

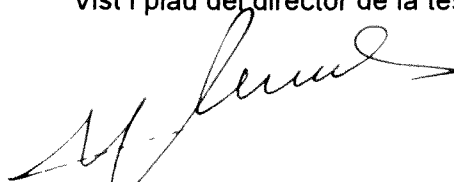
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
UNITAT DE BIOFÍSICA

OPTIMACIÓ DE FORMULACIONS AMB FOSFOLÍPIDS PER A ÚS DERMATOLÒGIC.

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

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

Vist i plau del director de la tesi:



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

T UAB
4761

COMPARACIÓ AMB L'ESPECTROSCÒPIA DE CORRELACIÓ FOTÒNICA.

S'obtingueren suspensions de liposomes (REVs) preparats a partir d'EPC/PA 9:1 mol/mol, amb una concentració de fosfolípids de 4 mg/mL, i emprant com a medi tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4. S'extrusionaren fins el diàmetre de porus desitjat i s'analitzà la seva distribució de grandàries amb el Malvern Autosizer IIc i amb el Microtrack UPA 150. Cada preparació es diluí en el tampó de preparació fins assolir la concentració idònia per realitzar les mesures en cada aparell. En el cas del Microtrack UPA, les concentracions crítiques de les suspensions no extrusionades i extrusionades per 400 i 100 nm s'obtingueren per interpolació a partir de les concentracions crítiques trobades a l'apartat anterior (els SUVs obtinguts a partir d'MLVs són equivalents als de REVs; Fig. 58). Pel que fa al Malvern Autosizer IIc, les dilucions s'ajustaren d'acord amb l'índex que indicà l'aparell. Els resultats, expressats en % vol per l'UPA i en % massa per l'Autosizer IIc, es mostren a la Fig. 66. Com s'aprecia, els resultats són similars, tot i que les anàlisi amb el Malvern de les suspensions no extrusionades i extrusionades fins 800 nm presenten petites desviacions respecte dels valors esperats, i l'extrusionada fins 400 nm mostra una població addicional important cap als 200 nm.

MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISIÓ (tinció negativa).

Donada la idoneïtat de les membranes d'extrusió (Ap. 4.2.2), s'analitzaren amb el Microtrack UPA 150 i per microscòpia electrònica de transmissió tres tipus de suspensions de liposomes: REV extrusionats fins 800 nm, REV extrusionats fins 200 nm i SUVs (obtinguts amb el Microfluidizer). El medi aquós fou tampó PBS ($314 \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1}$), de forma que es minimitzà la diferència de pressió osmòtica amb la dissolució de molibdat amònic al 2% pH 7,4 ($309 \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1}$) utilitzada durant el tractament de les mostres per l'anàlisi per microscòpia.

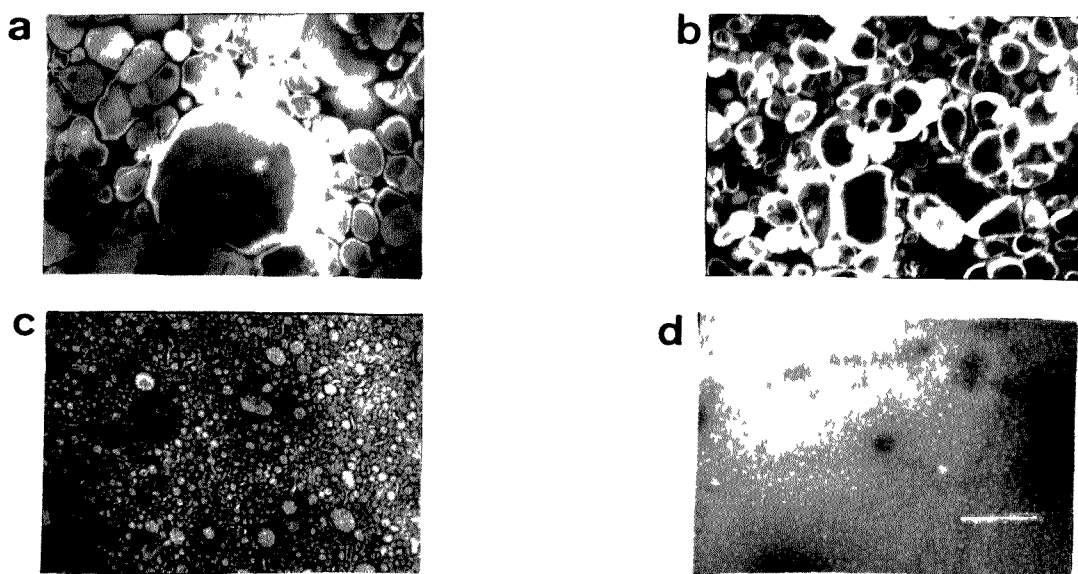


Fig. 67 Imatges de microscòpia de transmissió amb tinció negativa de liposomes REVs extrusionats per membranes de 800 nm (a), 200 nm (b), i processats en el Microfluidizer fins a obtenir SUVs (c). La imatge (d) correspon a un blanc de tinció

Les dades de microscòpia electrònica s'han obtingut amb un recompte de 465 liposomes en 16 camps visuals en el cas dels extrusionats fins 800 nm, amb 644 liposomes en 9 camps pels extrusionats fins 200 nm, i amb 483 liposomes en 5 camps pel cas dels SUVs. També s'obtingueren imatges de blancs de tinció per tal de diferenciar els artefactes propis del mètode de les vesícules. A la Fig. 67 es mostren imatges representatives de cada anàlisi.

Els resultats de cada tècnica apareixen a la Fig. 68 expressats en % vol. La diferència global entre cadascuna de les tècniques fou del 45% pel cas de liposomes extrusionats fins 800 nm, del 89 % pel cas dels extrusionats fins 200 nm, i del 52 % en el cas dels SUVs. En tots els casos els resultats de microscòpia proporcionen una distribució de grandàries situada per sota dels resultats del Microtrack UPA.

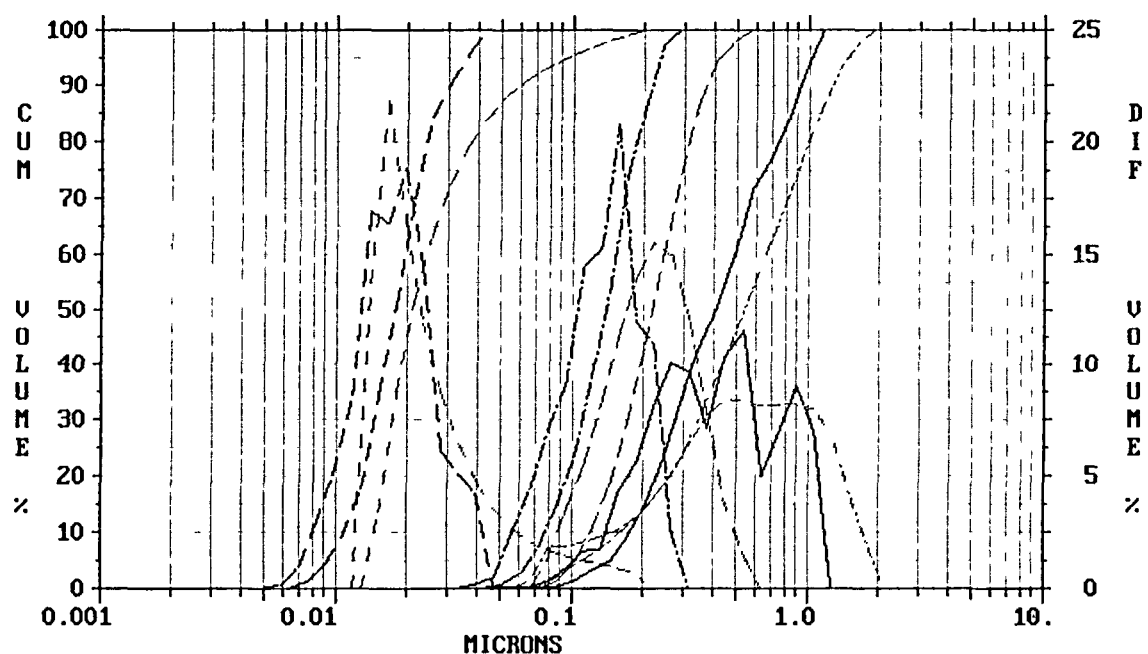


Fig. 68 Comparació de les anàlisis de diferents suspensions de liposomes mitjançant el Microtrack UPA 150 (---) i mitjançant microscòpia electrònica de transmissió (—).

DETERMINACIÓ DELS VOLUMS ENCAPSULATS.

El volum encapsulat en liposomes és un paràmetre que indica la quantitat de medi aquós que queda incorporat a l'interior de les vesícules per quantitat de fosfolípid, i que normalment s'expressa en L/mol de fosfolípid. Aquest valor depèn del número de bicapes fosfolipídiques de cada liposoma (a major número de bicapes menor volum encapsulat) i del seu diàmetre (el volum dels liposomes és una funció del radi elevat al cub). Conseqüentment, són els liposomes unilamelars grans els que encapsulen més medi aquós, fet que els fa òptims per a obtenir formulacions amb principis actius hidrosolubles encapsulats.

Els volum encapsulat dels liposomes unilamelars s'ha emprat per comprovar l'exactitud del Microtrack UPA 150 en la determinació del diàmetre dels liposomes. Així, en funció de l'ajust de les mesures de l'aparell a la realitat, el càlcul del volum encapsulat de liposomes unilamelars a partir de, bé el diàmetre mitjà, bé de la distribució de diàmetres obtinguda, serà més o menys aproximat al volum encapsulat experimental determinat encapsulant $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

Per aquest motiu es prepararen dos tipus de suspensions de liposomes:

- REVs, a partir d'EPC/PA 9:1 (mol/mol)

d'una concentració de fosfolípids de 35 mg/mL en tampó PBS. Es separaren alíquotes per tal d'obtenir diferents tipus de liposomes: No extrusionats, extrusionats fins 800, 400, 200 i 100 nm, i sonicats.

- SUVs, obtinguts a partir de Pro-Lipo S, d'una concentració de fosfolípids de 50 mg/mL, en tampó PBS i processats en el Microfluidizer.

Mitjançant columnes d'exclusió molecular es determinà experimentalment el volum encapsulat. La concentració de fosfolípids dels eluïts es quantificà per la densitat òptica a 550 nm, i la de crom per absorció atòmica.

Paral·lelament, totes les suspensions s'analitzaren en el Microtrack UPA 150 en les condicions establertes en els apartats anteriors. A partir dels resultats de diàmetre es calculà el volum encapsulat de cada tipus de vesícula suposant que aquestes fossin unilamelars (premissa prou justificada tractant-se de REVs i SUVs). El càlcul es dugué a terme a partir de dos paràmetres diferents com són el diàmetre mitjà i la distribució de grandàries en cada canal. Per realitzar-los s'empraren com a dades una àrea molecular transversal de la EPC²² en liposomes de $0,725 \text{ nm}^2$ (Lasic D.D., 1993; Rotenberg M. et al., 1991) i una amplada de bicapa de 4 nm. A partir del diàmetre mitjà, el volum encapsulat, expressat en funció del radi r de les vesícules compleix l'expressió:

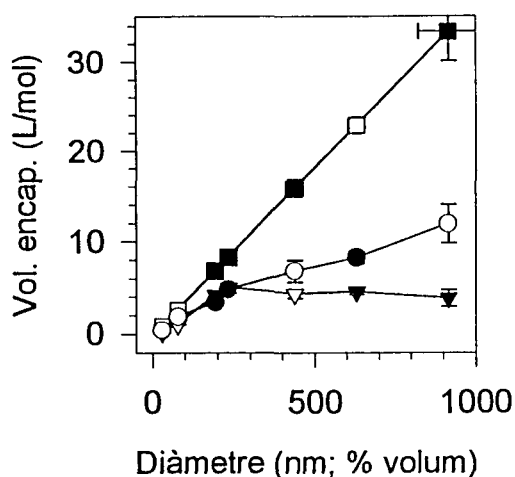


Fig. 69 Volums encapsulats de suspensions de liposomes REVs extrusionades. Els resultats s'han obtingut experimentalment amb $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (○); i a partir de càlculs emprant, en un cas, el diàmetre mitjà de les vesícules (□), i en l'altre, la distribució en número en cada canal (▽). Els símbols blancs indiquen $n=2$ i els negres $n=3$.

²² En la realització dels càlculs no s'ha considerat que, en SUVs, l'àrea transversal de la EPC depèn de la seva localització a la monocapa interna ($0,61 \text{ nm}^2$) o a la monocapa externa ($0,74 \text{ nm}^2$). Com s'observa, el valor mitjà ($0,675 \text{ nm}^2$) és, però, molt proper al dels liposomes grans.

$$V. enc. = \frac{0,07329 r^3}{r^2 + 4r + 8}$$

Si s'obté a partir de la distribució en canals s'expressa com:

$$V. enc. = 0,07329 \sum x_i \frac{r_i^3}{r_i^2 + 4r_i + 8} \quad Eq. 19$$

on:

r_i és el radi intern de la vesícula considerada.

X_i és el percentatge en número en el canal considerat.

En els resultats que es mostren a la Fig. 69, s'observa que és amb el càlcul que pren com a dades la distribució en canals com s'obtenen un valor de volum encapsulat més propers als experimentals. En concret, els millors resultats són pels liposomes petits i fins a un diàmetre de 400 nm. Per sobre d'aquest valor tots els càlculs teòrics s'allunyen progressivament dels resultats experimentals.

SUSPENSIONS DE LIPOSOMES EXTRUSIONATS.

La tècnica de l'extrusió aplicada a l'obtenció de liposomes, permet preparar suspensions amb vesícules amb distribucions de diàmetres força homogènies i que tenen com a valor central el diàmetre del porus d'extrusió. Donat que l'anàlisi de les membranes d'extrusió emprades indiquen una bona relació entre els diàmetres nominals i els reals (Ap. 4.2.2) s'han preparat i analitzat diferents suspensions de liposomes extrusionades i obtingudes amb matèries primeres diferents. En tots els casos el medi aquós fou tampó fosfat sódic 10 mM pH 7,4.

La comparació dels diàmetres obtinguts amb el Microtrack UPA 150 i els dels porus de les membranes d'extrusió corresponents es mostra a la Fig. 70. S'aprecia una bona correlació entre ambdós: el pendent de la recta de regressió comú a tots els punts és de 0,87, fet que ens indica l'exactitud de les mesures de l'aparell.

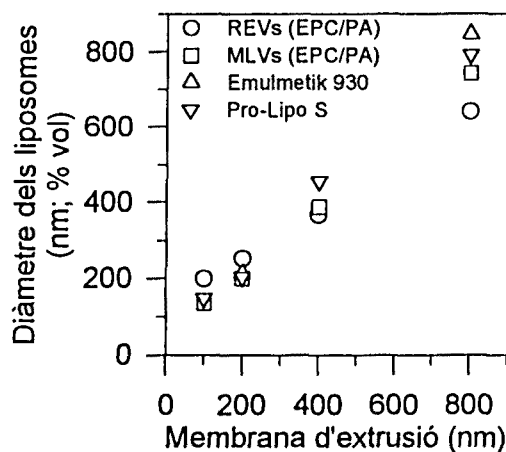


Fig. 70 Relació entre els diàmetres de suspensions de liposomes obtingudes amb diferents fosfolípids i determinats amb el Microtrack UPA 150 i els diàmetres dels porus de les membranes per les quals s'han extrusionat.

4.1.8.7 PRECISIÓ I EXACTITUD EN L'ANÀLISI DE POBLACIONS BIMODALS.

Totes les suspensions amb les quals d'han determinat les característiques analítiques del Microtrack UPA 150 han estat unimodals obtingudes per extrusió o, en el cas dels SUVs, amb el Microfluidizer. En aquest apartat es comparen els resultats anteriors amb els que proporcionen les anàlisi de suspensions amb vesícules de diferent diàmetre.

Inicialment es preparen dues suspensions de liposomes a partir de Pro-Lipo S en tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4 i s'extrusionaren bé fins 800 nm, bé fins 100 nm (Fig. 71a). Es realitzà un mescla (mescla A) en la proporció addient perque l'anàlisi de 10 minuts proporcionés dues poblacions amb una relació propera al 50 % en volum (Fig. 71b). Cadascuna d'aquestes poblacions serà referida com P800 o P100 en relació al seu origen. A partir de la Mescla A i de les suspensions inicials (no mesclades) s'obtingueren dues més que, d'acord amb la relació de volums 1/1 de les mescles i l'anàlisi de la mescla A, haurien de tenir la relació entre poblacions descrita a la Taula 14.

	P100	P800
Mescla A	44 %	56%
Mescla B	72 %	28 %
Mescla C	22 %	78 %

Taula 14 Percentatge en volum de cada població.

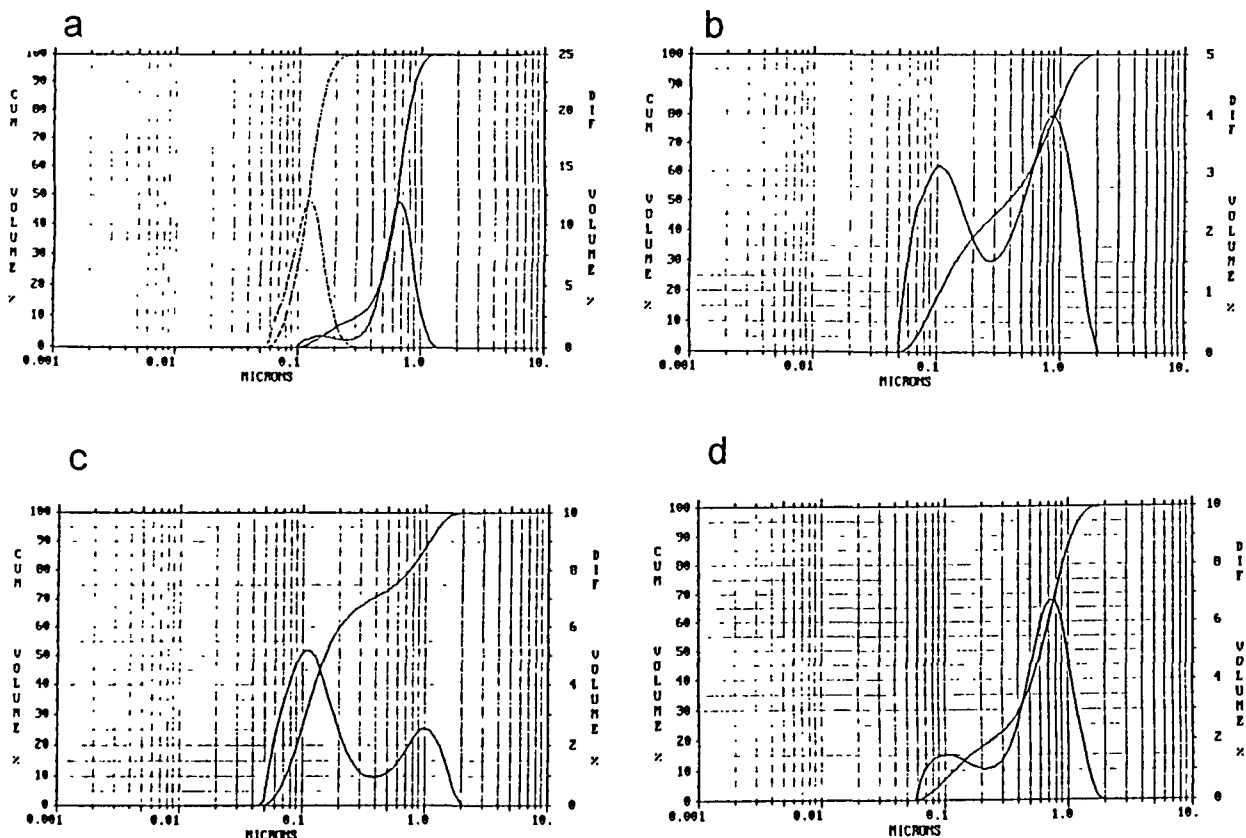


Fig. 71 Distribució de grandàries dels liposomes extrusionats fins 800 o 100 nm (a), de la mescla apropiada de les suspensions anterior per obtenir una relació aproximada del 50 % de cada tipus de vesícula (b), i de les mescles 1/1 v/v de la suspensió anterior amb liposomes extrusionats fins 800 nm (c) o fins 100 nm (d).

Amb les suspensions bimodals anteriors (Fig. 71 c i d) es realitzà el mateix número d'anàlisi i de la mateixa durada que els presentats a la Taula 6 (pàg. 94 x). A partir de la mitjana de les mitjanes de cada temps (equivalent a una lectura de 1h 38 min) s'obtingué el diàmetre i l'amplada de cada tipus de suspensió:

	Mescla A	Mescla B	Mescla C
Diàmetre (nm; % vol)	485± 29	349± 20	625±15
Amplada (nm; % vol)	429± 20	357± 29	420± 23

Taula 15 Diàmetre i amplada de les diferents suspensions bimodals.

La relació entre els coeficients de variació (del diàmetre i de l'amplada) amb el diàmetre mitjà de la població i amb el temps d'anàlisi (Fig. 72 a i b) és equivalent a la de les suspensions unimodals mostrats a la Fig.43. La resta d'anàlisi també indica que la precisió de l'aparell és la mateixa en mostres unimodals i bimodals: la Fig. 72c mostra la desviació standard mitjana en cada canal i la Fig. 72d la variació en canals entre les anàlisi de cada temps. La lletra M indica els resultats pel cas de la mitjana de mitjanes de cada suspensió (Taula 15). Els resultats mostren que en tots el casos tant la variabilitat com el temps d'anàlisi necessari per què aquesta

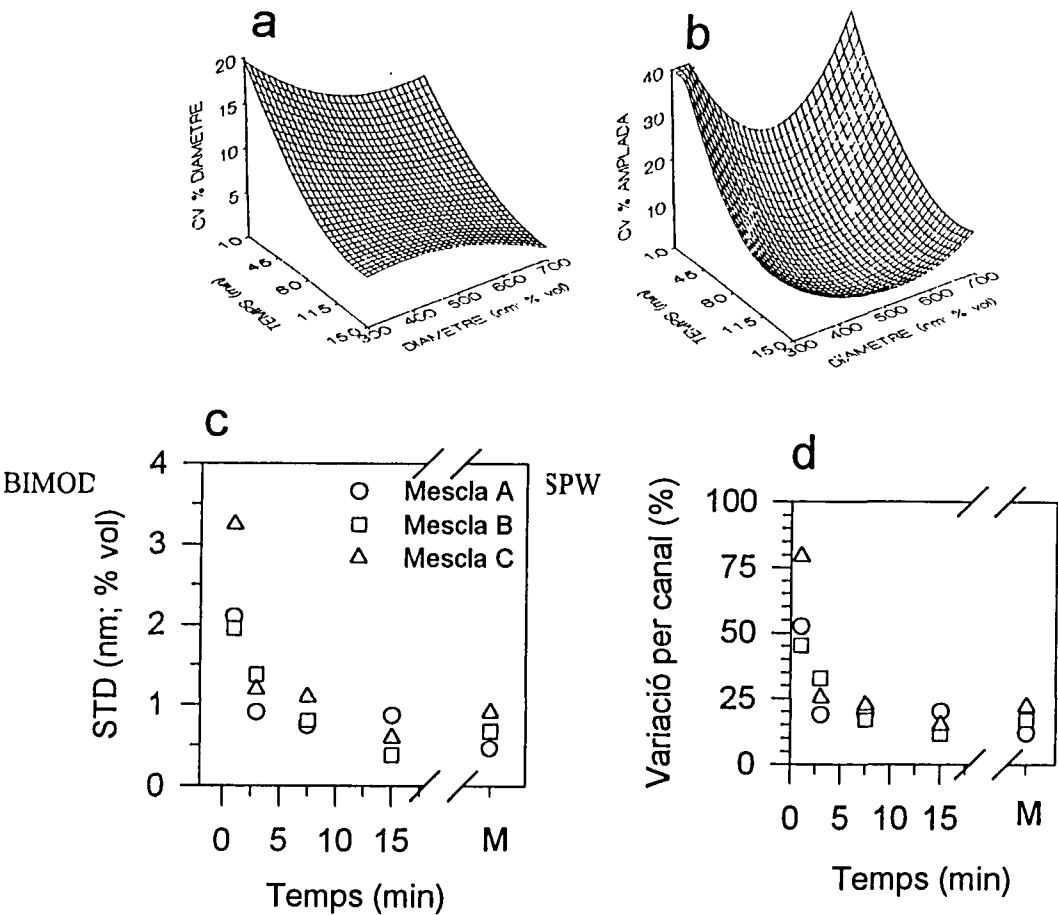


Fig. 72 Coeficient de variació del diàmetre mitjà (a) i de l'amplada (b) de les suspensions bimodals de liposomes. La desviació standard mitjana per cada canal i la variació global en tots els canals es mostren en (c) i (d) respectivament.

sigui mínima són els mateixos que els obtinguts amb poblacions unimodals de liposomes (Fig.49 i Fig. 54).

Totes les determinacions anteriors fan referència al conjunt dels liposomes presents a les suspensions, i no a les diferents poblacions que les formen. És per això que també s’han determinat els coeficients de variació del diàmetre i del percentatge en volum de cada població. El resultats (Fig. 73) mostren que el diàmetre de cada població d’una suspensió bimodal té una indeterminació comparable a la que mostren les mostres amb una única població. Pel que fa a la variabilitat en el percentatge en volum corresponent a cada població, el valor mitjà se situa al voltant del 10 % en cada població, la qual cosa indica una variació del 20 % en total, valor del mateix ordre que el de la diferència en canals de les suspensions unimodals. D’altra banda, cal destacar que algunes de les lectures d’un i de tres minuts varen presentar més de dues poblacions.

