina, Naloxona, Codeïna i Meperidina).

Vam optar per treballar amb n-octanol/aigua ja que era el sistema més emprat (Betagieri, G.Y., 1987) si bé a la literatura havíem trobat dades en que s'utilitzava també n-hexà, cloroform, iso-octanol i n-heptà entre d'altres. Es va utilitzar el n-octanol, de naturalesa semipolar, perquè s'ha demostrat que presenta una millor correlació en el repartiment de soluts en models de membrana i en membranes biològiques que els solvents no polars (Collander, R., 1951; Diamond i Katz, 1974). A més a més, el n-octanol ha demostrat ésser un sistema de referència molt útil per a estudis extratermodinàmics en una gran varietat de sistemes (Hansch i Dunn, 1972).

La quantificació de les molècules en la fase aquosa es va fer en primer lloc per lectures de les solucions a U.V. donat que ja disposàvem de les rectes de calibrat. Quan la solució contenia aigua es va poder quantificar perfectament, però quan es tractava d'una solució amortidora, el contingut en principi actiu que quedava en la fase aquosa era tant baix que no es podia quantificar per aquest mètode. Per a solventar-ho es van analitzar les mostres quoses per HPLC, seguint la metodologia que s'havia posat a punt previament.

Els primers experiments fets per triplicat ens posaren de manifest com era de sensible el paràmetre estudiat a una sèrie de condicions de treball com, per exemple, l'agitació. Per tal d'aconseguir les condicions de contacte més íntimes possible. Vam optar per agitar mitjançant un bany d'ultrasons i separar a continuació per centrifugació. No obstant, ens vam trobar amb que els ultrasons produïen una emulsió que no es trencava per centrifugació. Això feia impossible separar la fase orgànica de l'aquosa i valorar per separat ambdues. Així doncs, va ésser necessari agitar manualment. Un altre paràmetre a considerar va ésser el temps d'agitació. Es van fer diferents proves agitant 5, 10, 15 i 20 minuts, i vam concloure que el temps òptim era de 15

minuts.

Un factor molt important és també el pH de la solució aquosa. Fauchère (1985) va demostrar que per a soluts ionitzables (Histidina i Tirosina), el repartiment n-octanol/aigua varia extraordinàriament en funció del pH del medi. Els mateixos autors recomanen no treballar amb àcid o base. En el nostre cas, malgrat aquest suggeriment, vam creure més adequat, per a poder realitzar a posteriori comparacions, el treballar, o bé amb aigua bidestil·lada de pH:5'5 quan surt del destil·lador, en que es posen de manifest les característiques de pKa de les molècules estudiades o bé amb la mateixa solució amortidora amb què després es prepararen els liposomes. Un factor que fou necessari fixar fou la relació de volums n-octanol/aigua i la concentració inicial dels principis actius en la fase aquosa. En aquest cas, seguint les dades de la literatura, vam optar per volums iguals i solucions inicials 0'2 mM.

Un altre factor molt important i no citat a la bibliografia va ésser, en el nostre cas, la presència de traces de lípids adherides a la superfície dels recipients de vidre emprats en la part experimental, que influïa en que els triplicats no concordessin entre ells. Això ens va obligar a rentar previament a l'assaig, tot l'instrumental amb barreja cròmica.

El resultat obtinguts venen representats en la taula 11. Totes les mostres es van preparar per sextuplicat.

FARMAC	a) P OCTANOL/AIGUA	b) P OCTANOL/SOL. AMORTIDORA
Morfina	-1'915	0'128
Naloxona	-1'121	0'170
Meperidina	-0'912	0'181
Codeïna HCl	-0'280	0'188
Codeïna Base L.	0'274	0'398

Taula 11.- Valors d'hidrofobicitat calculats en un sistema: a) Octanol/aigua i, b) Octanol/Solució amortidora de fosfats pH: 7'4.

RESULTATS I DISCUSSIO

Val a dir com a matís, que d'acord amb la publicació de Fauchère, la paraula coeficient de partició o $\log P$ és aplicable a molècules sense càrrega neta mentre que per les que en tenen s'hauria de parlar de coeficient de distribució o $\log D$. No obstant, en el nostre cas i seguint les dades de la bibliografia per a opioïds, hem optat per emprar $\log P$.

Un valor de $\log P$ negatiu suposa una afinitat més elevada per la fase aquosa i per tant, una naturalesa hidròfila. Pel contrari, com més positiu és aquest paràmetre, més hidròfob és el principi actiu.

Quan es treballa amb una solució amortidora de fosfats pH: 7'4, els valors són molt més semblants entre si que no pas quan s'empra aigua. Això és coherent i lògic si es considera que en el primer cas els principis actius estan poc ionitzats i el seu estat entre ells és més similar. No obstant, tots presenten, encara que no d'una forma molt acusada, una certa afinitat per la fase aquosa. Al treballar amb aigua els valors de P són bastant diferents tot i que segueixen el mateix ordre que en el cas anterior. Potser és correcte pensar que per a conèixer la hidrofobicitat d'una molècula aïllada és millor treballar en un sistema octanol/aigua i, per a extrapolar-ho a nivell de membrana biològica, fer-ho en un sistema octanol/solució amortidora.

De tots els fàrmacs, la Morfina sembla ésser la més hidròfila doncs presenta els valors més baixos de P . En l'altre extrem es troba la Codeïna base lliure.

Paral·lelament a aquest mètode, la tècnica de HPLC en si mateixa proporciona una informació addicional sobre la hidrofobicitat. Si es té en compte l'estructura química del farciment, es pot comprendre que durant el procés cromatogràfic també s'està produint un repartiment continu entre una fase aquosa (mòbil) i una fase orgànica (estacionària). Així doncs a fi de complementar aquest estudi, es va dissenyar un experiment en el qual les molècules eren cromatografiades les mateixes condicions d'elució a fi de determinar diferències entre temps de retenció que poguessin ésser comparables als valors de P calculats anteriorment. En aquest cas es van escollir unes condicions en que tots els principis actius tenien un temps de retenció viables, encara que els cromatogrames no fossin els òptims per a cada una d'elles. Es van punxar els principis actius a les mateixes condicions. Fase estacionària: columna Spherisorb (ODS-2) de 5 μm de tamany de partícula. Fase mòbil: ACN/ACNH₄, pH: 5'4, (60/40), :254

nm, flux 1 ml/min i a temperatura ambient.

En la taula 12 es representen els paràmetres característics per a cadascun. En aquest cas, com més elevat és el valor de K i de t'_r , més afinitat té el fàrmac per la fase estacionària i per tant, més hidròfob és.

PRINCIPI ACTIU	t'_r	K
Morfina	2'10	2'44
Naloxona	2'01	1'97
Meperidina	10'43	9'19
Codeïna HCl	3'29	3'22
Codeïna base lliure	3'17	3'17

Taula 12.-Característiques cromatogràfiques dels principis actius. Elució: ACN/AcNH₄⁺-AcOH, pH: 5'4 (60/40).

Segons aquesta taula, tots els valors són bastant semblants excepte per la Meperidina que queda molt més retinguda. Aquests números són comparables als calculats en el sistema octanol/solució amortidora i guarden una certa correlació, excepte com ja s'ha indicat, per la Meperidina.

Analitzant l'estructura química d'aquesta molècula i comparant-lo amb la de les restants hom troba que hi ha una diferència notable d'estructures (Fig.9). Essent la molècula de Meperidina molt menys rígida es pot suposar que li és més fàcil intercalar-se o interposar-se entre les cadenes octadecíliques del farciment i quedar-hi més retinguda, mentre que les altres al posseir una estructura cíclica molt més rígida i voluminosa han d'interaccionar menys per impediments estèrics amb el farciment i eluir amb temps de retenció menors.

Aquestes diferències d'interacció quedarien anulades en el sistema n-octanol/aigua donada la fluidesa del mitjà orgànic amb què interacciona.

Tot això planteja la relativitat dels mètodes de determinació de la hidrofobicitat i la validesa de la seva extrapolació als sistemes biològics reals.

4.2.-CARACTERITZACIO DELS FOSFOLIPIDS

4.2.1.- Purificació de la Fosfatidilcolina

Es va seguir el procediment indicat en l'apartat 3.2.2.1. de mètodes. Es va fer per a dos tipus de lecitines de dues cases comercials diferents: Merck i Lucas Meyer. En tots els casos es va partir de 3 g de PC impura. El rendiment va ésser d'un 43% per la primera i d'un 39% per la segona.

El rendiment no va ésser gaire gran però no és d'estranyar si es considera que ambdues mostres eren crus de lecitines d'ou sense purificar.

La puresa de totes les mostres es va comprovar per TLC i HPLC.

En quan a la diferència d'aspecte entre la PC abans i després de la purificació cal destacar el color. La de partida presentava un color marron fosc degut sobretot a la presència de carotenoids, mentre que la purificada era practicament blanca.

El control de puresa dels fosfolípids de partida és imprescindible si posteriorment es pretén fer comparacions d'encapsulació i estabilitat doncs els resultats obtinguts depenen molt de la composició lipídica dels liposomes i la presència de petites proporcions d'altres fosfolípids pot alterar-los.

4.2.2.- Control de puresa per cromatografia en capa fina (TLC).

Es van controlar per aquesta tècnica tots els lípids fets servir per aquest treball experimental: PC sense purificar, PC purificada, colesterol, PS i DPPC. En el cas de la PC vam considerar oportú fer una anàlisi abans i després del procés de purificació per assegurar-nos de l'eficàcia de tal assaig i per a decidir quina de les dues lecitines de partida era millor.

La PC Merck purificada, DPPC, PS i colesterol presentaren una sola taca. La PC Lucas Meyer purificada en tenia varies el que ens va fer decidir per emprar la primera pels nostres assajos.

En la taula 13 es presenten els valor de Rf trobats per totes les mostres pures.

LIPID	Rf
Colesterol	0'77
DPPC	0'17
PC (Merck) (purificada)	0'36
PS	0'17

Taula 13.- Rf pels lípids. Elució: $\text{Cl}_3\text{CH}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{OH}$ (65/25/4). Revelat: 1) Vaporització: HClO_4 i, 2) Carbonització.

4.2.3.- Control de peròxids.

En la fig.31 es presenta un registre de dues solucions clorofòrmiques (10 mM) fetes a partir d'un mateix lot de PC purificada i conservat a 4°. L'única diferència entre la PC d'una i altra solució està en que la corresponent a la línia discontinua es va mantenir sota atmosfera de nitrogen i l'altra no.

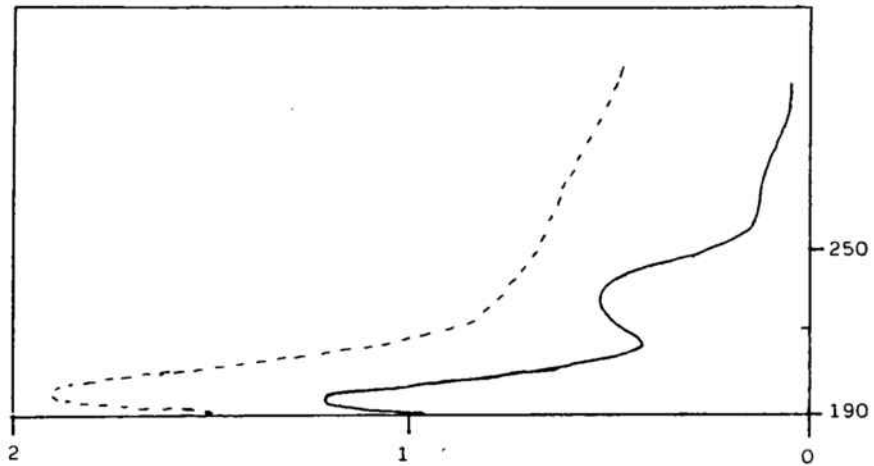


Figura 31.- Registres d'una escombrat espectrefotomètric de U.V. de dues solucions clorofòrmiques (10 mM) de PC d'ou purificada:

- Mantinguda sota atmosfera d'aire
- - - Mantinguda sota atmosfera de N_2

La PC no tractada amb N₂ presenta una banda entre 220 i 250 nm que indica que ha sofert oxidació (Klein, R.A., 1970) mentre que la mantinguda sota atmosfera de N₂ no. D'ací es dedueix la importància en la conservació de la PC i en el seu posterior maneig de l'absència de qualsevol traça de O₂ i per tant la necessitat de tractar-la sempre sota atmosfera de N₂.

4.2.4.-Control de puresa per HPLC.

L'anàlisi qualitativa i semiquantitativa de fosfolípids és laboriosa atesa la necessitat prèvia de separar les diferents espècies entre elles PS, PC, PE, PI. No obstant, si es vol estudiar la influència de la composició en l'encapsulació i estabilitat, és imprescindible estar segurs dels components lipídics i de les seves proporcions. La cromatografia en capa fina dóna bons resultats pel que a composició qualitativa es refereix, però la quantificació és molt més problemàtica. La cromatografia líquida d'alta resolució és un sistema molt adient per a treballar amb mostres de les que se'n disposa en poca quantitat, però segons quins substractes presenten problemes de separació. A la literatura hi ha distintes metodologies per a analitzar fosfolípids treballant amb tres components amb gradient (Ostro, M., 1983), però en el nostre cas això era impossible per no disposar d'aquest tipus de bombes. No obstant, vam trobar unes condicions en que s'elueix amb una barreja de quatre components però en règim isocràtic i aquest va ésser el mètode que vam aplicar (Bahrani, S., 1987).

Es van preparar solucions clorofòrmiques de 1 mg/ml de PC purificada i sense purificar. Es van fer punxades de 20 µl. En les figures 32 i 33 es mostren els registres per a cada tipus de PC.

Com es pot apreciar, la banda al voltant de 3 minuts és deguda al front del solvent atés que s'està llegint a 205 nm. La PC impura conté una proporció elevada de PS que s'elueix primer essent el temps de retenció de la PC entre 9 i 10 minuts. Això es pot comprovar en el cromatograma de la figura 33.

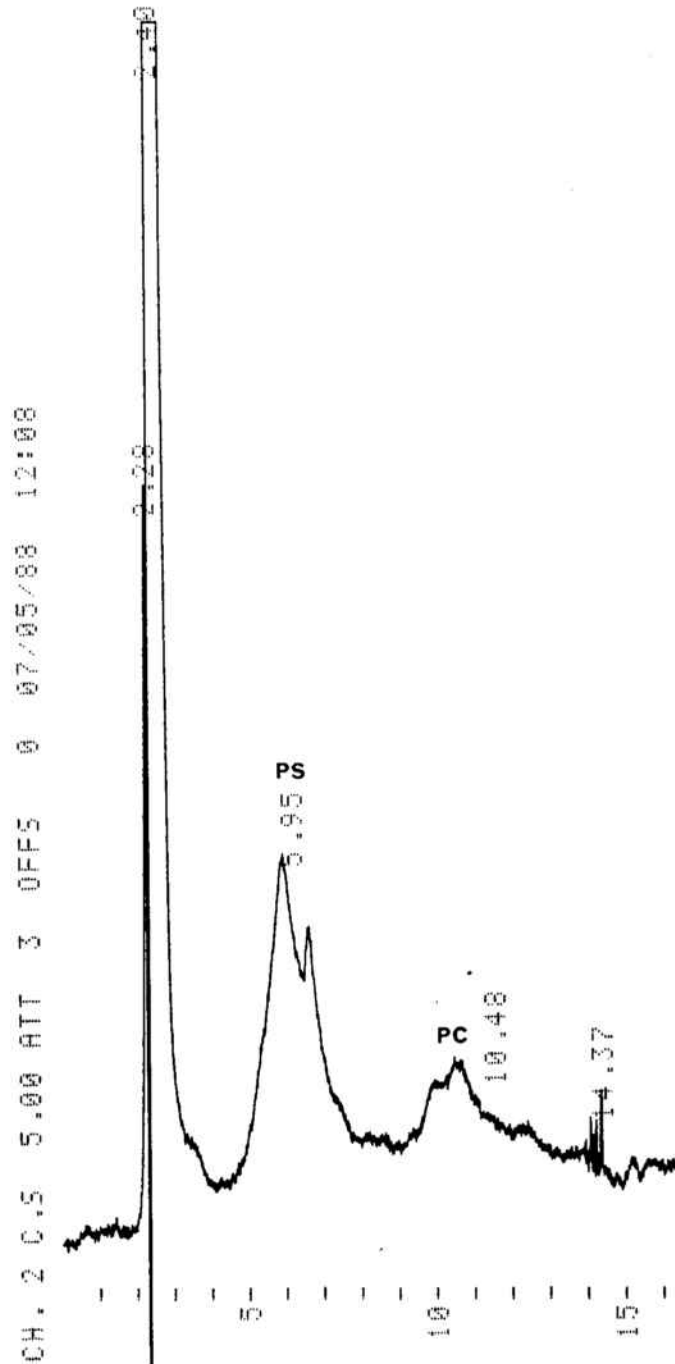


Figura 32.- Registre de HPLC per la PC impura. T_R : 5'95 correspon a la PS i T_R : 10'48 a la PC.

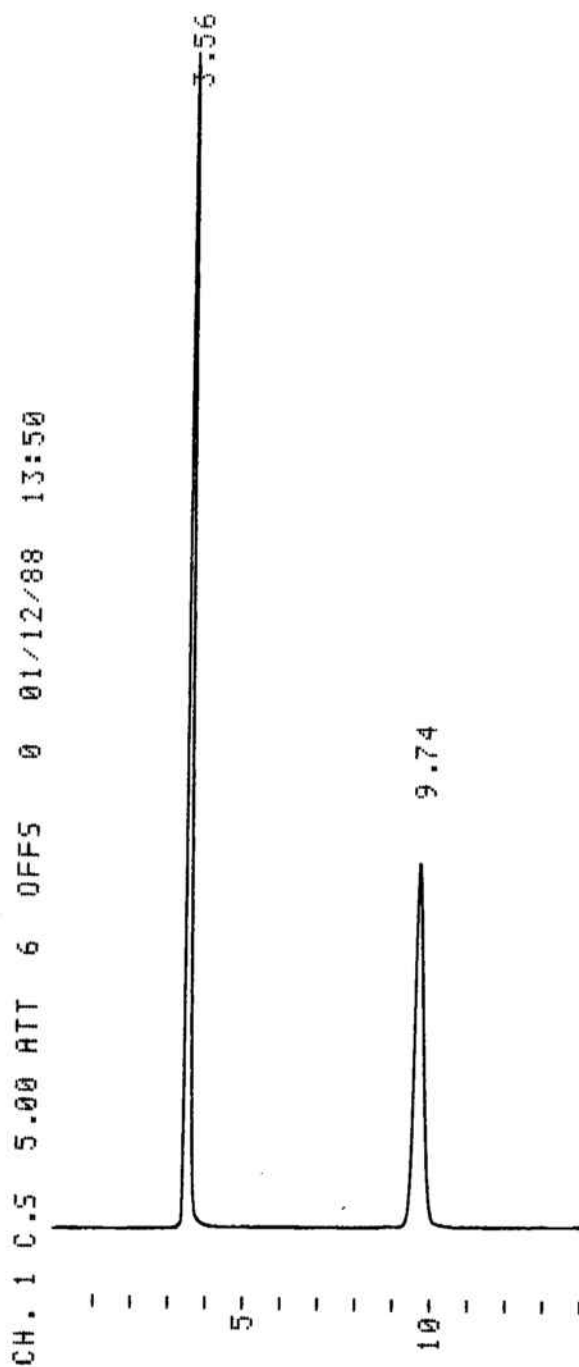


Figura 33.- Registre de HPLC per la PC purificada.

4.2.5.- Determinació quantitativa del fòsfor.

Donat que la PC purificada per nosaltres estava constituïda per una barreja de molècules que, poseint el mateix terminal polar, tenien la resta glicerol acilada per diferents àcids grassos (Figura 2), no era possible des d'un punt de vista químic parlar de pes molecular sino tan sols de per molecular promig. Era necessari saber aquest valor perquè, durant la preparació de liposomes, s'han de mantenir les proporcions lipídiques constants sobretot si es considera que es treballava amb diferents lots de PC.

Seguint el mètode analític descrit en el punt 3.2.2.5 de materials i mètodes es va trobar un PM mig per la PC de 745.

En la figura 34 es representa la recta de calibració de fosfat inorgànic a partir de la què es va calcular el PM de la PC.

Els coeficients de correlació van ésser de l'ordre de 0'999.

Aquesta anàlisi es va aplicar a la valoració de la possible pèrdua de fosfolípids durant el procés de rentat i centrifugació dels liposomes.

RECTA DE CALIBRACIO DE FOSFAT INORGANIC

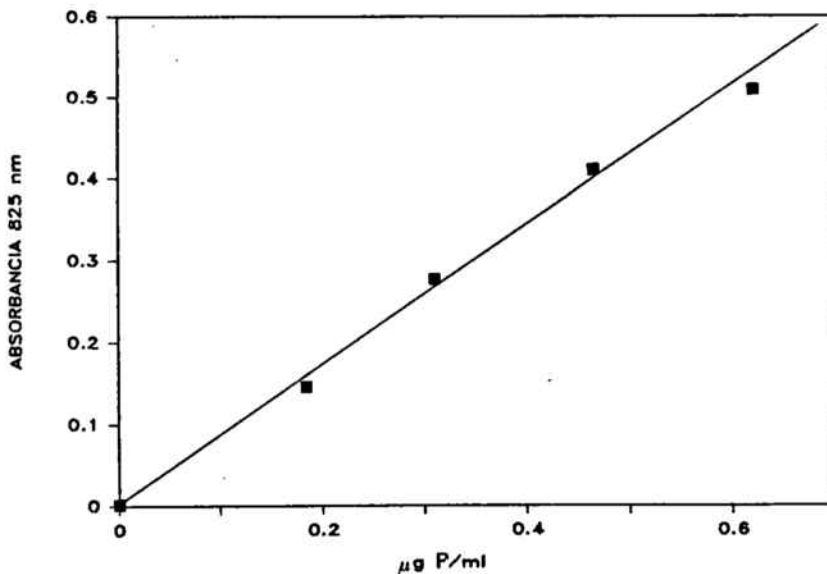


Figura 34.- Recta de Calibració de Fosfat inorgànic.

4.3.-CAPACITAT D'ENCAPSULACIO DELS LIPOSOMES

4.3.1.-LIPOSOMES MULTILAMINARS

Es van preparar dos lots de MLV variant la composició lipídica: PC i PC/COL (1/0'3) encapsulant dos tipus de fàrmacs un hidrosoluble, la Morfina HCl, i un altre de liposoluble, el Tiofanat.

Els liposomes multilaminars són molt eficients quan es tracta d'encapsular molècules insolubles o poc solubles en aigua. En aquest cas, la composició lipídica és quasibé l'únic factor que influeix en l'eficàcia d'encapsulació.

Pel Tiofanat els resultats van ésser molt bons com era d'esperar. Vam preparar per triplicat dos lots de cada tipus de composició lipídica. Un el vam sotmetre a centrifugació i l'altre no per tal de comprovar que tot el Tiofanat quedava entre les bicapes lipídiques donat que té més afinitat per aquest que no pas per la fase aquosa. Així, el procediment d'obtenció seria molt simple al no necessitar el pas de la centrifugació per a separar el fàrmac lliure no encapsulat dels liposomes.

En la taula 14 s'indica el percentatge d'encapsulació pel lot de MLV sotmesos a centrifugació.

COMPOSICIO LIPIDICA	% ENCAPSULACIO
PC	97'00 ± 0'54
PC/COL	97'79 ± 0'66

Taula 14.- Percentatge d'encapsulació de MLV de Tiofanat en funció de la composició lipídica sotmesos a centrifugació.

Tal com era d'esperar, no es van detectar quantitats de Tiofanat superiors a un 2'5% en el primer sobrenedant i d'un 0'4% en el segon.

Com es pot comprovar degut a la insolubilitat de la molècula en presència d'aigua, el compost es situa quasibé exclusivament en les bicapes lipídiques i per això la presència de colesterol no afecta el percentatge d'incorporació en els liposomes.

RESULTATS I DISCUSSIO

En canvi, per a molècules hidrosolubles, cal considerar el procés d'obtenció dels liposomes de manera que encapsulin el màxim possible de producte i es fa necessària la introducció de colesterol perquè siguin més estables una vegada formats. Per això, en el cas de la Morfina es van fer per triplicat dos lots de cada tipus de composició lipídica un s'hidratà agitant suaument amb la solució de morfina a encapsular durant 2 h i l'altre durant 48 h, en ambdós casos a temperatura ambient. Després es van centrifugar tal com s'ha indicat en l'apartat 3.2.3.1. de mètodes.

En la taula 15 es mostren els percentatges d'encapsulació de fàrmac respecte la quantitat inicial per la Morfina en funció de la composició lipídica i del temps d'hidratació.