Per a la determinació de l’exactitud de l’aparell en l’anàlisi de poblacions bimodals s’empraren dos tipus d’anàlisi. En primer lloc es quantificà la diferència entre els diàmetres de cada pic de les mescles i els de les suspensions inicials no mesclades. Els resultats que es mostren a la Taula 16 corresponen a les mitjanes cada temps, i estan expressats com l’increment de diàmetre respecte al de les suspensions originals segons la relació:

$$\% \text{ Diàm.} = \frac{\text{Diam. } P_i - \text{Diam. } \text{Susp}_i}{\text{Diam } \text{susp}_i} 100$$

Eq. 20

on:
Diam *P_i* indica el diàmetre de la població *i* considerada (P100 o P800),
Diam. *Susp_i*, indica el diàmetre de la suspensió original que causa la població *i* a la mescla.

Temps	Mescla A		Mescla B		Mescla C	
	P100	P800	P100	P800	P100	P800
1 min	-13 %	8,6 %	-6,7 %	36 %	-6 %	5,8 %
3 min	-5,7 %	16 %	-8,1 %	26 %	-13 %	1,6 %
7,5 min	-8,1 %	19 %	-5,7 %	44 %	-13 %	9,0 %
15 min	-8,1 %	21 %	-8,1 %	32 %	-9,5 %	7,7 %
1h 38 min (M)	-9,8 %	18,3 %	-7,5 %	32 %	-9,8 %	7,7 %
Mitjana	-7,3 %	16,6 %	-7,2 %	34 %	-10,3 %	6,4 %

Taula 16 Increment del diàmetre de cada població respecte del diàmetre de la població original.

S’observa que en tots els casos hi ha un desplaçament de la posició de cada població. En el cas de les de diàmetre petit, l’aparell les situa a diàmetres menors que els de les

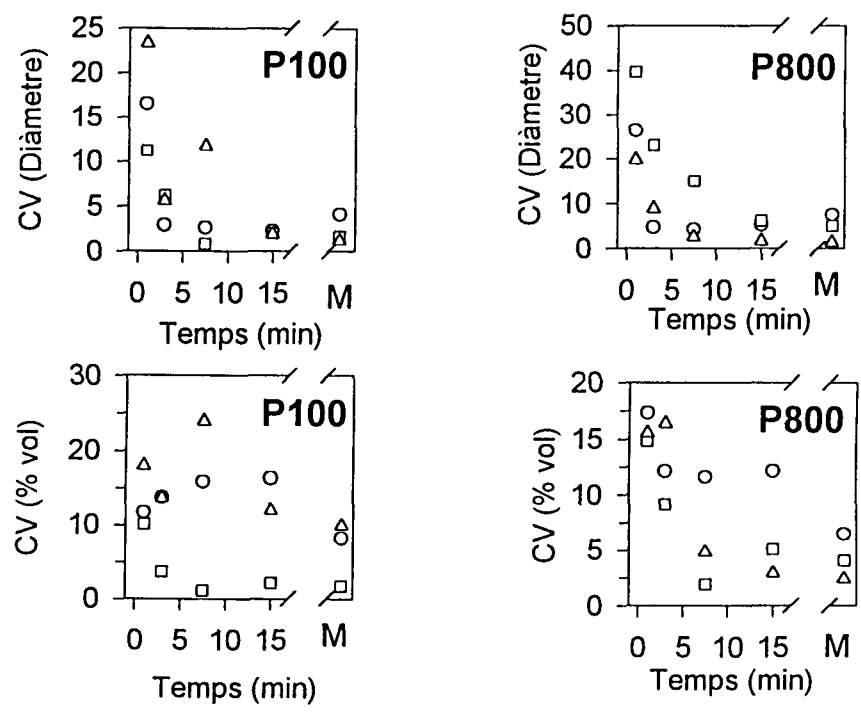


Fig. 73 Coeficient de variació del diàmetre i del percentatge en volum de cada població de les suspensions bimodals: (o) Mescla 1; (□) Mescla 2; (Δ) Mescla 3.

poblacions de referència, passant el contrari amb les poblacions de diàmetre gran. D'altra banda, en disminuir la quantitat relativa d'un tipus de vesícula s'incrementa la seva desviació, i aquest efecte és més important en el cas dels liposomes de major grandària.

El segon paràmetre que s'ha emprat per determinar l'exactitud ha estat el percentatge en volum de cadascuna de les poblacions. S'ha comparat el seu valor amb el que claudria esperar (Taula 14) com a conseqüència de la relació en volums de les suspensions emprades en la seva preparació. A la Taula 17 es mostren els resultats expressats com el percentatge de variació respecte del valor esperat (calculat de manera anàloga al la variació del diàmetre que indica l'equació 20).

Temps	Mescla B		Mescla C	
	P100	P800	P100	P800
1 min	-5%	-3,6 %	1,4 %	-7,6 %
3 min	-0,7 %	1,8 %	-20 %	-0,8 %
7,5 min	-3,2 %	8,2 %	-24 %	6,8 %
15 min	-2,4 %	6,1 %	-12,3 %	3,5 %
1h 38 min (M)	-2,4 %	6,1 %	-12,7 %	3,5 %
Mitjana	-2,7 %	3,7 %	-13,5 %	1,1 %

Taula 17 Increment del percentatge en volum de cada població respecte del volum previst.

Únicament la població de petit diàmetre en la mescla C (on és el component minoritari)

té una disminució significativa respecte del valor esperat.

En conjunt, aquests resultats indiquen que els resultats de les anàlisi de poblacions bimodals presenten un desplaçament del diàmetre de cada població, però que això té lloc sense que es produeixi una variació important del percentatge en volum assignat a cadascuna d'elles.

4.1.9 AVALUACIÓ DELS PARÀMETRES DE LA VELOCIMETRIA DE LÀSER DOPPLER.

Prèviament a la determinació del poder vasoconstrictor del butirat-propionat d'hidrocortisona, s'ha realitzat una anàlisi dels paràmetres que s'obtenen amb aquesta tècnica, i de les relacions entre ells. Els resultats es mostren a la Fig.74 i a la Taula 18 .

Com s'observa hi ha una bona correlació entre t_0 i t_M , i entre A_0 i ΔI , mentre que qualsevol altre creuament de paràmetres no indica interrelació. La relació entre els temps coincideix amb la trobada per Oestman E. et al. (1993) en estudis realitzats amb nicotinat d'hexil.Les correlacions observades ens permeten caracteritzar les respostes dels subjectes d'una manera més precisa i ràpida. En emprar t_0 com a indicador de la funció barrera de la pell

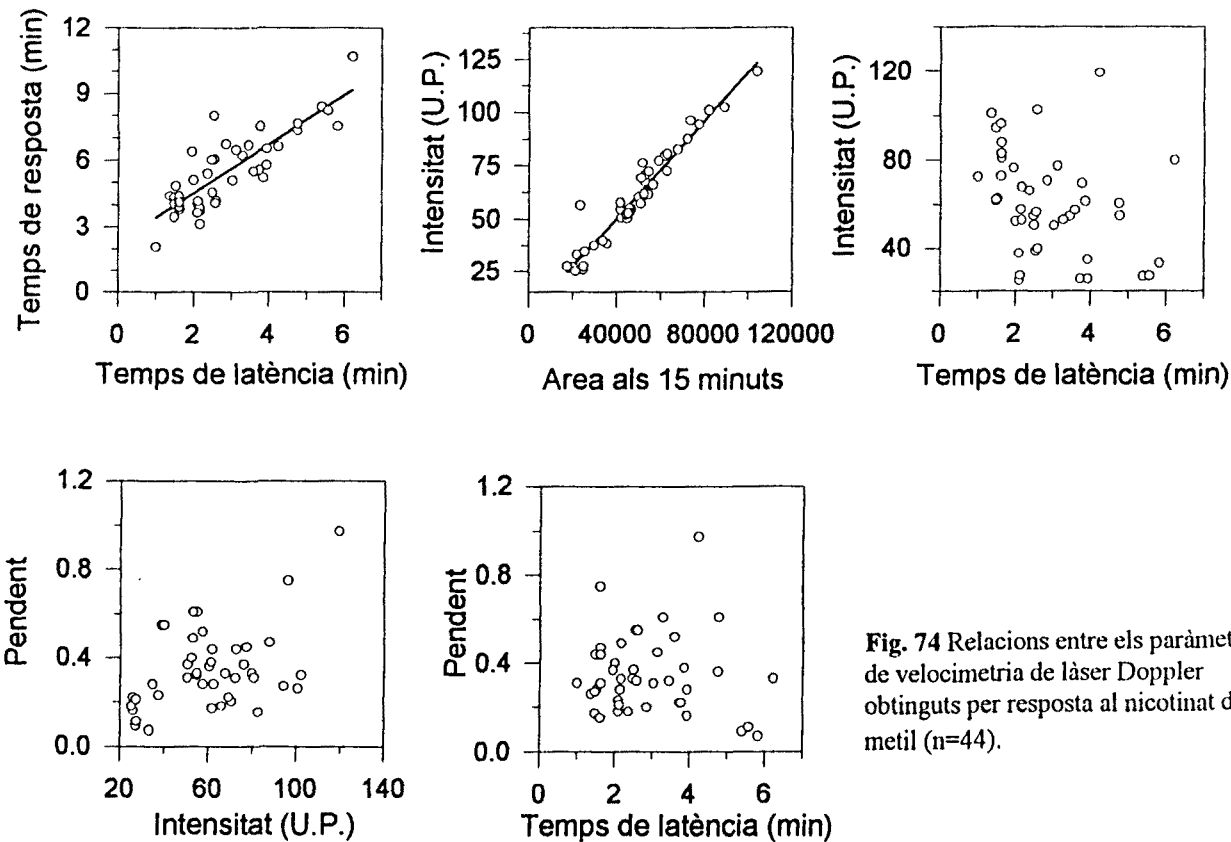


Fig. 74 Relacions entre els paràmetres de velocimetria de làser Doppler obtinguts per resposta al nicotinat de metil (n=44).

(Guessant et al., 1993) evitem les imprecisions en la determinació de t_M quan la resposta presenta un planell previ al màxim (Ap. 3.1.3.3). De la mateixa manera, l'elecció de ΔI enlloc d' A_{15} com a indicador de la microcirculació -i per tant de la inhibició de vasodilatació que causa l'HBP-, permet obtenir un paràmetre significatiu en un temps menor, ja que en tots els casos estudiats s'ha assolit la intensitat màxima en menys de 10 minuts des del valor de t_0 .

	Relació	
	t_M v t_0	ΔI v A_{15}
Coeficient de determinació (r^2)	0,708	0,981
Coeficient de regressió (r)	0,842	0,963
Test de significació de la correlació ($F_{1,43}$); ($4,00 < F_{crit} < 4,08$)	104	1096
Error standard	0,938	4,46

Taula 18 Resultats de l'anàlisi de les relacions entre diferents paràmetres que proporciona la resposta al nicotinat de metil.

Per tal de caracteritzar la cinètica de la disminució del senyal màxim fins el nivell basal, es varen realitzar sis lectures d'1 hora de durada en voluntaris als quals no s'aplicà el fàrmac prèviament a l'exposició al nicotinat de metil. La intensitat del senyal als 60 minuts, o el temps necessari per retornar a $I_M/2$, no es correlacionaren amb cap dels paràmetres tractats anteriorment no resultant, a més, reproduïbles en realitzar replicats en un mateix individu.

Consegüentment, els paràmetres escollits per carateritzar la resposta front al nicotinat de metil foren el temps de latència t_0 , i l'increment del senyal ΔI , no determinant-se en cap cas cap variable que avalués el retorn fins al nivell basal.

4.1.10 AVALUACIÓ DE L'ERROR DE L'ANALITZADOR D'IMATGES.

Per determinar l'error experimental que comporta la mesura de distàncies amb l'analitzador d'imatges Olympus Cue-3, es compararen les lectures experimentals amb les nominals corresponents a un micròmetre calibrat Wild (Heerburg, Suïssa). Es realitzà un mínim de 10 lectures de distàncies compreses entre línies separades 10, 100 i 500 μm . Els resultats es mostren a la Taula 19.

Taula 19	Distància (μm)							
	5	10	15	20	50	100	150	250
Micròmetre								
Cue-3	5,4±0,89	10,2±0,98	14,8±0,98	19,6±0,3	50,1±1	101±2	152±2	250±2

L'error experimental màxim per a les lectures situades entre 5 i 20 μm és d'1 μm , mentre que per a les compreses entre 50 i 250 μm és de 2 μm .

4.2

RESULTATS DELS MÈTODES PREPARATIUS.

Aquest apartat inclou els resultats experimentals dels mètodes preparatius emprats de forma rutinaria (purificació de fosfolípids, mètodes de separació de liposomes i de molècules encapsulades) i la posta a punt d'altres (utilització del Microfluidizer).

En particular, l'estudi dels factors que afecten a la producció de liposomes amb el Microfluidizer s'ha realitzat de forma detallada, presentant-se en els diversos subapartats l'anàlisi de la variança exposada al capítol 3.3.1. La pressió de treball, el número de cicles que es processa la mostra, la força iònica del medi, i la concentració d'etanol, són les variables que s'han analitzat detalladament a l'apartat 4.2.5.

4.2.1 PURIFICACIÓ DE LA FOSFATIDILCOLINA D'OU.

La purificació tingué un rendiment global del 2,6 % referit al pes inicial de rovell d'ou. La dissolució final en cloroform del producte purificat mostrà, per cromatografia en capa prima, una única taca fosfolípid-positiu corresponent a l'EPC. L'espectre FTIR de la Fig. 75 correspon a aquest fosfolípid. A la Taula 20 es mostra l'assignació directa dels pics sense cap tractament matemàtic de l'espectre.

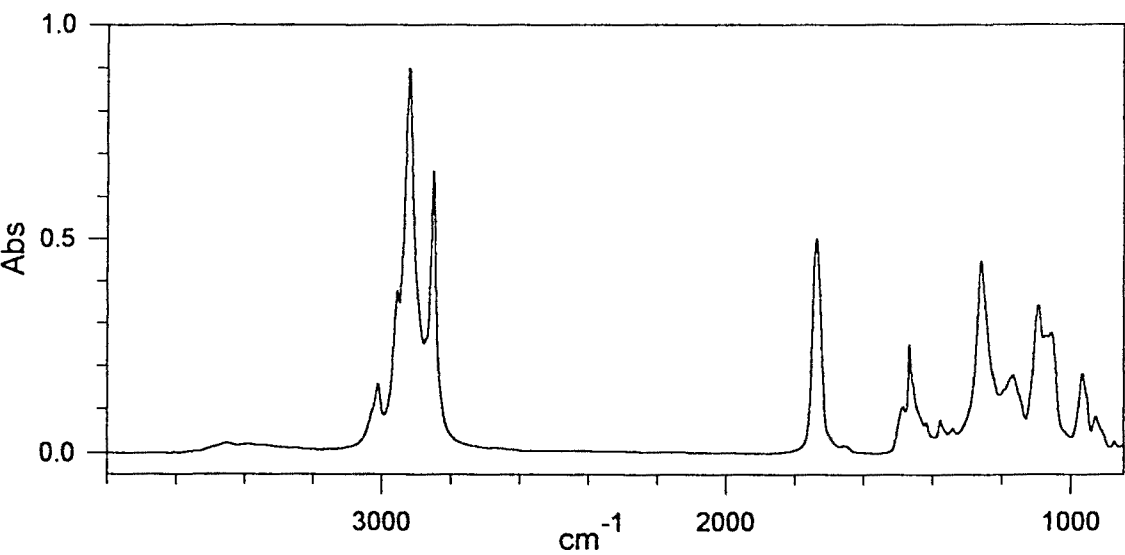


Fig. 75 Espectre d'absorció a l'infraroig de la fosfatidilcolina d'ou purificada.

Freqüència (cm ⁻¹)	Origen	Freqüència (cm ⁻¹)	Origen
3500-3100	H ₂ O d'hidratació	1468	Deformació CH ₂
3011	Tensió =C-H	1377	Deformació CH ₃
2955	Tensió ant CH ₃	1260	Tensió ant P=O
2921	Tensió ant CH ₂	1169	Tensió ant CO-O
2851	Tensió sim CH ₂	1095	Tensió sim P=O
1737	Tensió C=O (éster)	1073	Tensió sim CO-C
1654	Tensió C=C	1057	Tensió C-O-PO ₂
1487	Deformació N ⁺ -(CH ₃) ₃	968	Tensió N ⁺ (CH ₃) ₃

Taula 20 Assignació del pics de l'espectre d'infraroig de l'EPC.
(sim: vibr simètrica; ant: vibr. antisimètrica).

L'índex d'oxidació inicial fou de 0,143, amb un percentatge d'oxidació de 0,609 μmol diens/μmol F. Aquests valors corresponen a un fosfolípid en un bon estat de conservació (Biblio 46.2/7.3) que presenta els nivells normals d'autooxidació. L'anàlisi de les cadenes d'àcid gras

mitjançant cromatografia de gasos donà la composició presentada a la Taula 21, valors que també es corresponen amb els descrits (Dahim M. et al., 1998; Lang J.K. i Vigo-Pelfrey C., 1993; Yamamoto Y. et al., 1984).

Cadena d'àcid gras	16:0	18:0	18:1	18:2
% molar	34,3	16,4	30,1	19,3

Taula 21 Composició molar de les cadenes d'àcid gras de l'EPC purificada.

4.2.2 DETERMINACIÓ DELS DIÀMETRES DE PORUS DE LES MEMBRANES D'EXTRUSIÓ.

L'anàlisi de les membranes d'extrusió es realitzà segons el descrit a l'Ap. 3.1.2.7. Es prengueren 2 mostres de membranes de 100, 200, 400 i 800 nm de diàmetre de porus i fotografiaren, com a mínim, 8 camps visuals. Cada tipus de membrana fou fotografiada a uns augments que permetessin realitzar les mesures de les grandàries dels porus amb una bona resolució.

A partir de les fotografies es determinà l'error experimental de la mesura de distàncies. Per a tal fi, amb un llapis electrònic i un software propi del departament de microscòpia de la UAB, es realitzaren lectures replicades de distàncies conegudes a les diferents escales de treball utilitzades. Aquestes distàncies de referència són les que figuren a la part inferior de les

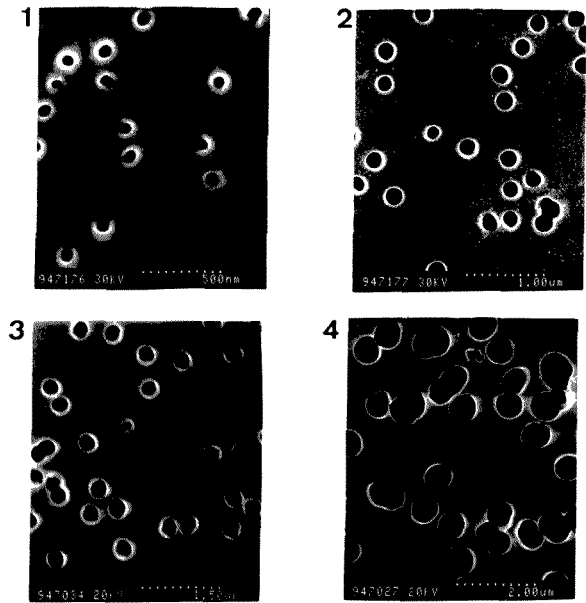


Fig.76 Fotografies de microscopia electrònica de membranes de policarbonat amb porus de 100 nm(1), 200 nm (2), 400nm (3) i 800 nm. A la part inferior de les fotografies es mostra l'escala de treball: la distància indicada correspon als extrems de la línia puntejada.

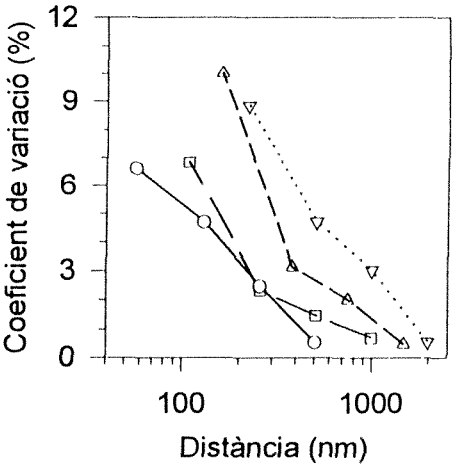


Fig. 77 El coeficient de variació en la lectura de la grandària dels porus de les membranes d'extrusió varia en funció de l'escala de treball. Escala emprada per les lectures de membranes de: 100 nm (○), 200 nm (□); 400 nm (Δ);800 nm (▽).

fotografies (Fig. 76). Els resultats es mostren a la Fig.77. En ells s’observa que a cada escala de treball el coeficient de variació és una funció de la distància mesurada. A partir d’aquests resultats s’establiren els intervals de classe en els quals s’agruparen les mesures dels diàmetres dels porus. Els increments en els intervals, que foren sempre superiors a la desviació standard màxima trobada per cada augment, van ser els següents: 10 nm per les membranes de 100 nm, 10 nm per les de 200 nm, 20 nm per les de 400 nm, i 30 nm per les de 800 nm.

Una vegada determinat l’error en les mesures, es procedí a la mesura del diàmetre dels porus de les membranes. Als valor experimentals se’ls sumà 20 nm per tal de corregir l’acumulació d’or als límits de cada porus. Els resultats es presenten a la Fig. 78 i a la Taula 22, on s’aprecia una bona relació entre els valors nominals del fabricant i els experimentals.

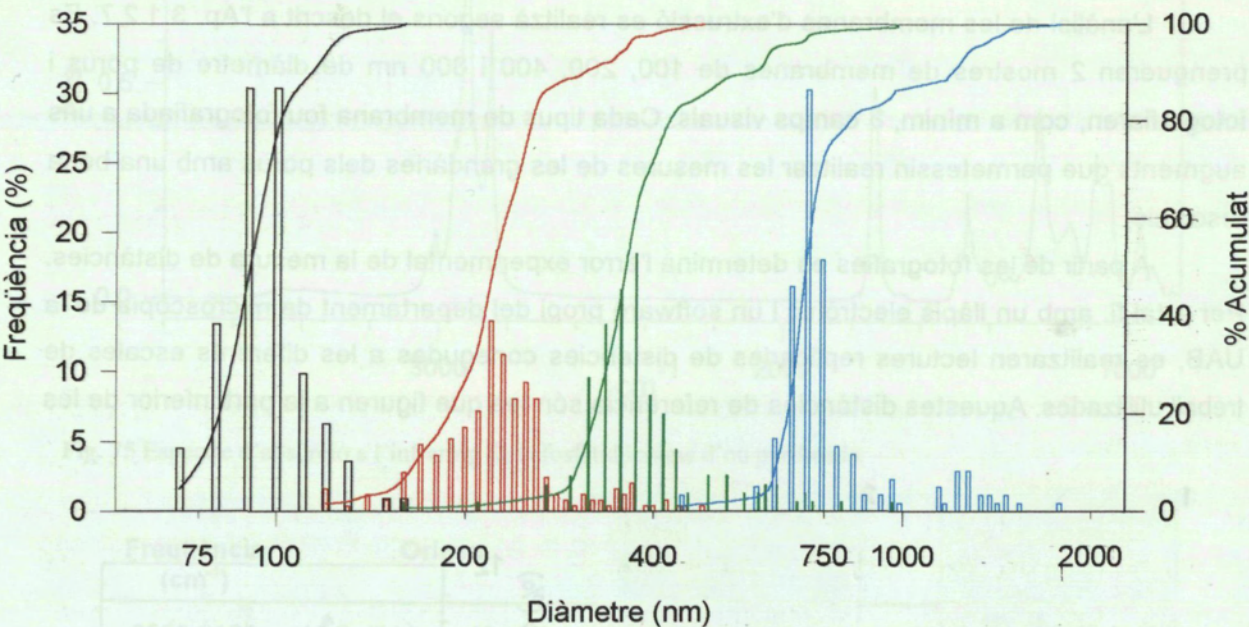


Fig. 78 Distribució de freqüències i percentatges acumulats dels diàmetres dels porus de diferents membranes d’extrusió. Membranes de: 100 nm (□); 200 nm (■); 400 nm (■); 800 nm (■);

	Membr. 100	Membr. 200	Membr. 400	Membr. 800
n	112	249	157	172
Camps visuals	13	11	8	12
Mitjana (nm)	100	230	400	800
Std	15	60	110	220
Moda	95	220	375	705
Valor mínim	70	120	160	440
Valor màxim	160	480	960	1780

Taula 22 Resultats de l’anàlisi de les membranes d’extrusió.

4.2.3 QUANTIFICACIÓ DE LA PÈRDUA DE FOSFOLIPID DURANT L'EXTRUSIÓ I DURANT EL PROCESSAMENT EN EL MICROFLUIDIZER.

S'avaluà la possible pèrdua de fosfolípid durant la preparació de liposomes mitjançant aquestes dues tècniques. En el cas de l'extrusió, es feu passar una suspensió de liposomes obtinguda a partir de Pro-Lipo S, a través de membranes de policarbonat fins a la de porus de 100 nm i, segons es descriu a l'Ap. 3.1.1.1, s'analitzà la concentració de fosfolípid en les diferents etapes d'extrusió. Els resultats, expressats en percentatge de la concentració de la suspensió mare no extrusionada ($21\pm1,1$ mg F /mL), es presenten a la Taula 23, on s'aprecia que no hi ha cap diferència significativa entre les diferents suspensions obtingudes.