COMPOSICIO LIPIDICA	% ENCAPSULACIO	
	2 h HIDRATACIO	48h HIDRATACIO
PC	1'02 ± 0'02	2'29 ± 0'03
PC/COL	0'67 ± 0'01	1'27 ± 0'02

Taula 15.- Percentatge d'encapsulació de Morfina en MLV HCl en funció de la composició lipídica i del temps d'hidratació.

D'aquesta taula es dedueix que l'encapsulació es veu lleugerament incrementada al l'augmentar el temps d'hidratació, però tot i així, els valors són molt baixos. Per assegurar-nos de que no hi havia hagut pèrdues per error experimental, es van valorar els sobrenedants quins valors s'indiquen en la taula 16.

COMPOSICIO LIPIDICA	QUANTITAT DE MORFINA (mg)					
	2 h hidratació			48 h hidratació		
	S.1	S.2	S.3	S.1	S.2	S.3
PC	0'81	0'07	0'02	0'79	0'06	0'02
PC/COL	0'80	0'09	0'02	0'89	0'08	0'01

Taula 16.- Contingut de Morfina HCl (mg) en els sobrenedants obtinguts per centrifugació de MLV.

Donat el baix percentatge d'encapsulació, vam considerar que no valia la pena, malgrat la senzillesa del mètode, emprar aquesta tècnica per a cap altra fàrmac hidrosoluble sino que vam optar per obtenir els liposomes per un altre mètode que proporcionés un volum intern més gran tal com s'indica en els apartats següents.

4.3.2.-LIPOSOMES UNILAMINARS PETITS

Es van preparar SUV de PC amb Morfina HCl, Naloxona HCl, Meperidina HCl, Codeïna HCl i Etilmorfina HCl.

Durant el procés de cromatografia sobre gel filtració en Sepharosa Cl 4B, es van recollir 40 fraccions de 1'5 ml, essent el flux d'elució de 32 ml/h. El volum total d'elució fou de 60 ml (temps total de 6 h).

En les figures 35 i 36 es representen els registres resultants de tal procés per la Morfina i Meperidina respectivament. Ambdós presenten 3 pics tal com es descriu a la bibliografia (Wilschut, J. 1982). El primer correspon als MLV residuals que no s'han convertit en SUV al sonicar i que surten amb el volum d'exclusió, entre els tubs 36 i 47 (aproximadament 11 ml). El segon, tubs 55 a 70 (\approx 22 ml) pertany a la població de SUV amb el principi actiu encapsulat. Finalment i molt més tard, tubs 100 a 120 (\approx 30 ml), s'elueix el fàrmac no encapsulat.

Es va intentar determinar per cromatografia en capa fina si en liposomes hi havia producte encapsulat però només es va detectar la PC en les fraccions de MLV i SUV i el principi actiu no encapsulat. Probablement el mètode era massa poc sensible per a saber si s'havia produït encapsulació.

A la vista d'aquest resultat negatiu, es van recollir les fraccions de SUV (\approx 22 ml) que en teoria havien de contenir el fàrmac encapsulat i es va valorar per HPLC. Al t'r no va sortir cap pic. Si suposéssim un 100% d'encapsulació, el ml sotmés a cromatografia sobre gel filtració i que contindria 1 mg de principi actiu es veuria diluït unes 20 vegades (volum de SUV recollit: 22 ml) i per tant la concentració en tal fàrmac de la fracció de SUV seria aproximadament 133 μ M, fàcilment detectable per HPLC. Però si el percentatge d'encapsulació fós del 5% (valors descrits en la bibliografia per aquest tipus de liposomes) la concentració del fàrmac seria 6'65 μ M i en aquest cas ja estariem per sota de la quantitat detectable. En tots els

RESULTATS I DISCUSSIO

registres a més a més, el pic corresponent al principi actiu lliure no encapsulat, és molt gran i per tant cal pensar que el % d'encapsulació és molt baix i està per sota del límit de detecció per HPLC, o és nul en tots els casos.

Per assegurar-nos de que el darrer pic corresponia al del fàrmac no encapsulat es va eluir una solució estandar de cada fàrmac a una concentració similar a l'emprada alhora de fer els liposomes i els volums de retenció van coincidir plenament.

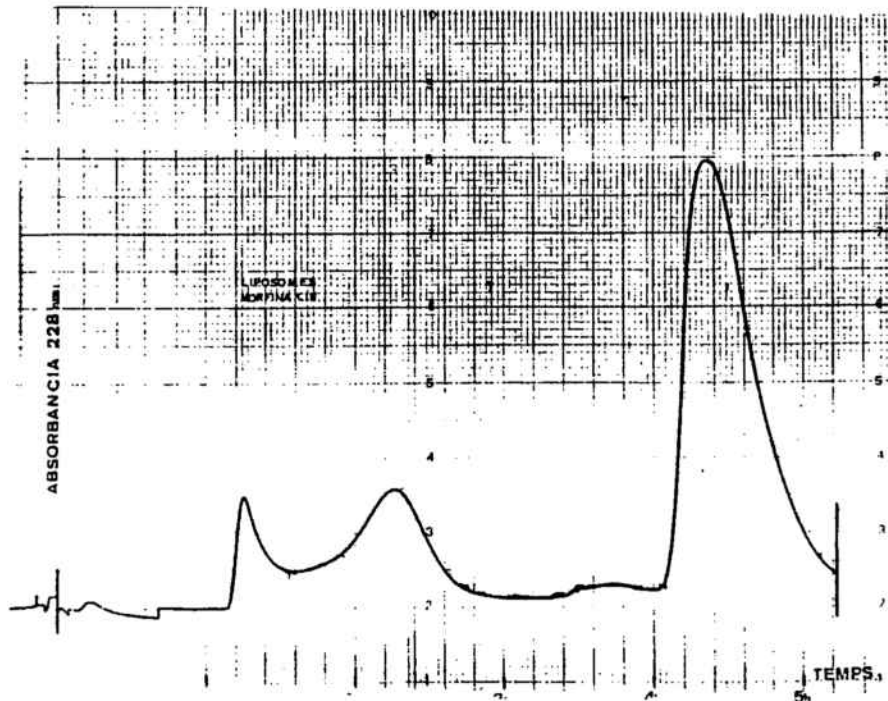


Figura 35.- Registre d'una cromatografia sobre gel filtració de SUV de Morfina HCl. Elució: PBS pH:7'4, Flux: 32 ml/h. Lectura U.V. a 228 nm.



Figura 36.- Registre d'una cromatografia sobre gel filtració de SUV de Meperidina HCl. Elució PBS, pH: 7'4, Flux: 32 ml/h. Lectura U.V. a 228 nm.

Així doncs, es pot dir que cap dels cinc principis actius encapsulats s'incorpora en quantitats detectables als SUV en les condicions estandar de treball.

4.3.3.- LIPOSOMES OBTINGUTS PER DESHIDRATAÇIO I
REHIDRATAÇIO (DRV)

4.3.3.1-DRV NO SONICATS

Es van preparar DRV de PC, PC/COL (1/0'3) i PC/COL/PS (1/0'3/0'16) de Morfina HCl, Naloxona HCl, Meperidina HCl, Metadona HCl, Codeïna HCl, Codeïna base lliure i Levamisol HCl. En la taula 17 es representen els percentatges d'encapsulació per a tots els fàrmacs en DRV de PC i PC/COL.

FARMAC	% ENCAPSULACIO	
	PC	PC/COL
Morfina HCl	4'23 ± 0'76	22'00 ± 0'18
Naloxona HCl	6'10 ± 0'56	15'70 ± 0'04
Etilmorfina	5'34 ± 0'33	12'44 ± 0'08
Meperidina HCl	3'05 ± 0'28	15'55 ± 0'20
Metadona HCl	4'12 ± 0'48	3'22 ± 0'12
Codeïna HCl	11'41 ± 0'88	11'75 ± 0'02
Codeïna base L.	0'30 ± 0'09	4'89 ± 0'01
Levamisol HCl	5'10 ± 0'46	7'20 ± 0'02

Taula 17.- Percentatge d'encapsulació en DRV sonicats en funció de la composició lipídica.

Per tal d'assegurar-nos de que els liposomes estaven lliures de qualsevol traça de material no encapsulat, es van valorar els sobrenedants de tots els lots. En la taula 18 s'indiquen els valors en mg pels DRV de Morfina HCl, Naloxona HCl, Meperidina HCl, Codeïna HCl i Codeïna base lliure.

FARMAC	DRV	Sobrenedant 1	Sobrenedant 2	Sobrenedant 3
Morfina	0'042	0'802	0'059	0'020
Naloxona	0'061	0'790	0'046	0'035
Meperidina	0'030	0'740	0'090	0'037
Codeïna HCl	0'110	0'588	0'140	0'071
Codeïna B.	0'003	0'820	0'053	0'008

Taula 18.- Contingut de Principi actiu (mg) en DRV de PC i en els sobrenedants (1 mg inicial).

RESULTATS I DISCUSSIO

En tots els casos la mostra que presenta més quantitat de principi actiu és el primer sobrenedant el que fa preveure a priori el baix percentatge d'encapsulació. Com és lògic, els següents sobrenedants van anar tenint menys contingut en fàrmac cosa que assegura l'efectivitat del mètode de rentat. No obstant, les diferències en contingut entre el tercer rentat i els liposomes són en alguns casos tan petites que no es pot afirmar que s'hagi produït encapsulació.

Pels DRV de PC/COL també s'ha seguit el mateix procediment de comprovació indicant-se en la Taula 19 els valors en mg pels mateixos fàrmacs.

FARMAC	DRV	Sobrenedant 1	Sobrenedant 2	Sobrenedant 3
Morfina	0'220	0'646	0'078	0'032
Naloxona	0'157	0'730	0'017	0'006
Meperidina	0'155	0'608	0'180	0'017
Codeïna HCl	0'117	0'578	0'198	0'078
Codeïna B.	0'048	0'609	0'189	0'083

Taula 19.- Contingut en mg de Principi actiu en DRV de PC/COL (1 mg inicial de fàrmac).

En aquest cas, excepte per la Codeïna base lliure, el percentatge d'encapsulació és més elevat essent notable la diferència de contingut de principi actiu entre el 3er sobrenedant i els DRV el que ens confirma que està realment encapsulat.

La introducció de PS en petit percentatge en els liposomes va crear problemes perquè els DRV no sonicats de PC/COL/PS no es van centrifugar bé, és a dir, no es produïa separació entre el material encapsulat i els liposomes tot i que es van modificar les condicions de centrifugació (aquesta es va fer a temperatura ambient i a 4°, a 1700 x g i 30.000 x g sense aconseguir cap millora). Per això vam optar per sotmetre'ls a una diàlisi en front a PBS, pH: 7'4.

Es van canviar les aigües de rentat dues vegades a les 5 i 10 hores respectivament. En la taula 20 es mostra el contingut en mg de Morfina HCl, Naloxona HCl i Codeïna HCl en cadascuna de les aigües de rentat així com en el interior del tub de diàlisi que conté els DRV.

FARMAC	mg			% ENCAPSULACIO
	1res Aigües	2nes Aigües	DRV	
Morfina HCl	0'385	0'072	0'073	7'39 ± 0'55
Naloxona HCl	0'630	0'140	0'166	16'60 ± 0'40
Codeïna HCl	0'630	0'138	0'131	13'18 ± 0'60

Taula 20.- mg de fàrmac en DRV de PC/COL/PS no sonicats sotmesos a diàlisi i en les aigües de rentat.

A la vista d'aquests valors ens hem de plantejar si realment hi ha hagut encapsulació doncs el contingut en fàrmac de les 2nes aigües és en totes les mostres quasibé igual que en els DRV. Podria ésser que durant la diàlisi i donat que és un procés bastant lent, s'hagi alliberat principi actiu de l'interior dels liposomes, bé perquè aquests s'hagin trencat o/i degut a un desequilibri entre les pressions osmòtiques de l'interior i exterior de la membrana de diàlisi. Per a evitar aquest segon factor, alhora de fer els liposomes es va fer un control de la força iònica de la solució amortidora (PBS) mesurant la seva conductivitat de forma que fos semblant a la de la dispersió de liposomes. De totes maneres, en el cas de la diàlisi és difícil de controlar la força iònica dels dos medis quan s'han canviat les aigües de rentat més d'una vegada.

4.3.3.2.-DRV SONICATS

Per a millorar els nivells d'encapsulació obtinguts vam optar per treballar amb DRV intercalant en el procés la sonicació. Així, es van preparar DRV de PC, PC/COL (1/0'3) i PC/COL/PS (1/0'3/0'16) encapsulant Morfina HCl, Naloxona HCl, Meperidina HCl, Codeïna HCl, Leu-Encefalina ACOH i Levamisol HCl. En la taula 21 es presenten els valors d'encapsulació calculats per HPLC, agrupats segons la composició lipídica del liposoma.

RESULTATS I DISCUSSIO

FARMAC	% ENCAPSULACIO		
	PC	PC/COL	PC/COL/PS
Morfina HCl	34'80 ± 0'40	29'66 ± 1'32	32'50 ± 0'01
Naloxona HCl	26'77 ± 0'01	45'00 ± 3'97	46'60 ± 6'09
Meperidina HCl	9'46 ± 0'03	9'19 ± 0'05	23'87 ± 0'09
Codeïna HCl	26'51 ± 4'34	16'36 ± 1'07	23'25 ± 0'01
Leu-Encefalina	18'28 ± 1'24	9'19 ± 1'47	36.28 ± 0'09
Levamisol HCl	2'02 ± 0'78	30'73 ± 1'11	60'40 ± 0'30

Taula 21.- Percentatge d'encapsulació de DRV sonicats en funció de la composició lipídica.

Per tal d'assegurar-nos de que els DRV estaven ben centrifugats i que el fàrmac estava realment encapsulat, es van valorar els sobrenedants quins valors pels DRV de PC/COL estan representats en la taula 22.

FARMAC	DRV	SOBRENEDANT 1	SOBRENEDANT 2
Morfina HCl	0'296 ± 0'01	0'620 ± 0'01	0'015 ± 0'01
Naloxona HCl	0'450 ± 0'03	0'501 ± 0'03	0'050 ± 0'02
Meperidina	0'091 ± 0'03	0'780 ± 0'01	0'065 ± 0'01
Codeïna HCl	0'163 ± 0'01	0'745 ± 0'02	0'049 ± 0'02
Leu-Encef.	0'091 ± 0'03	0'655 ± 0'03	0'071 ± 0'03
Levamisol	0'307 ± 0'01	0'600 ± 0'02	0'030 ± 0'01

Taula 22.- Contingut en mg de fàrmac en cadascuna de les mostres obtingudes al fer DRV de PC/COL.

Per a comprovar que el tipus de lípid emprat no influïa en la separació del material encapsulat del lliure es van valorar també, pel cas de la Morfina, els sobrenedants de tots els tipus de DRV tal com s'indica en la taula 23.

COMPOSICIO LIPIDICA	DRV	SOBRENEDANT 1	SOBRENEDANT 2
PC	0'348 ± 0'04	0'512 ± 0'04	0'017 ± 0'02
PC/COL	0'296 ± 0'01	0'620 ± 0'01	0'015 ± 0'03
PC/COL/PS	0'325 ± 0'01	0'590 ± 0'01	0'010 ± 0'02

Taula 23.- Contingut en mg de Morfina en DRV sonicats i sobrenedants segons la composició lipídica dels mateixos.

Segons els resultats de les taules 26 i 27, és evident que el contingut en fàrmac trobat en els liposomes està realment encapsulat i que amb dues centrifugacions és suficient per a rentar els DRV del material no encapsulat.

Respecte a la proporció de PC/COL, si bé en el treball inicial de Gregoriadis es parlava de la relació 1:0'3, estudis posteriors d'altres autors han indicat que es pot arribar a una relació 1:1 i que aquest increment de mols pot resultar beneficiós per a l'estabilitat i el percentatge d'encapsulació. Es per això que per la Morfina es van preparar a més a més, DRV de PC/COL amb una relació molar 1/1 (fins ara era 1/0'3) per a estudiar com influïa en l'encapsulació i comportament dels liposomes tal modificació. El percentatge d'encapsulació va ésser d'un 9'6 % inferior a l'aconseguit amb la relació PC/COL: 1/0'3 (26'66 %).

Com es dedueix dels valors obtinguts, l'augment proporcional de colesterol te un efecte negatiu en aquest cas sobre l'encapsulació. En l'apartat 5.4.1. s'indica quin efecte ha tingut en l'estabilitat.

Així mateix, tal com s'ha esmentat en el punt 3.2.3.3. de l'apartat de Mètodes, per tal de millorar l'encapsulació de Morfina, es van forçar les condicions augmentant la quantitat de cadascun dels components però mantenint la relació molar entre ells (PC/COL/Morfina:1/0'3/0'16), reduint al màxim el volum d'hidratació, augmentant el temps de sonicació a 15 min i sonicant amb una sonda de 20 mm de diàmetre.

En la taula 24 s'indiquen els mg de morfina trobats en cadascuna de les mostres.

MOSTRA	mg
DRV	27'22
Sobrenedant 1	23'22
Sobrenedant 2	1'20

Taula 24.- Contingut en mg de Morfina en sobrenedants i DRV obtinguts modificant les condicions d'hidratació i de sonicació.

El percentatge d'encapsulació fou d'un 51'90 % molt més elevat que l'obtingut d'antuvi (29'66 %). Aquest fet indica la importància de reduir al màxim els volums d'hidratació dels lípids.

4.4.- CARACTERITZACIO DELS LIPOSOMES: MICROSCOPIA
ELECTRONICA.

En la figura 37 es mostra una foto d'una preparació de DRV sonicats sotmesos a la tècnica de tinció negativa amb fosfotungstat sòdic al 1%, pH:7.

Es treballà a 8750 augments i el tamany aproximat dels liposomes fou de 1 a 1'5 μm .

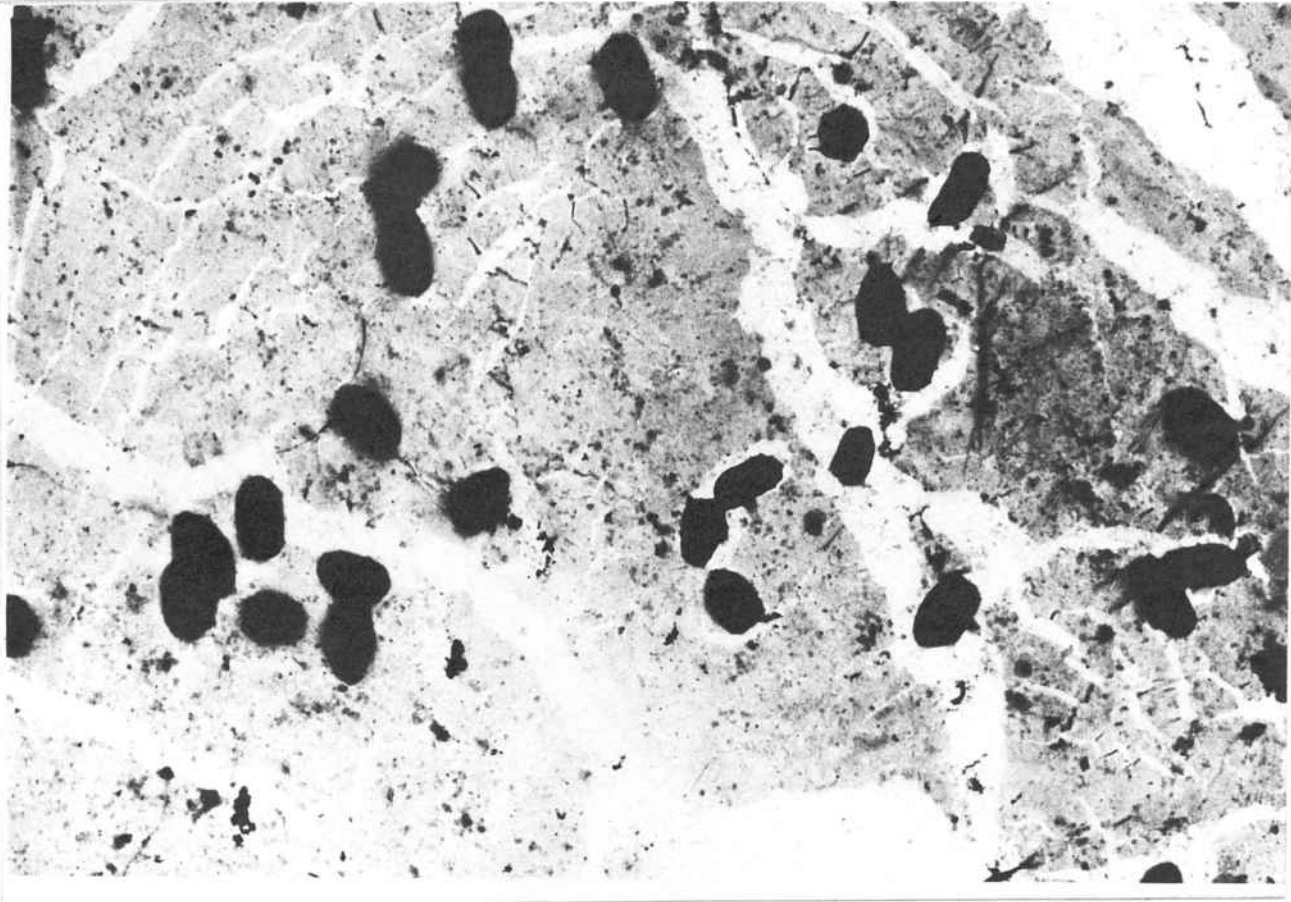


Figura 37.- Fotografia d'una suspensió de liposomes obtinguda per observació al Microscopi Electrònic.

4.5.-FACTORS QUE INFLUEIXEN EN L'ENCAPSULACIO DE PRINCIPIIS ACTIUS.

4.5.1.- INFLUENCIA DEL TIPUS DE LIPOSOMA

A la vista dels resultats indicats en el punt 4.2.3 d'aquest apartat de resultats, és evident que alhora d'aconseguir una capacitat d'encapsulació de principis actius hidrosolubles elevada, el tipus de liposomes a escollir són els DRV amb sonicació prèvia.

En la figura 38 es compara el percentatge d'encapsulació per la Morfina en els diferents tipus de liposomes preparats.

INFLUENCIA DEL TIPUS DE LIPOSOMA

L'ENCAPSULACIO DE FARMACS

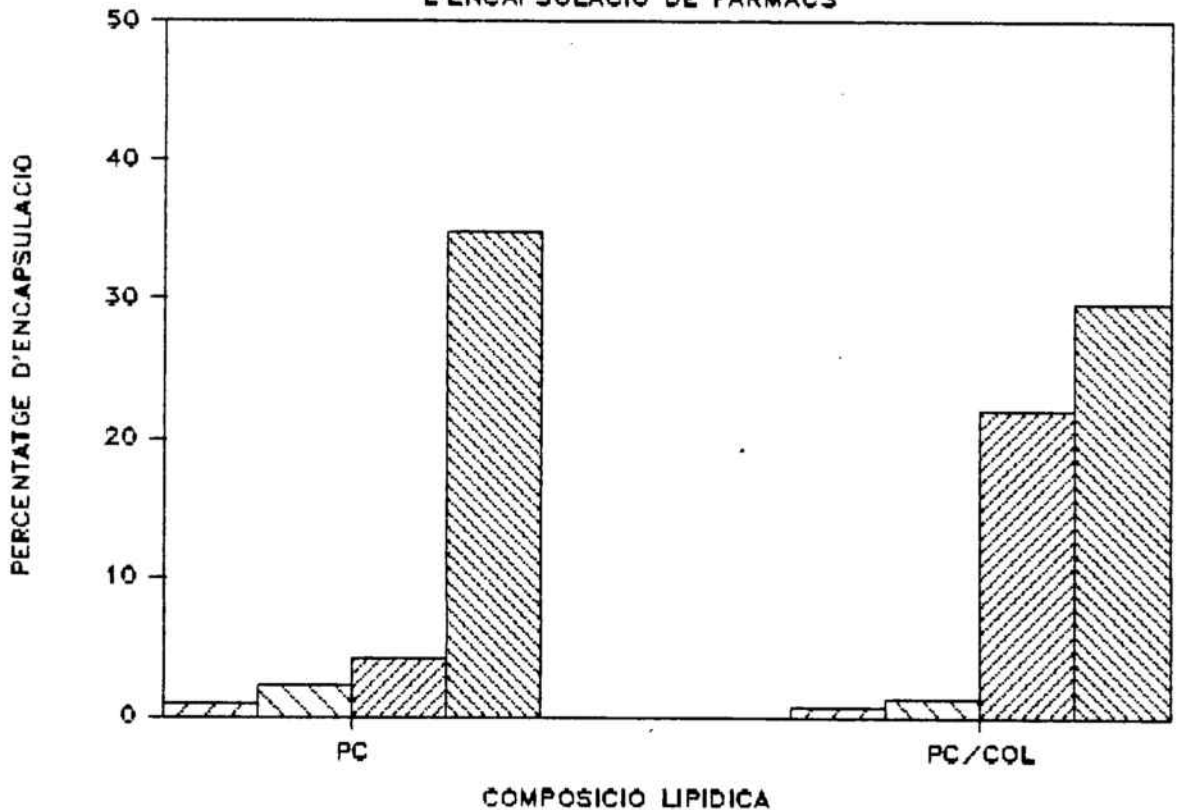


Figura 38.- Influència del tipus de liposoma en l'encapsulació de Morfina HCl. ▨ MLV: 2h hidratació, ▩ MLV 48h hidratació, ▤ DRV no sonicats i ▧ DRV sonicats

El percentatge d'encapsulació dels SUV és molt petit. A més a més, si considerem l'aspecte pràctic, la tècnica que s'ha de seguir per a obtenir-los presenta varis aspectes negatius com són per exemple, la lentitud del procés i el baix rendiment de SUV, així com l'elevat nivell de dilució de les preparacions finals.

En l'elaboració de DRV hi intervenen molts passos el que també suposa una certa lentitud en la seva obtenció, però això es veu compensat per una considerable eficàcia d'encapsulació i perquè se'n poden obtenir en quantitats elevades.

Finalment, cal dir que els MLV són els més adients per a substàncies hidròfobes, com el Tiofanat, ja que queden incorporades entre les bicapes de fosfolípid, pel que tenen més afinitat. Així tot el fàrmac està formant part dels MLV i no cal sotmetrel's a cap tècnica per a eliminar el material no encapsulat com en els casos anteriors que s'ha treballat amb substàncies de naturalesa hidròfila.

4.5.2.- INFLUENCIA DE LA COMPOSICIO LIPIDICA EN L'ENCAPSULACIO

En la figura 39 venen representats, mitjançant un diagrama de barres, els percentatges d'encapsulació de DRV no sonicats per tots els fàrmacs.

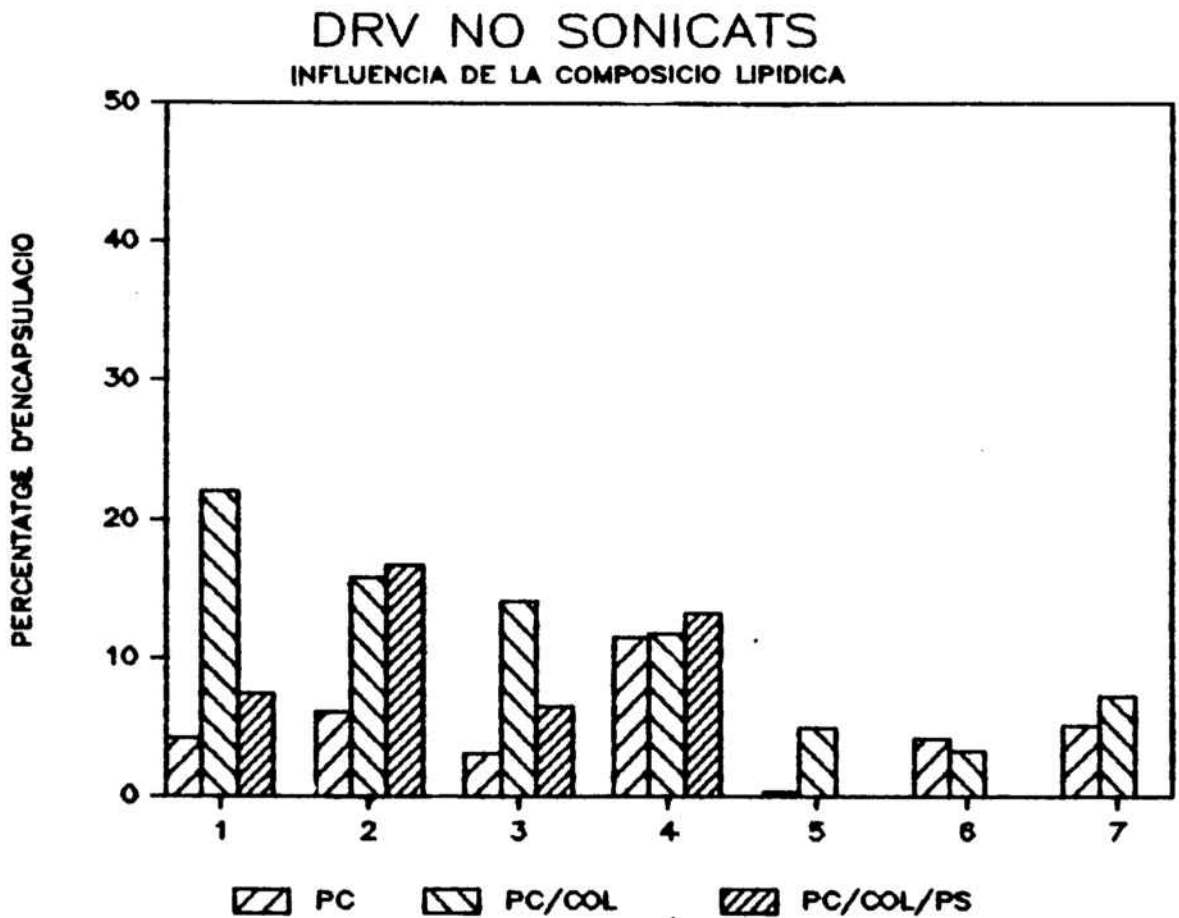


Figura 39.- Influència de la composició lipídica en l'encapsulació de fàrmacs en DRV no sonicats. 1) Morfina HCl, 2) Naloxona HCl, 3) Meperidina HCl, 4) Codeïna HCl, 5) Codeïna Base Lliure, 6) Metadona HCl i, 7) Levamisol HCl.

RESULTATS I DISCUSSIO

Quan la PC és l'únic component lipídic dels liposomes, el percentatge d'encapsulació no sobrepassa el 10% excepte per la Codeïna HCl que és d'un 11'41 %, i és especialment baix en el cas de la Codeïna Base Lliure (0'3 %).

La presència de colesterol sembla tenir un efecte positiu sobretot per la Morfina, Naloxona i Meperidina per les que s'arriba a un 22%, 15'5% i 15'7 respectivament.

Els resultats obtinguts a l'addicionar un 10% de PS, són més dispars, potser influeix el fet de que la separació del material no encapsulat es feu per diàlisi i no per centrifugació com en els casos anteriors. Per la Morfina i Meperidina els valors han davallat de nou encara que no són tan baixos com quan només es treballava amb PC. La Naloxona presenta un % molt similar a l'anterior.

Finalment cal destacar el comportament presentat per la Codeïna HCl quin % d'encapsulació sembla independent de la composició lipídica dels liposomes, donat que en els tres tipus de DRV es va obtenir un valor similar.

L'estudi de l'efecte de PS al 10% en liposomes DRV sonicats es va fer per: Morfina, Naloxona, Codeïna HCl, Meperidina, Levamisol i Leu-Encefalina.

En aquest cas (Fig. 40), els resultats són bastants dispars. La presència de PS eleva el % d'encapsulació d'una forma considerable pel Levamisol (30'73% a 69'40%), Leu-Encefalina (9'19% a 36%) i Meperidina (9'19% a 23'87%). Per la Morfina també augmenta respecte a les altres dues composicions. Per la Codeïna HCl augmenta respecte a la PC/COL però disminueix si ho comparem amb el % que presenta quan l'únic component lipídic és la PC. Finalment cal dir que en el cas de la Naloxona sembla que la presència de COL és un factor important per incrementar el valor en qüestió ja que passa d'un 27% a un 45% i l'addició de PS l'augmenta lleugerament però no de forma significativa.

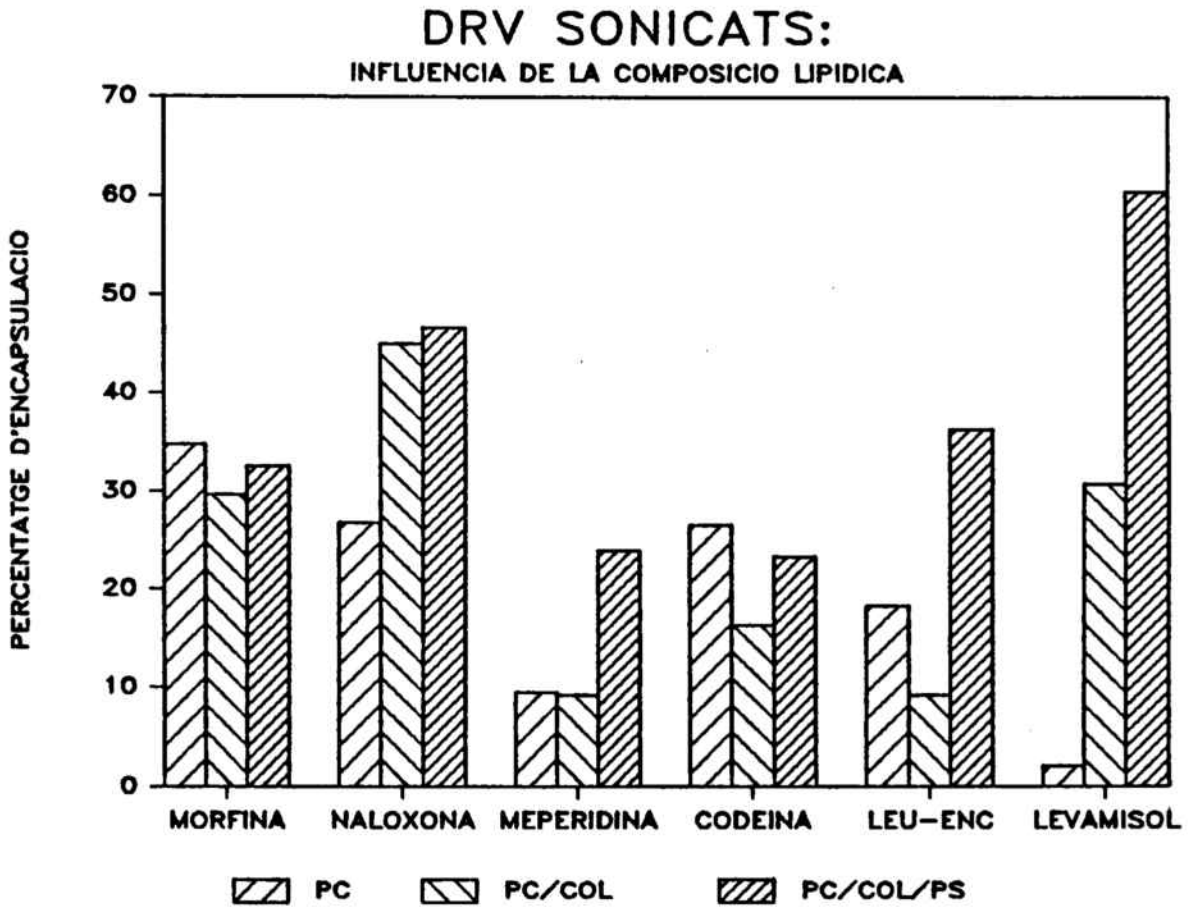


Figura 40.- Influència de la composició lipídica en l'encapsulació de fàrmacs en DRV sonicats.

4.5.3.- INFLUENCIA DEL PROCES DE SONICACIO EN L'ENCAPSULACIO

En la figura 41 s'ha representat mitjançant un diagrama de barres el % d'encapsulació de Morfina HCl, Naloxona HCl, Meperidina HCl i Codeïna HCl en DRV sonicats i no sonicats de PC.

En tots ells, la sonicació augmenta considerablement el percentatge d'encapsulació fet que es fa més palès per la Morfina que passa d'un 5% a un 35%.

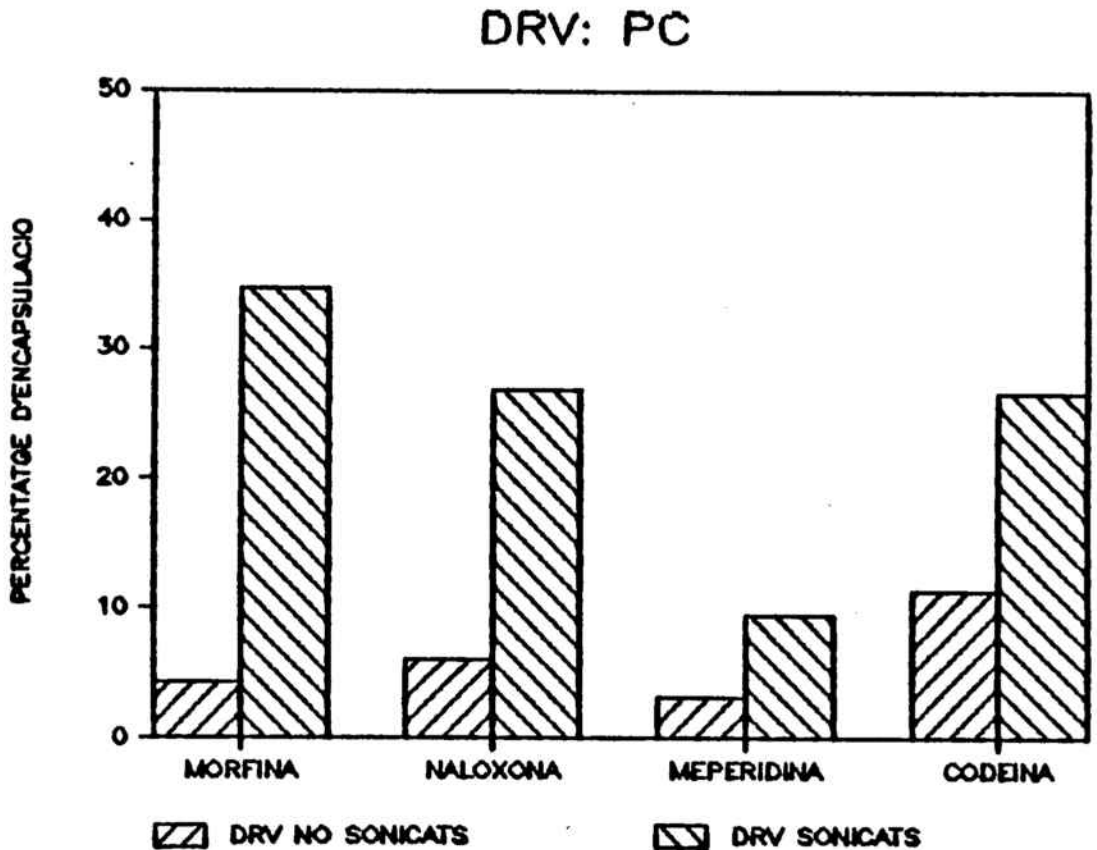


Figura 41.- Influència de la sonicació prèvia en l'encapsulació de fàrmacs en DRV de PC.

L'addició de colesterol (Figura 42) segueix augmentant l'eficàcia d'encapsulació per la Naloxona de forma acusada, aproximadament un 35%, i per la Morfina i Codeïna lleugerament, un 8% i un 5% respectivament, mentre que per la Meperidina davalla una mica.

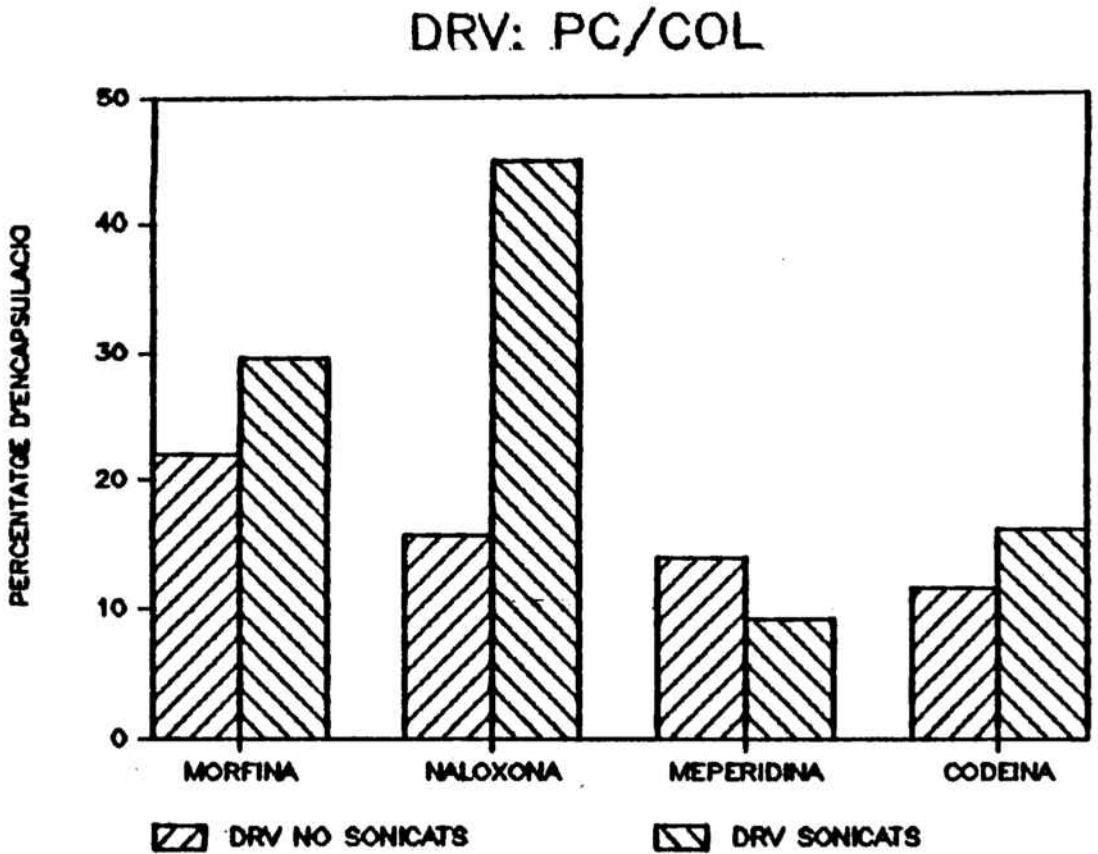


Figura 42.- Influència de la sonicació en l'encapsulació de principis actius en DRV de PC/COL (1/0'3).

Finalment i pel darrer tipus de composició lipídica: PC/COL/PS, per tots els fàrmacs s'observa un increment en l'encapsulació (Figura 43).

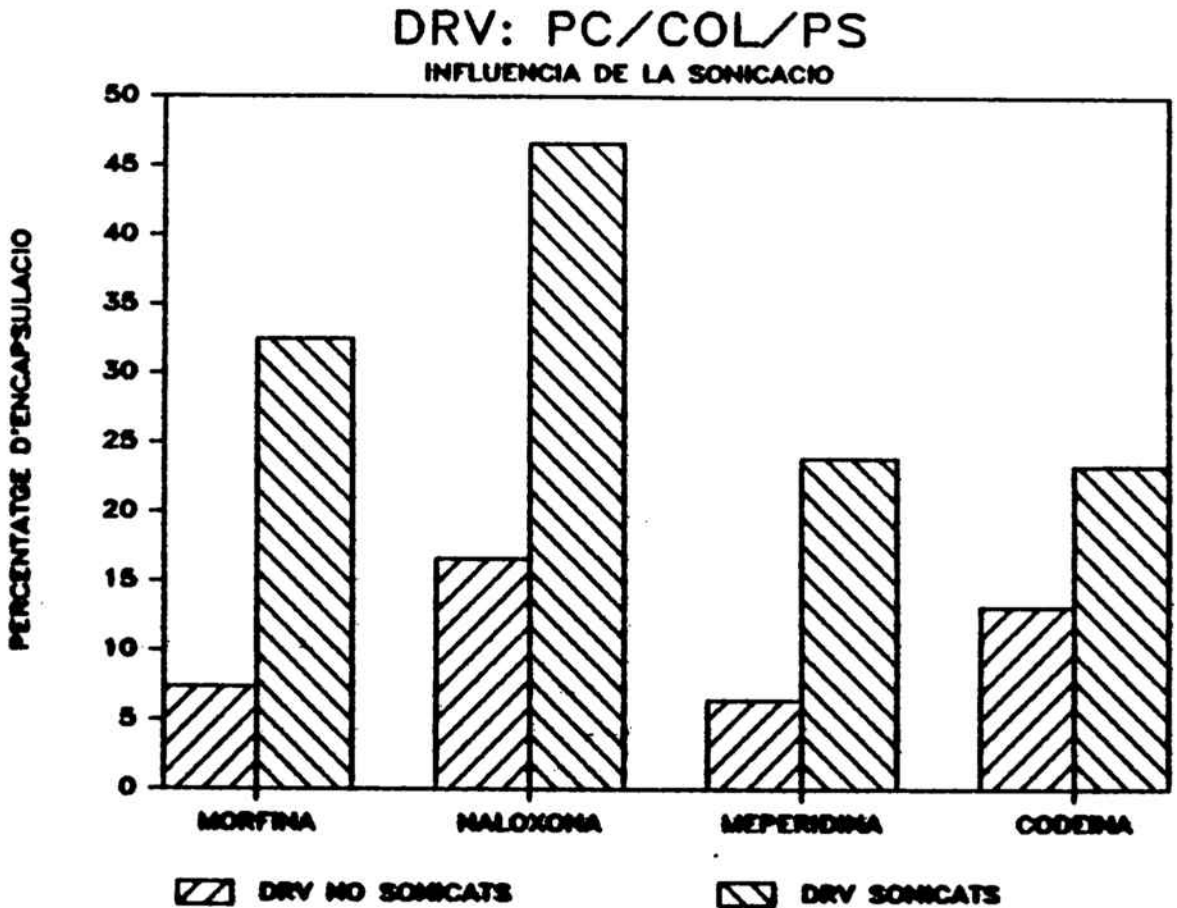


Figura 43.- Influència de la sonicació en l'encapsulació de principis actius en DRV de PC/COL/PS (1/0'3/0'16).

Donat que els dos lots de DRV s'han fet seguint el mateix protocol tal com s'ha descrit en l'apartat 3.2.3.3. de Mètodes essent l'única diferència la sonicació intermitja, es pot generalitzar que aquest procés és un paràmetre important per augmentar el percentatge de material encapsulat.

Per una altra part i tal com s'ha indicat d'antuvi, pels DRV no sonicats de PC/COL/PS va ésser impossible de separar els principis actius no encapsulats dels DRV per centrifugació malgrat es van assajar diferents condicions (de centrifugació), havent-se de recórrer a una diàlisi per aconseguir-ho. Totes aquestes dades indiquen que la intercalació d'un procés de sonicació afavoreix en general, l'eficiència d'encapsulació, proporciona poblacions més homogènies de liposomes i resultats més repetitius.

4.6. -COMPARACIO DELS METODES DE SEPARACIO DELS LIPOSOMES DEL MATERIAL NO ENCAPSULAT

El procés de separació del material hidròfil no encapsulat en els liposomes es va fer mitjançant tres tècniques: diàlisi, centrifugació i cromatografia sobre gel filtració.

La cromatografia sobre gel filtració ens assegura l'obtenció d'una població molt homogènia de liposomes doncs fa una separació per tamany amb un rang més estret que no pas els altres dos mètodes (Huang, C.H., 1969). Això permet fer una separació del fàrmac no encapsulat i dels liposomes de diferent tamany tal com s'ha indicat en les figures 35 i 36. Presenta el inconvenient de que dilueix molt la mostra i si el nivell d'encapsulació és baix, l'anàlisi quantitativa és impossible. Així per exemple, els SUV de Morfina HCL no donaven cap lectura per HPLC doncs ens movíem en els límits inferiors de detecció. Un altre punt negatiu és la lentitud amb que s'ha de treballar per a obtenir una bona separació. No es pot eluir a una velocitat superior a 32 ml/hora.

Com a últim punt referit a aquesta tècnica, cal esmentar el control que s'ha de fer de la quantitat de mostra aplicada, cosa que no cal fer en els altres dos mètodes. Un excés impediria la total separació dels components. La concentració màxima de mostra és de 70 mg/ml per al tipus de columna feta servir en aquest treball.

La diàlisi per altra banda presenta l'avantatge de que no es perd gens de lípid com pot ocórrer en la centrifugació i columnació. Aquest aspecte no obstant, no és massa important doncs sempre es pot quantificar el contingut de lípid dels liposomes i rectificar la relació lípid/molècula en cas necessari. En el cas dels DRV, el fet de que els sobrenedants donessin pràcticament transparents ja era indicatiu de l'absència de quantitats apreciables de

fosfolípid. No obstant, a efectes de control es va quantificar el contingut en fòsfor dels sobrenedants i es va trobar en tots els casos inferior al 5% del lípid total.

Amb la diàlisi s'obté una població heterogènia de liposomes ja que a través de la membrana només passa el principi actiu no encapsulat. El diàmetre de porus promig és de 2'4 nm, tamany molt més petit que els SUV (50 nm). S'ha de controlar també el contingut del material a separar de les aigües de rentat per no arribar a un equilibri entre les concentracions al interior i a l'exterior que fa que no progressi el procés. Per una altra part, aquest equilibri pot induir una alliberació del principi actiu encapsulat, tal com s'ha indicat en la taula 20 d'aquest apartat de Resultats on segons el contingut de Morfina trobat en les segones aigües de rentat i en els liposomes, cal dubtar que realment s'hagi encapsulat producte. Els valors de les dues mostres són molt similars.