	Extr. 800	Extr. 400	Extr. 200	Extr. 100
% Concentració inicial	100,5 ± 7	101,4 ± 7	101,9 ± 6	105,5 ± 3

Taula 23 Percentatges de fosfolípid en cada etapa d'extrusió referents a la concentració inicial.

Per tal de determinar l'existència o no de variacions de la concentració de fosfolípids durant la preparació de liposomes amb el Microfluidizer, es comparà la concentració de suspensions mare de tres concentracions diferents amb les obtingudes a partir d'elles processant-les diferent número de cicles i a diverses pressions de treball. Així s'obtingué una suspensió inicial per agitació de Pro-Lipo S amb la quantitat de tampó fosfat sódic 10 mM pH 7,4 necessària per obtenir una concentració de 100 mg F/mL. Les concentracions menors s'obtingueren per dilució de la suspensió anterior en el mateix tampó. Els nivells dels factors es distribuïren segons una estrella. Els nivells absoluts, els codificats i els resultats, expressats aquests com a percentatge de la concentració inicial abans del procesament amb el Microfluidizer, es mostren a la Taula 24.

Concentració inicial de fosfolípid (mg/mL)	Cicles	Pressió	n	% recuperat
10 (-0,8)	5 (0)	2,4 (0)	1	103,2
100 (1)	5 (0)	2,4 (0)	1	95,1
50 (0)	5 (0)	0,8 (-1)	2	95,2±6,8
50 (0)	5 (0)	4 (1)	2	97,5±2,1
50 (0)	5 (0)	2,4 (0)	1	99,8
50 (0)	9 (1)	2,4 (0)	1	93,2
50 (0)	1 (-1)	2,4 (0)	1	99,0

Taula 24 Convinacions de nivells dels factors emprats en la quantificació de fosfolípid de les suspensions obtingudes amb el Microfluidizer (entre parèntesi s'indica el valor codificat), i percentatges de la recuperació de fosfolípid en les suspensions obtingudes. Els valors estan referits a les suspensions mare inicials (mitjana±std).

L'anàlisi dels resultats (ajust de la superfície de resposta) mostra la independència de la recuperació de fosfolípids respecte de les variables emprades:

$$\% \text{ Recuperació} = 97,3; \quad \text{Std} = 3,95$$

El valor mitjà obtingut està dins de l'error experimental del mètode analític (~5%), fet pel que considerem que el tractament amb el Microfluidizer no causa una disminució significativa de la concentració de la suspensió inicial.

4.2.4 SEPARACIÓ DE SUBSTÀNCIES NO ENCAPSULADES.

Per calcular l'encapsulació de diferents substàncies en liposomes s'han emprat mètodes que permeten separar les vesícules del medi aquós inicial en el qual es troben. D'aquesta manera, la quantificació de les molècules en una o altra fracció permet obtenir la relació entre la quantitat de substància en liposomes i el total en la preparació. Els mètodes emprats s'han basat en la cromatografia d'exclusió molecular, en la centrifugació, i en la ultrafiltració (Ap 2.2.4), estudiant-se prèviament al seu ús, la seva efectivitat per cadascuna de les molècules a les quals es pretenien aplicar.

4.2.4.1 COLUMNS D'EXCLUSIÓ MOLECULAR (Sephadex G-25).

La efectivitat d'aquesta tècnica depengué de caràcter hidrofòbic/hidrofílic de les molècules encapsulades en liposomes. En el cas de les molècules hidrofòbiques només s'emprà ocasionalment. Així, en els casos del DT, HC i HBP, l'excés de fàrmac insoluble en aigua i no encapsulat, present en forma sòlida a les preparacions, quedà retintut a la part superior de les columnes i obligà a emprar-les una única vegada. Com a model d'elució d'aquestes tres molècules s'utilitzà la HC, ja que és la que té una major solubilitat en aigua i, per tant, la que pot eluir-se a una concentració més alta en les primeres fraccions sense que estigui encapsulada en liposomes.

A la Fig. 79 es mostren les elucions de 200 µL de diferents suspensions de liposomes (SUVs i MLVs) i de 200 µL de tampó saturat d'HC, aplicats per separat. Pel que fa als liposomes, s'elueixen en les mateixes fraccions independentment del seu diàmetre, fet pel qual al gràfic es representa la seva mitjana. En referència al fàrmac i les vesícules, s'aprecia que es produeix

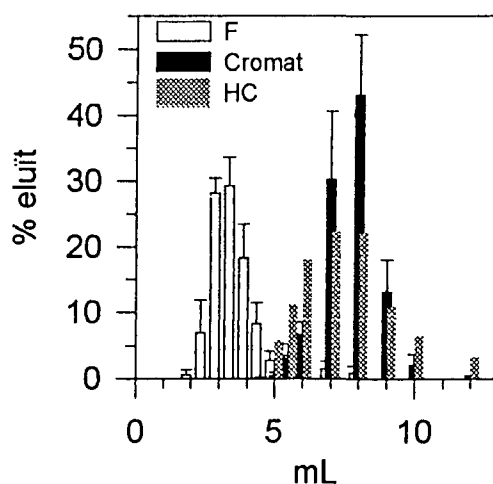


Fig. 79 Elució en columnes d'exclusió molecular de Sephadex G-25 de liposomes (n=4), hidro cortisona no encapsulada (n=3), i cromat no encapsulat (n=2).

una bona separació, de forma que poden obtenir-se fraccions amb liposomes exemptes d'HC no encapsulada.

Pel que fa a l'OB, la tècnica no resultà aplicable: les microgotetes inestables que s'obtenen al processar al Microfluidizer l'oli i tampó s'elueixen tot seguit del volum mort de la columna, la qual cosa impedeix separar-les de les que s'obtenen amb fosfolípids.

En el present treball, l'única molècula soluble en aigua que s'ha encapsulat és el cromat, tot fent-la servir com a marcador del volum intern dels liposomes. Per tal de determinar la validesa de la tècnica es realitzaren aplicacions de 200 µL de tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4, amb $1,04 \cdot 10^5$ ppb de crom. Els resultats de les cromatografies es mostren a la Fig. 79, on s'aprecia que a les fraccions més riques en liposomes no té lloc l'elució del cromat.

4.2.4.2 MINICOLUMNES D'EXCLUSIÓ MOLECULAR (SEPHADEX G-50).

Per tal d'avaluar l'eficàcia d'aquest mètode per a la determinació de l'encapsulació de cromat i d'hidrocortisona en liposomes, s'ha comprovat la seva capacitat de separació dels liposomes del material no associat a ells. Així, s'elueixen per separat liposomes i dissolucions de cromat i d'hidrocortisona per tal d'obtenir els perfils d'elució i quantificar cada substància en les fraccions recollides. La determinació de fosfolípids s'ha realitzat mitjançant lectures de densitat òptica a 550 nm (Ap. 3.1.1.2), empran-se tècniques específiques per les quantificacions del crom (absorció atòmica) i la hidrocortisona (HPLC).

Pel que fa als liposomes, es determinà, per separat, el perfil d'elució d'aplicacions de 0,1 mL de suspensions de MLVs i de SUVs, ambdúes a una concentració de 50 mg/mL. L'elució en les mateixes fraccions fa que es representi la mitjana a la Fig. 80. L'elució de les substàncies a encapsular es determinà aplicant 0,1 mL de dissolucions seves ($1,04 \cdot 10^5$ ppb de crom; hidrocortisona a saturació) en tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4. Els resultats es mostren a la Fig. 80.

S'observa que el mètode permet separar de forma eficient els liposomes de la hidrocortisona dissolta en el tampó, de forma que és aplicable per a la determinació de la seva encapsulació. Pel que fa al cromat, la presència d'aproximadament un 0,14% de l'aplicat en les primeres fraccions resulta una interferència molt important en el cas dels SUVs: tenint en compte els valors previstos a la bibliografia, representa al voltant del 20 % del valor

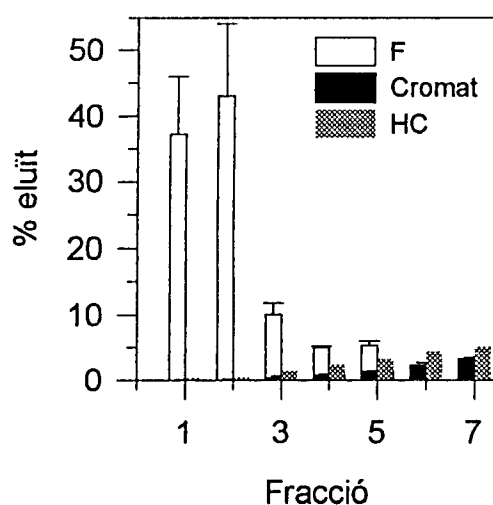


Fig. 80 Perfils d'elució de liposomes (n=4), hidrocortisona (n=3) i cromat (n=2) en minicolumnes d'exclusió molecular.

que proporcionaria el cromat encapsulat en aquest tipus de liposomes.

4.2.4.3 CENTRIFUGACIÓ.

Donat que la velocitat de sedimentació dels liposomes depèn, entre altres factors, de la seva grandària, es determinaren, en funció del diàmetre dels liposomes, les condicions idònies per a la separació del material no encapsulat molt poc soluble en aigua i present en forma sòlida en les preparacions amb DT, HC i HBP. Els diferents tipus de preparacions assajades foren:

- i/ Suspensions que presentaren vesícules (totes o una part) més grans d'1 µm. Aquest tipus de liposomes foren emprats, en un major número d'ocasions, per a l'encapsulació del DT.
- ii/ Suspensions que presentaren vesícules menors d'1 µm de diàmetre. Aquest tipus de liposomes foren emprats, en major un major número d'ocasions, per a l'encapsulació de l'HC i l'HBP.

Com a punt de partida comú per a tots els casos, es prepararen dissolucions saturades de cada fàrmac afegint a tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4 un excés de sòlid i mantenint-hi agitació, a la foscor, durant 24 hores. La posterior centrifugació d'alíquotes de cada mescla durant diferents temps, i la quantificació de cada fàrmac en els sobrenedants, permeten determinar el temps mínim de centrifugació (temps a partir del qual les concentracions als sobrenedants són constants) i llurs solubilitats en medi aquós (la mitjana dels valors anteriors). Els resultats han estat els següents²³:

Fàrmac	Gravetats	Temps mínim (min)	Solubilitat (mg/mL)
Ditranol	1.100	2,5	<0,01 (n=3)
Hidrocortisona	12.500	1	0,327±0,051 (n=4)
But-prop-hidrocortisona	12.500	1	0,0102±0,0005 (n=4)

Taula 25 Solubilitats dels fàrmacs en medi aquós (tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4).

Abans de donar-los com definitius cal, però, estudiar l'efecte de la centrifugació en la sedimentació dels liposomes en els dos tipus de suspensions esmentats anteriorment.

SUSPENSIONS AMB LIPOSOMES MÉS GRANS D'1 µm.

Per tal d'evitar en el possible la sedimentació dels liposomes, les centrifugacions es realitzaren a 1100 x g (a 4°C). En una primera etapa, s'estudià l'efecte del temps de centrifugació en la sedimentació dels liposomes, i posteriorment, degut a la viscositat de les mostres

²³ La centrifugació del DT a menys gravetats es deu a que part de les vesícules en les que s'encapsulà tenien diàmetres majors d'1 µm, fet pel qual són susceptibles de sedimentar ràpidament.

d'elevada concentració de fosfolípid, s'avaluà l'eliminació del DT sòlid present en excés a les suspensions de liposomes.

La concentració de fosfolípid de les suspensions abans i després de la seva centrifugació es quantificà mitjançant el rectiu de Steward, analitzant-se el sobrenedant en el cas de les mostres centrifugades. Els factors escollits foren la concentració de fosfolípids i el temps de centrifugació, determinant els nivells, aproximadament, amb un disseny d'estrella, i amb tres replicats de mostres independents en el valor central. Els liposomes s'obtingueren per agitació a partir de Pro-Lipo S, en medi de tampó fosfat sòdic 10 mM, pH 7,4. El volum centrifugat fou sempre de 2 mL, recollint-se com a sobrenedant, aproximadament, entre un 90 i un 95 % del volum total centrifugat. Els resultats, expressats com a percentatge de la concentració de la mostra no centrifugada, es mostren a la Taula 26.

Conc. F (mg/mL)	Temps (min, seg)	% Conc. Inicial
150 (3)	6' 15" (0)	104 ± 4
75 (0)	2' 30" (-1)	103 ± 2
75 (0)	6' 15" (0)	101 ± 6
75 (0)	10' 00" (1)	100 ± 6
50 (-1)	6' 15" (0)	96 ± 2

Taula 26 Percentatges de recuperació de fosfolípid, en els sobrenedants de suspensions centrifugades. Entre parèntesi s'indiquen els valors codificats.

L'ajust d'una superfície de resposta dins del rang treballat mostrà la independència del percentatge de fosfolípid en els sobrenedants respecte dels dos factors escollits (% conc. Inicial

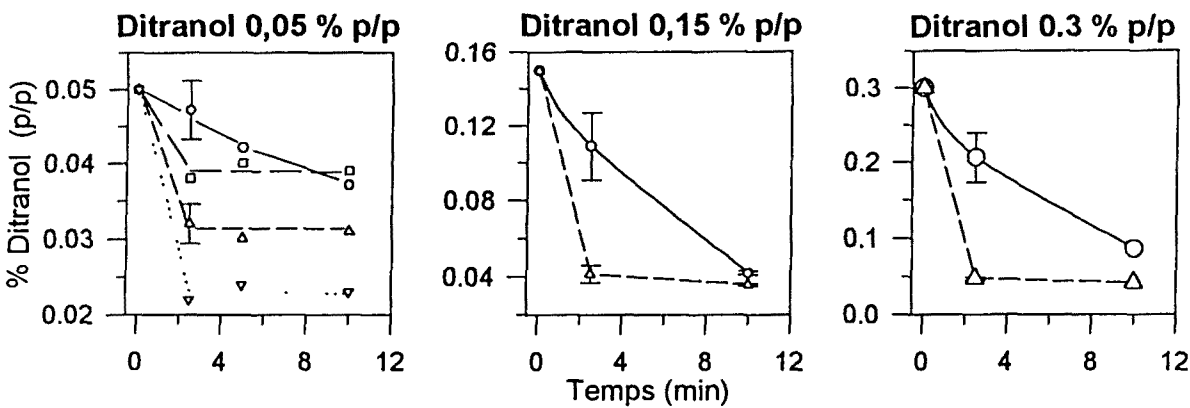


Fig. 81 Sedimentació mitjançant centrifugació a 1.100 x g del ditranol en excés en suspensions de liposomes. Els gràfics mostren les concentracions del fàrmac en els sobrenedants. El temps mínim per a la seva eliminació depèn de la quantitat inicial de fàrmac present (0,05; 0,15 o 0,3 % p/p) i de la concentració de fosfolípids: (○) 150 mg/mL; (□) 100 mg/mL; (△) 75 mg/mL; (▽) 50 mg/mL.

= 101±1). Per tant, dins dels límits de concentració i temps anteriors, no es produeix cap sedimentació detectable d'aquest tipus de liposomes.

Degut que les suspensions de liposomes de diàmetres relativament grans i a altes concentracions de fosfolípid tenen una viscositat elevada, es valorà l'eliminació del ditranol en presència d'aquest tipus de liposomes. Es prepararen suspensions de liposomes amb ditranol a partir de Pro-Lipo S emprant diferents concentracions inicials de fàrmac i de fosfolípid. Els resultats de les centrifugacions (1.100 x g) es mostren a la Fig. 81. S'aprecia que el temps mínim per l'eliminació del fàrmac en excés depèn de la composició de la mostra, i que en tots els casos als 10 min ja ha sedimentat tot el ditranol sòlid present a les preparacions. D'acord amb els resultats anteriors, s'establí, per a les suspensions que contenen liposomes majors d'1 µm i amb concentracions iguals o menors a 100 mg F/mL, un temps de centrifugació de 2,5 min a 1100 x g i a 4º C, i per aquelles amb una concentració major, un temps de centrifugació de 10 min en les mateixes condicions.

Quan fou necessari un control de la concentració de fosfolípids, es comprovà que les condicions anteriors no produïen la sedimentació de liposomes determinant la densitat òptica de dilucions de la suspensió mare i de la mostra centrifugada (Ap. 3.1.2.4).

SUSPENSIONS AMB LIPOSOMES DE DIÀMETRE MENOR A 1 µm.

Les molècules encapsulades en aquest tipus de liposomes foren DT, HC i l'HBP. Es determinà el temps de centrifugació mínim en microtubs a 12.500 x g que permetia l'eliminació del fàrmac en excés no solubilitzat. Consegüentment amb els resultats anteriors pels liposomes més grans d'1 µm, s'assajà la sedimentació de liposomes a una única concentració inicial.

La Fig. 82 mostra les concentracions de fosfolípid i HBP en els sobrenedants d'alíquotes d'una suspensió de liposomes (Pro-Lipo S, processada en el Microfluidizer 3 cicles, C3, a una pressió d'entrada de 3 bars, p3: resumidament C3p3) i centrifugades diferents intervals de temps. Els resultats mostren que

quan la centrifugació té una durada superior a 1 min, té lloc la sedimentació dels liposomes, alhora que es manté constant la relació fàrmac/fosfolípid en els sobrenedants. Aquest fet posa de manifest que en menys d'1 minut ja s'ha eliminat l'excés del fàrmac sòlid, de manera que a continuació es produeix la sedimentació dels liposomes que contenen el fàrmac

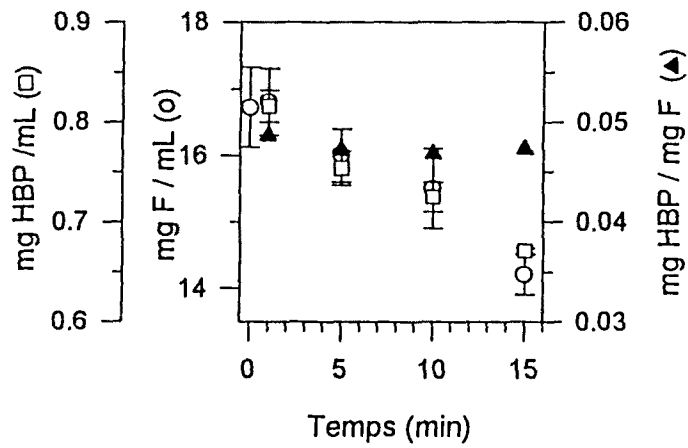


Fig. 82 Sedimentació de liposomes amb HBP en funció del temps de centrifugació a 12.500 x g.

encapsulat (Fig. 83).

Com l'HBP és el menys soluble dels dos corticoides amb els quals s'ha treballat, els resultats anteriors són extensibles a la HC.

Donats els resultats anteriors, per a les suspensions de liposomes amb diàmetres menors a 1 μm , es determinà un temps de centrifugació mínim d'1 min a 12.500 x g a 4°C.

Com en el cas anterior per liposomes majors d'1 μm , quan fou necessari un control qualitatiu de la concentració de fosfolípids, es determinaren les DO de dilucions d'aliquotes de la mare i dels sobrenedants (Ap. 3.1.2.4).

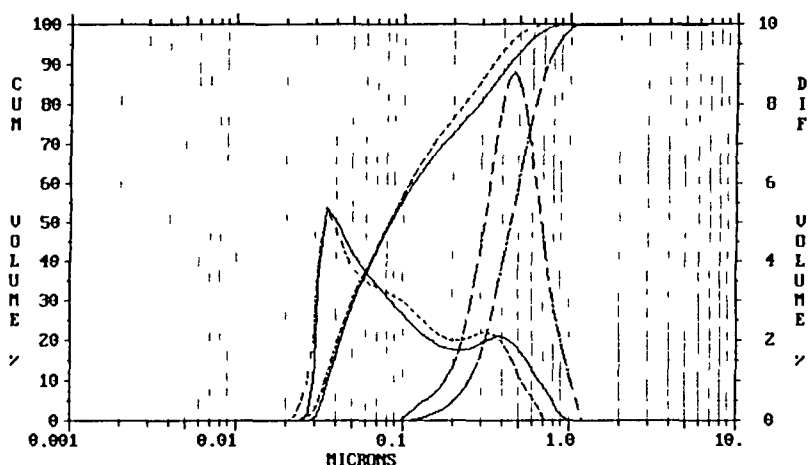


Fig. 83 Distribució de diàmetres d'una suspensió de liposomes C3p3 (—), de la mateixa suspensió centrifugada 15 min a 12 500 x g (---), i del pellet obtingut i resospès en medi aquós (---).

4.2.4.4 ULTRACENTRIFUGACIÓ.

Aquesta tècnica es va emprar per sedimentar els liposomes extrusionats per membranes de 200 nm, i també per separar els diferents tipus de vesícules presents a les microemulsions de fosfolípid amb oli de borratge. En cada cas es van trobar les condicions òptimes.

SEDIMENTACIÓ DE LIPOSOMES.

La petita diferència de densitat entre les bicapes constituïdes per fosfolípids d'origen natural ($\rho = 1,0135 \text{ g/mL}$) i l'aigua, unida a la presència de fosfolípids carregats a les membranes, fa que la sedimentació dels REVs PC/PA 9:1 mol/mol extrusionats fins 200 nm només sigui pràcticament completa després de moltes hores d'ultracentrifugació. Per avaluar el mètode es centrifugaren 5 mL de suspensions de 50 mg/mL de fosfolípid en tampó Tris-HCl 10 mM pH 7,4 a 200.000 x g durant 15 hores a 4°C.

El resultat fou un sediment de color blanc i un sobrenedant

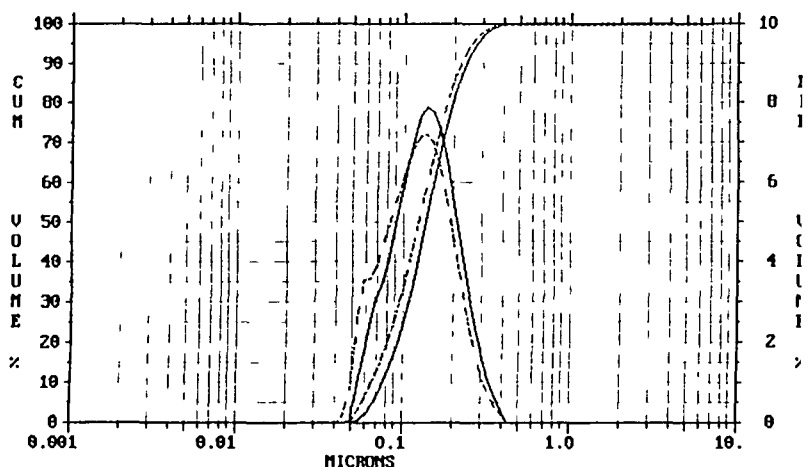


Fig. 84 (→) Suspensió de liposomes REVs PC/PA 9:1 mol/mol extrusionats fins 200 nm (→) Pellet resospès de la suspensió anterior després de la centrifugació a 200 000 x g durant 15 hores a 4°C

transparent del qual es determinà la concentració de fosfolípids colorimètricament: $0,61 \pm 0,01$ mg/mL ($n=2$), un 1,2 % de la concentració inicial. Amb l'objectiu de comprovar l'estabilitat física de les vesícules, es realitzaren anàlisi de grandària de les suspensions de liposomes abans de centrifugar, i del sediment resospés. Els resultats, que es mostren a la Fig. 84, indiquen que hi ha una bona conservació de l'estructura original dels liposomes.

D'acord amb els resultats anteriors s'establí un temps de centrifugació mínim per aquest tipus de mostra de 15 hores, a $200.000 \times g$ a 4°C .

SEPARACIÓ DE LES VESÍCULES CONSTITUENTS DE LES MICROEMULSIONS D'OLI DE BORRATGE.

Les emulsions aquoses d'OB i fosfolípids poden estar compostes per diferents tipus de vesícules que es diferencien en la seva composició. Així, la preparació d'emulsions d'OB (sense fosfolípids) mitjançant el Microfluidizer permet obtenir emulsions o/w homogènies compostes per microgotetes d'oli (microgotetes OB) que presenten una baixa estabilitat física. La incorporació de fosfolípids en diferents quantitats fa possible l'aparició d'altres fases disperses, com els liposomes i les microgotetes d'OB estabilitzades amb fosfolípids (microgotetes OB/F). Per tal de separar els tres tipus de vesícules la bibliografia descriu mètodes d'ultracentrifugació on s'empren capilars com a contenidors de les mostres a centrifugar (Miller K.W. i Small D.M., 1982; Hamilton J.A., 1989). La centrifugació fa que les preparacions se separin en les fases constituents de forma que, en tallar el capilar pels límits que aquestes originen, s'obté cadascuna per separat.

En el present treball s'ha establert el temps de centrifugació necessari per tal d'analitzar, sense l'ús de capilars, el contingut de microgotetes OB d'emulsions amb diferents relacions OB/F. La capacitat de realitzar l'anàlisi permet escollir la relació OB/F que formarà emulsions sense microgotetes OB i que seran, per tant, formulacions de gran estabilitat.

Des del punt de vista de la realització experimental, els factors mantinguts invariables, i llurs valors, han estat els següents:

- * Volum de centrifugació: 35 mL
- * Gravetat: $100.000 \times g$
- * Rotor basculant
- * Temperatura: 4°C
- * Composició i obtenció de les preparacions: OB 2 % p/p en tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4, processades en el Microfluidizer 7 cicles a 4 bars de pressió.