Un altre paràmetre crític és el temps de diàlisi. Per a controlar-lo es van sotmetre a aquest procés uns sobrenedants (previament valorats per HPLC) obtinguts en la preparació de MLV de PC/COL/Morfina (1/0'3/0'3). Es van dialitzar aquelles mostres ja que el % d'encapsulació dels MLV va ésser molt baix (1'27).

El volum de PBS, pH: 7'4 emprat per a fer la diàlisi va ésser de 50 ml. Es van recollir fraccions a les 3, 5, 6 i 7 h. El contingut en morfina de cadascuna s'indica en la taula 25.

Temps (hores)	mg
3	0'227
5	0'218
6	0'183
7	0'142

Taula 25.- Contingut en Morfina dels sobrenedants de MLV (PC/COL/Morfina: 3/1/1) sotmesos a diàlisi.

D'ací es dedueix que a les 7 h ja s'havia arribat a un equilibri osmòtic entre els dos medis. A continuació es van canviar les aigües de diàlisi (50ml) i es deixà tota la nit dialitzant-se. A les 17 h els mg trobats foren 0'057, es deixà dues h més obtenint-se un valor de 0'055 mg el que ens

va indicar que ja podiem donar per acabat el procés. També es va valorar el contingut del tub de diàlisi el qual contenia 0'024 mg.

Així doncs vam considerar que, treballant amb les quantitats de fosfolípid i fàrmac que s'han anat esmentant en aquest treball, era convenient canviar les aigües de diàlisi cada 6 h.

Finalment, es presentà el problema de la impossibilitat de calcular el contingut en principi actiu de les últimes aigües de rentat ja que es treballava amb dilucions molt elevades. La separació del producte no encapsulat per centrifugació és el procés més adient en el cas del liposomes quin tamany ho permeti. El temps emprat és molt més curt que en els processos precedents i l'eficàcia de rentat, comparable. Però a més a més, presenta l'avantatge de permetre diluir al nivell que hom desitja els sediments del liposomes amb el que sempre es treballa en concentracions superiors.

4.7.- ESTUDI DE L'ESTABILITAT DELS LIPOSOMES

4.7.1.-ESTUDI DE LA PERDUA DEL MATERIAL ENCAPSULAT EN FUNCIO DEL TEMPS.

Aquest estudi es va dur a terme amb els liposomes DRV sonicats perquè eren els únics que, donat el seu elevat nivell d'encapsulació, serien interessants des d'un punt de vista pràctic. El principi actiu encapsulat fou la Morfina i les composicions lipídiques:PC, PC/COL (1/0'3), PC/COL (1/1) i PC/COL/PS (1/0'3/0'16). En la figura 44 s'han representat conjuntament els valors en funció de la composició lipídica. Tots els punts són el promig de tres determinacions.

El fet més destacable està en que l'estabilitat dels DRV de PC/COL (1/0'3) és molt més elevada, les dues primeres setmanes, que pels altres tipus, però la pèrdua del contingut es dispara a partir de la segona setmana. Per una altra part és sorprenent la inestabilitat a l'augmentar la proporció de colesterol doncs és superior que la dels DRV de PC. Els resultats obtinguts són difícils d'explicar perquè contradiuen l'experiència general de que la incorporació de colesterol a les bicapes de PC augmenta la seva rigidesa i les fa més impermeables. Segons la bibliografia, la inestabilitat dels liposomes pot ésser deguda a l'estat de cristall o ordenat dels lípids en la bicapa. Es sap que

segons la composició química de la barreja de lípids, la temperatura de transició de gel a cristall líquid i en conseqüència l'ordenació de les molècules lipídiques varia. No obstant en el nostre cas, atés que s'ha emprat una lecitina de T_c aproximadament de 5° , la presència de colesterol o PS no pot modificar gaire aquest valor i per això totes les preparacions de liposomes han d'estar per sobre de la T_c dels lípids que els componen. A més a més, tenint en compte que s'han preparat en paral·lel i per triplicat, els factors ambientals i d'error de treball poden descartar-se. Sembla doncs, que la raó més plausible és l'elevada dependència de l'estabilitat del tipus de molècula emprat. Segons la literatura, la permeabilitat depèn molt de la hidrofobicitat de la molècula i és màxima per a valors intermitjos. Això, junt amb les grans oscil·lacions en els percentatges d'encapsulació que hem trobat suggereixen que la permeabilitat està bastant en funció del principi actiu encapsulat.

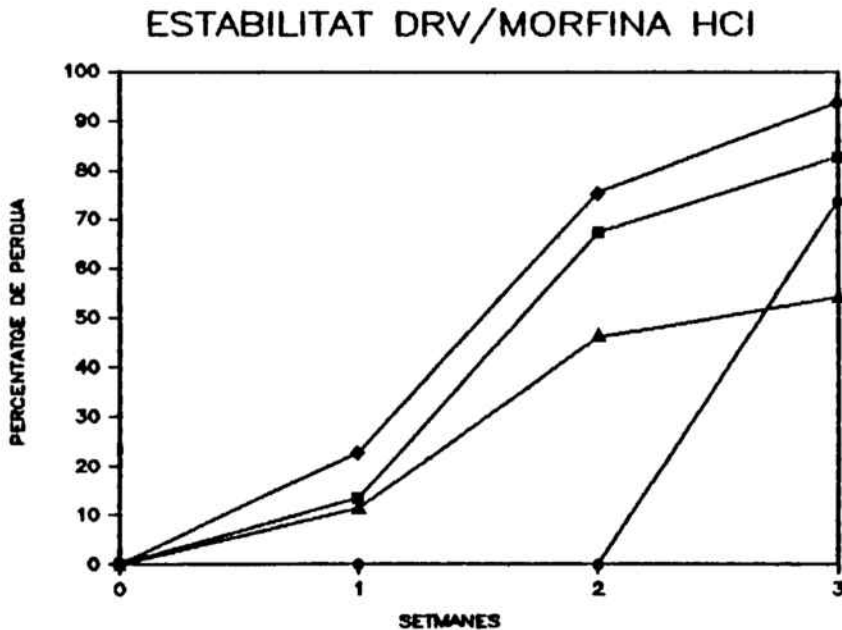


Figura 44.- Percentatge de pèrdua de Morfina, encapsulada en DRV sonicats, en funció del temps per a diferents composicions lipídiques. ■ PC, ● PC/COL(1/0'3), ◆ PC/COL(1/1), ▲ PC/COL/PS (3/1/0'5).

Els DRV formats només amb PC són els que van presentar més variabilitat en la pèrdua.

Finalment cal dir que els que contenen PS, malgrat anar perdent Morfina ja desde la 1a setmana, no van arribar als valors tan elevats com els altres, tenint una tendència a estabilitzar-se.

4.7.2.-ESTUDI DE L'AGREGACIO EN FUNCIO DEL TEMPS

Es va estudiar en DRV sonicats de PC, PC/COL (1/0'3), PC/COL/PS (1/0'3/0'16) buits, amb Morfina i amb Meperidina per ésser el tipus de liposoma amb una capacitat d'encapsulació més gran. En el cas de la Morfina també es va fer amb DRV de PC/COL (1/1).

Es van preparar dos lots de cada tipus, un es mantingué a temperatura ambient i l'altre a 4°. Aquest darrer però, només es va poder valorar la primera setmana doncs en totes les mostres es va formar un precipitat (essent impossible homogeneitzar la solució) fet que impedí la seva mesura espectrefotomètrica.

Això ens va limitar a la valoració de les solucions mantingudes a 4°. En les figures 45 a 47 es presenten els valors per DRV buits, amb Morfina i amb Meperidina respectivament. En totes elles es pot considerar que les 3 primeres setmanes pràcticament no hi ha hagut variació en l'agregació i que les petites oscil·lacions poden atribuir-se a la instrumentació. A partir de la tercera setmana es produeix un augment de la lectura el que indica una fusió dels liposomes.

Comparant els valors numèrics d'absorbància, els liposomes buits s'agreguen més que els carregats amb Morfina o Meperidina. En aquests darrers sembla que la presència de PS també redueix el procés. Aquest fet està d'acord amb les dades de la bibliografia. Es pot dir que aquest paràmetre varia en funció de la molècula encapsulada, el que confirma la influència de les característiques físico-químiques de la substància encapsulada.

No sembla ésser que la composició lipídica influeixi en aquest fenomen doncs els valors són molt similars. Només en el cas de DRV de PC/Morfina és una mica més gran.

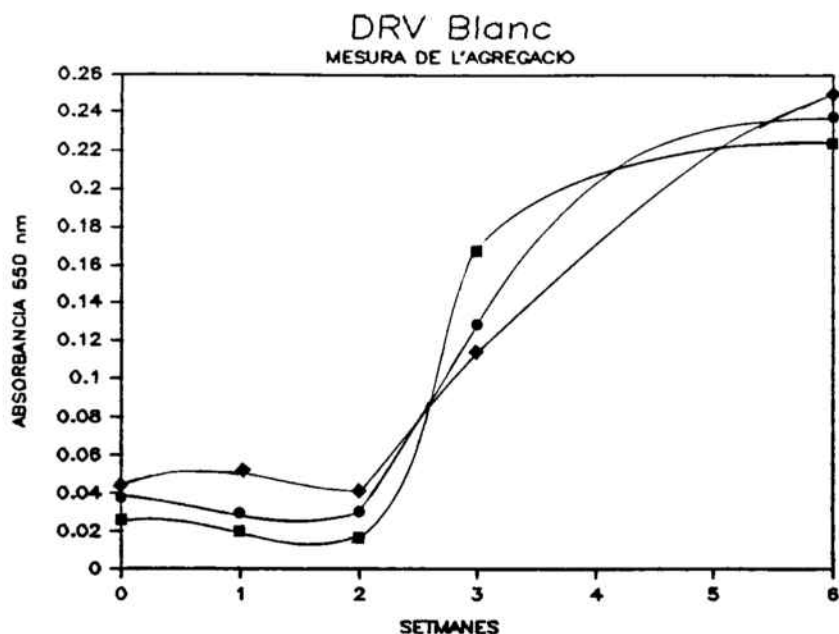


Figura 45.- Mesura de l'agregació de DRV sonicats buits, mantinguts a 4°, en funció del temps i segons la seva composició lipídica: ■ PC, ● PC/COL (1/0'3) i ◆ PC/COL/PS (1/0'3/0'16).

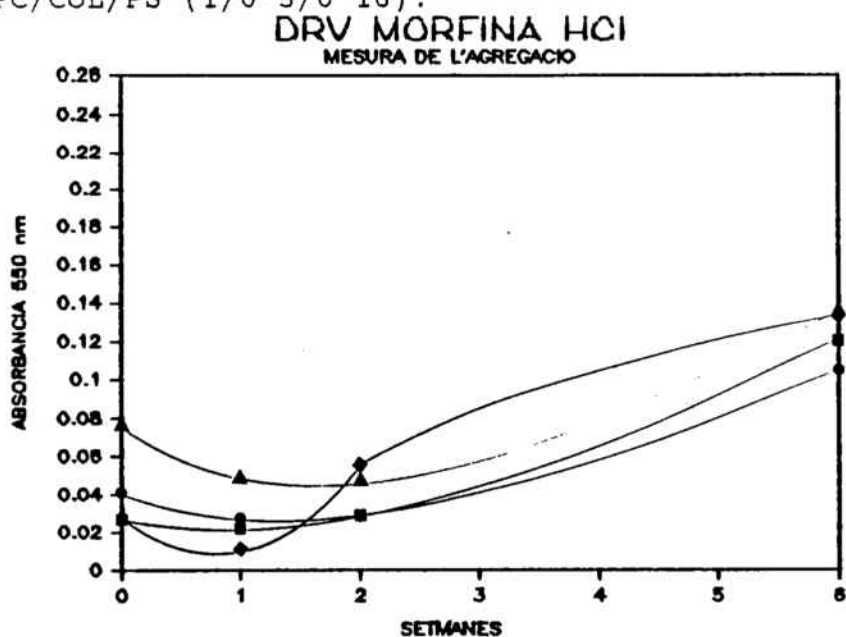


Figura 46.- Mesura de l'agregació de DRV sonicats de Morfina, mantinguts a 4°, en funció del temps i segons la seva composició lipídica: ■ PC, ● PC/COL (1/0'3), ◆ PC/COL (1/1) i ▲ PC/COL/PS (1/0'3/0'16).

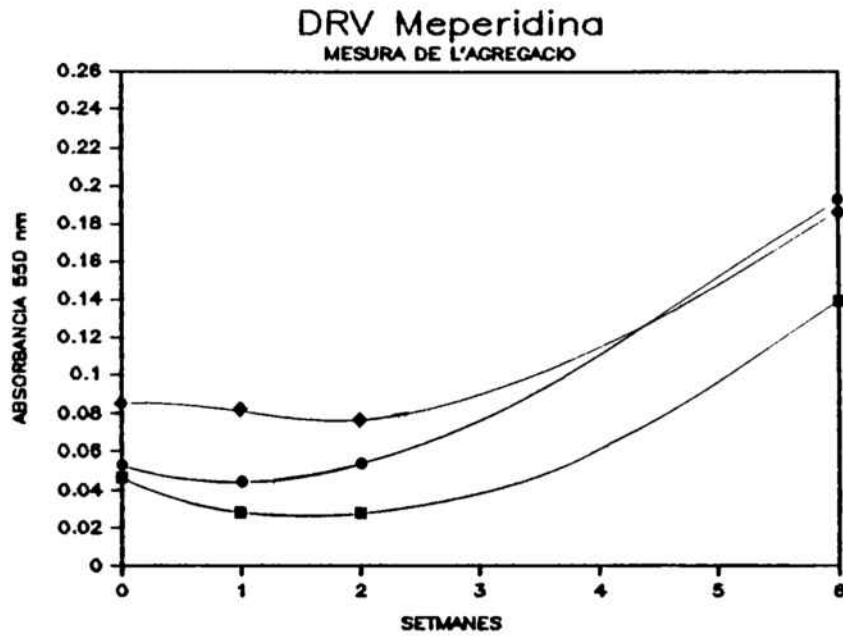


Figura 47.- Mesura de l'agregació de DRV sonicats de Meperidina, mantinguts a 4°, en funció del temps i segons la seva composició lipídica: ■PC, ●PC/COL(1/0'3), ◆PC/COL/PS (1/0'3/0'16).

4.8.- ESTUDI DE LA INTERACCIO FOSFOLIPID/PRINCIPI ACTIU4.8.1.- CALORIMETRIA DE DIFERENCIAL D'ESCOMBRAT

Les anàlisis tèrmiques diferencials s'han dut a terme tal com s'ha indicat en l'apartat de Mètodes amb liposomes de DPPC, quin registre de transicions de fase en estat pur s'indica en la figura 48. Es va escollir aquest fosfolípid sintètic, doncs només els fosfolípids purs donen transicions de fase apreciables i quantificables.

El tipus de liposoma emprat, seguint les indicacions de la literatura, va ésser MLV. Les raons per aquesta elecció són que, respecte els SUV, les molècules de lípid estan molt menys tensionades. S'ha comprovat que els SUV donen una T_c dos o tres graus inferior respecte l'obtinguda amb MLV degut precisament, al menor radi de corbatura que influeix en la compressió de les molècules de lípid. En segon lloc, quan es tracta de liposomes que contenen encapsulada alguna molècula, la interacció entre el lípid i aquella pot no donar-se o ésser feble. En canvi, quan els liposomes són multilaminars, encara que s'encapsuli un percentatge més baix de molècula, la interacció ve afavorida perquè les que s'hi incorporen ho fan entre les bicapes de lípid i el contacte que s'estableix és molt més íntim.

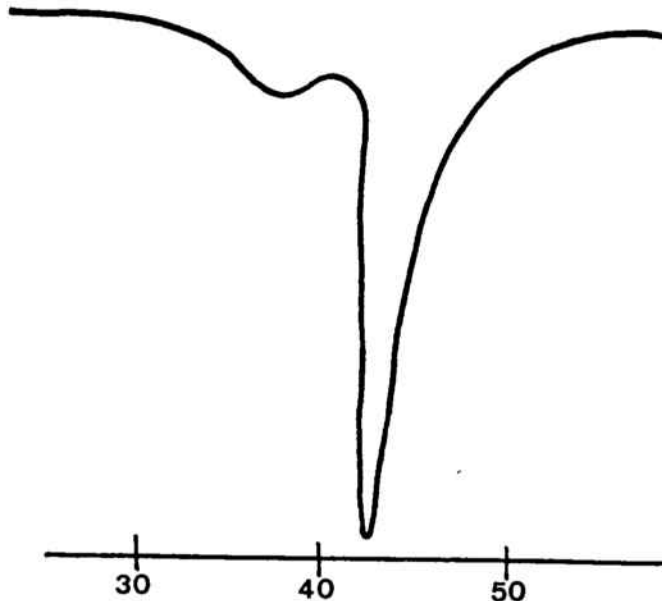


Figura 48.- Termograma de la DPPC pura. T_m : 42'1 °C, ΔH : 9'04 Kcal/mol.

RESULTATS I DISCUSSIO

En les figures 49 a 51 es mostren les gràfiques corresponents als perfils d'un cicle de calentament per diferents fraccions molars de DPPC/Morfina, Naloxona, Codeïna, Meperidina i Metadona.

Quan s'escalfa el lípid en estat pur presenta una pretransició endotèrmica degut a un increment de la motilitat dels grups polars (Verksli, Z., 1969). Estudis fets amb ratjos X han demostrat que aquesta transició correspon a un canvi de posició de les cadenes lipídiques que passen d'una conformació β' o inclinada a una de β en que les cadenes estan perpendiculars respecte al pla de la monocapa (Tardieu, A., 1973). En els nostres assajos s'observa, en tots els casos, que el pic corresponent a la pretransició es va fent gradualment més petit a mesura que augmenta la concentració d'opiàci fins arribar a desaparèixer. La fracció molar a la que això ocorre no és constant, depèn de la molècula. Aquest fet implica que la seva presència àdhuc a petites concentracions, modifica l'orientació de les cadenes hidrocarbonades respecte la situació vertical de la cadena, passant-se d'una conformació β' a una β . Procés que està acompanyat per una disminució en l'àrea per grup polar lipídic en la interfase lípid/aigua.

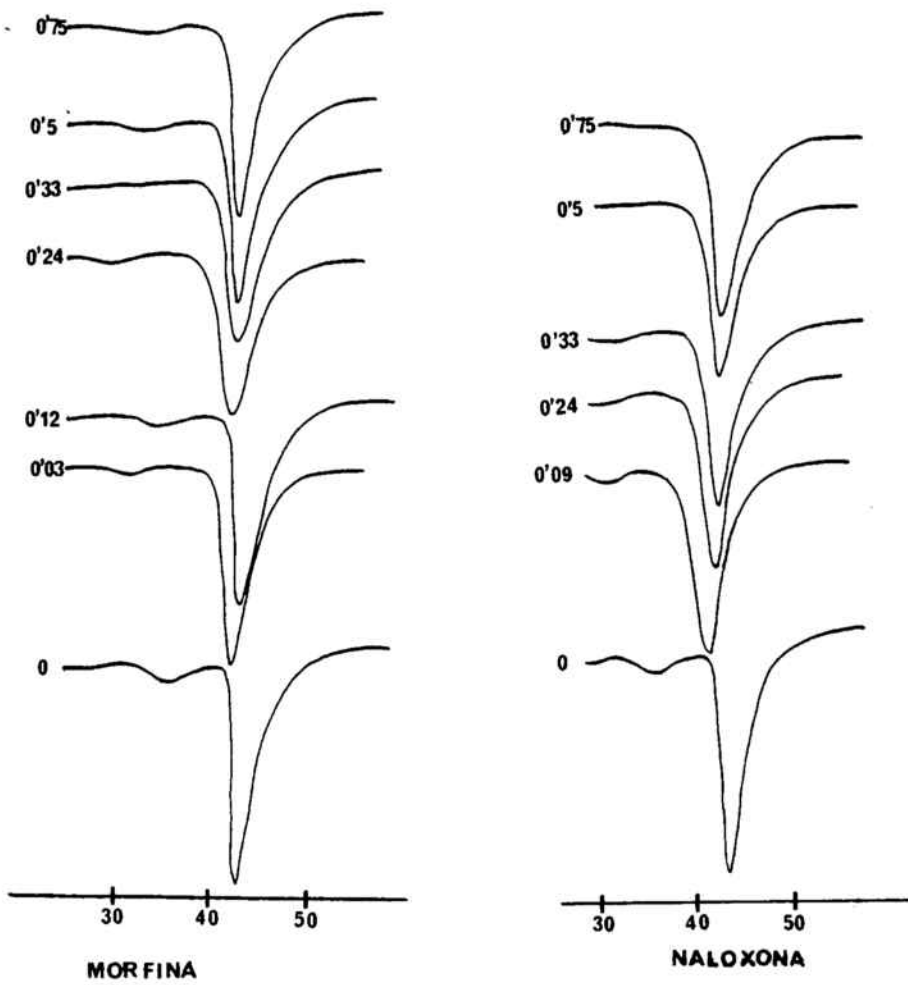


Figura 49.- Termogrames d'esclafament de MLV de DPPC en presència de diferents fraccions de Morfina HCl i Naloxona HCl.

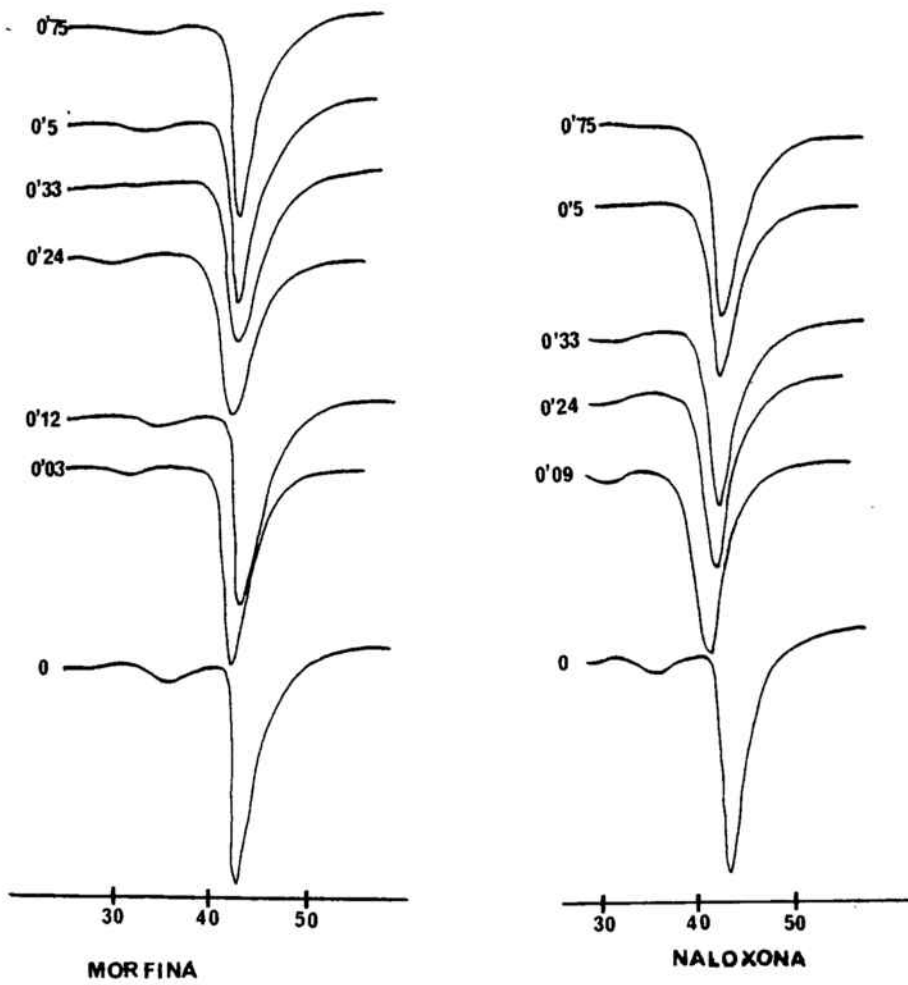


Figura 49.- Termogrames d'esclafament de MLV de DPPC en presència de diferents fraccions de Morfina HCl i Naloxona HCl.

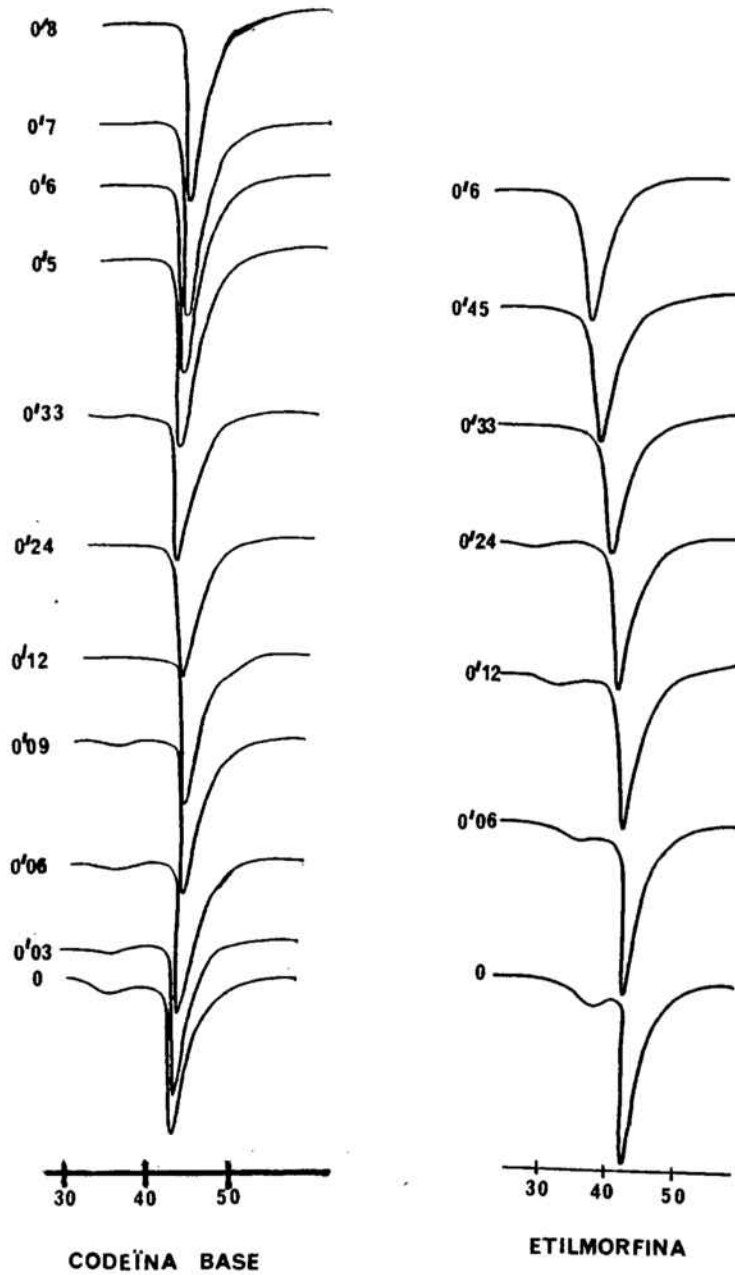


Figura 50.- Termogrames d'escalfament de MLV de DPPC en presència de diferents fraccions molars de Codeina Base lliure i Etilmorfina HCl.

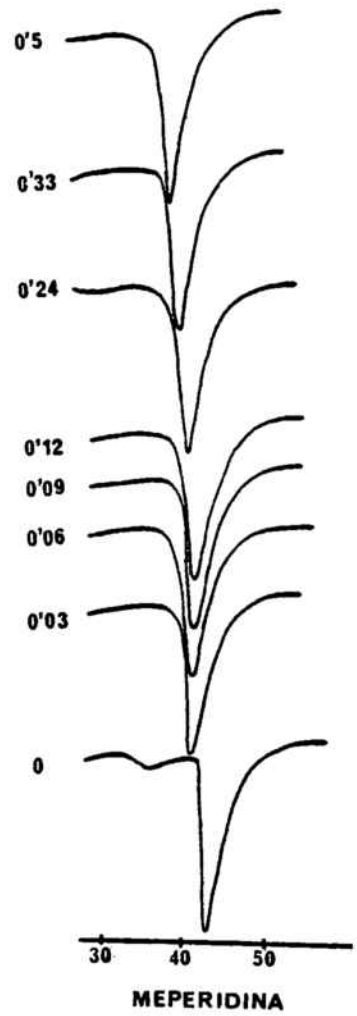
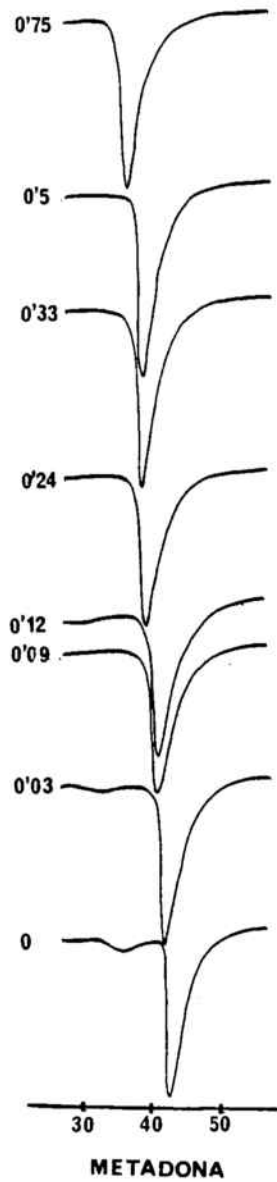


Figura 51.- Termogrames d'escalfament de MLV de DPPC en presència de diferents fraccions molars de Metadona HCl i Meperidina HCl.

En totes elles es pot apreciar un cert canvi en el perfil del pic de la transició fet relacionat amb la fracció de bicapa modificada pel fàrmac. Independentment del mecanisme d'incorporació dels principis actius en les bicapes, el seu efecte en el perfil de la transició sembla dependre de la seva concentració en el liposoma. Així, tals efectes poden correlacionar-se amb interaccions a nivell de membrana depenents de la concentració, per exemple el seu efecte analgèsic (Jain, M.K., 1975).

Els resultats obtinguts per aquesta tècnica s'han analitzat atenent als següents paràmetres: variació de la temperatura de transició, variació de l'amplada del pic, variació de l'entalpia associada a la transició i la relació alçada del pic/amplada del pic a mitja alçada. Els resultats obtinguts venen representats en les figures 52 a 69.

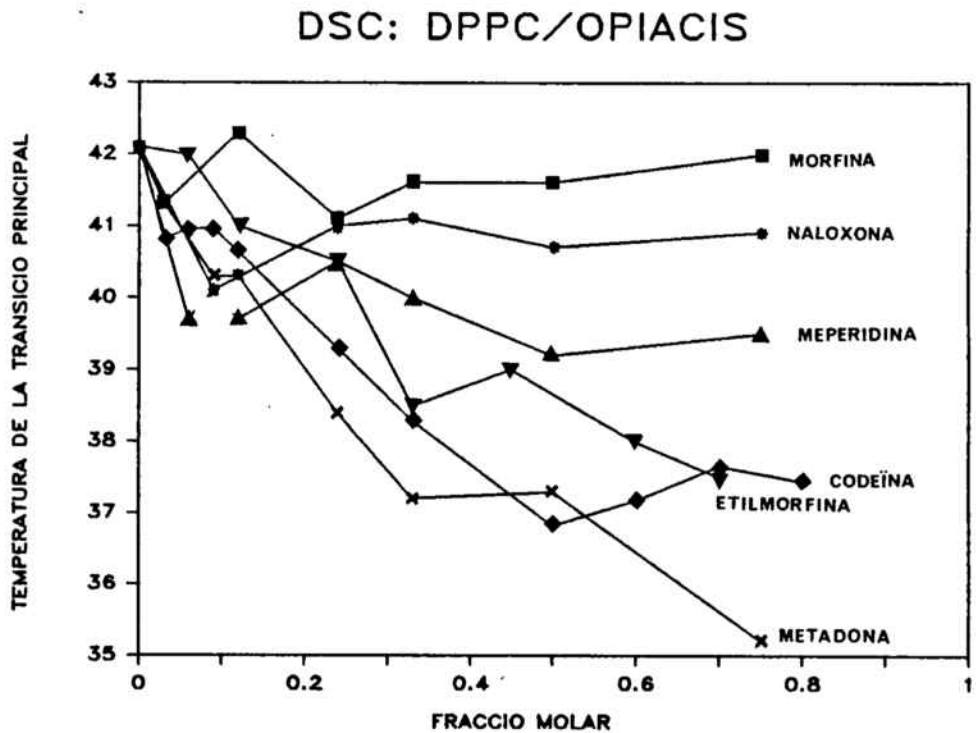


Figura 52.- Influència de diferents fraccions molars d'opiaci en la T_c de la DPPC

En la figura 52 es mostren els valors de temperatura de la transició principal de gel a cristall líquid, després de l'escalfament de les mostres, respecte la fracció molar d'opiàci. La T_c disminueix a l'augmentar la concentració d'opiàci. Aquest efecte és general per a totes les molècules assajades. Sembla que per a cadascuna s'arribi a un punt de saturació, que en les més hidròfiles, Morfina i Codeïna, es manifesta a partir de X:0'2. Aquest valor es va desplaçant cap a X més grans a mida que augmenta la hidrofobicitat de la molècula. Així, per la Meperidina i la Codeïna X: 0'5. Per l'Etilmorfina i, sobretot, per la Metadona no està clar que s'arribi a una saturació, essent aquesta última la que presenta comportaments més extrems.

La transició de gel a cristall líquid en una bicapa fosfolipídica pot descriure's com una transició altament cooperativa de l'ordre al desordre, implicant una expansió lateral en espessor i disminució de densitat. Aquests dos estats coexisteixen mentre dura la transició. L'addició de fàrmacs solubles en el lípid o que s'incorporin en la membrana, no solsament disminueix la T_c sino que també amplia el marge de temperatures en que coexisteixen els estats sòlid i fluid. Per sota i per damunt d'aquest marge, la membrana existeix en fase de gel i fluid respectivament. En presència de fàrmacs a una temperatura donada, hi ha una fracció superior de la membrana en estat fluid que no pas quan el fosfolípid està sol. Així, substàncies que disminueixen la T_c produeixen un increment de solubilitat, desordre i mobilitat de la bicapa lipídica fets que es podrien correlacionar amb la seva modulació de les funcions de les proteïnes de membrana (Fourcans, B., 1974). Segons aquesta interpretació, en el nostre cas les molècules que més afecten la T_c són la Metadona i Codeïna.

Tal com s'ha indicat anteriorment, s'han representat els canvis d'entalpia en funció de la fracció molar (figures 53 a 58) pels escalfaments de les mostres.

DSC: DPPC/MORFINA

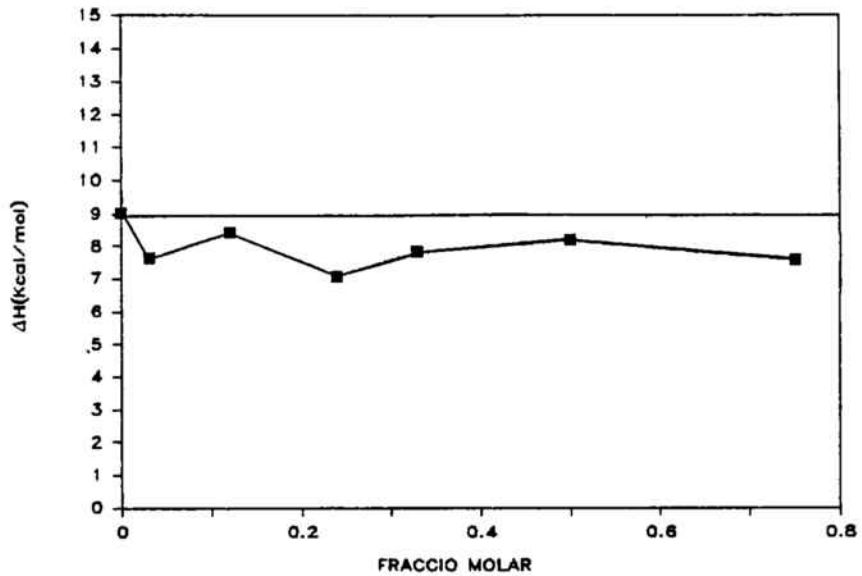


Figura 53.- Canvis d'entalpia, en els cicles d'escalfament, de la transició principal de la DPPC en funció de la fracció molar de Morfina.

DSC: DPPC/NALOXONA

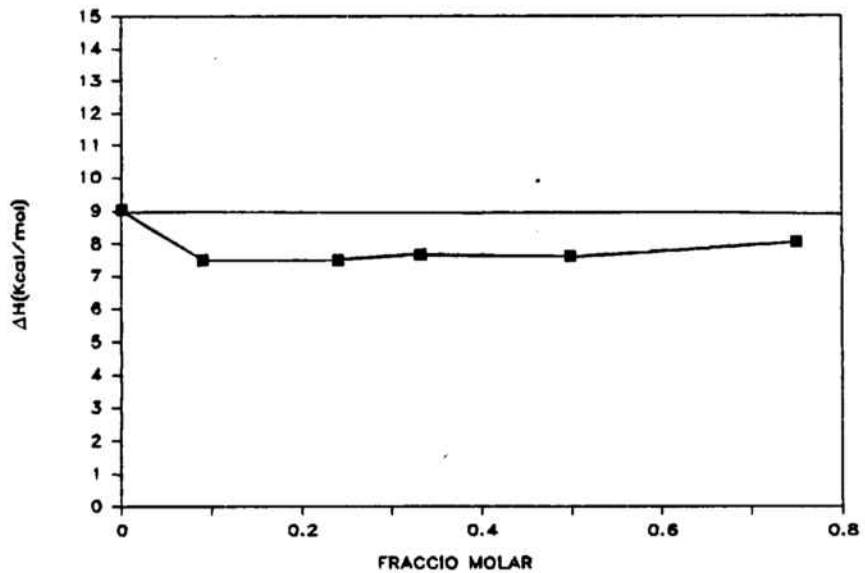


Figura 54.- Canvis d'entalpia, en els cicles d'escalfament, de la transició principal de la DPPC en funció de la fracció molar de Naloxona.

DSC: DPPC/CODEINA BASE LLIURE

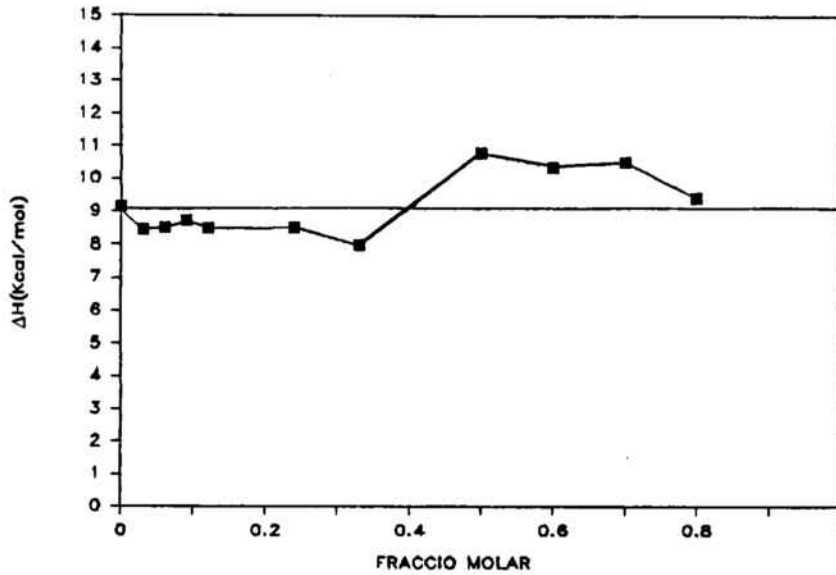


Figura 55.- Canvis d'entalpia, en els cicles d'escalfament, de la transició principal de la DPPC en funció de la fracció molar de Codeïna Base lliure.

DSC: DPPC/ETILMORFINA

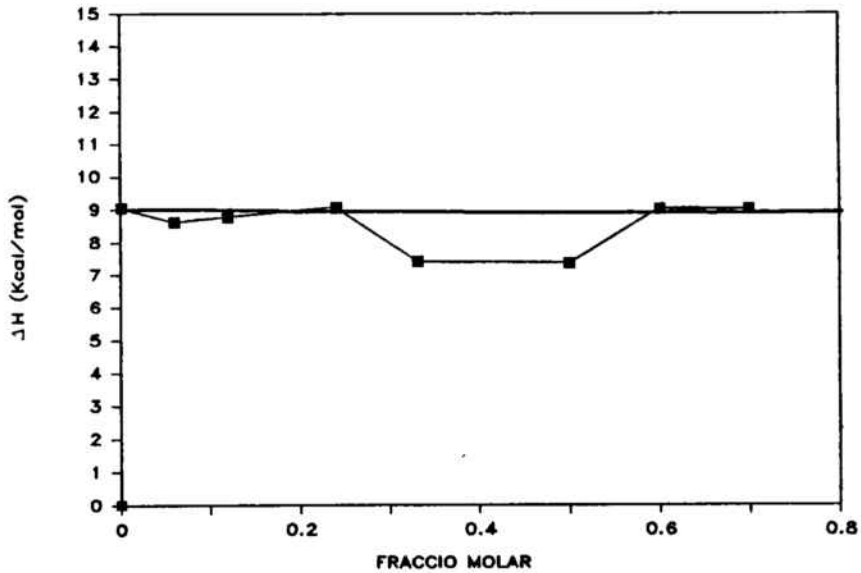


Figura 56.- Canvis d'entalpia, en els cicles d'escalfament, de la transició principal de la DPPC en funció molar d'Etilmorfina.

DSC: DPPC/MEPERIDINA

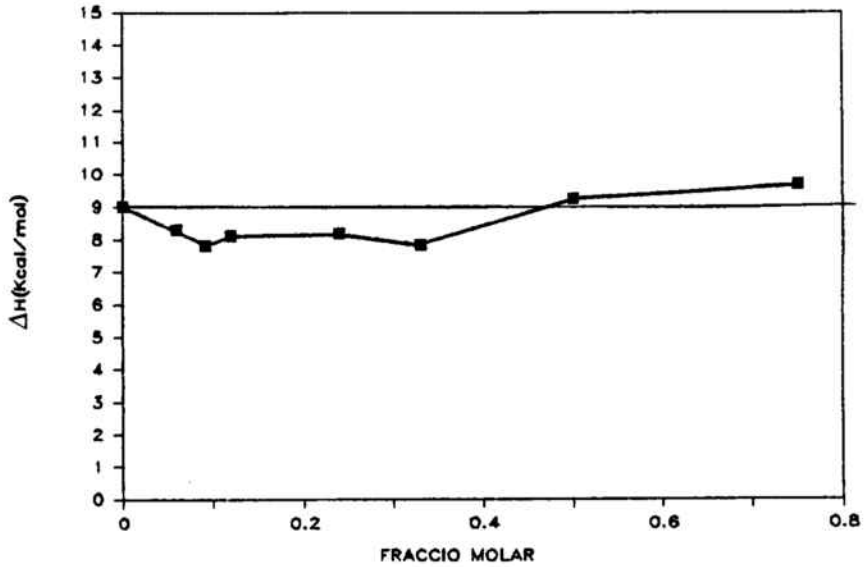


Figura 57.- Canvis d'entalpia, en els cicles d'escalfament, de la transició principal de la DPPC en funció de la fracció molar de Meperidina

DSC: DPPC/METADONA

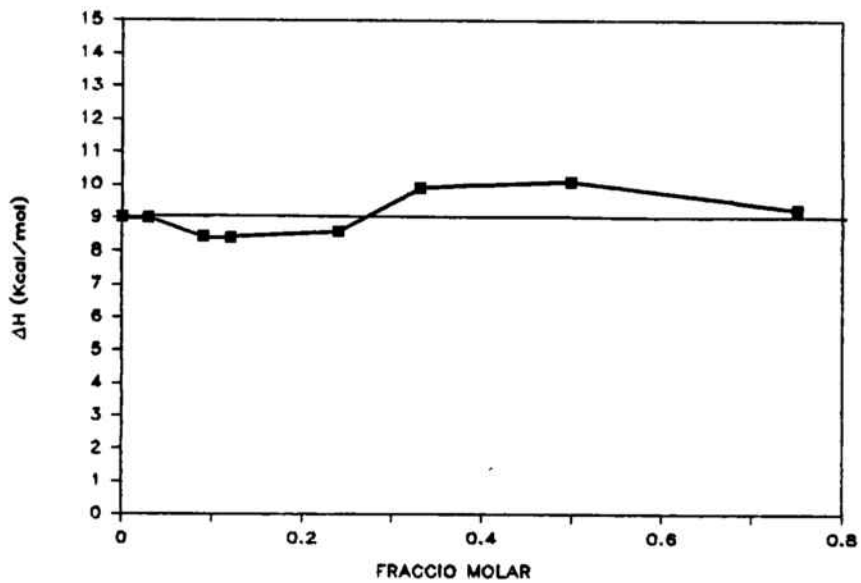


Figura 58.- Canvis d'entalpia, en els cicles d'escalfament, de la transició principal de la DPPC en funció de la fracció molar de Metadona.

En els canvis d'entalpia es pot observar una variabilitat més gran. Les molècules que donen valors més baixos d'entalpia són, també, les que modifiquen en menor grau el paràmetre T_m .

La Naloxona sembla assolir al voltant de X: 0.1 una certa saturació, mentre que la Morfina presenta oscil·lacions al llarg de totes les X estudiades. Pel contrari, la Meperidina, Metadona, Codeïna i Etilmorfina que produïen canvis en T_m més acusats, es comporten respecte ΔH de manera similar. A valors baixos de X redueixen el canvi d'entalpia associada a la transició de fase, però per sobre d'un determinat valor de X, els ΔH són superiors als del lípid pur.

La zona de transició correspon aproximadament a X:0.27 per la Metadona, X:0.47 per la Meperidina, X:0.4 per la Codeïna Base Lliure i X:0.6 per l'Etilmorfina. Aquesta característica coincideix amb la major hidrofobicitat dels opiacis i la seva estructura que, llevat el cas de la Codeïna, és molt més flexible que en els heterocicles de la Morfina i Naloxona.

DSC: DPPC/MORFINA

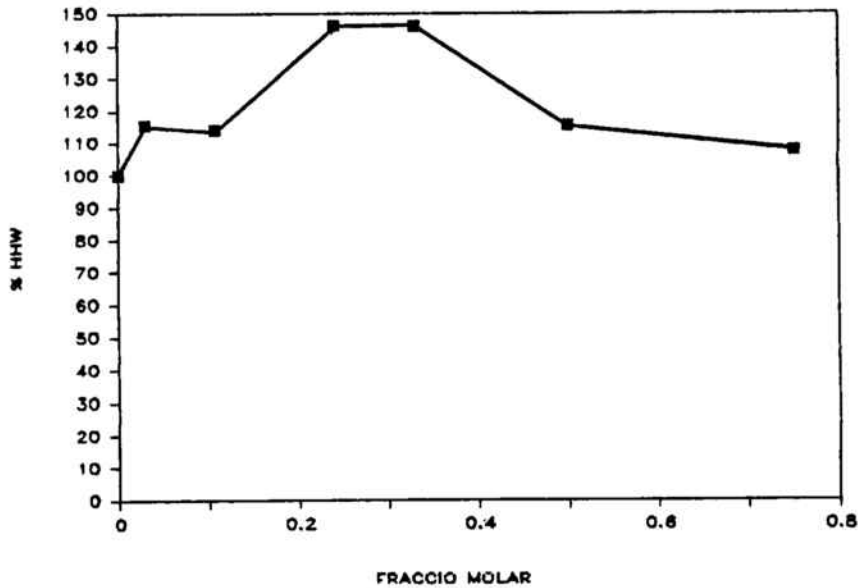


Figura 59.- Percentatge de variació de l'amplada dels pics (HHW) a la mitat de l'alçada, en els cicles d'escalfament de MLV de DPPC en funció de la fracció molar de Morfina.

DSC: DPPC/NALOXONA

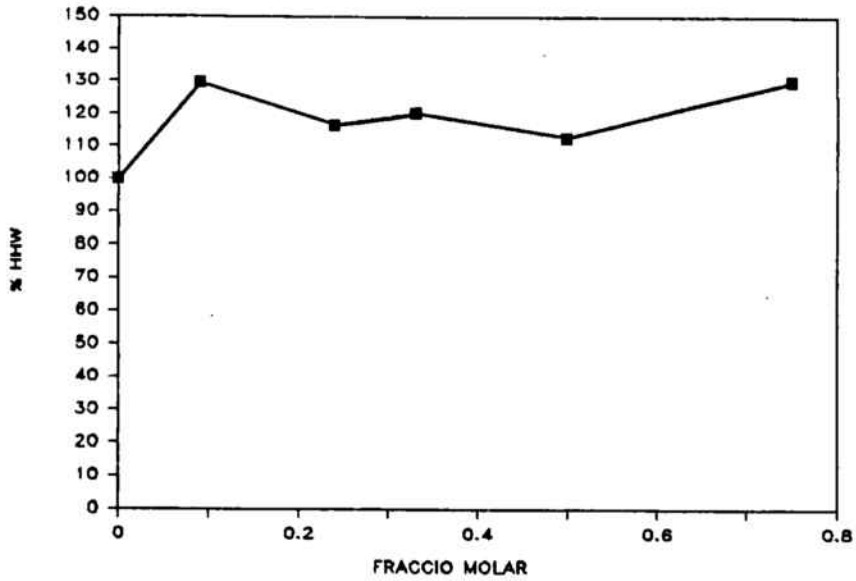


Figura 60.- Percentatge de variació de l'amplada dels pics (HHW) a la mitad de l'alçada, en els cicles d'escalfament de MLV de DPPC en funció de la fracció molar de Naloxona.