Com a factors variables s'escoliren:

- * la relació inicial OB/F (des de 1 fins 40% p/p)
- * el temps de centrifugació (des de 15 fins 120 minuts).

Les conivacions de nivells segueixen un disseny de quadrat centrat en creu (Taula 27). Les mostres un cop centrifugades mostraren, com a màxim i en funció de la seva composició,

quatre fases. Aquestes, per ordre decreixent de densitats foren:

- 1.- Un sediment constituït per liposomes de diàmetre gran i/o mitjà.
- 2.- Una fase aquosa amb liposomes de petit diàmetre.
- 3.- Una crema per sobre de la fase aquosa constituïda per microgotes OB/F.
- 4.- OB líquid a la part superior.

En cas de formar-se, la fase oliosa (4) fou retirada quantitativament dels tubs mitjançant una micropipeta, mentre que de la crema OB+F (3) es prengué una mostra representativa.

A partir d'aquestes mostres s'avaluaren els següents paràmetres:

- * el percentatge en pes d'OB a la fase oliosa superior respecte del total que conté la mostra prèviament a la centrifugació,
- * el diàmetre de la població constituent de la crema de microgotes OB/F.

OB/F p/p	Temps (min)	n	% OB sobrenedant	Diàmetre (nm; % num)
1(-2)	60 (0)	2	0 ± 0	133 ± 1,9
20 (0)	15 (-2)	2	0 ± 0	443 ± 62
40 (2)	60 (0)	2	35,8 ± 0,8	402 ± 9
20 (0)	120 (2)	2	43,0 ± 1,4	256 ± 27
20 (0)	60 (0)	2	30,1± 0,1	282 ± 38
10 (-1)	30 (-1)	1	4,25	259
10 (-1)	90 (1)	1	32,5	244
30 (1)	30 (-1)	1	10	536
30 (1)	90 (1)	1	55	303

Taula 27 Convinacions de factors i nivells (entre parèntesi s'indiquen els valors codificats) emprats en la determinació del temps de centrifugació mínim d'emulsions OB/F.

Les Fig. 85 i 86 mostren les respectives superfícies de resposta, i a la Taula 28 els resultats de l'ajust.

	Resposta	
	% Oli de borratge	Diàmetre (nm; % núm)
Coef. de determinació (r²)	0,908	0,938
Coeficient de regressió (r)	0,954	0,968
Test de significació de la correlació (F _{crit} = 4,26)	64,14	48,84
Error standard	6,64	29,7

Taula 28 Resultats de les superfícies de resposta corresponents a l'oli de borratge sobrenedant, i als diàmetres de les vesícules constituents de la crema de microgotes OB/F.

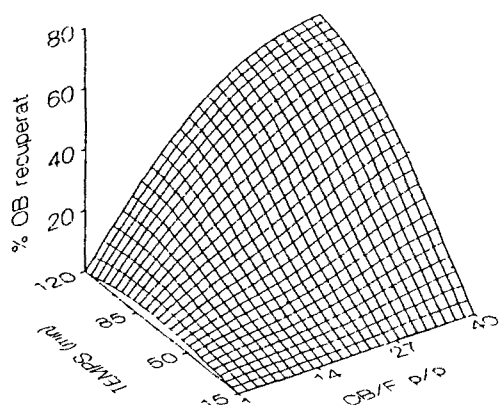


Fig. 85 Variació del percentatge d'oli recuperat en funció del temps de centrifugació i de la composició de les emulsions. Els valors estan referits a la composició de la mostra no centrifugada.

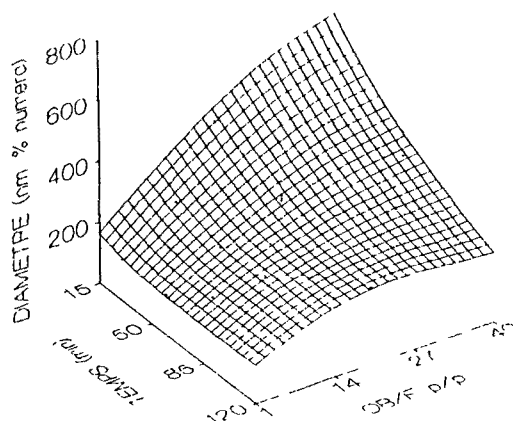


Fig. 86 Variació del diàmetre de les vesícules que constitueixen les microgotes OB/F en funció del temps de centrifugació i de la composició de les mostres. Les anàlisis es realitzaren amb el Microtrack UPA 150.

Els resultats posen de manifest que a totes les preparacions la totalitat de l'OB no estabilitzat amb fosfolípids pot determinar-se amb un mínim de 120 minuts de centrifugació en les condicions decrites ja que, en tots el casos, el percentatge d'oli recuperat de la part superior dels tubs (4) esdevé constant. Aquests resultats són coherents amb els proporcionats per l'anàlisi de diàmetres de les microgotes de la fase OB/F. La progressiva eliminació de les microgotes d'OB inestables es posa de manifest en el diàmetre de les vesícules que formen la crema OB/F i que detecta el Microtrack UPA 150. La grandària disminueix fins a arribar a ser independent del temps de centrifugació a partir d'un valor crític. És en aquest moment que la crema està constituïda únicament per microgotes OB/F, havent-se eliminat les microgotes OB, les quals han col.lapsat i apareixen en forma d'una fase oliosa contínua a la part superior dels tubs. Cal assenyalar que la formació de la crema de microgotes OB/F origina l'aparició de vesícules de gran diàmetre (superiors al micròmetre). Aquestes, que no són detectades amb les anàlisis amb el Microtrack UPA 150 degut al seu petit número i al seu gran diàmetre, s'observen mitjançant microscòpia òptica (Fig. 87).

Complementàriament, l'anàlisi mitjançant FTIR posa de manifest que la fase oliosa superior està constituïda únicament per OB.

Així, per a la determinació del percentatge d'OB estabilitzat amb fosfolípids, s'establí un temps de centrifugació de 120 minuts en les condicions fixades anteriorment.

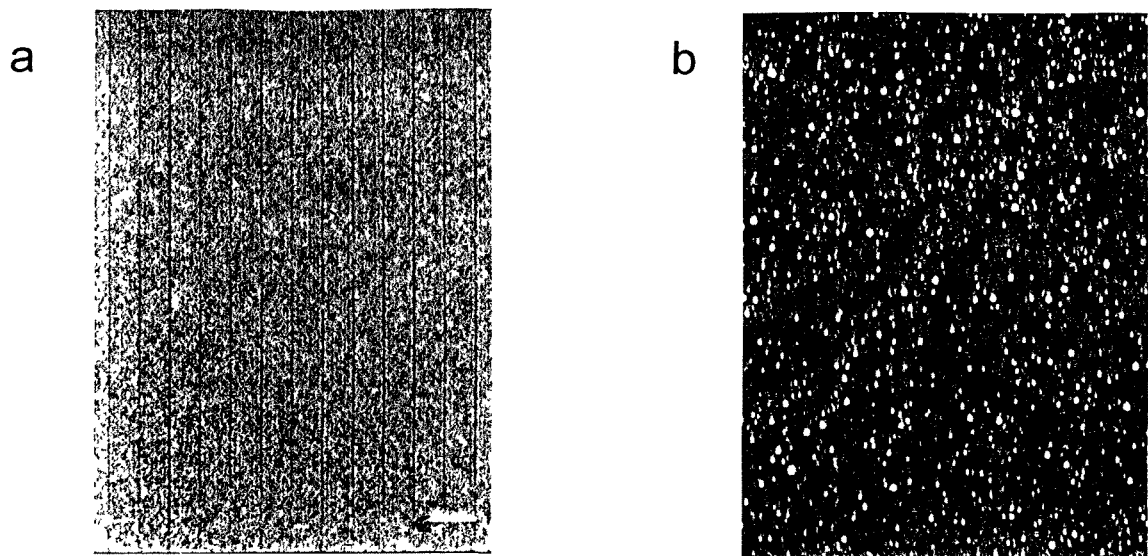


Fig. 87 La formacio de la crema de microgotes OB/F durant la centrifugació a 100 000 x g origina l'aparicio de microgotes de diametre molt superior a l'inicial La imatge a) corespon a un camp visual característic d'una emulsio OB/F 1/1 p/p no centrifugada Mitjançant microscòpia òptica no s'aprecien vesícules superiors a 1 µm (límit de deteccio) Un cop centrifugada la mostra, separada la crema de microgotes OB/F i resospesa en el medi aquós (imatge b) es detecten microgotes de gran diàmetre (~2,5 µm) La barra indica 20 µm

4.2.4.5 ULTRAFILTRACIÓ.

Prèviament a la quantificació de la concentració d'hidrocortisona present en el medi aquós de les suspensions de liposomes mitjançant aquesta tècnica, es procedí a comprovar l'eficàcia de tall de les membranes i a determinar l'existència o no d'interaccions entre aquestes i el farmac.

Així, en primer lloc, es valorà la concentració de fosfolípids de l'ultrafiltrat obtingut amb la ultrafiltració de suspensions de liposomes (REVs 200 nm, 50 mg/mL). La Taula 29 mostra que les vesícules romanen al reservori de l'aplicació. S'observà que, degut a la presència de les vesícules, el flux del procés (< 0,05mL/min) fou molt inferior al que proporcionà la ultrafiltració de medi aquós sense liposomes en les mateixes condicions de pressió (2 mL/min, pressió 3-4 bar)

Volum eluït. (mL)	0,3	0,8	1,4	2
Conc. F (mg/mL)	0	0	0	0

Taula_29 Concentracions de fosfolípid de l'ultrafiltrat. (n=2)

Per tal de determinar les possibles interaccions fàrmac-membrana, es procedí a la ultrafiltració de volums de 10mL d'una dissolució de tampó fosfat sòdic 10 mM, pH 7,4 saturada d'HC (0,327 mg/mL). Abans del seu ús, les membranes es rentaren amb tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4 Durant la ultrafiltració es recolliren fraccions de 0,5 mL, quantificant-se la concentració del fàrmac en les fraccions senars. A la Fig. 88a es mostra, per diferents fluxs de treball (obtinguts variant la pressió de nitrogen), la dependència del quocient entre la

concentració de l'ultrafiltrat i la concentració inicial de l'aplicació ($C_{ultr} / C_{ini\ apl}$) amb el volum d'ultrafiltrat obtingut. En tots els casos té lloc un augment progressiu de la concentració d'HC a l'ultrafiltrat fins a un valor constant, que és menor que l'inicial de la dissolució aplicada. Aquesta concentració d'equilibri (C_{equi}) té el mateix valor que la concentració de la part no ultrafiltrada que resta al reservori d'aplicació. S'observa a la Fig. 88b que el volum necessari perquè s'assoleixi aquest equilibri depèn del flux al qual es realitza el procés. Aquests fenòmens posen de manifest l'existència d'interaccions de la hidro cortisona amb la membrana: donat que a les primeres fraccions de la ultrafiltració la concentració d'HC és molt baixa, provablement s'obté en elles una gran part

del medi en el qual s'han rentat les membranes i que hi ha quedat retinut, mentre que a les següents s'incrementa el contingut de la mostra ultrafiltrada. Durant el procés el fàrmac va quedant adsorbit en la membrana fins arribar a l'establiment d'un equilibri entre la hidro cortisona associada a ella i la present en el medi aquós (la concentració de les darreres fraccions és constant i més baixa que la inicial de l'aplicació). Els resultats amb diferents fluxos indiquen que a major temps d'interacció entre el medi aquós i la membrana (flux més lent) són necessàries menys fraccions per assolir l'equilibri. Per tant, si es pretèn fer servir aquesta tècnica per determinar la concentració d'HC al medi aquós de les suspensions de liposomes, és necessari tenir en compte que una part del fàrmac de la mostra pot quedar retinguda a la membrana.

Tenint com a referència els resultats anteriors, s'ha estudiat l'efecte que sobre la concentració del fàrmac a les fraccions ultrafiltrades produïen:

- la concentració de fàrmac en el tampó amb el qual es renten les membranes (C_{rent}), ja que una saturació prèvia podria evitar la retenció del fàrmac present a l'aplicació,
- la concentració del fàrmac de l'aplicació, donat que encara que la membrana s'hagi saturat prèviament, cal que aquesta i l'aplicació estiguin en equilibri. En cas contrari tindrà lloc la transferència de fàrmac des d'una de les fases a l'altra,
- el flux al qual té lloc el procés, el qual determina el volum necessari per assolir l'equilibri.

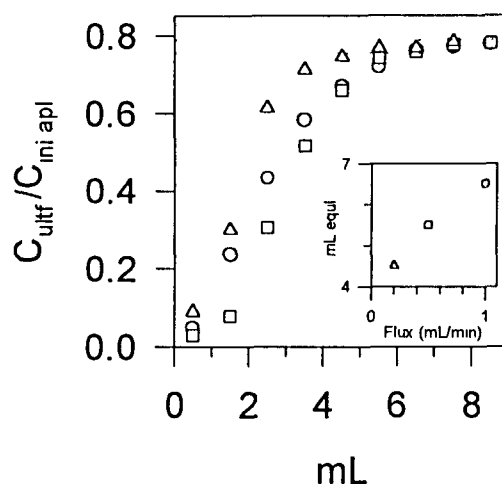
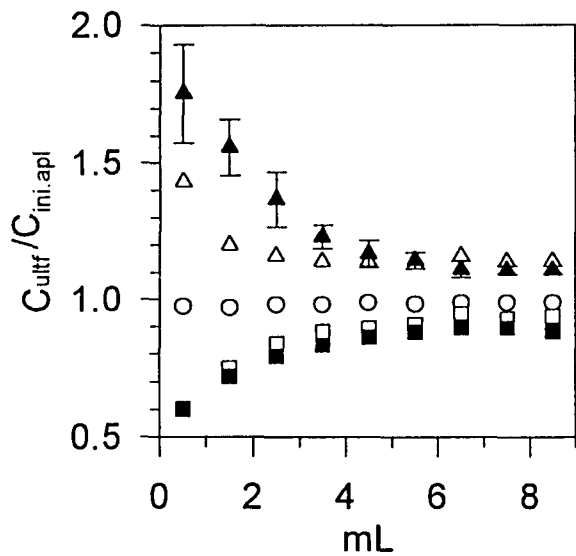


Fig. 88 a) La variació del quocient $C_{ultr} / C_{ini\ apl}$ durant la ultrafiltració posa de manifest que les fraccions obtingudes no tenen la concentració de la mostra aplicada inicialment **b)** Al llarg del procés s'arriba a un equilibri, i aquest s'assoleix més ràpidament a menor flux de treball
(○) 1 mL/min, (□) 0,5 mL/min, (Δ) 0,2 mL/min



$C_{rent}/C_{ini.apl}$	Flux (mL/min)	n	Símbol
1	1	2	○
0,5	0,2	1	□
0,5	0,5	1	■
2	0,5	1	△
2	1	3	▲

Fig. 89 Variació de la concentració d'hydrocortisona en les fraccions ultrafiltrades en funció del quocient entre la concentració del fàrmac en el tampó de rentatge de les membranes (C_{rent}) i la concentració de l'aplicació ($C_{ini.apl}$), i en funció del flux de treball.

L'avaluació d'aquests tres factors s'ha dut a terme realitzant aplicacions de 10 mL. La concentració màxima d'HCemprada ha estat la de saturació (Hc_{sat}), ja que la màxima que pot haver en el medi aquós de les suspensions de liposomes serà d'aquest ordre. Els resultats es mostren a la Fig. 89 on es representa el quocient $C_{ultf} / C_{ini.apl}$ front al volum ultrafiltrat per diferents conuinacions dels factors descrits anteriorment. S'observa que quan la concentració d'hydrocortisona a la dissolució amb la qual es renta la membrana és igual a la concentració inicial de l'aplicació ($C_{rent}/C_{ini.apl}=1$), l'ultrafiltrat no presenta cap variació de concentració respecte l'aplicació inicial. Aquest fet previsible posa de manifest que en els casos en que es compleixi aquesta relació, totes les fraccions ultrafiltrades tindran la mateixa concentració de fàrmac. Si la concentració del tampó de rentatge és major que la concentració de l'aplicació ($C_{rent}/C_{ini.apl}>1$), la concentració a l'ultrafiltrat quan s'assoleix l'equilibri és superior a la concentració inicial de l'aplicació. Això és degut a que, al no estar inicialment en equilibri i per tal d'assolir-lo, part del fàrmac es transfereix des de la membrana a la dissolució aplicada. En el cas contrari ($C_{rent}/C_{ini.apl}<1$) la causa i els resultats tenen lloc en sentit invers. Pel que fa a la cinètica del procés, s'observa que de nou el volum ultrafiltrat necessari per arribar a l'equilibri augmenta amb el flux.

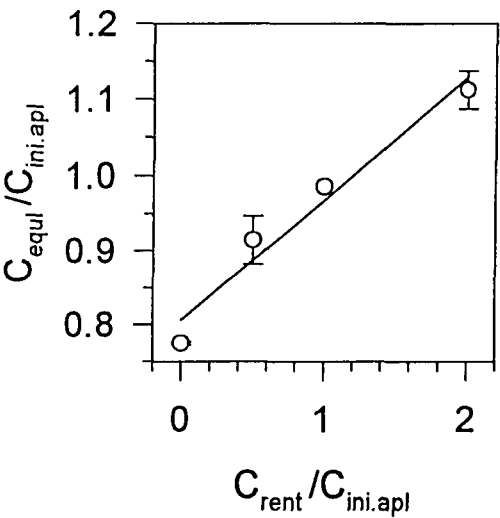


Fig. 90 Relació entre la concentració d'hydrocortisona d'equilibri a les fraccions ultrafiltrades (expressada en tant per u respecte la inicial de l'aplicació: $C_{equl}/C_{ini.apl}$) i el quocient $C_{rent}/C_{ini.apl}$, que indica l'allunyament inicial del sistema respecte l'equilibri.

Amb aquests resultats és palés que la concentració d'equilibri (C_{equil}) a les fraccions ultrafiltrades és depenent del quocient $C_{\text{rent}}/C_{\text{ini apl}}$. També es posa de manifest que el flux no afecta a la C_{equil} (amb aplicacions de 10 mL i en el rang de flux estudiat). Això s'aprecia en la Fig. 90, on es representa la relació $C_{\text{equil}}/C_{\text{ini apl}}$ (el tant per u de fàrmac a les fraccions en equilibri respecte de la concentració inicial de l'aplicació) respecte al quocient $C_{\text{rent}}/C_{\text{ini apl}}$ (el tant per u de fàrmac al medi amb que es renten les membranes respecte la concentració de la mostra). Aquests resultats permeten calcular la concentració inicial ($C_{\text{ini apl}}$) d'una mostra de 10 mL ultrafiltrada sempre que es coneguin C_{equil} i C_{rent} , ja que les relacions indicades anteriorment es poden ajustar a una recta d'expressió:

$$\frac{C_{\text{equil}}}{C_{\text{ini apl}}} = b_0 + b_1 * \frac{C_{\text{rent}}}{C_{\text{ini apl}}} \quad \text{Eq. 21}$$

on:
 $b_0 = 0,7978$
 $b_1 = 0,1613$
i corresponen als termes ajustats a partir dels resultats experimentals anteriors.

D'acord amb les dades presentades, per a l'estudi de les suspensions de liposomes s'han emprat membranes rentades amb tampó saturat amb hidrocortisona. D'aquesta manera es pretèn minimitzar l'associació de la HC present en el medi aquós de les mostres a les membranes d'ultrafiltració, ja que la concentració en el medi extern de les vesícules es preveu que sigui la de saturació o propera a ella. Per calcular la concentració d'HC en el medi aquós de les mostres s'ha emprat l'equació 21.

De manera complementària, es realitzaren estudis d'estabilitat física dels liposomes durant el procés d'ultrafiltració. Els resultats, que es mostren a la Fig. 91, posen de manifest que es produeix una agregació-fusió de les vesícules que queden retingudes a la part superior de la cel.la.

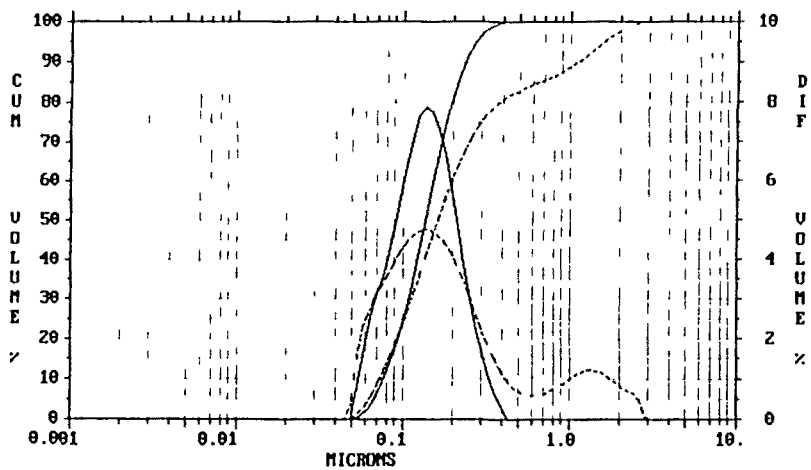


Fig. 91 (—) Suspensió de liposomes REV's PC/PA 9:1 mol/mol extrusionats fins 200 nm (---) Concentrat de la suspensió anterior obtingut per ultrafiltració

4.2.5 OBTENCIÓ DE LIPOSOMES AMB EL MICROFLUIDIZER 110 S.

Per tal de realitzar una posta a punt exhaustiva de la producció de liposomes mitjançant aquest mètode, s'ha estudiat l'efecte de diferents factors en les característiques de les suspensions de liposomes així obtingudes. D'una banda s'analitzà la repercusió de la pressió d'entrada, del número de cicles, i de la força iònica del medi en el diàmetre, amplada i polidispersió de les vesícules (Ap. 4.2.5.1). Per l'estudi del volum encapsulat (Ap. 4.2.5.2) només es variaren la pressió i el número de cicles. Com a conseqüència de la presència d'alcohols en els Pro-Lipo S, també es realitzà una anàlisi del diàmetre i amplada en funció de les concentracions d'etanol i fosfolípid (Ap. 4.2.5.3).

4.2.5.1 VARIACIÓ DE LA GRANDÀRIA DELS LIPOSOMES EN FUNCIÓ DE LES CONDICIONS DE PROCESSAMENT I DE LA FORÇA IÒNICA DEL MEDI.

Dels possibles factors que *a priori* poden afectar a les característiques de les poblacions de liposomes obtinguts amb el Microfluidizer, s'escolliren tres per a realitzar experiments a diferents nivells: el número de cicles, la pressió d'entrada de l'aparell i la força iònica del medi. El número de cicles es correspon amb el número de vegades que la mostra passa per la cambra d'interacció de l'aparell. Pel que fa a la força iònica, aquesta es controlà mitjançant la concentració de NaCl en tampó fosfat sòdic 10 mM, pH 7,4 (22 mOsm·kg⁻¹). La resta de factors reconeguts com a tals es mantingueren constants: temperatura ambient, i concentració de fosfolípid de les mostres de 50 mg/mL. Els nivells dels factors escollits es distribuïren d'acord amb un disseny de cub centrat amb estel, realitzant 3 replicats en tots el punts pertanyents a l'estel. Les conbinacions de nivells i els resultats en mostren a la Taula 30.

Cicles	Pressió (bar)	Força iònica (mOsm/kg ⁻¹)	n	Diàmetre (nm; % número)	Amplada (nm; % número)	Índex de polidispersió
3(-1)	0,8 (-1)	55 (-1)	1	117,5	44,7	0,350
3(-1)	0,8 (-1)	121 (1)	1	140,7	71,3	0,384
3 (-1)	2,4 (1)	121 (1)	1	111,0	37,0	0,375
3 (-1)	2,4 (1)	55 (-1)	1	88,4	27,2	0,400
7 (1)	1,6 (-1)	55 (-1)	1	99,2	32,3	0,387
7 (1)	3,2 (1)	55 (-1)	1	64,6	17,0	0,380
7 (1)	1,6 (-1)	121 (1)	1	123,2	47,4	0,366
7 (1)	3,2 (1)	121 (1)	1	78,3	21,3	0,357
5 (0)	2,4 (0)	22 (-2)	3	81,6±1,75	24,3±1,02	0,393±0,0075
5 (0)	2,4 (0)	155 (2)	3	117,2±1,33	37,8±1,42	0,326±0,0071
5 (0)	0,8 (-2)	88 (0)	3	130,2±3,69	72,0±5,06	0,401±0,0156

Cicles	Pressió (bar)	Força iònica (mOsm/kg ⁻¹)	n	Diàmetre (nm; % número)	Amplada (nm; % número)	Índex de polidispersió
5 (0)	4 (2)	88 (0)	3	63,4±11,6	15,6±2,00	0,387±0,0091
5 (0)	2,4 (0)	88 (0)	3	102,7±0,95	32,6±0,35	0,370±0,0065
1 (-2)	2,4 (0)	88 (0)	3	158,3±17,4	86,2±5,15	0,411±0,0088
9 (2)	2,4 (0)	88 (0)	3	88,9±10,4	26,6±2,46	0,371±0,0055

Taula 30 Nivells i codificacions (entre parèntesi) dels factors emprats en l'estudi de la producció de liposomes amb el Microfluidizer. Les respostes analitzades foren el diàmetre, l'amplada, i la polidispersió de les vesícules, de les qual es mostra la mitjana±std.

Passada com a mínim 1 hora des de la seva preparació, les suspensions s'analitzaren amb un Autosizer llc per tal d'obtenir el diàmetre dels liposomes i l'amplada de la seva distribució. Els ambdós resultats s'ajustaren a una superfície de resposta a partir d'una equació que incloguè, originalment, termes lineals, quadràtics i creuats de cadascun dels factors. Els valors del coeficients (per als factorts normalitzats) i l'anàlisi de la variança per cada ajust es mostren tot seguit:

Diàmetre

Diàmetre= 98,3-15,9Cicles'-16,8Pressió'+9,30Força iònica'+6,18(Cicles')²

	Totals	Mitjana	Ajustats	Factors	Residuals	Manca ajust	Err. Exp.
SS ²	344792	320689	24103	22565	1538	410	1128
DF	29	1	28	4	24	10	14

Coeficient de determinació (r²): 0,9362
Coeficient de regressió (r): 0,9676
Test de significació de la regressió (F_{4,24}): 88,0; (F_{crit}= 2,78)
Test de significació del model (F_{10,14}): 0,509; (2,53<F_{crit}<2,70)
Error standard del model: 8,01

Amplada

Amplada= 30,32-13,12Cicles'-12,94Pressió'+4,27Força iònica'+6,27(Cicles')² +3,51(Pressió')²

	Totals	Mitjana	Ajustats	Factors	Residuals	Manca ajust	Err. Exp.
SS ²	63588	49021	14567	13791	776	645	131
DF	29	1	28	5	23	9	14

Coeficient de determinació (r²): 0,9467
Coeficient de regressió (r): 0,9730
Test de significació de la regressió (F_{5,23}): 81,7; (F_{crit}= 2,64)
Test de significació del model (F_{9,14}): 7,66; (2,53<F_{crit}<2,70)
Error standard del model: 5,81

A partir de les equacions poden representar-se les superfícies de resposta de cada parell de factors mantenint el tercer constant (Fig. 92). S'aprecia una clara dependència del diàmetre amb la pressió d'entrada i el número de cicles, mentre que l'efecte de la força iònica no és tan acusat. Pel que fa a l'índex de polidispersió, es compararen les mitjanes dels punts de l'estrella, ja que tots ells tenen tres replicats. Els resultats només mostraren diferències significatives entre la conivació (002) i la resta de punts, i entre el (-200) i els punts (200), (000), i (002).

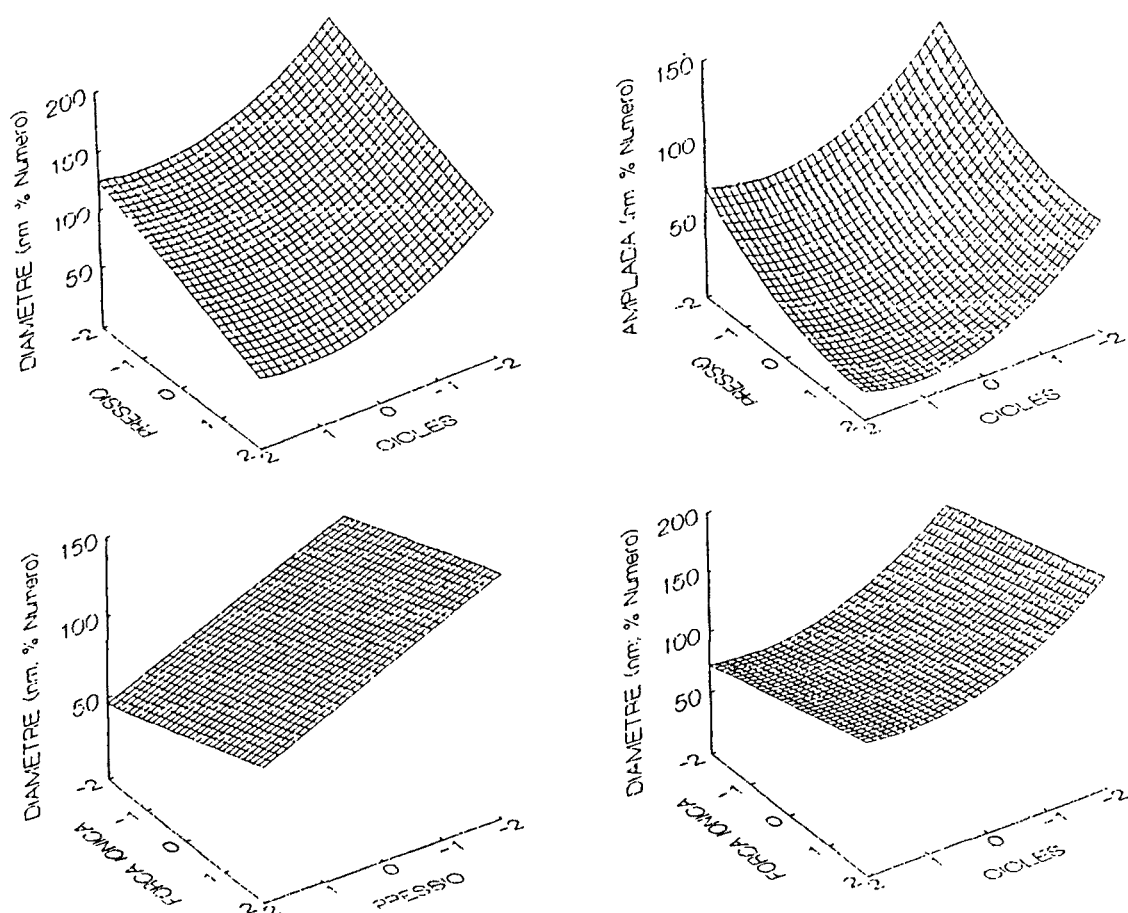


Fig. 92 Superfícies de resposta del diàmetre i la amplada obtingudes per conivacions de dos factors. En tots els casos els valors de les variables estan codificats, i la que no està representada s'ha fixat a un valor codificat de 0.

4.2.5.2 VARIACIÓ DEL VOLUM ENCAPSULAT DELS LIPOSOMES EN FUNCIO DE LES CONDICIONS DE PROCESSAMENT.

S'obtingueren suspensions de liposomes de 50 mg F/mL per agitació de Pro-Lipo S amb la quantitat necessària de tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4 amb $1,04 \cdot 10^5$ ppb de crom

(addicionat al tampó a partir d'una dissolució mare 2 M de $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Les suspensions es processaren en el Microfluidizer en diferents condicions de cicles i pressió, convinant aquestes variables segons un disseny de quadrat amb creu amb varis punts addicionals (Taula 31). Les noves suspensions obtingudes es mantingueren 1 hora a temperatura ambient abans de determinar els volums encapsulats i la grandària de les vesícules²⁴ amb el Microtrack UPA 150. Els resultats es mostren a la Taula 31, on el diàmetre i l'amplada estan expressats com a percentatge en volum.

Cicles	Pressió (bar)	Diàmetre (n) (nm; % vol)	Amplada (nm; % vol)	Volum encapsulat (n) (L/mol)	Encapsulació (% volum)
1 (-2)	2,4 (0)	275±18,2 (6)	151±21,4	0,902±0,109 (6)	6,01±0,725
5 (0)	0,8 (-2)	264±15,7 (7)	167±15,5	1,209±0,050 (4)	8,07±0,319
5 (0)	2,4 (0)	154±30,1 (5)	114±16,1	0,669±0,008 (2)	4,46±0,050
5 (0)	4 (2)	56,4±6,20 (6)	33,95±11,91	0,491±0,015 (2)	2,97±0,100
9 (2)	2,4 (0)	106±23,2 (5)	92,2±14,49	0,561±0,014 (3)	3,74±0,093
3 (-1)	1,6 (-1)	242±2,5 (2)	147±17	1,300±0,190 (2)	8,71±1,248
3 (-1)	3,2 (1)	112±8,04 (4)	104±5,44	0,469±0,054 (4)	3,14±0,357
7 (1)	1,6 (-1)	163±11 (2)	126±0,5	0,765±0,001 (2)	5,08±0,009
7 (1)	3,2 (1)	81,0±11,7 (2)	70,5±19,5	0,557±0,021 (2)	3,72±0,135
1 (-2)	0,8 (-2)	406±73,9 (7)	258±73,7	1,360±0,092 (4)	9,03±0,636
1 (-2)	1,6 (-1)	366 (1)	244	ND	ND
1 (-2)	3,2 (1)	234 (1)	159	ND	ND
1 (-2)	4 (2)	233±29,2 (6)	143±15,7	0,648±0,010 (2)	4,32±0,065
3 (-1)	0,8 (-2)	284±26,7 (5)	187±18,9	ND	ND
3 (-1)	2,4 (0)	177±23,2 (3)	135±8,99	ND	ND
3 (-1)	4 (2)	113±8,65 (5)	108±8,31	ND	ND
5 (0)	1,6 (-1)	180 (1)	138	ND	ND
5 (0)	3,2 (1)	98,9 (1)	92,9	ND	ND
7 (1)	0,8 (-2)	248±5,7 (3)	165±6,5	ND	ND
7 (1)	2,4 (0)	108±5,4 (3)	101±4,5	ND	ND
7 (1)	4 (2)	34,9±2,1 (3)	12,8±1,27	ND	ND
9 (2)	0,8 (-2)	240±30,7 (4)	150±10	0,995±0,125 (3)	6,64±0,841
9 (2)	4 (2)	24,5±4,19 (9)	8,14±1,74	0,471±0,053 (9)	2,85±0,352

Taula 31 Nivells dels factors (codificats entre parèntesi) i respostes (mitjana±std; replicats entre parèntesi) emprats en l'estudi del volum encapsulat. ND: No determinat.

A continuació es mostren els resultats dels ajustaments dels diàmetres, amplades, volums encapsulats i percentatges d'encapsulació (per la concentració de 50 mg/mL) a models

²⁴ Es realitzà un nou estudi del diàmetre degut a un canvi de lot de fabricació de Pro-Lipo S, fet que originà un diàmetre inicial dels liposomes obtinguts per agitació diferent del que s'obtingué a la secció 4.2.4.1.

linials i llurs anàlisi de la varianza:

Volum encapsulat

Vol. enc.= 0.722-0,0716Ciclesˆ-0,1804Pressióˆ+0,0305(Pressióˆ)²+0,0191(CiclesˆPressióˆ)

	Totals	Mitjana	Ajustats	Factors	Residuals	Manca ajust	Err. Exp.
SS²	31,74	26,37	5,375	4,777	0,600	0,317	0,283
DF	45	1	44	4	40	7	33

Coefficient de determinació (r²): 0,8887
Coefficient de regressió (r): 0,9427
Test de significació de la regressió (F_{4,40}): 79,7; (F_{crit}=2,61)
Test de significació del model (F_{7,33}): 5,28; (2,18<F_{crit}<2,42)
Error standard del model: 0,122

Percentatge d'encapsulació

% Enc.= 4,823-0,4733Ciclesˆ-1,202Pressióˆ+0,2005(Pressióˆ)²+0,1257(CiclesˆPressióˆ)

	Totals	Mitjana	Ajustats	Factors	Residuals	Manca ajust	Err. Exp.
SS²	1411	1172	238,7	211,7	27,03	14,48	12,53
DF	45	1	44	4	40	7	33

Coefficient de determinació (r²): 0,8868
Coefficient de regressió (r): 0,9417
Test de significació de la regressió (F_{4,40}): 78,31; (F_{crit}=2,61)
Test de significació del model (F_{7,33}): 5,448; (2,18<F_{crit}<2,42)
Error standard del model: 0,822

Diàmetre

Diàmetre= 131-43,0Ciclesˆ-49,4Pressióˆ+15,9(Ciclesˆ)²+6,47(Pressióˆ)²

	Totals	Mitjana	Ajustats	Factors	Residuals	Manca ajust	Err. Exp.
SS²	4206599	3051526	1155073	1068156	86916	20857	66059
DF	91	1	90	4	86	18	68

Coefficient de determinació (r²): 0,9248
Coefficient de regressió (r): 0,9617
Test de significació de la regressió (F_{4,86}): 264; (2,02<F_{crit}<2,10)
Test de significació del model (F_{18,68}): 1,193; (1,61<F_{crit}<1,92)
Error standard del model: 31,8

Amplada

Amplada= 108-25,4Ciclesˆ-31,1Pressióˆ+6,86(Ciclesˆ)²-2,66(CiclesˆPressióˆ)

	Totals	Mitjana	Ajustats	Factors	Residuals	Manca ajust	Err. Exp.
SS²	1828896	1364344	464552	393251	71301	19694	51607
DF	91	1	90	4	86	18	68
Coeficient de determinació (r²): 0,8465							
Coeficient de regressió (r): 0,9201							
Test de significació de la regressió (F _{4,86}): 119; (2,02<F _{crit} <2,10)							
Test de significació del model (F _{18,68}): 1,442; (1,61<F _{crit} <1,92)							
Error standard del model: 28,8							

Tal i com s'observa a la Fig. 93, a partir de les expressions matemàtiques trobades anteriorment es poden representar les superfícies de resposta per les dues variables emprades.

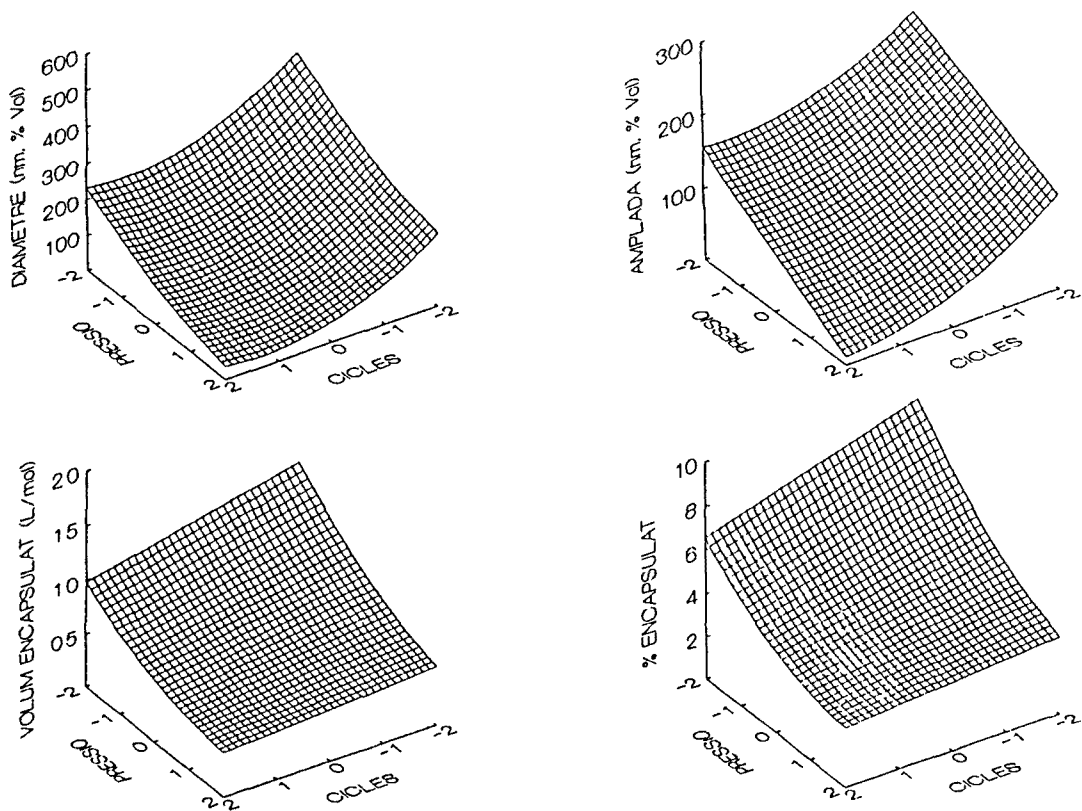


Fig.93 Superfícies de resposta del diàmetre (nm, % vol), amplada, volum encapsulat (L/mol) i encapsulació (% volum) de suspensions de liposomes de 50 mg/mL obtingudes en el Microfluidizer. Els factors estudiats (cicles i pressió) es mostren en valors codificats.

La variació del percentatge de partícules en cada canal amb les variables estudiades pot seguir-se en els gràfics que es mostren a la Fig. 94, en els quals es manté constant una de les variables. S'observa que les poblacions són majoritàriament bimodals, de manera que el diàmetre mitjà que proporcionen les anàlisi no té per què indicar la població majoritària de la suspensió. Per tant, es fa necessari escollir una combinació de cicles i pressió concreta per poden preparar suspensions unimodals.

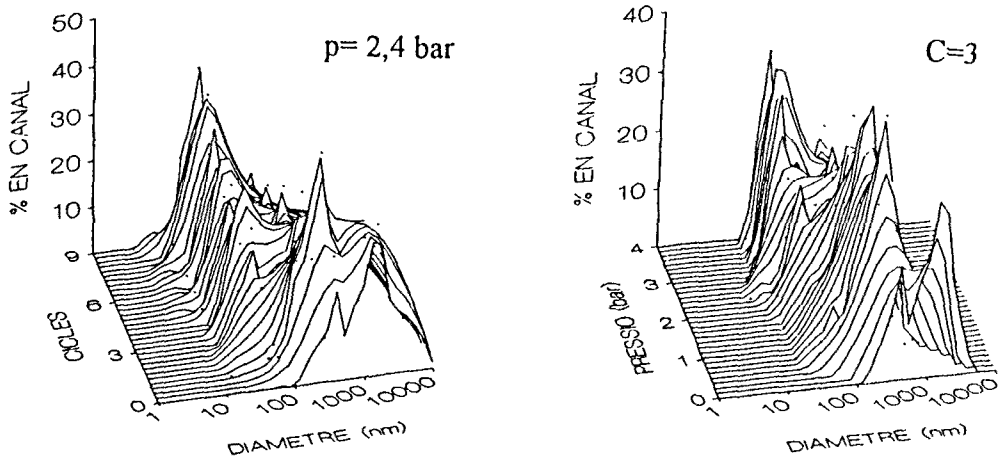


Fig. 94 Variació del percentatge per canal de la població de liposomes en funció d'una sola variable (als gràfics s'indica el valor de l'altra).

4.2.5.3 EFECTE DE LA CONCENTRACIÓ D'ETANOL EN LA GRANDÀRIA DELS LIPOSOMES.

La presència d'etanol a les suspensions de liposomes pot afectar l'estructura i grandària de les vesícules (Ahl P.L. et al., 1994; Komatsu H. i Okada S., 1995). Donada la presència d'alcohols en els Pro-Lipo S, es va dur a terme un estudi de l'efecte de la concentració d'etanol en el diàmetre dels liposomes obtinguts amb el Microfluidizer. Per tal de realitzar-lo es va emprar com a matèria primera Emulmetik 930 (SPC~95%). Es va mesclar, mitjançant agitació durant 1 hora, la quantitat necessària de fosfolípid amb aigua a 45-50°C, tot mantenint la temperatura constant durant el procés. D'aquesta forma s'obtingueren MLVs (Ap. 3.2.2.1) a la concentració de fosfolípid desitjada.

Degut a la presència de liposomes de gran diàmetre i exemptes de fosfolípids carregats en les suspensions de MLVs, es comprovà si durant el temps de lectura del Microtrack UPA 150 es produïa una sedimentació apreciable de part de la població. Per a realitzar-ho es mesurà durant 15 minuts la DO a 780 nm (longitud d'ona del làser del Microtrack UPA) de dilucions de les suspensions de MLVs obtingudes per agitació. Els resultats apareixen a la Fig. 95, on es mostra l'evolució de la DO amb el temps. D'ells es desprèn que no hi ha una sedimentació apreciable que pugui interferir en la lectura de l'analitzador de partícules, ja que el valor es manté constant durant el temps d'anàlisi en el Microtrack UPA 150 (10 min).

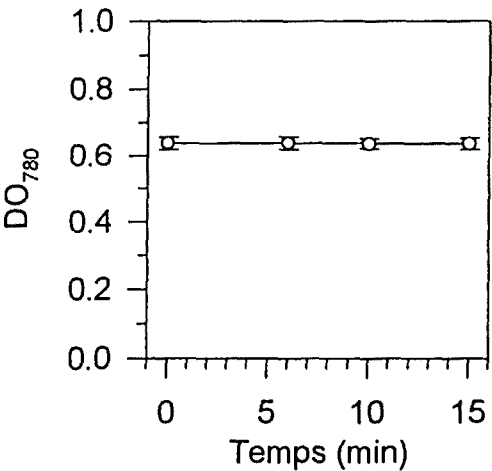


Fig. 95 Evolució en el temps de la densitat òptica a 780 nm de dilucions (n=2) de MLVs obtinguts a partir d'Emulmetik 930.

Per tal de fixar el número de cicles i la pressió de treball s'escolliren aquests de forma que el diàmetre i l'amplada de les poblacions obtingudes sense etanol estiguessin compresos a la meitat del rang d'anàlisi del Microtrack UPA 150. Això permetria observar tant els augments com les disminucions de diàmetre i amplada que podien ocasionar la presència d'etanol. A la Fig. 96 es mostra, en funció del número de cicles, les evolucions del diàmetre i de l'amplada dels liposomes d'una mostra d'SPC (25 mg/g F; 0 mg/g d'etanol) processada a una pressió de 2,4 bar. D'acord amb els resultats s'escollí processar les mostres 2 cicles a una pressió de 2,4 bar.

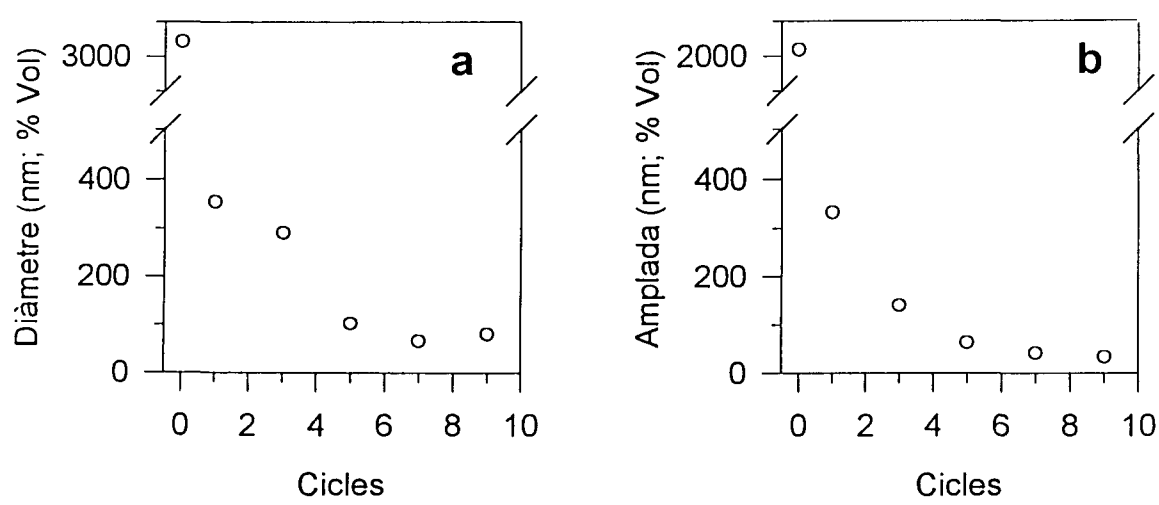


Fig. 96 Variació del diàmetre (a) i de l'amplada (b) de la distribució de grandàries de liposomes en funció del número de cicles que es procesen les suspensions en el Microfluidizer a una pressió de 2,4 bar.

Les variables emprades foren les concentracions de fosfolípid i d'etanol. Els nivells d'aquestes variables es conuinaren en un diseny de quadrat, essent complementat amb altres punts (Taula 32). Aquestes conuinacions se situaren sempre dins de la zona de formació de liposomes que constitueix el sistema temari fosfolípid/etanol/aigua (Ap. 1.4). La resta de factors es mantinguè constant. Les mostres es preparaen a partir de suspensions mare de 160 mg F/g en aigua, que es mesclaren amb les quantitats adients d'etanol prèviament al processament en el Microfluidizer.

Fosfolípid (mg/g)	Etanol (mg/g)	n	Diàmetre (nm; % vol)	Amplada (nm; % vol)
10 (-2)	0 (-2)	1	547	614
10 (-2)	160 (2)	2	39,5±1,50	16,0±1,00
40 (2)	0 (-2)	3	557±104,6	688±169,1
40 (2)	160 (2)	1	33	14
10 (-2)	10 (-1,75)	1	348	226
10 (-2)	20 (-1,5)	1	490	565
10 (-2)	40 (-1)	3	496±108,3	486±171,4
10 (-2)	80 (0)	1	367	269

Fosfolípid (mg/g)	Etanol (mg/g)	n	Diàmetre (nm; % vol)	Amplada (nm; % vol)
10 (-2)	120 (1)	1	89	38
10 (-2)	160 (2)	1	77	21
25 (0)	0 (-2)	4	410±93,01	439±193,4
25 (0)	10 (-1,75)	1	448	392
25 (0)	20 (-1.5)	3	584±50,16	686±52,6
25 (0)	40 (-1)	1	384	419
25 (0)	80 (0)	1	300	182
25 (0)	120 (1)	1	66	39
25 (0)	160 (2)	1	51	20
40 (2)	80 (0)	1	316	194
40 (2)	120 (1)	1	174	69

Taula 32 Nivells dels factors (codificats entre parèntesi) emprats en l'estudi de l'efecte de l'etanol en el diàmetre i amplada dels liposomes. Els resultats s'expressen com la mitjana±std.