DSC: DPPC/CODEINA BASE LLIURE

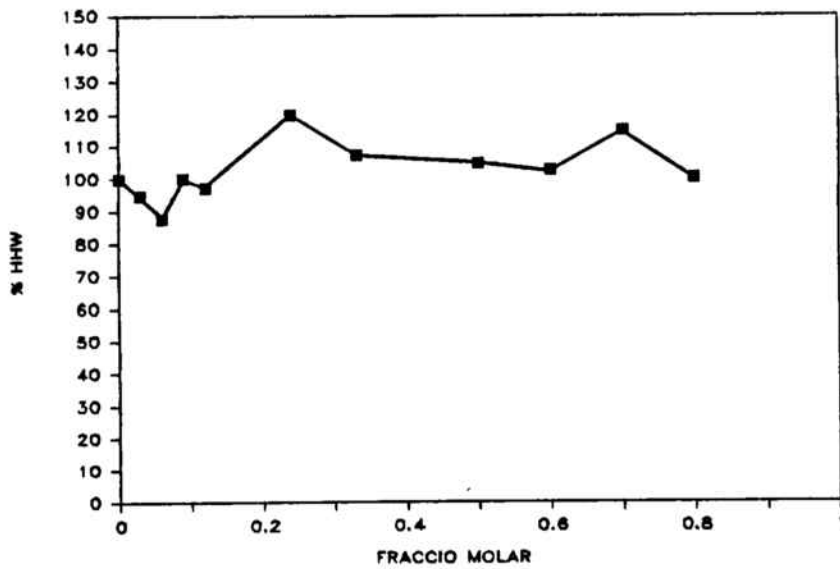


Figura 61.- Percentatge de variació de l'amplada dels pics (HHW) a la mitad de l'alçada, en els cicles d'escalfament de MLV de DPPC en funció de la fracció molar de Codeïna Base Lliure.

DSC: DPPC/MEPERIDINA

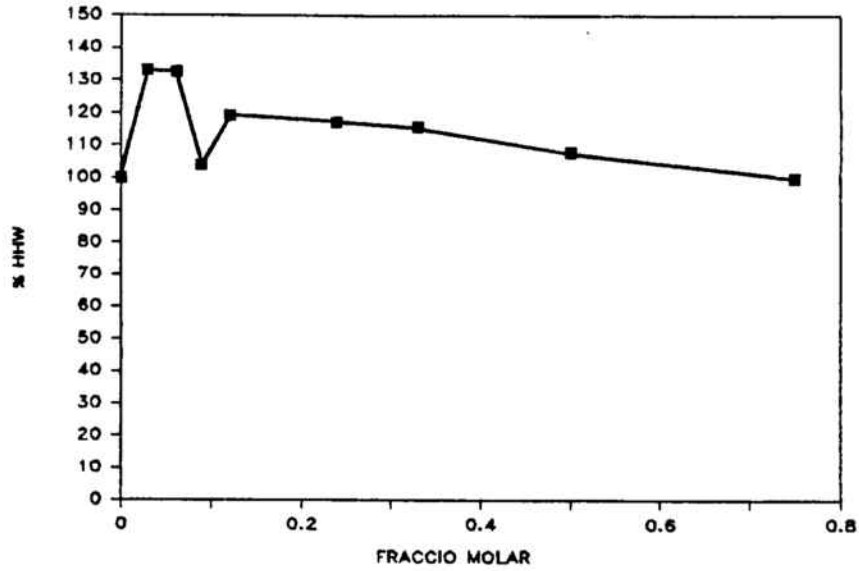


Figura 62.- Percentatge de variació de l'amplada dels pics (HHW) a la mitad de l'alçada, en els cicles d'escalfament de MLV de DPPC en funció de la fracció molar de Meperidina.

DSC: DPPC/METADONA

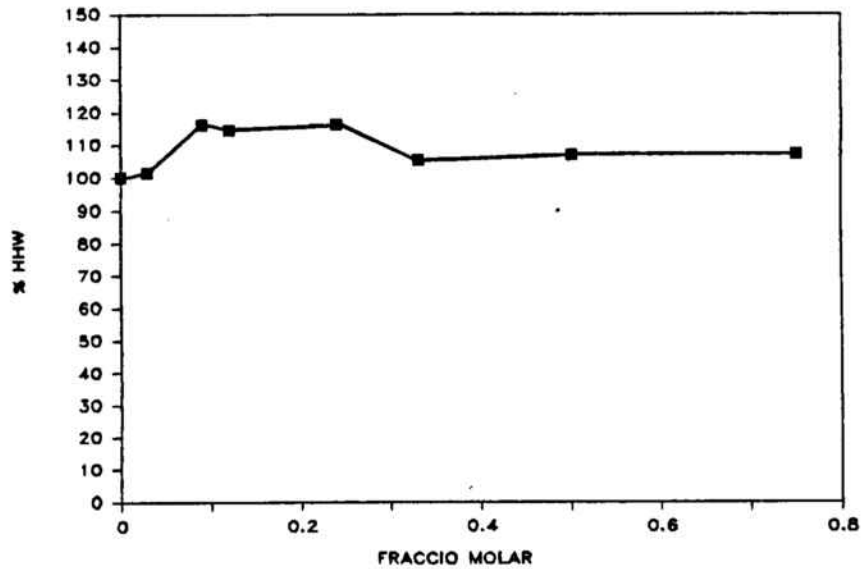


Figura 63.- Percentatge de variació de l'amplada dels pics (HHW) a la mitad de l'alçada, en els cicles d'escalfament de MLV de DPPC en funció de la fracció molar de Metadona.

DSC: DPPC/MORFINA

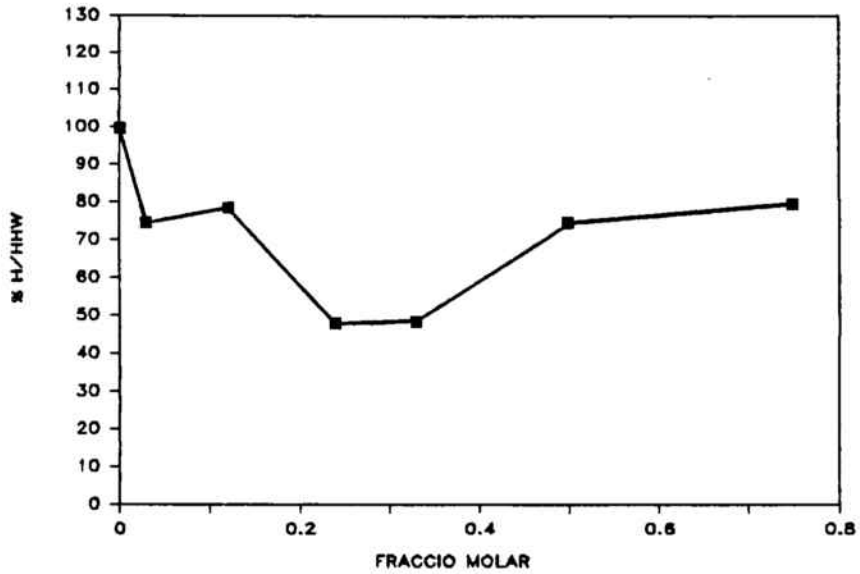


Figura 64.- Percentatge del quocient entre l'alçada (H) i HHW, en els cicles d'escalfament de MLV de DPPC en funció de la fracció molar de Morfina.

DSC: DPPC/NALOXONA

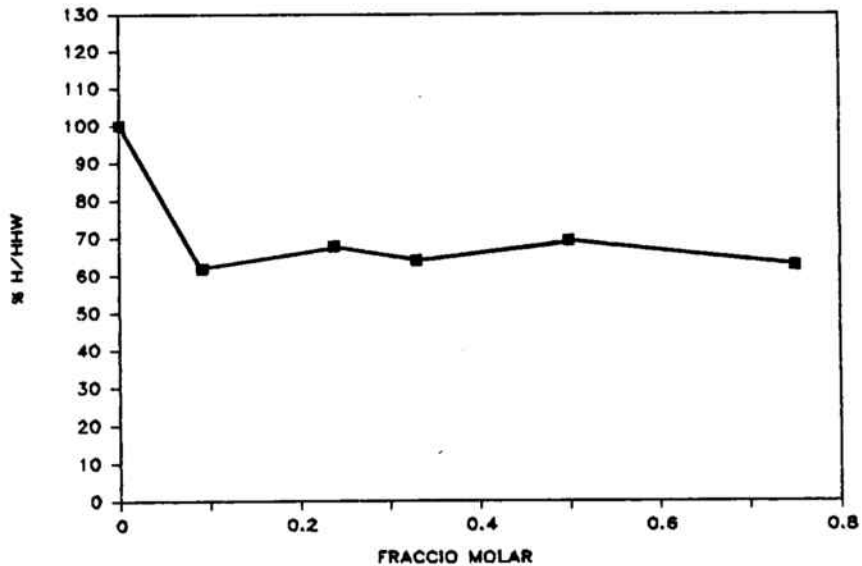


Figura 65.- Percentatge del quocient entre l'alçada (H) i HHW, en els cicles d'escalfament de MLV de DPPC en funció de la fracció molar de Naloxona.

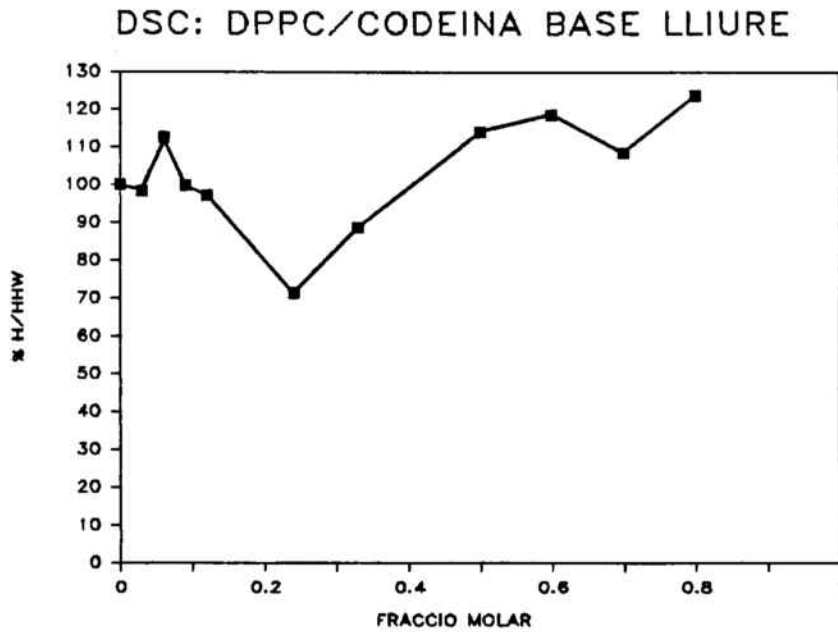


Figura 66.- Percentatge del quocient entre l'alçada (H) i HHW, en els cicles d'escalfament de MLV de DPPC en funció de la fracció molar de Codeïna Base Lliure.

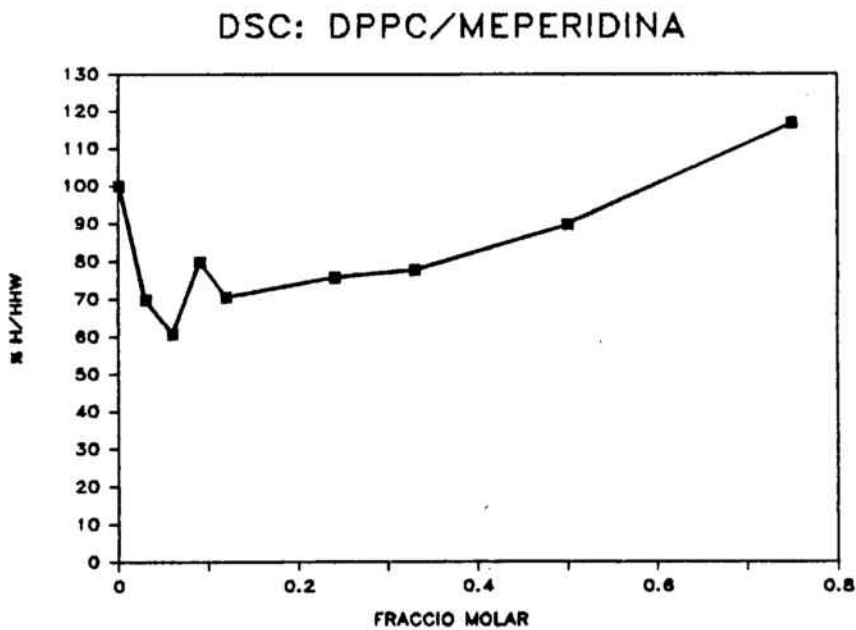


Figura 67.- Percentatge del quocient entre l'alçada (H) i HHW, en els cicles d'escalfament de MLV de DPPC en funció de la fracció molar de Meperidina.

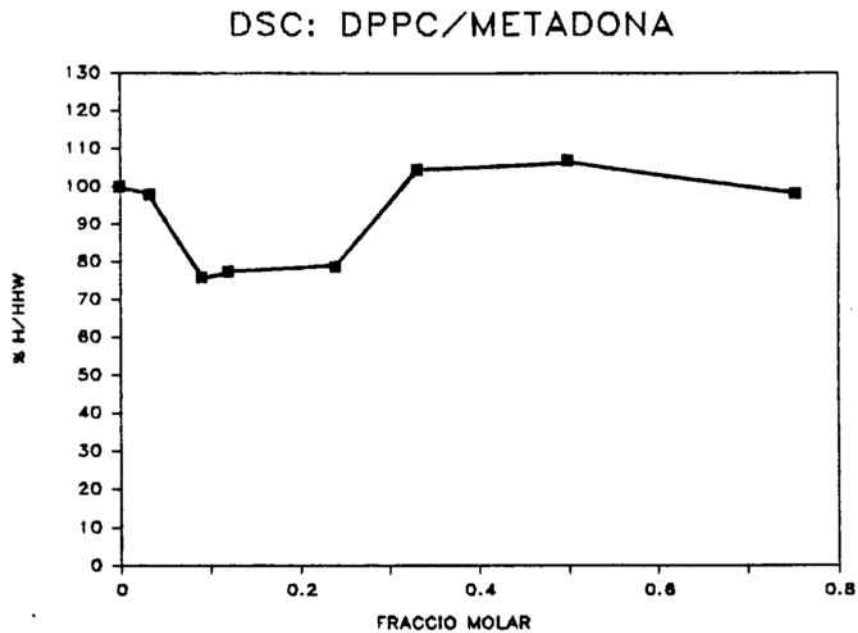


Figura 68.- Percentatge del quocient entre l'alçada (H) i HHW, en els cicles d'escalfament de MLV de DPPC en funció de la fracció molar de Metadona.

El quocient H/HHW no segueix un comportament regular per les molècules estudiades.

Comparant els valors absoluts associats als canvis d'entalpia amb els descrits a la literatura per altres molècules, està clar que les assajades en aquest treball interaccionen molt lleugerament amb les de DPPC.

DSC:DPPC/OPIACIS

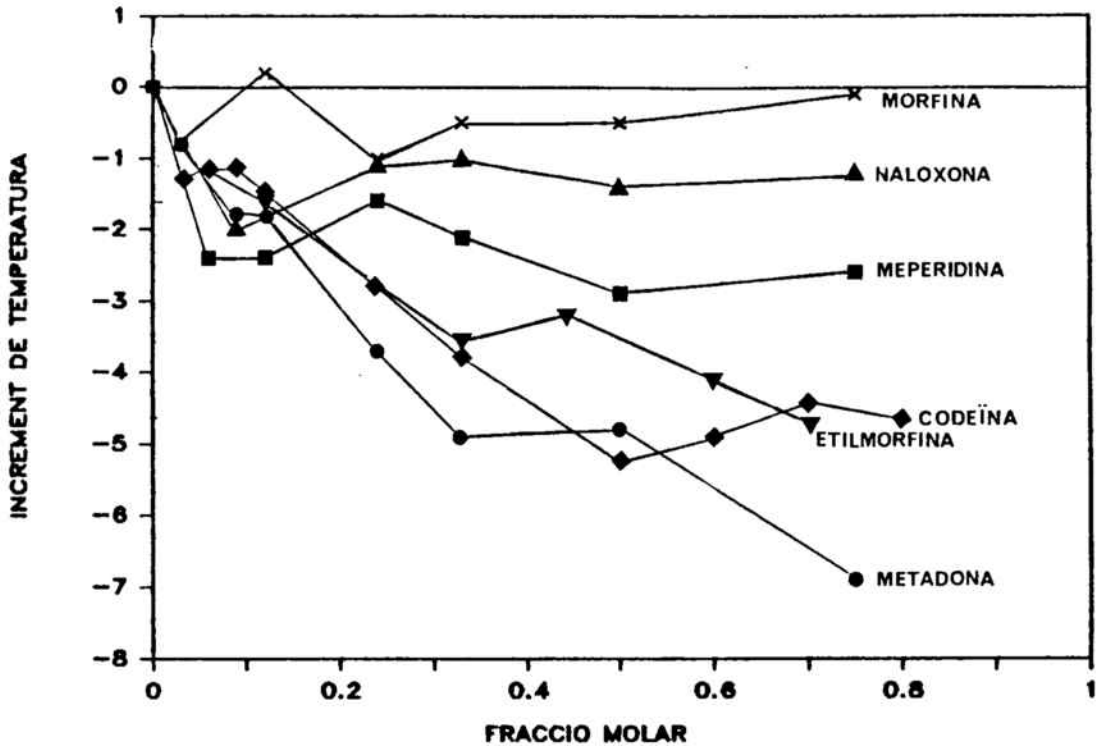


Figura 69.- Variació de la temperatura de transició de gel a cristall líquid en MLV de DPPC, en funció de la fracció molar dels diferents opiàcis.

Segons la termodinàmica clàssica un solut en presència d'un solvent canviarà la seva T_m . Mitjançant aproximacions estandar (Pitzer i Brewer, 1961), el canvi en la temperatura de fusió ΔT ve donada per:

$$\Delta T \approx - \frac{R T_m^2}{\Delta H_A} (C_1 - C_G)$$

on ΔH_A és l'entalpia del canvi de gel a cristall líquid i C_1 i C_G són les concentracions del solut en les fases de cristall líquid i gel respectivament. Hill (1974) va aplicar per primera vegada, aquest tractament a les bicapes lipídiques i va assumir que el repartiment es produeix només en els dominis de l'estat de cristall líquid, és a dir, que $C_G = 0$ i va demostrar que per l'octanol i nonanol:

$$\Delta T \approx - \frac{R T_m^2}{\Delta H_A} (C_1)$$

mentre que Pringle i Miller (1979) van assenyalar que si C_G és més gran que C_1 , la temperatura de transició de fase augmentaria.

En el nostre cas i atès que ΔT és negatiu, la diferència ($C_1 - C_G$) ha d'ésser positiva, és a dir, que si hi ha repartiment del solut entre ambdues fases mesomòrfiques, la concentració en la fase de cristall líquid ha d'ésser més gran que en la fase de gel en tots els casos.

Aplicant aquesta equació, tot i acceptant les seves limitacions quant a valor aproximat, s'han calculat les concentracions dels opiacis en ambdues fases. Els resultats venen representats en les figures 70 i 71.

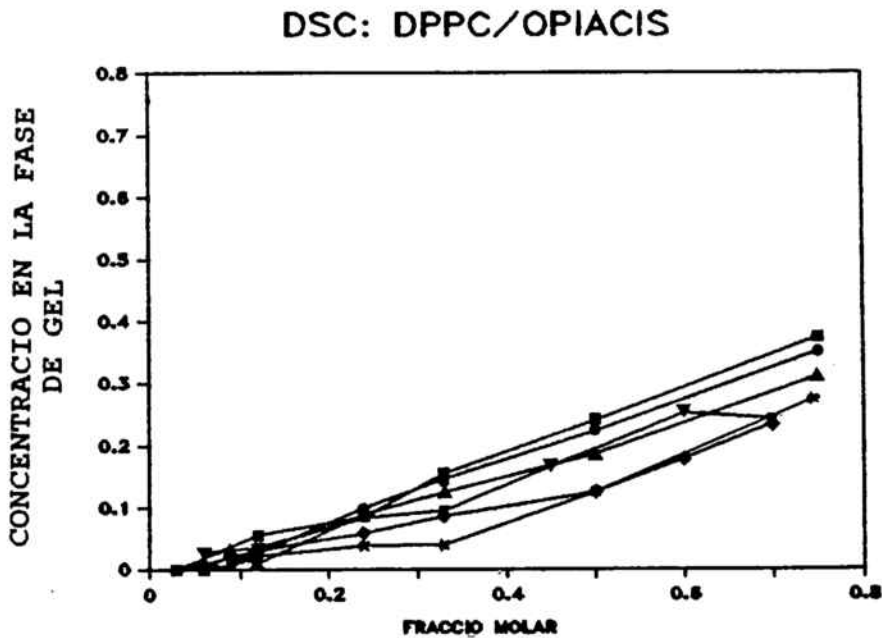


Figura 70.- Concentració en fase de gel en les diferents fraccions molars DPPC/Opiaci: Morfina, ■ Naloxona, ◆ Codeïna, ▼ Etilmorfina, ▲ Meperidina i ★ Metadona.

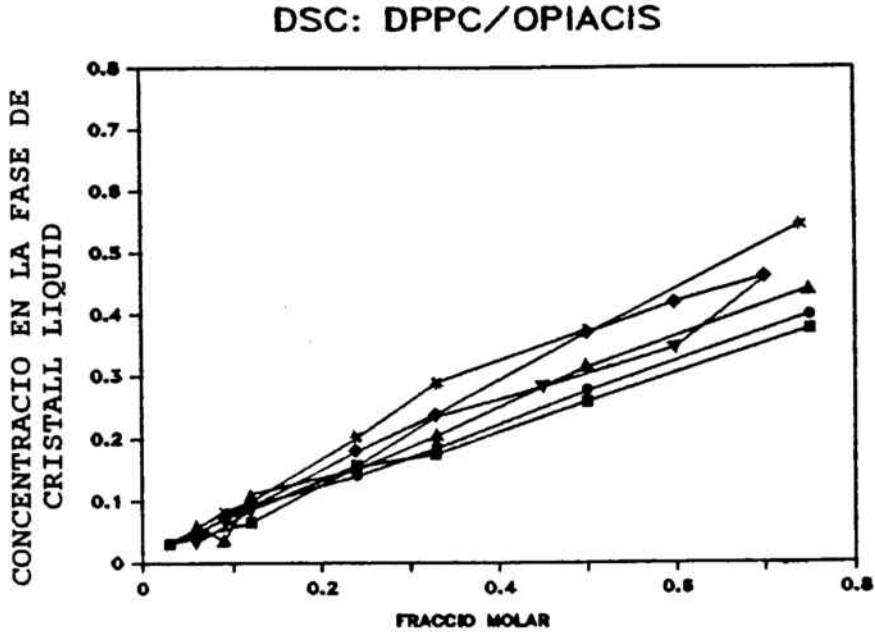


Figura 71.- Concentració en fase de cristall líquid en les diferents fraccions molars DPPC/Opiaci: ● Morfina, ■ Naloxona, ◆ Codeïna, ▼ Etilmorfina, ▲ Meperidina i * Metadona.

Com es pot comprovar, totes les molècules segueixen un comportament similar llevat el cas de la Metadona que ja presentava valors més extrems en els paràmetres esmentats d'antuvi. S'observa que encara que C_1 sigui més gran que C_2 , les diferències entre elles disminueixen a mesura que augmenta X de l'opiàci. Es pot dir que primer es satura una fase i després es va enriquint l'altre.

Malgrat la simplicitat del model, els resultats obtinguts estan d'acord amb el fet observat de que la fluïdesa de la membrana influeix en l'afinitat de les molècules opiàcies pel seu receptor (Borochoy, H., 1976; Heron, D., 1981).

4.8.2.- TURBIDIMETRIA

Les modificacions de les transicions de fase degudes a la presència de molècules opiàcies han estat també estudiades mitjançant canvis turbidimètrics.

En la figura 72 s'han representat els canvis d'absorbància a 550 nm observats per suspensions de SUV i MLV de PC/Morfina i MLV de PC, en funció de la temperatura. En cap cas no s'aprecia un canvi significatiu el que indica que no es produeix transició de fase de gel a cristall líquid.