Els resultats, presentats a la Taula 32, s'ajustaren a les respectives superfícies de resposta (les equacions es presenten amb els factors normalitzats):

Diàmetre

Diàmetre= 288,4-118,4Etanol'

	Totals	Mitjana	Ajustats	Factors	Residuals	Manca ajust	Err. Exp.
SS ²	4862045	3671785	1190260	906923	283337	172191	111146
DF	29	1	28	1	27	16	11

Coefficient de determinació (r²): 0,7620

Coefficient de regressió (r): 0,8729

Test de significació de la regressió (F_{1,27}): 86,4; (F_{crit}=4,21)

Test de significació del model (F_{16,11}): 1,07; (2,61<F_{crit}<2,,79)

Error standard del model: 102,4

Amplada

Amplada= 276,1-146,9Etanol'

	Totals	Mitjana	Ajustats	Factors	Residuals	Manca ajust	Err. Exp.
SS ²	5873367	3751923	2121444	1396339	725106	393305	331801
DF	29	1	28	1	27	16	11

Coefficient de determinació (r²): 0,6582

Coefficient de regressió (r): 0,8113

Test de significació de la regressió (F_{1,27}): 52,0; (F_{crit}=4,21)

Test de significació del model (F_{16,11}): 0,815; (2,61<F_{crit}<2,,79)

Error standard del model: 163,8

A la Fig. 97 es mostren les respectives representacions gràfiques, on s'observa la dependència exclusiva del diàmetre i de l'amplada dels liposomes amb la concentració d'etanol del medi.

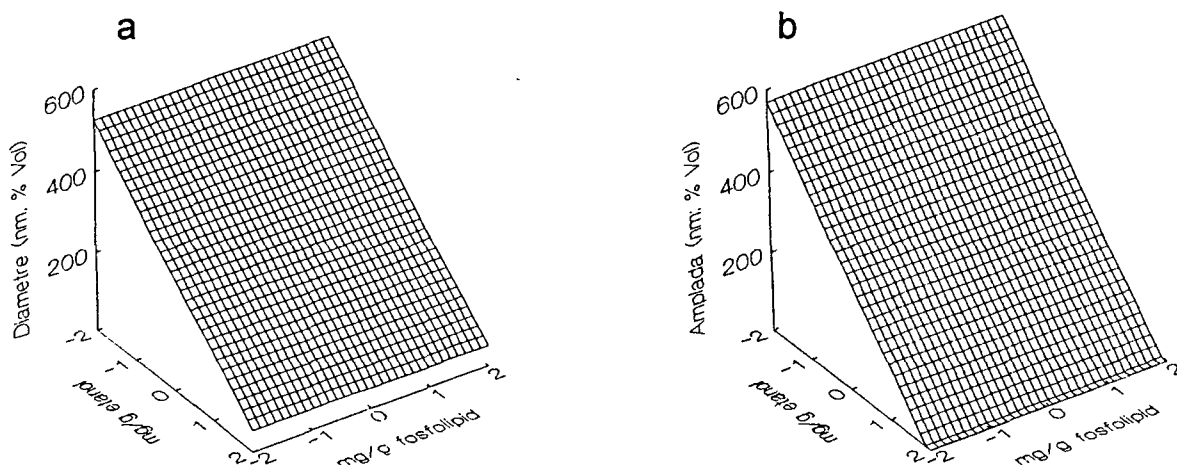


Fig. 97 Variació del diàmetre (a) i de l'amplada (b) de la distribució de grandàries de liposomes en funció de la concentració de fosfolípids i d'etanol, en mostres processades en el Microfluidizer 2 cicles a 2,4 bar de pressió.

4.2.6 LIOFILITZACIÓ.

La bibliografia descriu la utilització de sucres, en especial la trehalosa, com a agents crioprotectors de les membranes biològiques (Crowe J.H. et al., 1984; Crowe L.M. i Crowe J.H., 1991; Demel R.A. et al., 1998; Nagase H. et al., 1998). Aquesta propietat és deguda a que les seves funcions alcohol substitueixen l'aigua i permeten mantenir les macroestructures en condicions extremes de deshidratació. La disposició espacial d'aquests grups en els sucres és el que els fa diferents entre ells, permetent un determinat grau d'interacció amb les estructures que protegeixen. Sense ésser tan efectiva com la trehalosa, la sacarosa té propietats molt semblants que, pel seu cost baix, fan que sigui el sucre idoni per a l'obtenció de liofilitzats de liposomes. La capacitat de preservar la grandària dels liposomes és funció de la relació sucre/fosfolípid, i se situa en un valor d'1:1 p/p.

Per tal de determinar, en el cas de suspensions obtingudes a partir de Pro-Lipo S, la relació òptima sacarosa/fosfolípid (SAC/F), l'efecte de la concentració, i la influència del diàmetre de les vesícules en la seva estabilitat a la liofilització, s'ha realitzat un estudi emprant aquests tres factors conuinats en un disseny d'estrella. A la Taula 33 es mostren les conuinacions de nivells dels tres factors i la codificació emprada. Cada liofilitzat fou resuspès en la quantitat d'aigua que li corresponia (Ap. 3.2.3.4). Posteriorment, i per tal de realitzar les lectures de diàmetre dels liposomes, es feren dilucions en el tampó de preparació al qual se li afegí sacarosa a la mateixa concentració que la mostra.

F mg/mL	SAC/F p/p	Diàmetre previst (nm)	n	Aspecte	Diam. inicial (nm)	Diam. final ¹ (nm)	Amplada inicial (nm)	Amplada final ¹ (nm)	Variació global (%)
10 (-1)	1 (0)	200 (0)	2	Liof	219±22	177±13	75±9	84±12	63,6±8,4
33 (0)	0,2 (-1)	200 (0)	2	Gromull	183±9	809±42	74±9	551±29	153±8,6
33 (0)	1 (0)	200 (0)	3	Liof	240±14	202±10	96±7	107±7	49,1±7,9
33 (0)	1,8 (1)	200 (0)	2	Liof	278±18	206±12	99±4	107±4	71,5±7,8
33 (0)	1 (0)	24,5 (-1)	2	Liof	38,0±7,0	709±139	17±5,2	616±93	163±14
33 (0)	1 (0)	800 (3,4)	2	Liof	798±112	717±85	418±189	528±151	52,2±5,4
56 (1)	1 (0)	200 (0)	2	Liof	259±11	218±17	94±1,4	118±5	55,5±12,9

Taula 33 Valors de les variables emprades i resultats obtinguts en l'estudi de la liofilització de liposomes. Entre parentesi s'indiquen els valors codificats per l'ajust de la superfície de resposta, i els resultats s'expressen com la mitjana±std ¹Obtingut amb el liofilitzat resospés

Únicament els liofilitzats amb una relació SAC/F=0,2 van mostrar un aspecte macroscòpic incorrecte, esdevenint una pasta que mostrà problemes per a la seva resuspensió total en aigua

L'avaluació de la conservació del diàmetre i l'amplada dels liposomes es realitzà mitjançant la diferència entre els valors dels liofilitzats resuspesos i els respectius valors a les

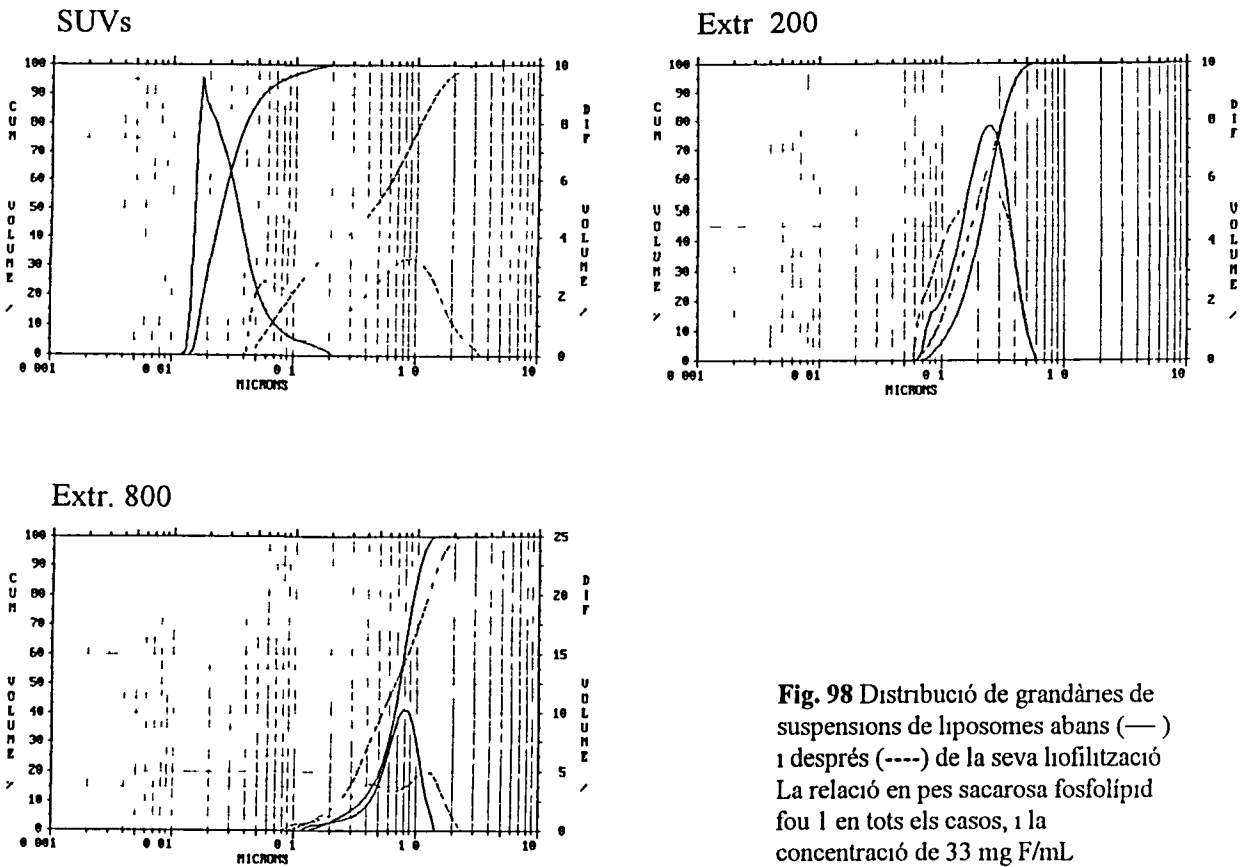


Fig. 98 Distribució de grandàries de suspensions de liposomes abans (—) i després (----) de la seva liofilització. La relació en pes sacarosa fosfolípid fou 1 en tots els casos, i la concentració de 33 mg F/mL.

suspensions inicials. L'estudi de la variació global en canals es realitzà tal i com es va descriure a l'apartat 4.1.8.3 durant l'estudi de la variabilitat en les lectures del Microtrack UPA 150. A la Fig. 98 es mostra uns exemples que corresponen a la liofilització de liposomes de 800 nm, 200 nm i 24,5 nm amb una relació SAC/F=1, i una concentració de fosfolípids de 33 mg/mL.

Els resultats de l'ajust matemàtic mostren que, a més de la relació SAC/F, el manteniment de les característiques físiques de les suspensions té una important dependència amb el diàmetre inicial de les vesícules:

$$\Delta \text{Diàmetre} = -39,71 - 561,8 \text{Diàmetre}' - 349,0 \text{SAC/F}' + 148,8 (\text{Diàmetre}')^2 + 316,2 (\text{SAC/F}')^2$$
$$\Delta \text{Amplada} = 14,00 - 443,9 \text{Diàmetre}' - 234,3 \text{SAC/F}' + 141,1 (\text{Diàmetre}')^2 + 228,3 (\text{SAC/F}')^2$$
$$\Delta \text{Canals} = 55,0 - 83,6 \text{Diàmetre}' - 40,5 \text{SAC/F}' + 24,3 (\text{Diàmetre}')^2 + 56,9 (\text{SAC/F}')^2$$

	$\Delta \text{Diàm}$	$\Delta \text{Ampl.}$	ΔGlobal
Coef. det. (r ²)	0,983	0,986	0,966
Coef. regr. (r)	0,991	0,993	0,983
Test de la regressió (F _{4,10}); (F _{crít} =3,48)	143	177	71,7
Test del model (F _{2,8}); (F _{crít} = 4,46)	0,004	0,0954	1,78
Error standard del model	50,4	33,2	10,2

S'observa que la relació mínima sacarosa/fosfolípid que permet una bona conservació

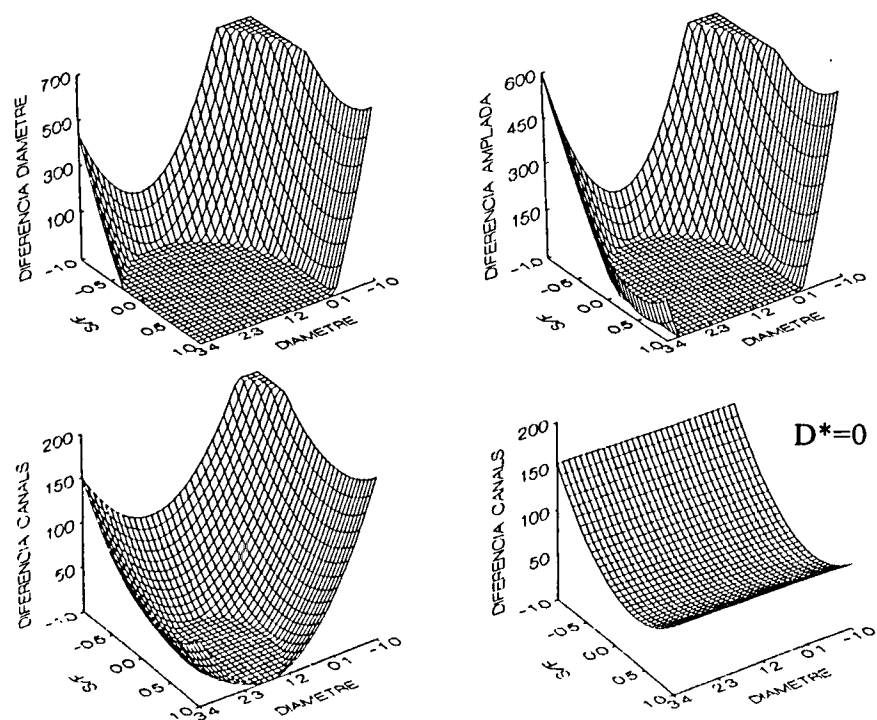


Fig. 99 Superfícies de resposta de la variació del diàmetre, amplada i percentatge en canal de suspensions de liposomes liofilitzades i resuspeses en aigua. Els factors estan codificats. En cas necessari es mostra el valor de la variable mantinguda constant.

de la població de liposomes és 1:1 p/p. Hi ha, però, una contribució molt important del tipus de població inicial: les suspensions de SUVs no conserven la seva grandària després de la resuspensió ni en un medi amb una relació SAC/F òptima (Fig. 98). Pel que fa a la concentració de fosfolípid, no té cap efecte dins dels valors estudiats. Aquests resultats apareixen representats en les superfícies de resposta de la Fig. 99. En ells s'aprecia que els tres tipus de quantificació de l'estabilitat física dels liposomes emprats són comparables.

4.2.7 OBTENCIÓ DE LIPOSOMES EN HIDROGELS

Moltes formulacions de dermofarmàcia i cosmètica empenen com a component els hidrogels els quals, en donar consistència a les preparacions, permeten una fàcil aplicació sobre la pell en la zona desitjada. A nivell molecular, els hidrogels estan constituïts per polímers que en contacte amb l'aigua formen una xarxa tridimensional que dóna lloc a un gel, el qual té una viscositat que depèn de la seva concentració, del pH i de la força iònica.

Existeixen diverses formulacions comercialitzades que incorporen liposomes en gels i en cremes, però, en la majoria de casos, no hi ha estudis que posin de manifest el grau d'estabilitat d'aquestes vesícules en aquests tipus de presentacions.

Amb aquests precedents, s'han dut a terme una sèrie d'assajos dirigits a quantificar la proporció de liposomes que mantenen la seva estructura dins d'hidrogels. Com a gelificant model s'ha emprat el Carbopol 940, un àcid poliacrílic molt estable fins i tot a temperatures de 80°C, i que és àmpliament emprat a la indústria farmacèutica i cosmètica (Fig. 100).

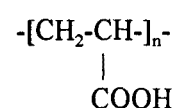


Fig. 100 Fórmula molecular del Carbopol 940. Massa molecular $\sim 4 \cdot 10^6$ Da.

Els estudis han estat basats en dos tipus de metodologies: la determinació de la densitat òptica a 500 nm de mescles de l'hidrogel i liposomes en diferents proporcions, i la mesura de la grandària dels liposomes en aquestes mescles.

Com s'ha demostrat a l'apartat 4.1.4, la mesura de la DO entre 280 i 550 nm és una metodologia ràpida i precisa per quantificar la concentració de fosfolípids quan no hi ha variació de l'estructura dels liposomes que constitueixen. És per aquest motiu que s'ha comparat la DO a 500 nm entre mescles de Carbopol 940 amb liposomes, i suspensions de liposomes en absència del gelificant. L'estudi s'ha realitzat amb suspensions de liposomes obtingudes a partir de Pro-Lipo S en aigua i extrusionant-les fins 800 o 200 nm. Les mescles de Carbopol 940 i liposomes es prepararen segons es descriu a l'apartat 3.2.3.5, i s'obtingueren de forma directa, és a dir, sense realitzar dilucions de mescles més concentrades. Totes elles foren prou líquides com per no presentar problemes de lectura en l'espectrofotòmetre. Els factors analitzats foren les concentracions de Carbopol 940 i de fosfolípid. Els nivells es distribuïren en un disseny de quadrat centrat en estel, complementant-se amb altres punts (Taula 34).

Carbopol 940 % p/p	Fosfolípid mg/g	n	Abs 500 nm (Extr 800 nm)	Abs 500 nm (Extr 200 nm)
0,01 (-2)	3 (0)	1	2,06	0,351
0,03 (0)	1 (-2)	1	0,894	0,138
0,03 (0)	3 (0)	3	2,09±0,02	0,383±0,008
0,05 (2)	3 (0)	1	2,07	0,419
0,03 (0)	5 (2)	1	2,50	0,616
0,02 (-1)	2 (-1)	1	1,58	0,256
0,02 (-1)	4 (1)	1	2,38	0,481
0,04 (1)	2 (-1)	1	1,58	0,269
0,04 (1)	4 (1)	1	2,38	0,523
0 (-3)	1 (-2)	2	0,876±0,007	0,135±0,006
0 (-3)	3 (0)	1	2,10	0,327
0 (-3)	5 (2)	1	2,51	0,482
0,01 (-2)	0 (-3)	4	0,09±0,006	
0,03 (0)	0 (-3)	2	0,013±0,013	
0,05 (2)	0 (-3)	3	0,022±0,007	

Taula 34 Composicions i absorbàncies a 500 nm de les mescles de liposomes i Carbopol 940 emprades per l'estudi de l'estabilitat física de les vesícules en hidrogels. S'empraren dos tipus de suspensions de liposomes: extrusionades fins 800 nm i extrusionades fins 200 nm. Entre parèntesi es mostren els valors de les variables codificades.

Cada grup de resultats s'ajustà a una superfície de resposta. L'anàlisi estadística de cadascuna d'elles fou:

Taula 35	Tipus de liposoma	
	Liposomes 800 nm	Liposomes 200 nm
Coef. de determinació (r ²)	1	0,998
Coef. de regressió (r)	1	0,999
Test de significació de la correlació (F _{crit} = 3,20)	61265	2151
Error standard	0,012	0,010

S'observa que, en les mescles amb liposomes extrusionats fins 800 nm (Fig. 101a) i dins dels intervals estudiats, la concentració de Carbopol 940 no afecta a la DO causada pels liposomes, ja que els valors coincideixen amb els de les mostres control (sense l'hidrogel). Aquest fet, però, no es dona quan els liposomes s'han extrusionat fins els 200 nm (Fig.101b). En aquest cas hi ha un important efecte creuat entre les concentracions del Carbopol 940 i de fosfolípids.

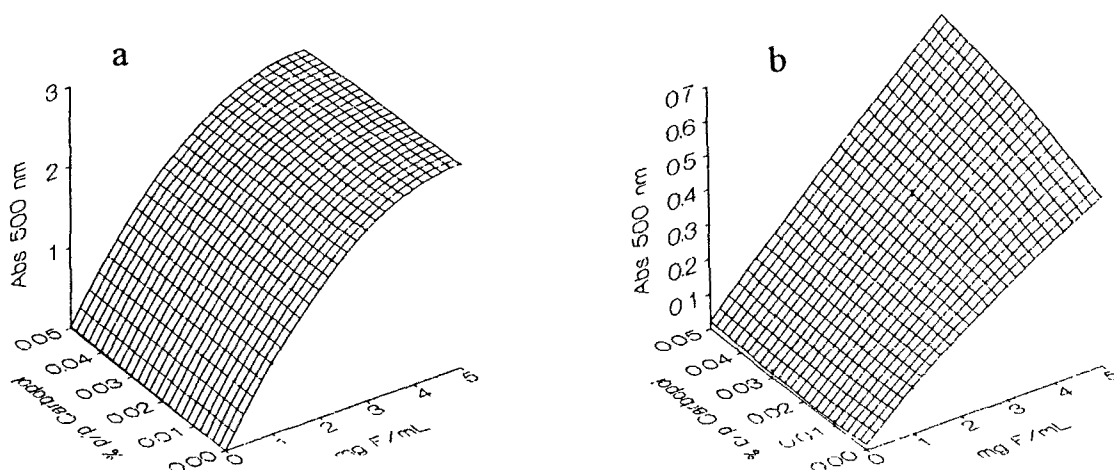


Fig. 101 Superfícies de resposta de ajustades a partir de les absorbàncies a 500 nm de mescles de Carbopol 940 amb suspensions de liposomes de 800 nm (a) o de 200 nm (b).

La invariabilitat de la DO en les mescles que contingueren liposomes de 800 nm indica que no s'altera ni el diàmetre de les vesícules ni la seva quantitat. En cas contrari es detectarien variacions respecte dels controls en algun dels nivells estudiats. Ara bé, en el cas dels liposomes extrusionats fins 200 nm, sí hi ha variacions de DO, i són més importants a mida que augmenten alhora les concentracions de Carbopol 940 i de fosfolípid. Aquest fet pot atribuir-se bé a variacions del diàmetre i/o quantitat de liposomes (la qual cosa indicaria una estabilitat molt diferent a la que presenten els extrusionats fins 800 nm), bé a un fenomen òptic causat conjuntament per les vesícules i el gelificant, o bé a totes dues causes alhora.

Per confirmar una d'aquestes possibilitats es mesurà amb el Microtrack UPA 150 la grandària de liposomes incorporats o no en els gels. Les mostres s'obtingueren de dues formes: directament mesclant les quantitats adients de mares de Carbopol 940 i suspensions de liposomes, o per dilució de mescles més concentrades constituïdes per un 0,3% p/p de Carbopol 940 i 30 mg F/g. En tots els casos les lectures es realitzaren sense tenir en compte els valors de viscositat de les mostres, emprant sempre el valor de la viscositat de l'aigua.

Les preparacions directes amb Carbopol 940 i amb una concentració de fosfolípid d'1 mg/g (Fig. 102, cercles) motren uns resultats equivalents a les mostres de referència (sense el polímer) quan la concentració de l'hidrogel és menor del 0,03% p/p. Com que la concentració de fosfolípids és inferior a la que causa una alteració de les lectures (Fig. 60), les diferències respecte del control només poden ser ocasionades per la presència de l'hidrogel: o bé aquest modifica la distribució de grandàries de les vesícules (i ho fa de forma més acusada a mida que augmenta la seva concentració absoluta o la seva concentració respecte la concentració de fosfolípid), o bé modifica la distribució de velocitats dels liposomes (i ho pot fer

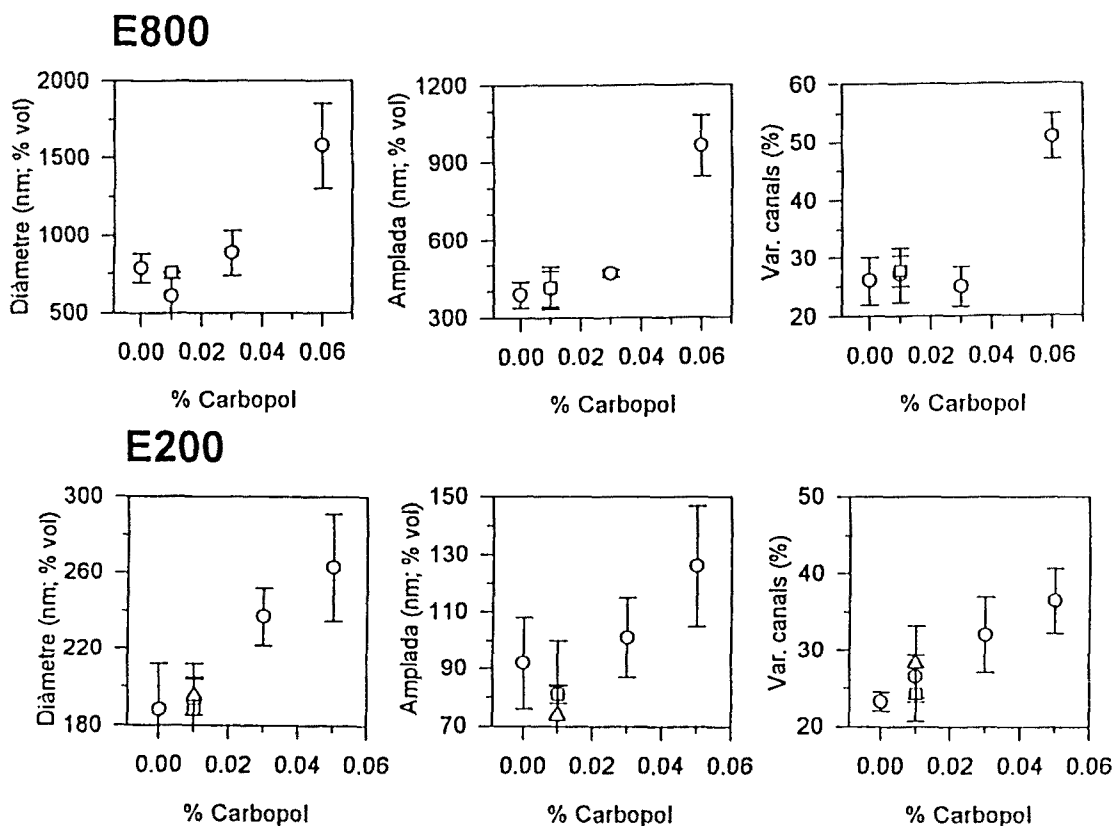


Fig. 102 El diàmetre, l'amplada i la variació global en canals dels liposomes analitzats amb el Microtrack UPA 150 depenen de la concentració de Carbopol 940. (○): Preparacions amb 1 mg F/g obtingudes directament a les concentracions indicades. (□): Preparacions amb 0,3 mg F/g obtingudes directament a la concentració indicada. (Δ): Preparacions obtingudes per dilució de mares més concentrades (0,3% p/p de Carbopol 940 i 30 mg F/g). La variació en canals està referida a les suspensions de liposomes sense polímer (controls).

per canvis en la viscositat del medi, Fig. 103, i/o per interacció dels grups carboxil desprotonats amb els liposomes amb càrrega.

D'altra banda, tant les anàlisis de preparacions directes de composició 0,01% p/p de Carbopol 940 i 0,3 mg F/g (Fig. 102, quadrat), com les de les dilucions (Fig. 102, triangle) de les mares (0,3% Carbopol 940 i 30 mg F/g) fins 0,01% Carbopol 940 / 1mg F/g, proporcionen resultats de grandàries que coincideixen amb els valors dels controls. Aquests fets posen de manifest, respectivament, que no té lloc cap variació de l'estructura dels liposomes ni en augmentar la relació hidrogel/fosfolípid, ni en augmentar la concentració absoluta del polímer. Així, les variacions observades han d'ésser degudes exclusivament a canvis en la distribució de velocitats de les vesícules. Aquest efecte és degut a la viscositat (Fig. 103) i a les càrregues del polímer, ja que en recalculant amb els valors de viscositat experimentals les anàlisis de mostres amb concentracions de Carbopol iguals o majors a 0,03% p/p, no es corregeix la distribució de grandàries dels liposomes.

Per tant, l'anàlisi de grandària dels liposomes posa de manifest que no hi ha alteracions físiques de les vesícules quan s'incorporen en gels de Carbopol 940. A més, i en el cas dels

liposomes extrusionats fins 800 nm, la DO a 500 nm indica que es conserva el 100 % de la població.

Per tal de completar l'estudi obtenint resultats quantitatius pels dos tipus de liposomes preparats, es procedí a mesurar la DO a 500 nm de dilucions progressives de gels amb 0,3% p/p de Carbopol 940 i 30 mg F/g. Aquesta concentració de Carbopol 940 és la prevista per tal d'obtenir gels amb liposomes amb una viscositat del mateix ordre de la que presenten les preparacions comercials. Les dilucions es realitzaren de forma que les concentracions de l'hidrogel i de fosfolípid es situessin dins del rang que proporcionaren les mescles directes estudiades anteriorment (Fig. 101) i que, a més, les absorbàncies a mesurar fossin menors que 1 UA. En tots els casos (Taula 36) les absorbàncies de les dilucions no foren significativament diferents a les de les superfícies de resposta obtingudes per mescles directes. D'altra banda, totes les absobàncies de les mostres diluïdes foren iguals a les dels controls.

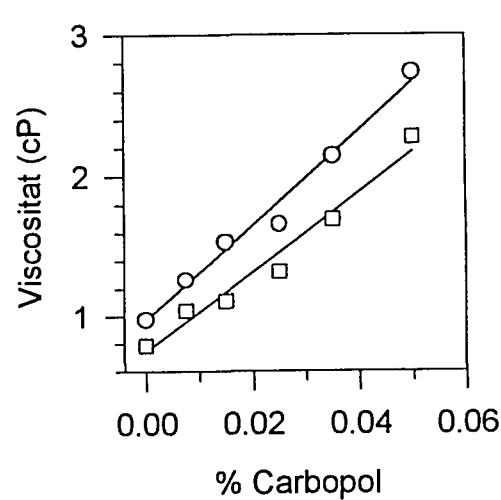


Fig. 103 Viscositat en aigua, a 20°C (○) i 30°C (□), de preparacions amb Carbopol 940 neutralitzat amb NaOH. Els resultat foren equivalents quan les preparacions es realitzaren en aigua o en aigua amb una relació blanc de Pro-Lipo S/ Carbopol 940 10:1 p/p (equivalent a la de les mostres amb liposomes).

Liposoma en el gel.	Composició de la dilució	Abs ₅₀₀ de la dilució	Abs ₅₀₀ nm superfície de resposta	Abs ₅₀₀ nm control (0% Carbopol 940)
Extr. 800 (n=2)	0,0025% Carb. / 0,25 mg F/g	0,246±0,008	0,250±0,012	ND
	0,005% Carb. / 0,5 mg F/g	0,472±0,008	0,476±0,012	ND
	0,01% Carb. / 1 mg F/g	0,895±0,015	0,892±0,012	0,876±0,007
Extr. 200 (n=4)	0,01% Carb. / 1 mg F/g	0,121±0,006	0,131±0,010	0,135±0,006
	0,03% Carb. / 3 mg F/g	0,388±0,037	0,385±0,010	0,327
	0,05% Carb. / 5 mg F/g	0,709±0,031	0,671±0,010	0,482

Taula 36 Composició de les dilucions de gels amb liposomes i llurs absorbàncies a 500 nm. Els valors obtinguts es comparen amb els de les superfícies de resposta (Fig. 101) i amb els valors que proporcionen les mateixes suspensions de liposomes sense Carbopol 940 (control).

A les zones on la concentració de Carbopol 940 no afecta la DO, el fet de que les dilucions del gels concentrats tinguin igual valor de DO que les mescles directes amb les quals s'han obtingut les superfícies de resposta, posa de manifest que no es produeix una disminució de la quantitat de liposomes amb la presència de l'hidrogel. En cas contrari la DO de les dilucions dels gels concentrats serien menors a les que mostren les mescles directes i els controls. Això es pot afirmar donat que sabem que no hi ha canvis en la grandària dels liposomes i que la DO és

proporcional a la concentració de fosfolípid.

D'altra banda, a les zones on la concentració del polímer sí afecta a la DO, el fet de que les dilucions del gels concentrats tinguin igual valor de DO que les mescles directes amb les quals s'han obtingut les superfícies de resposta, posa de manifest que les interaccions que originen la diferència respecte dels controls no afecten ni a la grandària ni a la quantitat de liposomes. Això es pot afirmar per què en augmentar la dilució s'obtenen, finalment, valors de DO iguals als de les mescles directes diluïdes i als de les suspensions control.

Amb aquests resultats es posa de manifest que, en cas de produir-se, les interaccions liposoma-hidrogel són reversibles i no destructives per les vesícules. Aquests fets són aplicables, com a mínim fins a concentracions de Carbopol del 0,3 % p/p.

4.3

RESULTATS DE SUSPENSIONS DE LIPOSOMES I EMULSIONS OB/F.

En aquest apartat es presenten els resultats corresponents a les diferents suspensions de liposomes que s'han obtingut. Inicialment es presenta l'estabilitat de liposomes de diferents grandàries, sense cap fàrmac encapsulat, i conservats a 4°C, temperatura ambient, i 40°C (Ap. 4.3.1). S'estudià l'estabilitat a llarg termini de liposomes inclosos en hidrogels (Ap. 4.3.1.2), complementant així l'estudi fet anteriorment (Ap. 4.2.7), i es realitzaren assajos *in vivo* amb tècniques no invasives (Ap. 4.3.1.3).

En els següents tres d'apartats es mostren les característiques de l'encapsulació del ditranol (Ap. 4.3.2), hidro cortisona (Ap. 4.3.3) i butirat-propionat d'hidro cortisona (Ap. 4.3.4). En tots els casos es determinà la relació màxima fàrmac/fosfolípid que admeten les membranes. D'altra banda, i en funció de les característiques d'encapsulació de les suspensions, es realitzaren estudis mitjançant espectrocòpia d'infraroig per determinar el tipus d'interacció entre el fàrmac i els fosfolípids (HC: Ap. 4.3.3.3, HBP: Ap. 4.3.4.2). En tots el casos es determinà l'estabilitat de les suspensions aquoses de liposomes i, amb el DT i l'HBP, s'estudià també la de liofilitzats i la d'hidrogels (HBP). Finalment, es realitzaren estudis *in vitro* del grau d'irritació produït pels liposomes amb DT (Ap. 4.3.2.5), i d'efectivitat de les preparacions amb HBP encapsulat (Ap. 4.3.4.3 i 4.3.4.4).

Dels tres fàrmac esmentats, només amb aquest darrer s'aconseguien suspensions amb la concentració desitjada. En els altres dos casos les concentracions màximes viables foren sempre menors a les que presenten les formulacions comercials en cremes i/o gels.

En el darrer apartat (Ap. 4.3.5) es descriuen els resultats de les emulsions amb oli de borratge estabilitzades amb fosfolípids. Inicialment es realitzà un estudi previ per escollir la relació fosfolípid/oli més adient. Una vegada obtinguda l'emulsió a la concentració d'oli desitjada, es caracteritzà cadascuna de les fases constituents de la preparació (Ap. 4.3.5.2) i, finalment, es realitzà un estudi d'estabilitat accelerada en medi aquós, en hidrogels, i en liofilitzats (Ap. 4.3.5.3).

4.3.1 LIPOSOMES OBTINGUTS AMB EL MICROFLUIDIZER 110S.

Es realitzà un estudi de l'estabilitat de diferents suspensions de liposomes obtingudes emprant Pro-Lipo S com a matèria primera i processant-les posteriorment amb el Microfluidizer 110S. L'assaig es duguè a terme amb suspensions aquoses i en gels de carbopol. Completetàriament es realitzàren estudis in vivo de la capacitat d'hidratació i d'alteració de la funció barera de la pell de les suspensions de liposomes, comparant-les amb el medi aquós i amb una crema comercial.

4.3.1.1 SUSPENSIONS AQUOSES.

El medi aquós fou tampó fosfat sòdic 10 mM, pH 7,4. Les variables que diferenciaren entre si les suspensions foren la concentració de fosfolípids, el diàmetre dels liposomes i la temperatura d'emmagatzematge, conservant-se totes en la foscor.

La composició i condicions d'emmagatzematge de les supensions foren:

Taula 37					Nº de suspensions emmagatzemades		
					4°C	Tª ambient	40°C
Pro-Lipo S (g)	Tampó (g)	Tractament al Microfluidizer	mg F/mL	Diàm .± ampl. (nm; % vol)			
1,67	qsp 100	C4p2,4	5	230 ± 222	-	-	2
4,98	qsp 100	C1p0,8	15	518 ± 376	1	1	2
4,98	qsp 100	C4p2,4	15	190 ±188	1	1	3
4,98	qsp 100	C9p4	15	36,3 ± 16	1	1	2
16,6	qsp 100	C4p2,4	50	165 ±151	-	-	2

A la Fig. 104 es mostra l'anàlisi de grandàries del liposomes de diferents suspensions de 15 mg F/mL en funció del seu tractament.

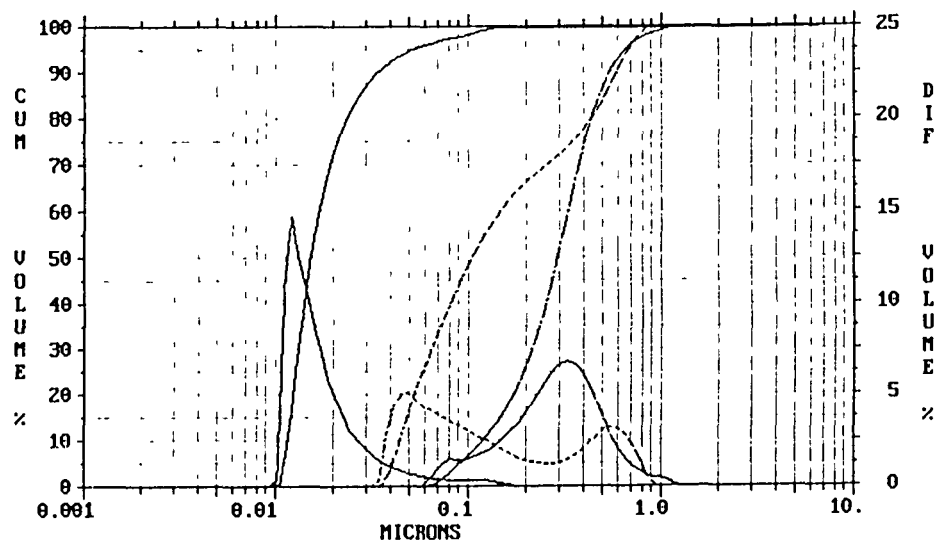


Fig. 104 Distribució de diàmetres de les suspensions de liposomes de 15 mg F/mL processades en el Microfluidizer (.....) C1p0,8, (----) C4p2,4, i (—) C9p4.

De cada mostra es guardà un volum mínim de 30 mL en les condicions descrites. A més de les variables físico-químiques, s'observaren variables macroscòpiques tals com el número de fases (indicant si té lloc el trencament de l'emulsió), el color i la olor (important a l'hora de comercialitzar productes). Coincidint amb les anàlisi, es prengueren alíquotes d'un dels replicats de 15 mg F/mL conservat a 40°C per tal de realitzar una cromatografia en capa prima i comparar els resultats amb l'índex de Klein. Les alíquotes es conservaren a -20°C fins a realitzar la TLC.

Durant el seguiment, totes les suspensions conservaren la coloració original. Les suspensions C9p4 (constituïdes per SUVs), es mostraren molt inestables: de les dues conservades a 40°C, una es trencà en dues fases als 10 dies, i les conservades a temperatura ambient i 4°C ho feren entre els 90 i 200 dies. A temperatura ambient, la suspensió C4p2,4 fou estable fins una antiguitat compresa entre 90 i 200 dies, mentre que la C1p0,8 ho fou fins poc després dels 200 dies. La resta de suspensions no es trencà en dues fases durant el període d'estudi.

Pel que fa als resultats dels paràmetres físico-químics, aquests es mostren a la Fig. 106. El pH disminueix amb el temps d'emmagatzematge, però no mostra, a cada temperatura, diferències significatives entre les suspensions. Els resultats de densitat òptica i anàlisi de diàmetres indiquen que l'estabilitat física està afavorida en les vesícules de diàmetre gran i per l'emmagatzematge a baixes temperatures. Com era previst, l'índex d'oxidació mostra diferències importants en funció de la temperatura: les suspensions conservades a 4°C resulten les més estables. A la Fig. 105 es presenta l'evolució amb el temps dels espectres d'absorbància d'una de les suspensions C4p2,4 conservada a 40°C. Pel que fa a l'efecte del diàmetre, les suspensions constituïdes per SUVs mostren el major grau d'oxidació a totes la temperatures. Les mostres presenten una relació entre el grau d'oxidació i la olor a ranci: en la majoria de casos, a un valor d'índex de Klein igual o major a 1,2 es detectà aquesta olor.

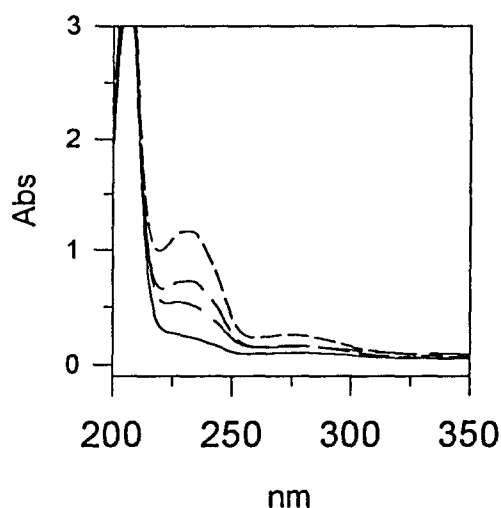


Fig. 105 Evolució dels espectres d'absorbància UV-Vis d'una suspensió de liposomes emmagatzemada a 40°C. L'increment dels número de diens i de triens conjugats amb el temps causa l'augment d'absorbància a 233 nm i 277 nm respectivament.

Els resultats de l'anàlisi per capa prima de la suspensió C4p2,4 emmagatzemada a 40°C no detectaren cap variació ni en el número, ni en la intensitat de les taques de lípids, tot que la mostra assolí índexs d'oxidació elevats. Per tant es posa de manifest que mitjançant aquesta tècnica no és possible relacionar l'increment de dobles enllaços conjugats en les cadens d'àcid gras dels fosfolípids amb l'aparició de lisofosfatidilcolina.

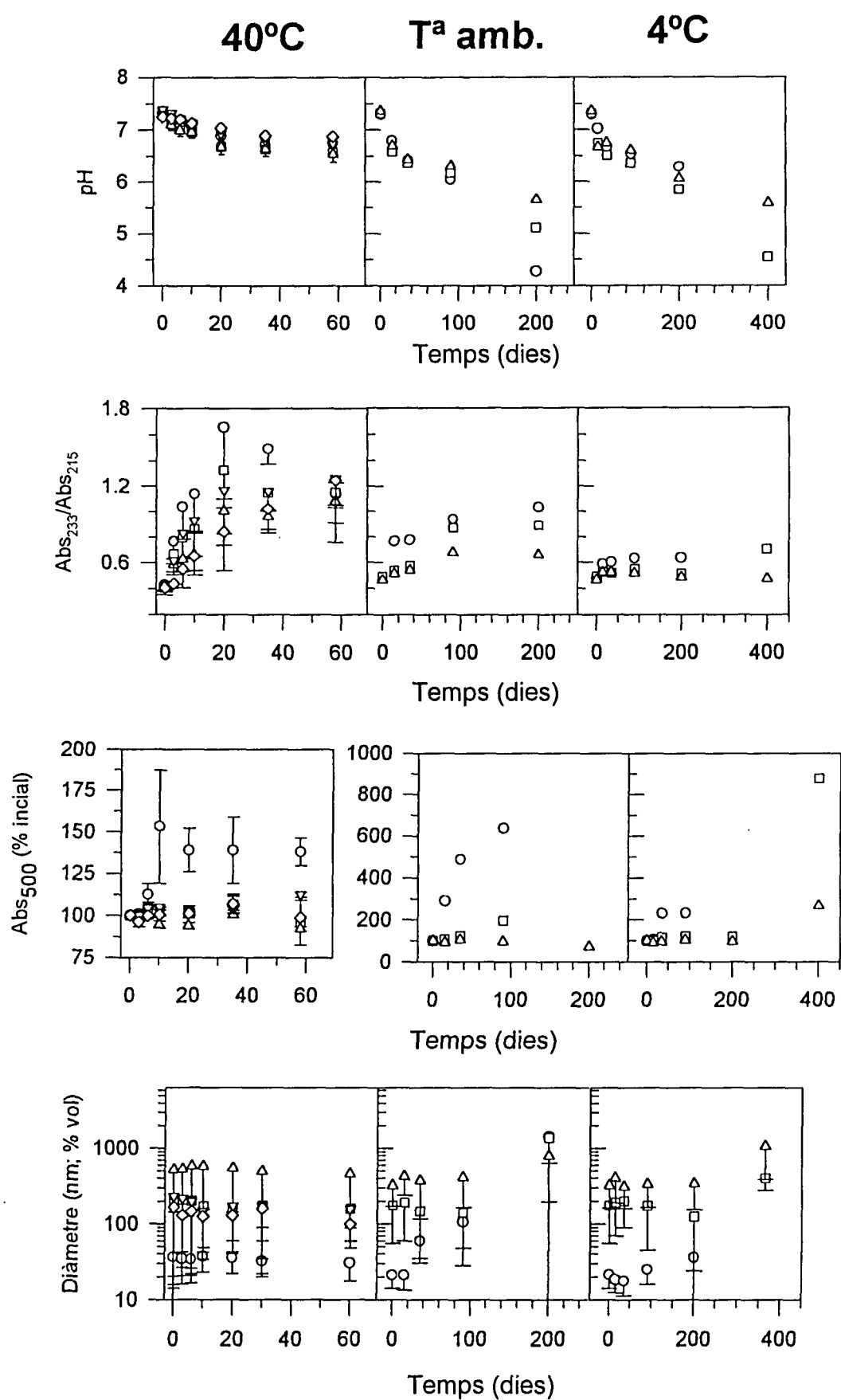


Fig. 106 Controls d'estabilitat de suspensions de liposomes en diferents condicions de temperatura. (●) 15 mg F/mL, C9p4; (□) 15 mg F/mL, C4p2,4; (Δ) 15 mg F/mL, C1p0,8; (▽) 5 mg F/mL, C4p2,4; (◇) 50 mg F/mL, C4p2,4.

4.3.1.2 HIDROGELS AMB LIPOSOMES.

Es prepararen dues mostres d'hidrogels amb liposomes per determinar-ne l'estabilitat accelerada a la foscor durant 60 dies. Prèviament a la obenció dels gels, s'obtingueren dues suspensions de liposomes en tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4 amb la composició i tractament que es descriu tot seguit:

Pro-Lipo S (g)	Tampó (g)	Tractament	mg F/mL
19,8	qsp 100	Microfluidizer C1p2,4	59,5

Taula 38 Composició de les suspensions preparades per a l'estudi d'estabilitat accelerada dels liposomes en hidrogels.

Per obtenir les mostres, d'un pes final de 100 g, es realitzà la mescla de les suspensions anteriors amb Carbopol 940 al 2% p/p neutralitzat, en una relació suspensió/Carbopol 2% 5,3:1 p/p. Per tant, la composició final dels hidrogels fou:

Pro-Lipo S (g)	Carbopol 940 %	Tampó (g)	mg F/g
16,8	0,3	qsp 100	50

Taula 39 Composició dels hidrogels amb liposomes.

Com a referència es prepararen dos blancs d'hidrogels sense fosfolípids. Amb ells es determinà si el Carbopol 940 petia cap alteració química que interferís en la mesura de l'índex de Klein dels fosfolípids, o en la quantificació de la DO a 500 nm. Els resultats es mostren a la Fig. 107. Durant la durada de l'anàlisi, a més de mantenir el pH constant, els blancs amb carbopol no mostraren cap interferència en la mesura de la DO que no fos la corresponent a la terbolesa. Pel que fa als gels amb liposomes, s'aprecia que les preparacions mostren una major estabilitat física i química que en el cas de les suspensions aquoses.

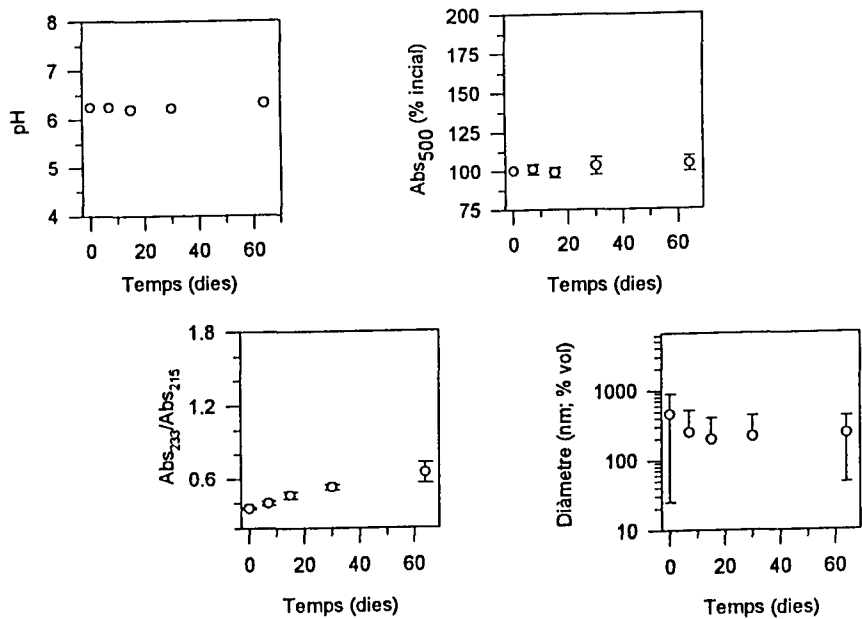


Fig. 107 Estabilitat d'hidrogels amb liposomes (50 mg F/g) emmagatzemats a 40°C i en la foscor.