TURBIDESIA LIPOSOMES PC

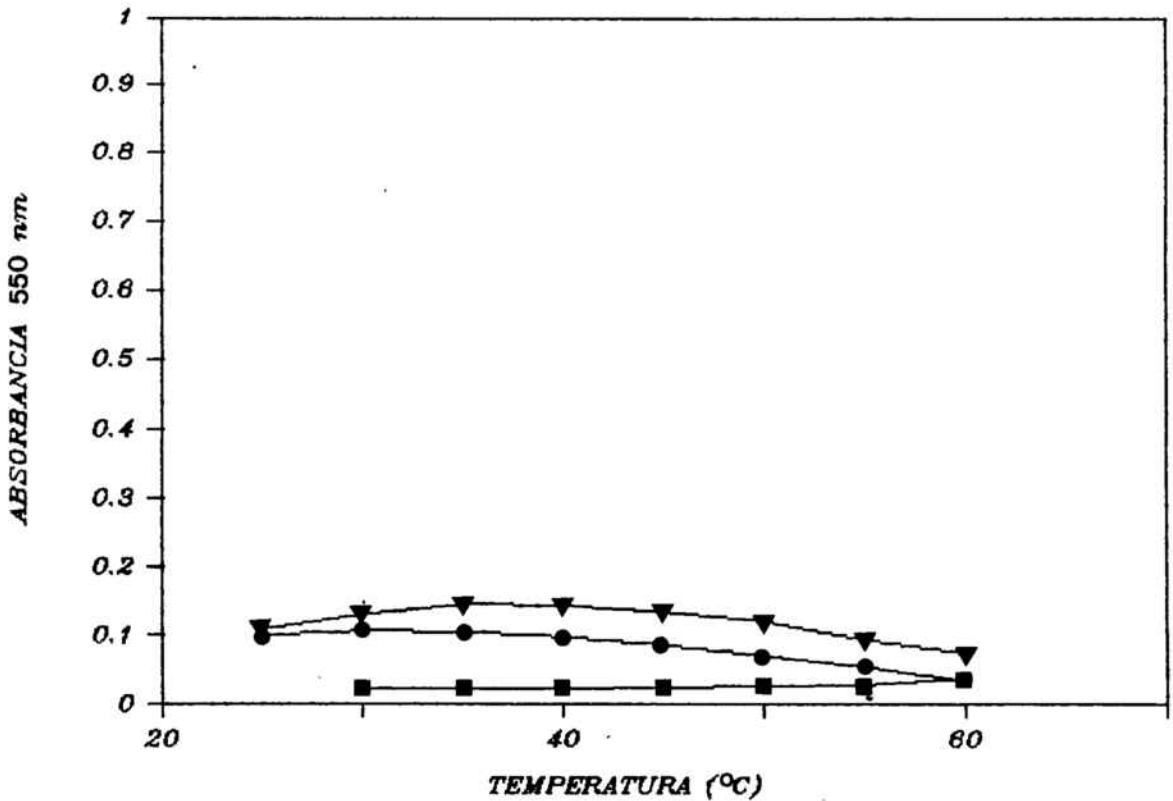


Figura 72.- Variació de l'absorbància a 550 nm en funció de la temperatura per liposomes de PC. ■ SUV: PC/Morfina, ● MLV: PC i ▼ MLV: PC/Morfina.

Les corbes corresponents a MLV i MLV/Morfina tenen el mateix perfil i són pràcticament superposables. La dels SUV es manté pràcticament constant durant tot l'experiment.

Aquests resultats són lògics ja que la PC està constituïda per una barreja de fosfolípids sense T_c concreta, com ocorre en el cas dels fosfolípids purs, sino que està compresa en un interval de temperatures de -15° a -5° . No es va assajar amb cap més fàrmac i es van considerar aquestes corbes com a referència.

Anàlogament es van preparar MLV de DPPC, fosfolípid amb T_c definida (41°). En aquest cas es va barrejar amb diferents opiacis per tal d'esbrinar la possible influència que exercien sobre la T_c (fig. 73).

TURBIDESA MLV DPPC

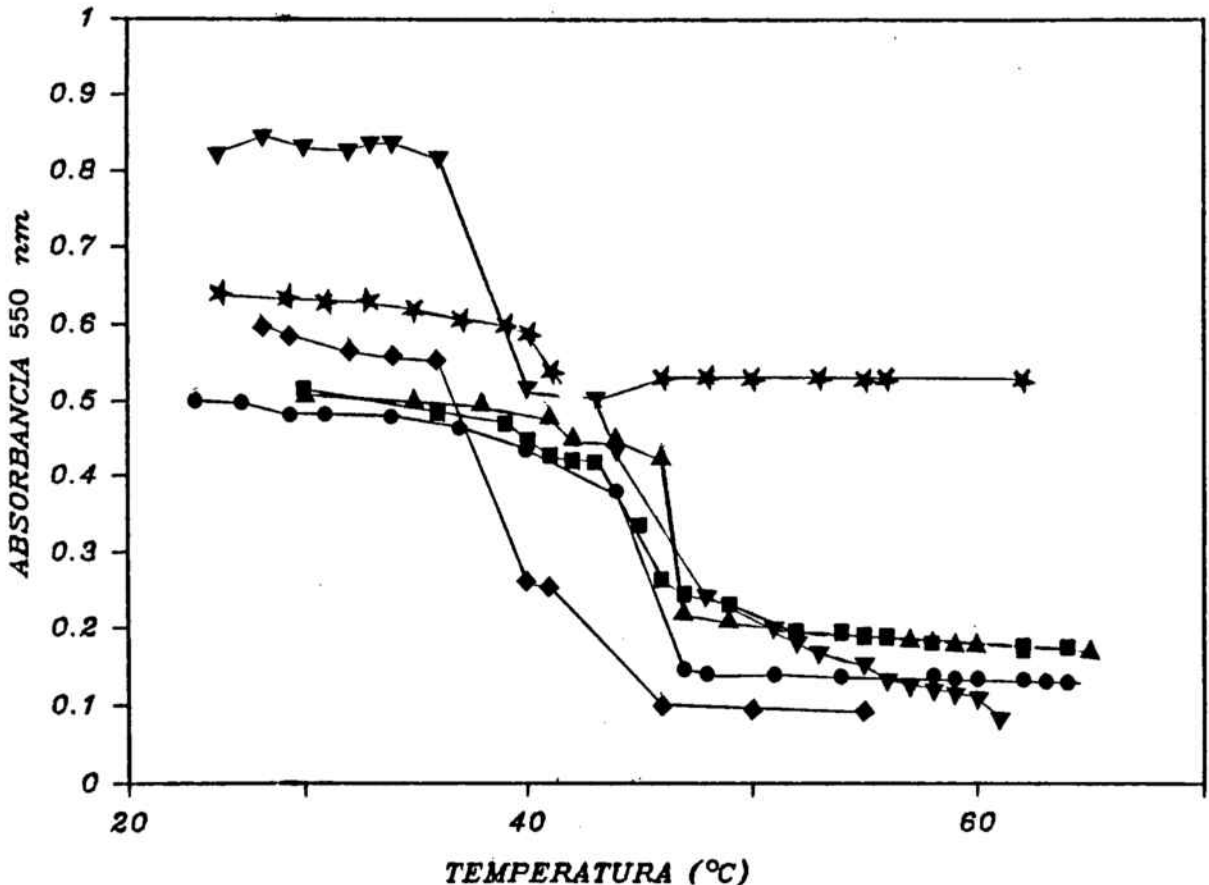


Figura 73.- Influència dels opiacis en la T_c de la DPPC.
 ■ Blanc, ● Morfina HCl, ◆ Codeïna Base lliure,
 ▲ Naloxona HCl, * Meperidina HCl, ▼ Etilmorfina HCl.

La Morfina i Naloxona presenten unes corbes pràcticament superposables a la de la DPPC. Les d'Etilmorfina i Codeïna base lliure tenen un perfil idèntic, per ambdues, la transició comença, aproximadament a 35'5°, abans que el blanc. Sembla com si tinguessin un efecte fluidificant més acusat.

Finalment cal destacar el comportament de la Meperdina per la qual, el primer tram de la corba és, com per la Morfina i la Naloxona, superposable a la del fosfolípid pur, però a mesura que augmenta la temperatura, s'aparta de la forma que segueixen els altres fàrmacs. Es com si coexistissin els estats de gel i cristall líquid, és a dir, com si no s'arribés a l'estat de líquid isotròpic.

Tant pels MLV de PC com de DPPC, tots els punts són el promig de tres determinacions.

4.9.- ACTIVITAT FARMACOLOGICA DELS LIPOSOMES

4.9.1.- "IN VITRO": BIOASSAIG DE L'ILEUM DE CONILL PORQUI

Tal com s'ha indicat en l'apartat d'objectius, es desitjava comprovar si l'administració de les molècules opiàcies encapsulades en liposomes tenia alguna influència en el seu perfil farmacològic. En el cas dels assajos "in vitro", la informació a obtenir podia ésser la cinètica d'interacció amb el receptor i la intensitat de l'efecte.

El tipus de registre obtingut a l'addicionar producte actiu a la preparació, concretament per la Morfina, s'indica en la figura 74. Aquesta, com tots els opiàcis, es caracteritza per produir una relaxació muscular que es tradueix en una inhibició de les contraccions de la musculatura llisa. L'efecte depèn de la dosi administrada. L'addició de Naloxona, antagonista opiàci, fa que es recuperi l'activitat inicial. Des d'un punt de vista qualitatiu, els registres corresponents a les molècules lliures i/o encapsulades eren iguals. De manera general es pot assegurar que la cinètica del procés és la mateixa, és a dir, que els liposomes són capaços de fusionar-se o ésser endocitats immediatament. Atés que els receptors opiàcis estan a la superfície de les cèl.lules, sembla que el procés majoritari hagi sigut la fusió. Aixímateix, el fet de que la recuperació per addició de Naloxona sigui també igual en

ambdues formes d'administració, confirma el mecanisme de fusió.

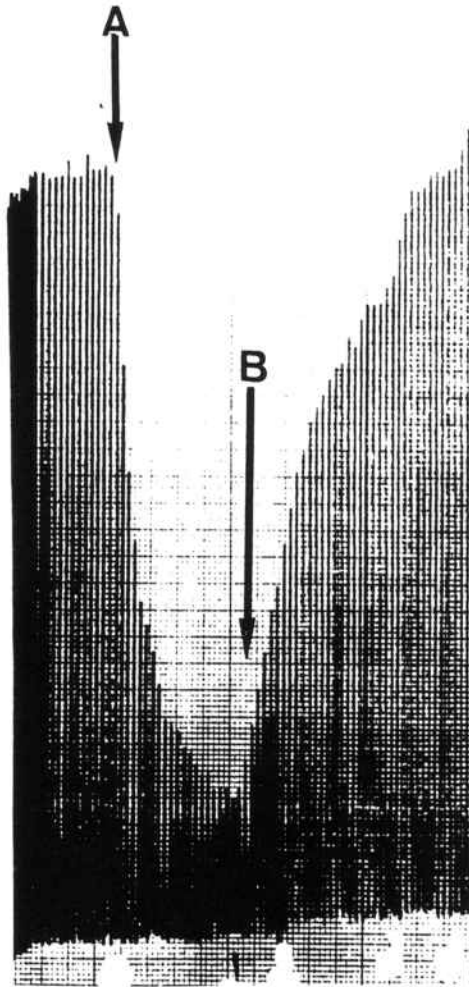


Figura 74.- Efecte relaxant d'una solució 10^{-7} de Morfina (A) sobre les contraccions induïdes mitjançant un estimulador (40 V, 0'1Hz) en la preparació d'íleum de conill porquí i recuperació de les mateixes mitjançant una solució 10^{-6} de Naloxona(B).

Amb els valors obtinguts a partir dels registres de GPI, es van fer les corbes dosi/resposta representant el log de concentració en funció del percentatge d'inhibició de les contraccions pels fàrmacs lliures (Figura 75) i per la Morfina encapsulada (Figura 76). Com més desplaçada està la corba cap a l'esquerra, més activa és la substància i com més cap a la dreta, menys ho és. Les més actives són la Morfina i la Meperidina i les menys, l'Etilmorfina i la Codeïna.

ACTIVITAT "IN VITRO" DELS OPIACIS

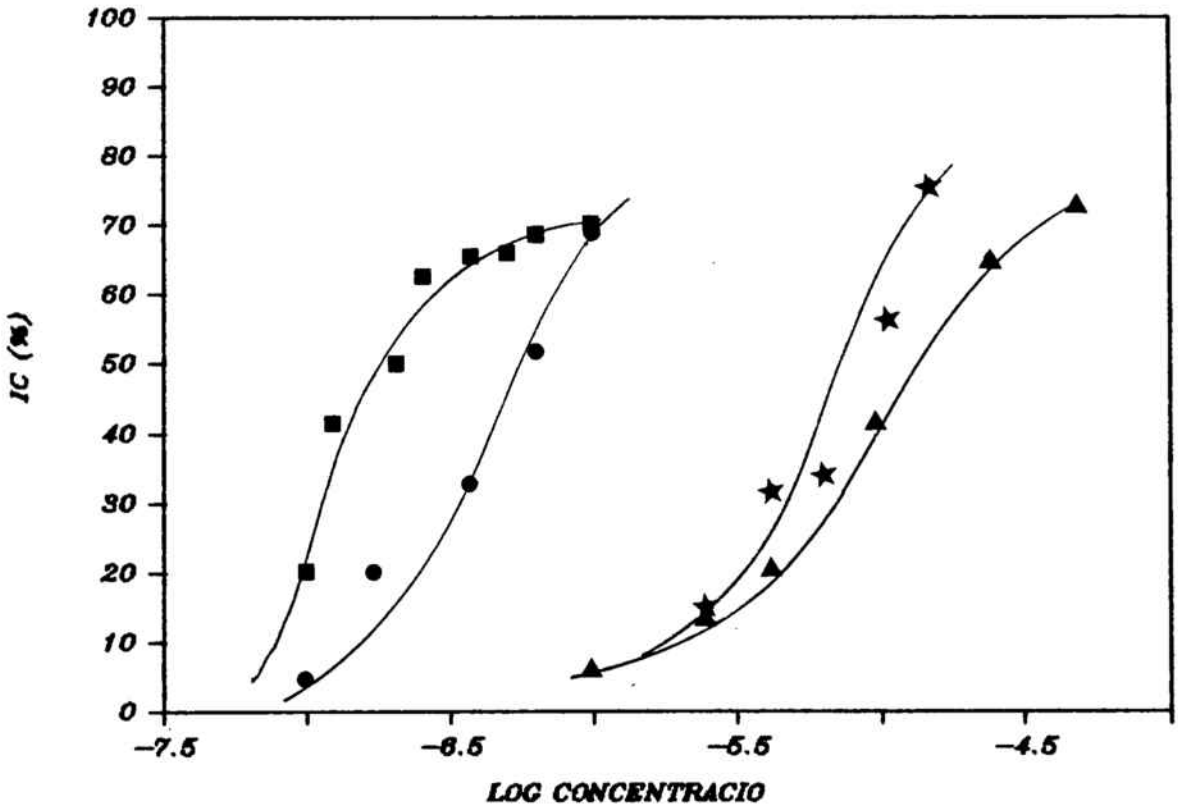


Figura 75- Corbes dosi/resposta per: ■ Morfina, * Codeïna, ● Meperidina i ▲ Etilmorfina.

Els liposomes assajats van ésser els DRV dels fàrmacs indicats d'antuvi per ésser els que presentaven una eficiència d'encapsulació superior. Segons es pot observar en la figura 76, l'encapsulació de Morfina en liposomes no millora l'efecte de relaxació sobre aquest teixit, àdhuc disminueix una mica, si bé els valors obtinguts es poden considerar del mateix ordre. Una possible explicació per a aquestes petites diferències pot ésser que el lípid incorporat junt amb la molècula activa interaccioni també amb la membrana i alteri la seva fluidesa o microviscositat de manera que la conformació del receptor opioide quedi una mica modificada i en conseqüència, l'afinitat de la molècula opiàcia al mateix.

MORFINA: ACTIVITAT "IN VITRO"

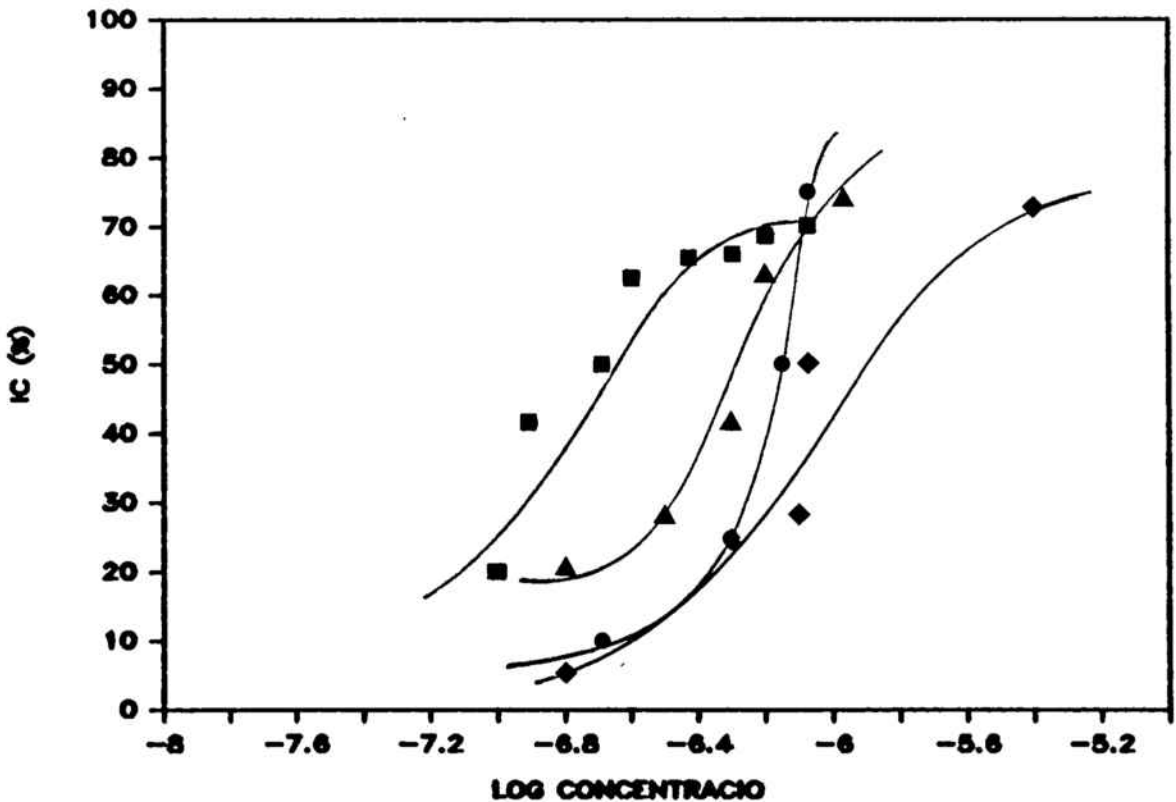


Figura 76.- Corbes dosi/resposta per la Morfina:
 ■ lliure, ● DRV:PC, ◆ DRV:PC/COL, ▲ DRV: PC/COL/PS.

RESULTATS I DISCUSSIO

Si comparem les corbes corresponents als DRV es pot apreciar que l'activitat dels constituïts per PC i PC/COL és pràcticament superposable, mentre que la dels que contenen PS està lleugerament desplaçada més cap a l'esquerra. Això indica que per aconseguir una resposta amb DRV de PC/COL/PS es necessita una dosi lleugerament menor que per aconseguir la mateixa resposta amb DRV de PC i PC/COL.

Pels DRV de Meperidina tampoc s'observà cap millora d'activitat respecte al fàrmac administrat en forma lliure. Per la Codeïna i Etilmorfina l'activitat fou nul·la possiblement degut a que el seu IC_{50} és bastant elevat i la quantitat encapsulada era insuficient per aconseguir cap efecte.

Aixímateix, la capacitat de la Naloxona encapsulada d'antagonitzar l'acció de la Morfina va resultar ésser del mateix ordre que la corresponent a la molècula lliure i tampoc es van detectar variacions en la cinètica del procés.

A partir d'aquestes gràfiques es va calcular el IC_{50} per a cada tipus d'opiàci i preparació del mateix (taula 25).

FARMAC	PREPARACIO	IC_{50} (Concentració molar)
MORFINA	Lliure	$2 \cdot 10^{-7}$
	DRV:PC	$7 \cdot 10^{-7}$
	DRV:PC/COL	$10 \cdot 10^{-7}$
	DRV:PC/COL/PS	$5 \cdot 10^{-7}$
MEPERIDINA	Lliure	$5 \cdot 10^{-7}$
	DRV:PC	$7'5 \cdot 10^{-7}$
	DRV:PC/COL	$7'5 \cdot 10^{-7}$
	DRV:PC/COL/PS	$7 \cdot 10^{-7}$
CODEINA	Lliure	$8 \cdot 10^{-6}$
	DRV:PC/COL	_____
METADONA	Lliure	$6 \cdot 10^{-7}$
ETILMORFINA	Lliure	$1'2 \cdot 10^{-5}$
	DRV:PC/COL	_____

Taula 25.- Valors de IC_{50} pels opiàcis en forma lliure i encapsulats.

4.9.2.- "IN VIVO": BIOASSAIG DE LA IMMERSIO DE LA CUA.

Tal com està descrit en l'apartat de Mètodes, el test emprat per a determinar l'activitat analgèsica "in vivo" va ésser el de la immersió de la cua. En aquest assaig el paràmetre que es va determinar va ésser el temps de retirada de la cua.

En la figura 77 s'ha representat el percentatge d'analgèsia en funció del temps per la Morfina lliure i encapsulada en DRV de PC/COL (1/0'3), preparacions que s'havien administrat previament via subcutània a una dosi de 8 mg/Kg.

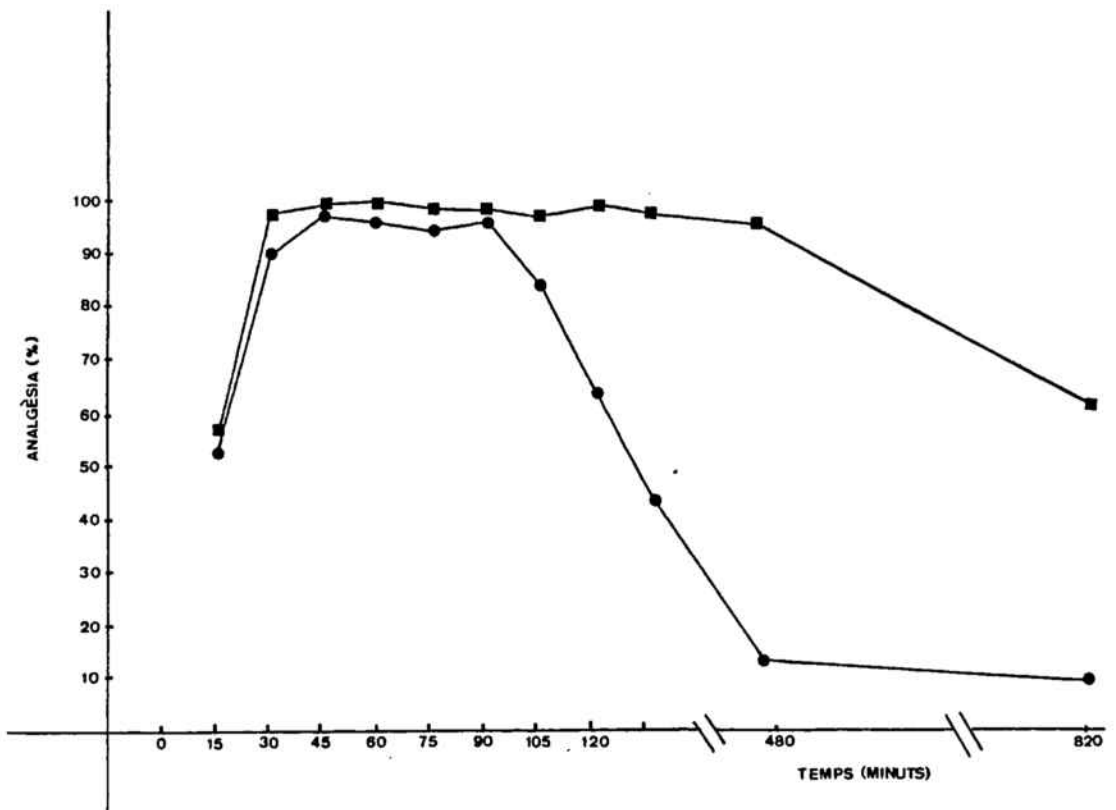


Figura 77.- Corba % d'analgèsia en funció del temps en el bioassaig de la immersió de la cua per la Morfina:
 ● Lliure, ■ encapsulada en DRV de PC/COL (1/0'3).

RESULTATS I DISCUSSIO

De l'observació d'aquesta gràfica es pot deduir que si bé l'administració de Morfina en forma de DRV no potencia l'efecte analgèsic, si manté l'activitat durant més temps. Així, als 90 minuts, el percentatge d'analgèsia per la Morfina en forma lliure comença a davallar acusadament fins arribar a un 10% als 480 minuts, que s'estabilitza. Encapsulada té un comportament diferent ja que manté l'activitat fins aproximadament als 480 minuts que és quan comença a disminuir poc a poc. Als 820 minuts encara és superior al 60%.

Per una altra part, la davallada quan s'administra en forma lliure té un pendent més acusat que quan està encapsulada.

El número d'animals emprats en aquest experiment fou de 4 per la Morfina lliure i 3 per l'encapsulada.

Segons els resultats dels assajos "in vivo" i "in vitro" sembla clar que la potència no varia l'administrar-se la Morfina encapsulada en liposomes. Quan s'administra directament en un teixit ric en receptors, la cinètica és també la mateixa, però quan l'administració és subcutània, tal com era d'esperar, entren en joc altres factors que alteren la resposta prolongant considerablement la durada de l'efecte.

CONCLUSIONS

5.- CONCLUSIONS

1.- S'han posat a punt les condicions òptimes de quantificació per la Morfina, Naloxona, Codeïna, Etilmorfina, Metadona, Meperidina, Levamisol, Tiofanat i Leu-Encefalina així com pels fosfolípids: PC, DPPC i PS per les tècniques de Cromatografia Líquida d'Alta Eficàcia i Espectrofotometria d'Ultraviolat.

2.- S'ha determinat la hidrofobicitat de les molècules estudiades mitjançant el càlcul del coeficient de repartiment n-octanol/principi actiu i temps de retenció per HPLC.

3.- Dels resultats obtinguts en la posta a punt dels mètodes d'obtenció de MLV, SUV i DRV es conclou que el tipus de liposoma més adient per l'encapsulació de substàncies hidròfiles és DRV amb sonicació prèvia i per les hidròfobes MLV.

4.- Un augment del temps d'hidratació millora, encara que no de forma notable, l'eficàcia d'encapsulació de substàncies hidrosolubles en MLV.

5.- La sonicació intermitja és un paràmetre important per a millorar el percentatge d'encapsulació de les substàncies hidrosolubles en DRV. Així, independentment de la composició lipídica, els DRV amb sonicació prèvia presenten una eficàcia d'encapsulació superior als no sonicats.

6.- En DRV no sonicats previament, el percentatge d'encapsulació depèn de la composició lipídica. Quan l'únic component lipídic és la PC no s'arriba al 10% d'encapsulació. Amb l'addició de colesterol es millora notablement per la Morfina, Naloxona, Meperidina i Levamisol. Per la resta s'incrementa lleugerament.

7.- El percentatge d'encapsulació de la Codeïna Base lliure en els tres tipus de liposomes assajats ha sigut molt baix respecte a l'obtingut amb el corresponent clorhidrat i als altres fàrmacs estudiats.

CONCLUSIONS

8.- Les proves d'estabilitat referides a la pèrdua de producte encapsulat han posat de manifest que la cinètica depèn de la composició lipídica. El procés és lineal en funció del temps excepte en el cas de PC/COL/PS en que s'arriba a una saturació.

9.- L'estudi de les transicions de fase mitjançant espectrocòpia de U.V. i DSC indica que, malgrat que la primera tècnica no és tan acurada com la segona, en ambdues es poden apreciar els mateixos trets. Existeix una coincidència entre les molècules que produeixen canvis més grans i perllongats de turbidesa i els que disminueixen més extensament la T_c determinada per DSC.

10.- Els valors d'increment d'entalpia determinats a partir de les anàlisis de DSC indiquen que les interaccions de les molècules estudiades amb DPPC són molt lleugeres i es deuen reduir solsament a interaccions de tipus iònic.

11.- Els liposomes no milloren l'activitat farmacològica del opiacis "in vitro" segons els resultats obtinguts al fer l'assaig de l'Ileum de Conill Porquí ni varien la cinètica de la seva interacció amb el receptor.

12.- L'administració subcutània de Morfina encapsulada en DRV no potencia el seu efecte analgèsic però perllonga la seva activitat notablement respecte el mateix principi actiu administrat en forma lliure.

BIBLIOGRAFIA

6.- BIBLIOGRAFIA

- Abraham, I., Goudalkar, A., Mezei, M., *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 5: 387-398 (1984).
- Adrian, G. i Huang, L., *Biochem.*, 18: 5610-5614 (1979).
- Allen, T.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 640: 385-397 (1981).
- Alving, C.A., Steck, E.A., Chapman, W.L. Jr, Waits, V.B., Hendricks, L.D., Swartz, C.M., Hanson, W.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 2959-2963 (1978).
- Alving, C.A. Targeting of Drugs, Gregoriadis, G., Senior, J. i Trouet, A. Eds., New York, London: Plenum Press, 47: 337-353 (1982).
- Attwood, D. i Florence, A.T., "Surfactant Systems: Their Chemistry, Pharmacy and Biology", Chapman and Hall, New York, pp. 739 (1983).
- Bahrami, S., *J. Lipid Research*, 28: 596-598 (1987).
- Bakouche, O. i Gerlier, D., *Anal. Biochem.*, 130: 379- 384 (1983).
- Bangham, A.D. i Horne, R.W., *Nature*, 186: 952 (1962).
- Bangham, A.D., Standish, M.M. i Watkins, J.C., *J. Mol. Biol.*, 13: 238-252 (1965).
- Bangham, A.D., Hill, M.W. i Miller, N.G., *Methods Membr. Biol.*, 1: 1-68 (1974).
- Barenholz, Y., Amselem, S., Lichtenberg, D., *FEBS Lett.*, 99: 210-214 (1979).
- Batzri, S. i Korn, E.D., *Biochim. Biophys. Acta*, 298: 1015-1019 (1973).
- Betageri, G.Y. i Rogers, J.A., *Int. J. of Pharmaceutics*, 36: 165-173 (1987).
- Black, C.D.V. i Gregoriadis, G., *Biochem. Soc. Trans.*, 4: 253-256 (1976).
- Borochoy, H. i Shinitzky, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73: 4526 (1976).

BIBLIOGRAFIA

- Bruckdorfer, K.R., Demel, J., De Gier, J., Van Deenen, L.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 183: 334-345 (1969).
- Burgess, C. i Knowles, A., *Standars in Absorption Spectrometry*. Burgess i Knowles Ed. Capman and Hall II. New Fetter Lane. London E-C 4P 4EE (1981).
- Caride, V.J., Twickler, J., Zaret, B.L., *J. Cardiol. Pharmacol.*, 6: 996-1005 (1984).
- Cevc, G. i Marsh, D., *Biophys. J.*, 47: 21-31 (1985).
- Chapman, D., *Chem. Phys. Lipids*, 1: 445 (1967).
- Chapman, D., *Q. Rev. Biophys.*, 8: 185-235 (1975).
- Chen, S. i Keenan, R.M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 79: 852-858 (1977).
- Collander, R., *Acta Chemica Scandinavica*, 5: 774-780 (1951).
- Cullis, P.R. i de Kruijff, B., *Biochim. Biophys. Acta*, 559: 399-420 (1979).
- Damen, J., Regts, J. i Scherphof, G., *Biochim. Biophys. Acta*, 665: 538-545 (1981).
- D'Amour, F.E. i Smith, D.L., *J. Pharmacol.*: 72: 74 (1941).
- Defrise -Quertain, F., *Liposome Technology*, Vol. 2, pp. 19, CRC Press (1986).
- Deamer, D.W., Bangham, A.D., *Biochim. Biophys. Acta*, 443: 629-634 (1976).
- De Gier, J., Blok, M.C., van Dijck, P.W., Mombers, C., Verkley, A.J., van der Neut-Kok, E. i van Deenen, L.L., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 308: 85-100 (1978).
- Devaux, P. i McConnell, H.M., *J. Am. Chem. Soc.*, 94: 4475-4481 (1972).
- Diamond, J.M. i Katz, Y., *J. Membr. Biol.*, 17: 121-154 (1974).
- Enoch, H.G., Strittnatter, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 145-149 (1979).

- Fauchère, J.L., Quant. Struct.-Act. Relat., 4: 11-13 (1985).
- Finkelstein, M.C., Maniscalco, J. i Weissmann, G., Anal. Biochem., 89: 400-407 (1978).
- Forge, A., Knowles, P.F., Marsh, D., J. Membr. Biol., 41: 249-263 (1978).
- Forssen, E.A., Tokes, Z.A., Biochem. Biophys. Res. Commun., 91: 1295-1301 (1979).
- Fourcans, B. i Jain, M.K., Adv. Lipid Res., 12: 147-226 (1974).
- Freeman, B.A., Young, S.L., Crapo, J.D., J. Biol. Chem., 258: 12534-12542 (1983).
- Gaber, B.P., Yager, P., Sheridan, J.P., Chang, E.L., FEBS Lett., 153: 285-288 (1983).
- Gabizon, A., Goren, D., Barenholz, Y., J. Cell Biochem. 10B: 82 (1986).
- Gerritsen, W.J., Verkleij, A.J., Zwall, R.F., Van Deenen, L.L.M., Eur. J. Biochem., 85: 255-261 (1978).
- Gregoriadis, G., Neerunjun, E.D., Eur. J., Biochem., 47: 179-185 (1974).
- Gregoriadis, G., New England J. Med., 295: 704-710; 765-770 (1976).
- Gregoriadis, G., Neerunjun, E.D. i Hunt, R., Life Sci., 21: 357-369 (1977).
- Gregoriadis, G., Ann. N.Y. Acad. Sci., 308: 343-370 (1978).
- Gregoriadis, G., Senior, J., Biochem. Soc. Trans., 12: 337-339 (1984).
- Gregoriadis, G., Davis, D. i Davies, A., Vaccine, Vol. 5: 145-151 (1987).
- Guiot, P., Bandhuin, P., Liposome Technology. Gregoriadis, G., CRC Press, Vol. I, pp 163-177 (1984).

BIBLIOGRAFIA

- Habib, M.J. i Rogers, J.A., Drug Development and Industrial Pharmacy, 13 (9-11): 1947-1971 (1987).
- Hansch, C. i Dunn, W.J., Pharmaceutical Sciences, 61: 1-19 (1972).
- Hashimoto, A., Kawada, J., Endocrinol., 26: 337-344 (1979).
- Hauser, H. i Shipley, G.G., Biochem., 22: 2171-2178 (1983).
- Heath, T.D., Edwards, P.C., Ryman, B.E., Biochem. Soc. Trans., 4: 129-133 (1976).
- Heron, D., Israeli, M., Hershowitz, M., Samuel, D. i Shinitzky, M., Eur. J. Pharmacol., 72: 361 (1981).
- Hill, M.W., Biochem. Biophys. Acta, 356: 117-124 (1974).
- Hinz, H.J. i Sturtevant, J.M., J. Biol. Chem., 247: 6071-6075 (1972).
- Hoffman, R.M., Margolis, L.B. i Belgelson, L.D., FEBS Lett., 93: 365-368 (1978).
- Huang, C.H., Biochem., 8: 344-352 (1969).
- Huang, C.H., Ozato, K. i Pagano, R.E., Membrane Biochem., 1: 1 (1978).
- Hunt, G.R.A., FEBS Lett., 119: 132-136 (1980).
- Hutchinson, F.J. i Jones, M.N., FEBS Letters, 234 (2): 493-496 (1988).
- Jain, M.K., Wu, N.Y-N., Wray, L.W., Nature, 255: 494-495 (1975).
- Jonah, M.M., Cerny, E.A., Rahman, Y.E., Biochim. Biophys. Acta, 401: 336-348 (1975).
- Juliano, R.L., Stamp, D., Biochem. Biophys. Res. Commun., 63: 651-658 (1975).
- Juliano, R.L., Stamp, D., Biochem. Pharmacol., 27: 21-27 (1978).

BIBLIOGRAFIA

- Juliano, R.L. i McCullough, H.N., J. Pharm. Exp. Ther., 214: 381-387 (1980).
- Juliano, R.L., Hsu, M.J., Regen, S.L., Singh, M., Biochim. Biophys. Acta, 770: 109-114 (1984).
- Kagawa, Y., Racker, E., J. Biol. Chem., 246: 5477-5487 (1971).
- Kimelberg, H.K., Biochim. Biophys. Acta, 448: 531-550 (1976).
- Kimelberg, H.K., Tracy, T.F., Watson, R.E., Kung, D., reiss, F.L., Bourke, R.S., Cancer. Res., 38: 706-712 (1978).
- Kirby, Chr. J. i Gregoriadis, G., Liposome Technology. Vol. 1, pp. 19, CRC Press, (1986).
- Klein, R.A., Biochim. Biophys. Acta, 210: 486-489 (1970).
- Knight, C.J., Liposomes: From Physical Structure to Therapeutic Applications, Knight, C.J. Ed., Elsevier/North-Holland, Amsterdam, Chap. 13. (1981).
- Kosterlitz, H.W. i Watt, A.J., Br. J. Pharmacol. Chemother., 33: 266-276 (1968).
- Kremer, J.M., Esker, M.W., Pathmamanoharan, C., Wiersema, P.H., Biochem., 16: 3932-3935 (1977).
- Kulpa, C.F. i Tinghitella, T.J., Life Sci., 19: 1879-1888 (1976).
- Lawaczeck, R., Kainosho, M., Chan, S.I., Biochim. Biophys. Acta, 443: 313-330 (1976).
- Lee, A.G., Biochim. Biophys. Acta, 413: 11-23 (1975).
- Lee, A.G., Biochim. Biophys. Acta, 472: 235-281; 285-344 (1977).
- Ligler, F.S., Bredehorst, R., Talebian, A., Shriver, L.C., Hammer, C.F., Sheridan, J.P., Vogel, C.W., Gaber, B.P., Analytical Biochemistry, 163: 369-375 (1987).
- Lopez-Berestein, G., Mehta, R., Fainstein, V., Luma, V., Hersh, E.M., Juliano, R., J. Infect. Dis., 147: 939-945 (1983).

- Magee, W.E., Talcott, M.L., Straub, S.X., Uriend, C.Y., *Biochim. Biophys. Acta*, 451: 610-618 (1976).
- Magee, W.E., Gronenberg, J.H. i Thor, D.E., *Cancer Res.*, 38: 1173-1176 (1979).
- Makowski, L., Jade, L., *Biomembrane Structure and Function, Topics in Molecular and Structural Biology*, Chapman, D., Ed., 4: 43-166 (1983).
- Margolis, L.B., Bergelson, L.D., *Exp. Cell. Res.*, 119: 145-150 (1979).
- Mauk, M.R., Gamble, R.C., Baldeschwieler, J.D., *Science*, 207: 309-311 (1980).
- McClare, C.W.F., *Anal. Biochem.*, 39: 527 (1971).
- McElhaney, R.N., *Biochim. Biophys. Acta.*, 361-421 (1986).
- Mehta, R., Lopez-Berestein, G., Hopfer, R., Mills, K., Juliano, R.L., *Biochim. Biophys. Acta*, 770: 230-234 (1984).
- Miyamoto, V.K., Stoeckenius, m W., *Membr. Biol.*, 4: 252 (1971).
- Nacucchio, M.C., Gattton-Bellora, M.J., Sordelli, D.D., D'Aquino, M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27: 137 (1985).
- Neerunjun, E.D., Gregoriadis, G., *Biochem. Soc. Trans.*, 4: 133-134 (1976).
- New, R.R.C., Theakston, R.D.G., Zumbuehl, O., *New Engl. Med.*, 311: 56-57 (1984).
- Nichols, J.W. i Pagano, R.E., 20: 1783-2789 (1981).
- Nicolau, C., *Méthodologie des Liposomes*, Leserman, L.D. et Barbeet, J. Eds. Paris, Editions INSERM, vol. 107. pp 49-63 (1982).
- Nicolau, C., Le Pape, A., Soriano, P., Farguette, F., Juhel, M.F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 1068-1072 (1983).
- Nir, S. i Bentz, J., *Fed. Proc.* A°9 1834 (abstract) (1980).

BIBLIOGRAFIA

- Oldfield, E. i Chapman, D., FEBS Lett., 23: 285 (1972).
- Olieman, C. i Voskamp, D., Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins. Vol. I, William S. Hancock. CRC Press, pp. 161-166 (1984).
- Olson, F., Hunt, C.A., Szoka, F.C., Vail, W.J. i Papahadjopoulos, D., Biochim. Biophys. Acta, 557: 9-23 (1979).
- Oku, N., MacDonald, R.C., Biochem., 22: 855-863 (1983_a).
- Oku, N., MacDonald, R.C., Biochim. Biophys. Acta, 734: 54-61 (1983_b).
- Ostro, M.J., Giacomoni, D., Dray, S., Biochem. Biophys. Res. Commun., 76: 836-842 (1977).
- Ostro, M.J., Liposomes. New York and Basel: Marcel Dekker Inc. (1983).
- Pagano, R.E. i Huang, L., J. Cell. Biol., 67: 49-60 (1975).
- Papahadjopoulos, D., Vail, W. J., Pangborn, W.A., Poste, G., Lazo, R., Biochim. Biophys. Acta, 465: 579-598 (1977).
- Parker, R.J., Hartman, K.D. i Sieber, S.M., Cancer Res., 41: 1311-1317 (1981).
- Patel, H.M., Ryman, B.E., Liposomes: From Physical Structure to Therapeutic Applications, Knight, C.G. Ed., Amsterdam, New York: Elsevier/North Holland, 7: 409-441 (1981).
- Patel, H.M., Tuzel, N.S., Stevenson, R.W., Biochim. Biophys. Acta, 893: 40-49 (1985).
- Pitzer, K.S. i Brewer, L., "Thermodynamics" pp: 235, McGraw-Hill, New York (1961).
- Poste, G., Allison, A.C., J. Theor. Biol., 32: 165-184 (1971).
- Poste, G. i Papahadjopoulos, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1603-1607 (1976).

- Poste, G., Kirsch, R. i Koestler, T., Liposome Technology, vol. 3, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1), (1984).
- Pringle, M.J. i Miller, K.W., Biochemistry, 18: 3314-3320 (1979).
- Rahman, Y.E., Rosenthal, M.W., Cerny, E.A. i Moretti, E.S., J. Lab. Clin. Med., 83: 640-647 (1974).
- Rahman, Y.E., Liposomes in Biological Systems, Gregoriadis, G. i Allison, A.C. Eds., Chichester, New York: John Wiley and Sons, pp: 265-298 (1980).
- Rao, L.S., J. Parenteral Sc. Technol., 37: 72-75 (1983).
- Rast, A., Bucana, C., Fogler, W.E., poste, G. i Fidler, I.J., Cancer Res., 41: 487 (1981).
- Reeves, J.P. i Dowben, R.M., J. Membr. Biol., 3: 123-141 (1970).
- Richardson, V.J., Ryman, B.E., Br. J. Cancer, 45: 552-558 (1982).
- Roerdink, F.H., Wisse, E., Morsselt, H.W.M., Van der Meulen, J., Scherphof, G.L., Kupffer Cells and other Liver Sinusoidal Cells, Wisse, E. i Knook, D.L., Eds., Amsterdam: Elsevier/North Holland, 262-272 (1977).
- Roseman, M., Litman, B.J. i Thompson, T.E., Biochem. 14: 4826-4830 (1975)
- Sandra, A. i Pagano, R.E., J. Biol. Chem., 254: 2244-2249 (1979).
- Sasaki, H., Kakutani, T., Hashida, M. i Sezaki, H., Clin. Sci. Mol. Med., 49: 99 (1985).
- Scherphof, G., Damen, J., Hoekstra, D., Liposomes: From Physical Structure to Therapeutic Applications, Knight, C. G., Ed., Amsterdam, New York: Elsevier/North Holland. 7: 299-322 (1981).
- Schieren, H., Rudolph, S., Finkelstein, M., Coleman, P., Weissmann, G., Biochim. Biophys. Acta, 542: 137-153 (1978).
- Senior, J., Gregoriadis, G., Mitropoulos, K.A., Biochim. Biophys. Acta, 760: 111-118 (1983).

BIBLIOGRAFIA

- Senior, J., Crawley, J.C.W., Gregoriadis, G., *Biochim. Biophys. Acta*, 839: 1-8 (1985).
- Shaw, I.H., Knight, C.G., Page Thomas, D.P., Phillips, N.C., Dingle, J.T., *Br. J. Exp. Path*, 60: 142-150 (1979).
- Sinden, R.E. i Smith, J.E., *Acta Trop.*, 39: 11 (1982).
- Singleton, W.S., Gray, M.S., Brown, M.L. i White, J.L., *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42: 53 (1965).
- Skipski, U.K., i col., *J. Lipid Res.*, 3: 467 (1962).
- Steerenberg, P.A., Storm, G., Groot, G., Claessen, A., Bergers, J.J., Franken, M.A.M., van Hoesel, Q.G.C.M., Wubs, K.L. i de Jong, W.H., *Cancer Chemother Pharmacol.*, 21: 299-307 (1988).
- Stevenson, M., Baille, A. i Richards, R., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 24: 742 (1983).
- Struck, D.K. i Pagano, R.E., *J. Biol. Chem.*, 255: 5405-5410 (1980).
- Swenson, Ch. E., Popescu, M.C., Ginsberg, R.S., *Critical Reviews in Microbiology*, Vol. 15, Suppl. 1, S1-S31 (1988).
- Szoka, F., Olson, F., Heath, T., Vail, W., Mayhew, E., Papahadjopoulos, D., *Biochim. Biophys. Acta*, 601: 559-571 (1980_a).
- Szoka, F., Papahadjopoulos, D., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9 : 467-508 (1980_b).
- Tadakuma, T., Ikewaki, N., Yasuda, T., Tsutsumi, M., Saito, S., Saito, K., *Antimic. Agent and Chemother.*, 28: 28-32 (1985).
- Tardieu, A., Luzzati, V. i Reman, F.C., *J. Mol. Biol.*, 75: 711-733 (1973).
- Tokay, B.A., *Chem. Bus.*, 6: 40 (1985).
- Tuzel, S.N., Patel, H.M., Ryman, B.E., *Biochem. Soc. Trans.*, 88: 559-560 (1980).
- Tyrrell, D.A., Ryman, B.E., Keeton, B.R., Dubowitz, U., *Br. Med. J.*, 1: 88 (1976).

BIBLIOGRAFIA

- Umeda, M., Ishinari, Y., Yoshikaw, K., Takada, M. i Yasuda, T., *J. Immunological Methods*, 95: 15-21 (1986).
- Veksli, Z., Salsbury, N.J., Chapman, D., *Biochim. Biophys. Acta*, 183: 434-446 (1969).
- Viniegra, S., Franco, J., Cortés, E., *Int. J. Biochem.*, 16: 1167-1170 (1984).
- Wagner, N., Dose, K., Koch, H., Ringsdorf, H., *FEBS Lett.*, 132: 313-318 (1981).
- Warren, G.B., Toon, P.A., Birdsall, N.J., Lee, A.G., Metcalfe, J.C., *Biochem.*, 13: 5501-5507 (1974).
- Watts, A., Marsch, D., Knowles, P.F., *Biochemistry*, 17: 1792-1801 (1978).
- Weiner, A.L., Carpenter-Green, S.S., Soehngen, E.C., Lenk, R.P. i Popescu, M.C., *J. Pharmacol. Sci.*, 74: 922 (1985).
- Weinstein, J.N., Yoshikami, S., Henkart, P., Blumenthal, R. i Hagins, W.A., *Science*, 195: 489-491 (1977).
- Weinstein, J.N., Magin, R.L., Yatvin, M.B., Zaharko, M.B., *Science*, 204: 188-191 (1980).
- Wetterau, J.R. i Jonas, A., *J. Biol. Chem.* 257: 10961-10966 (1982).
- Weiss, L., Zeigel, R., Jung, O.S., Bross, I.D., *Exp. Cell Res.*, 70: 57-64 (1972)
- Wilschut, J., *Liposome Methodology*, Ed. INSERM Paris, pp 129 (1982).
- Wilson, T., Papahadjopoulos, D., Taber, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, 74: 3471-3475 (1977).
- Wilson, T.D., *J. Liquid. Chromat.*, 9 (11): 2309-2409 (1986).
- Wisse, E., Gregoriadis, G., Daems, W.T., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 73: 237-245 (1976).
- Wu, P., Tin, G.W. i Baldeschiwieber, J. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 2033-2037 (1981).

BIBLIOGRAFIA

- Yatvin, M.B., Weinstein, J.N., Dennis, W.H., Blumental, R., *Science*, 202: 1290-1293 (1978)
- Yatvin, M.B., Krentz, W., Horwitz, B.A. i Shinitzky, M., *Science*, 210: 1253-1255 (1980).
- Yatvin, M.B., Muhlensiepen, H., Porschen, W., Weinstein, J.N., Feinendegen, L.E., *Cancer Res.*, 41: 1602-1607 (1981).
- Zasadzin, J.A.N., *Biophys. J.*, 49: 1119-1130 (1986).
- Zumbuehl, O, Weder, H.G., *Biochim. Biophys. Acta*, 640: 252-262 (1981).