4.3.1.3 AVALUACIÓ DEL GRAU D'HIDRATACIÓ I FUNCIÓ BARRERA DE LA PELL.

Per comprovar l'efecte de les suspensions de liposomes en aquests paràmetres de la pell, es realitzaren estudis de l'efecte d'aplicacions de diferents mostres en pegats oclusius durant 4 hores, tal i com es descriu a l'apartat 3.1.3.1.

En primer lloc es determinà l'evolució front del temps de la TEWL i del grau d'hidratació (capacitània) en retirar pegats amb:

- 1.- crema base d'Isdinium, sense fàrmac (n=4),
- 2.- tampó fosfat sòdic 10 mM, pH 7,4 (n=5)

Els resultats es mostren a la Fig. 108, on els valors negatius de temps corresponen a les lectures basals en els llocs d'aplicació dels pegats abans de realitzar l'oclusió. Com s'aprecia, en els dos casos hi ha un notable augment dels valors de TEWL i del grau d'hidratació en els instants inicials, seguit d'una disminució exponencial. Aquesta evolució és equivalent a les descrites per Tagami H. et al. (1994) en els estudis absorció/desorció d'aigua a l'estrat corni després d'aplicacions del líquid durant 1 minut.

Les lectures de TEWL mostren que en els dos casos els sistemes retornen als nivell basals entre els 30 i 60 minuts des que els pegats són retirats. Per tant, en cap cas no hi ha una alteració de la funció barrera de la pell, sinó una desorció d'aigua fins que es retorna a l'estat inicial (Pinnagoda J., 1995). Les cinètiques observades també són similars a les que causen els pegats oclusius sense cap mostra (Barel A.O. i Clarys P., 1995a). Aquest fet pot explicar-se per la saturació de vapor d'aigua de l'aire contingut entre la pell i la superfície interna del pegat: en funció del grau d'humitat de l'entorn s'estableix un equilibri entre aquest i l'estrat corni, el qual pot absorbir aigua en les capes més externes, i alliberar-la un cop finalitzada l'oclusió.

La variació de la capacitància és diferent en cada cas. Després d'una ràpida disminució, la crema assoleix uns valors constants d'hidratació en uns 30 minuts. Aquest comportament

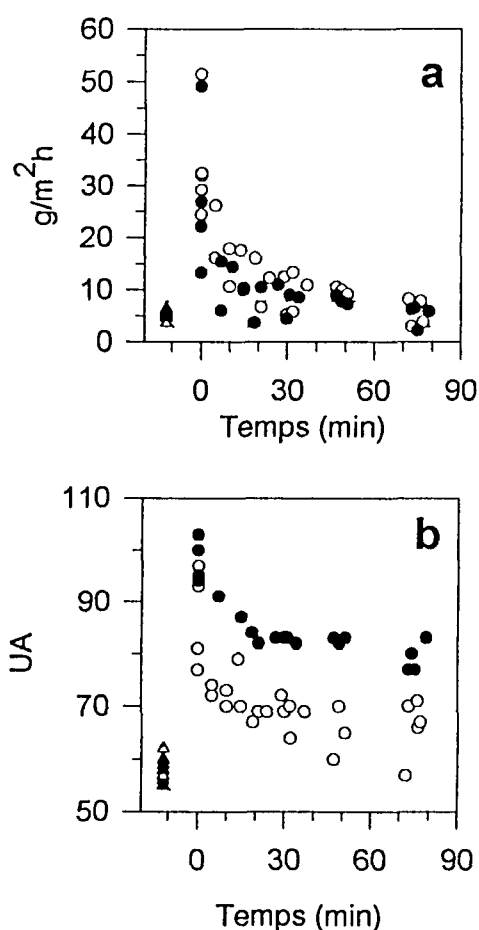


Fig. 108 Cinètica de TEWL (a) i grau d'hidratació (b) de la pell després de l'aplicació durant 4 h de pegats oclusius amb (●) crema base Isdinium sense fàrmac (n=4), (○) tampó fosfat 10 mM, pH 7,4 (n=5)

s'associa a un efecte oclussiu de les cremes sobre l'estrat corni, fet que causa una acumulació d'aigua provinent de la pròpia epidermis (Barel A.O. i Clarys P., 1995b). Partint dels mateixos valors inicials que els pegats amb crema, les aplicacions amb tampó retornen als valors inicials d'hidratació en uns 60 minuts, fet que indica la pèrdua de l'aigua adsorbida per les capes externes de l'estrat corni i que no té lloc cap deshidratació de la pell.

Un cop coneguda la cinètica de les oclussions amb la crema i amb el tampó, es compararen els valors de la TEWL i del grau d'hidratació als 30 minuts de retirar pegats oclussius aplicats durant 4 h i que contingueren alguna d'aquestes mostres:

- 1.- Suspensió de liposomes de 35 mg F/mL, obtinguda a partir de Pro-Lipo S en tampó fosfat sòdic 10 mM, pH 7,4 (Microfluidizer C1p3, diàmetre: 230 ± 131 nm),
- 2.- Suspensió de liposomes de 35 mg F/mL (REVs EPC/PA 9:1 mol/mol, diàmetre: 141± 63 nm),
- 3.- Blanc del medi aquós que resulta en obtenir liposomes a partir de Pro-Lipo S, amb la mateixa concentració d'etanol i glicerol que la suspensió de liposomes .
- 4.- Crema base sense fàrmac d'Isdinium.

En cada voluntari es reservà una zona de l'avantbraç com a control, no aplicant-se cap pegat. Els resultats es mostren a la Taula 40, on també s'inclouen els resultats obtinguts prèviament amb el tampó:

	Grau d'hidratació (UA)			TEWL (g/m²h)		
	Inicial	Final (30 min)	n	Inicial	Final (30 min)	n
Control	67,2 ± 5,3	71,0 ± 6,8	15	4,6 ± 1,2	4,0 ± 1,3	19
Pro-Lipo S	69,0 ± 6,9	79,5 ± 11,5	14	4,4 ± 1,3	7,4 ± 2,4	16
REVs	68,8 ± 5,5	75,5 ± 5,1	10	4,1 ± 1,3	6,9 ± 2,8	15
Medi Pro-Lipo S	71,4 ± 7,8	79,7 ± 8,5	13	4,2 ± 1,0	7,1 ± 1,8	16
Tampó	58,6 ± 2,3	68,8 ± 2,9	5	5,3 ± 1,1	9,7 ± 3,8	5
Crema	63,4 ± 5	85,4 ± 6,3	15	4,9 ± 1,2	5,6 ± 1,0	18

Taula 40 Valors d'hidratació i TEWL inicials i als 30 minuts després de l'apicació de pegats oclussius durant 4 hores amb diferents preparacions.

Per tal de comparar els valors, es normalitzaren els resultats prenent els valors inicials de cada tractament com a 100%. Els percentatges calculats es mostren a la Fig. 109. L'anàlisi de les dades indica que, en el cas de la TEWL, només el tractament amb crema no té diferències significatives respecte del control. Pel que fa als tractaments amb medi aquós, tots mostren el mateix increment de TEWL, de manera que ni les dues suspensions de liposomes, ni el medi aquós de la suspensió de Pro-Lipo S, causen alteracions que no puguin explicar-se per la desorció de l'aigua absorbida per les capes externes de l'estrat corni, ja que els seus resultats són equivalents als de les mostres amb tampó.

Pel que fa al grau d'hidratació, i com ja s'apreciava a l'estudi cinètic, el tractament amb crema és significativament diferent respecte de tots els altres (incloint-hi el grup de control). D'altra banda, els tractaments aquosos no són significativament diferents del control, però sí que tots ells mostren la mateixa tendència: un augment del grau d'hidratació. Aquest fet pot explicar-se fent de nou referència a la desorció d'aigua de la pell. Mentre dura aquest procés, tant els valors de TEWL com d'hidratació són més elevats que els valors basals, disminuint conjuntament alhora que la quantitat d'aigua absorbida es va alliberat. Com mostren l'estudi cinètic i els valors a 30 min de les aplicacions amb tampó, calen vora 60 min per tornar a l'estat inicial, fet que explica la tendència observada als 30 min en tots els tractament aquosos, en els quals els valors de TEWL són vora dels basals.

En el cas de la cema, la constància en el grau d'hidratació indica el final de la desorció de l'aigua. Com que a més en 30 min ja s'ha assolit el nivell base de TEWL, tot indica que la funció barrera de la pell no ha estat alterada, i que la quantitat d'aigua absorbida inicialment ha estat menor que en el cas dels tractament aquosos (en cas contrari els valors inicials d'hidratació serien majors o la disminució més lenta).

Per tant, els tractament amb suspensions de liposomes no tenen, en les condicions experimentals realitzades, cap incidència sobre el grau d'hidratació de la pell. D'altra banda, l'alteració de la TEWL detectada als 30 min no és diferent de la que causada pel propi medi aquós, posant-se de manifest l'absorció/desorció d'aigua que té lloc a les capes superficials de l'estrat corni.

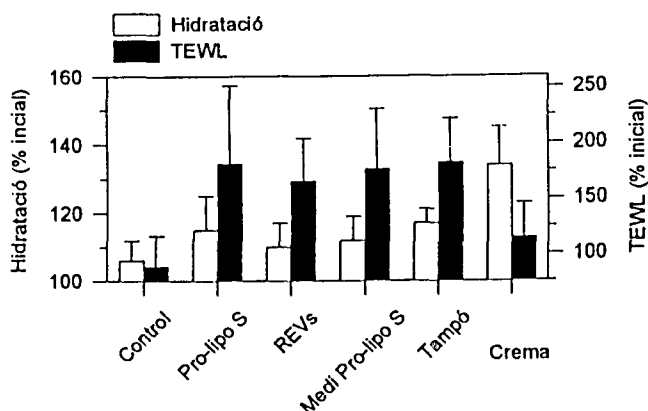


Fig. 109 Valors relatius del grau d'hidratació i de la TEWL causats per tractament oclusius durant 4 hores amb diferents mostres.

4.3.2 LIPOSOMES AMB DITRANOL (DT).

La posta a punt d'un mètode per a l'obtenció de liposomes amb ditranol encapsulat a la concentració de 0,1 % p/p es desenvolupà en dues etapes. En la primera es determinà l'efecte dels dissolvents i de la llum en l'estabilitat química del ditranol (Ap. 4.3.2.1). Tot seguit s'obtingueren les suspensions de liposomes per diferents mètodes, amb la intenció de millorar l'encapsulació del ditranol i augmentar la seva concentració en les suspensions.

Com a mètode general per a l'obtenció de suspensions de liposomes amb ditranol al 0,1 % p/p, s'emprà Pro-Lipo S. Inicialment es va determinar la saturació de les bicapes per part del fàrmac (Ap. 4.3.2.2.1). Una vegada conegut el comportament del sistema, es prepararen diferents suspensions per estudiar la seva estabilitat (Ap. 4.3.2.2.2). La degradació del ditranol encapsulat resultà, però, ràpida, i s'optà per alternatives com la liofilització (Ap. 4.3.2.2.3) o la inclusió directa del fàrmac en la mescla de Pro-Lipo S tal i com la proporciona el fabricant (Ap. 4.3.2.2.4). Aquesta darrera opció implicaria l'addició del medi aquós a la preparació tot just abans d'emprar-la.

D'altra banda, la baixa relació de saturació fàrmac/fosfolípid trobada fou un condicionant insalvable per obtenir suspensions amb un 0,1 % de ditranol encapsulat, inclús a concentracions de fosfolípid tan elevades com 75 mg/mL. Per això s'intentà millorar els resultats de varies formes: bé incorporant el ditranol en gel Natipide II; bé millorant la mescla del fàrmac amb els fosfolípids emprant sistemes d'obtenció de liposomes d'escala laboratori, com ara els REVs i MLVs. En tots els casos, però, els resultats foren negatius.

Com a corolari del tema es realitzà un assaig d'irritació *in vitro* comparant l'acció del ditranol en crema i en liposomes (Ap. 4.3.2.5).

Tot seguit es descriuen cadascun d'aquests resultats.

4.3.2.1 ESTABILITAT QUÍMICA DEL DITRANOL.

L'activitat terapèutica del ditranol està basada en la seva facilitat de formació de radicals. La bibliografia descriu els mecanismes de les reaccions, tant pel que fa a la interacció amb cèl·lules com els que el duen a la seva degradació (Wiegrebe W. i Müller K., 1995). Aquesta característica, però, fa que calgui extremar tant la seva manipulació com les condicions dels processos que impliquen l'obtenció de formulacions.

Els mètodes de formació de liposomes emprats en el present treball impliquen una o varies etapes on s'empra algun tipus de dissolvent orgànic. És per aquest motiu que, prèviament a la preparació de les suspensions, s'ha estudiat l'efecte que el medi pot tenir sobre l'estabilitat del fàrmac en diferents condicions d'il·luminació. La riquesa en ditranol s'ha determinat segons el descrit a l'apartat 3.1.1.4.

Els resultats es mostren a la Fig. 110, on es comparen els dissolvents emprats en l'anàlisi d'HPLC (en els que el ditranol mostra una major estabilitat), amb els necessaris per la

preparació de liposomes utilitzant diferents mètodes: etanol en el cas de Pro-Lipo S, éter en obtenir REVes, cloroform per a la obtenció d'MLVs. Com s'aprecia, l'estabilitat del ditranol en etanol del 96 % v/v depèn de les condicions d'il·luminació, fet pel qual totes les mostres que s'han preparat emprant Pro-Lipo S com a matèria primera de fosfolípids han estat protegides de la llum.

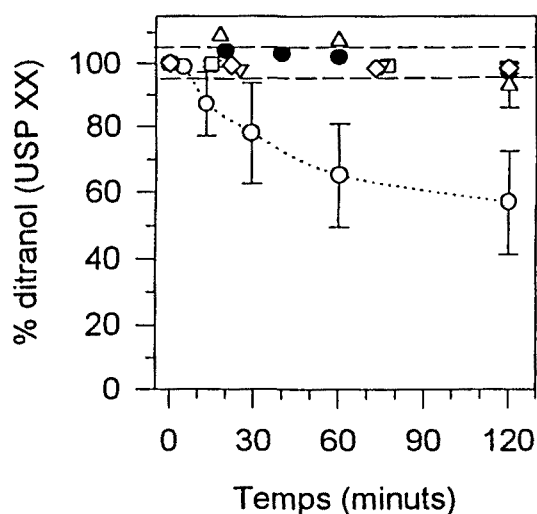


Fig. 110 Estabilitat química del ditranol (percentatge de riquesa) en dissolucions de: (○) etanol exposada a la llum; (●) etanol en foscor; (□) éter exposada a la llum; (△) n-hexà exposada a la llum; (▽) cloroform exposada a la llum; (◇) diclorometà exposada a la llum.

4.3.2.2 ENCAPSULACIÓ DE DITRANOL EN LIPOSOMES DE PRO-LIPO S.

Les suspensions de liposomes amb ditranol s'obtingueren segons els mètodes descrits a l'apartat 3.2.2 caracteritzant el sistema mitjançant la màxima relació fàrmac/fosfolípid

que es pot assolir a les membranes fosfolipídiques, i per l'estabilitat de les suspensions obtingudes.

L'estructura molecular del ditranol el fa susceptible d'ésser incorporat a les bicapes dels liposomes i és per aquest motiu que el fàrmac es mescla amb els Pro-Lipo S abans de l'addició del tampó, procés que indueix la formació dels liposomes. Aquesta primera etapa pot ser crítica per dues raons: pel contacte del ditranol amb un dissolvent que no li és químicament inert, i per la necessitat d'aconseguir la màxima incorporació del fàrmac a les bicapes abans d'afegir el medi aquós.

El primer condicionant quedà solventat en quantificar per HPLC l'estabilitat de la mescla ditranol /Pro-Lipo S (5 mg ditranol/mL Pro-Lipo S) mantinguda en agitació i a la foscor durant 75 minuts. A la Taula 41 s'observa que no es produí cap disminució significativa de la concentració de ditranol.

Per establir el temps mínim que permet una bona distribució del fàrmac dins les bicapes obertes de Pro-Lipo S, es van determinar les concentracions de ditranol de suspensions de liposomes de 75 mg F/mL obtingudes a partir de la mescla anterior amb diferents temps d'agitació (Taula 41). Tal i com s'indica a l'apartat 3.2.4.3, les suspensions foren centrifugades per tal de separar el fàrmac en excés que no es va solubilitzar a les bicapes o al medi aquós de la suspensió (tampó fosfat sòdic 10 mM, pH 7,4). Els resultats mostren que en 15 minuts s'assoleix la màxima concentració de la preparació, no incrementant-se amb l'agitació posterior. D'acord amb aquests resultats podem afirmar que aquest temps és suficient per a permetre la incorporació del ditranol en les bicapes obertes que constitueixen el Pro-Lipo S.

Aquest temps mínim s'ha emprat en tots els processos similars en els quals s'han encapsulat molècules hidrofòbiques en liposomes.

Temps (min)	% p/p ditranol ⁽¹⁾ (mescla ditranol / Pro-Lipo S)	% p/p de ditranol ⁽²⁾ (suspensió liposomes 75 mg F/ mL)
15	0,502 ± 0,001	0,042 ± 0,001
30	0,501 ± 0,001	0,044 ± 0,001
45	0,503 ± 0,001	0,044 ± 0,001
60	0,498 ± 0,001	0,041 ± 0,001
75	0,502 ± 0,001	0,042 ± 0,001

Taula 41 ⁽¹⁾: Concentracions de ditranol, en funció del temps d'agitació, d'una mescla de Pro-Lipo S amb el fàrmac. ⁽²⁾: Concentracions de ditranol de les suspensions de liposomes obtingudes a partir de les mescles anteriors.

4.3.2.2.1 SATURACIÓ DELS LIPOSOMES.

Amb els resultats anteriors es va procedir a determinar la saturació de les bicapes dels liposomes amb ditranol. En primer lloc es determinà el ditranol solubilitzat en blancs preparats amb una dissolució d'etanol/glicerol/tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4 equivalent a la que causen les concentracions de Pro-Lipo S utilitzades per obtenir les suspensions de liposomes (Taula 42). Una vegada centrifugats els blancs, i com en el cas de les dissolucions aquoses, tots els sobrenedants foren de concentracions iguals o menors a 0,001 % p/p de ditranol (límit de detecció). Per determinar la incorporació del ditranol en liposomes no extrusionats, es prepararen suspensions amb diferents concentracions de fosfolípid en tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4. A cadascuna d'elles s'incorporà el fàrmac en quantitats variables tal i com es mostra a la Taula 42. Aquestes quantitats inicials de ditranol en les mescles determinaren la concentració que caldria obtenir si tot el fàrmac s'incorporés a les preparacions (% p/p ditranol inicial). Després de la centrifugació, es quantificà la concentració del fàrmac als sobrenedants, determinant-se així la concentració real de ditranol a la suspensió.

Blanc de Pro-Lipo S ⁽¹⁾ . (g)	Ditranol (g)	Tampó (g)	Conc. F de la suspensió de la qual és blanc. (mg/mL)
11,7 (n=1)	0,150	qsp 100	50
17,5 (n=3)	0,19	qsp 100	70
23,3 (n=1)	0,17	qsp 100	100

Pro-Lipo S (g)	Ditranol (g)	Tampó (g)	Conc. F (mg/mL)
16,7 (n=2)	0,150; 0,100 ; 0,075; 0,020 ; 0,010	qsp 100	50

Pro-Lipo S (g)	Ditranol (g)	Tampó (g)	Conc. F (mg/mL)
25,0 (n=3)	0,190 ; 0,140 ; 0,100; 0,070 ; 0,050 ; 0,020;	qsp 100	75
33,3 (n=2)	0,170 ; 0,050 ; 0,025	qsp 100	100

Taula 42 Composició de les preparacions utilitzades per determinar la saturació de les suspensions de liposomes amb ditranol. ⁽¹⁾ Quantitat de la mescla etanol/glicerol/aigua 20:10:40 p/p/p afegida a la preparació per tal d'obtenir un blanc amb la mateixa quantitat d'alcohols que les preparacions amb fosfolípids.

A la Fig. 111 es mostra, per les diferents concentracions de fosfolípid, el percentatge de ditranol en les suspensions en funció de la quantitat de ditranol en la mescla inicial. S'observa que totes les suspensions mostren una saturació. Aquest fet permet calcular la saturació de les bicapes restant la concentració dels blancs (~0,001 % p/p) a la concentració total a la zona de saturació de la corba. El resultat és de $4,71 \pm 0,45$ mg ditranol/g F, valor que correspon a una relació ditranol/fosfolípid 1:60 mol:mol. A partir de les dades d'incorporació, i tenint en compte que la solubilitat del ditranol en el medi aquós fou pràcticament nul·la (menor al límit de detecció), s'obté la Fig. 112, on es representa la quantitat de ditranol incorporada a les bicapes i el rendiment del procés, en funció de la relació fàrmac/fosfolípid p/p en la mescla inicial.

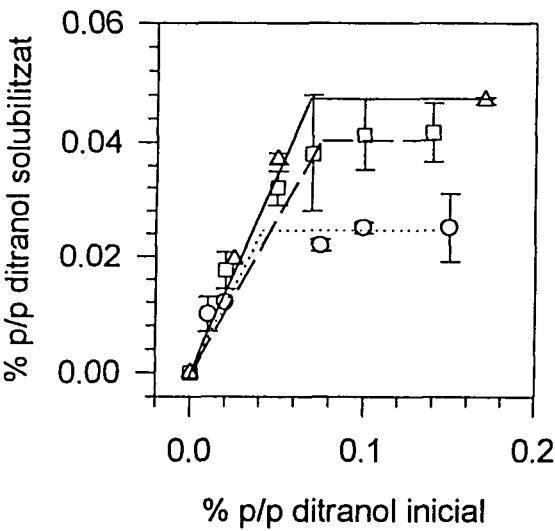


Fig. 111 Concentració de ditranol en suspensions de liposomes de 50 mg F/ml (○), 75 mg F/mL (□) i 100 mg F/mL (Δ), en funció del percentatge inicial de ditranol en la mescla de productes.

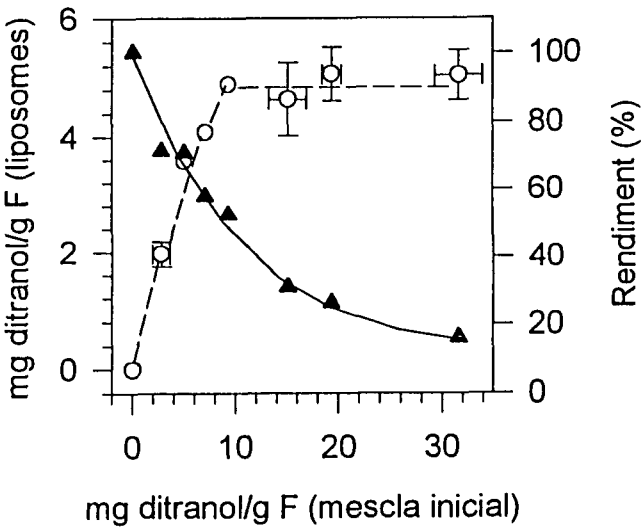


Fig. 112 Relació ditranol encapsulat/fosfolípid i rendiment del procés en funció de la relació de les dues substàncies en la mescla inicial

4.3.2.2.2 ESTABILITAT DE LES SUSPENSIONS.

Es prepararen 2 suspensions de liposomes, a partir de Pro-Lipo S, de 75 mg/mL de fosfolípid amb una concentració de ditranol inicial de 0,075 % p/p. Aquesta composició (relació

inicial 10:1 mg DT/g F) situa el sistema a la zona de saturació de les bicapes que té un rendiment d'incorporació màxim. Cada suspensió es dividí en quatre parts: la primera part no s'extrusionà, mentre que les altres tres parts de cada preparació s'extrusionaren fins un diàmetre mínim de porus de 800, 400 o 200 nm. Un cop centrifugades per separar el fàrmac en excés, s'analitzaren per HPLC, quantificant-se la concentració de ditranol solubilitzat i ajustant-se posteriorment la seva concentració al 0,03 % p/p mitjançant dilució amb el tampó de la preparació. S'aconseguí un volum de cada preparació situat entre 3 i 5 mL, conservant-se en recipients topacis a 4°C per tal de realitzar el seguiment de la seva estabilitat física i química. El resultats es mostren a les Fig. 113 i 114, on pot apreciar-se la ràpida degradació del ditranol, que resulta independent de la grandària de les vesícules. L'estabilitat física d'aquestes, però, és satisfactòria.

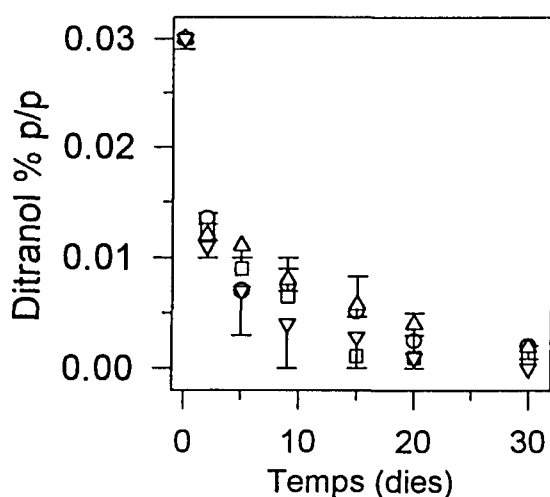


Fig. 113 Concentració de ditranol en funció del temps en suspensions de liposomes no extrusionats (○), extrusionats fins 800 nm (□), extrusionats fins 400 nm (Δ) i estrusionats fins 200nm (▽). Totes les preparacions es conservaren a 4°C i a la foscor. (n=2).

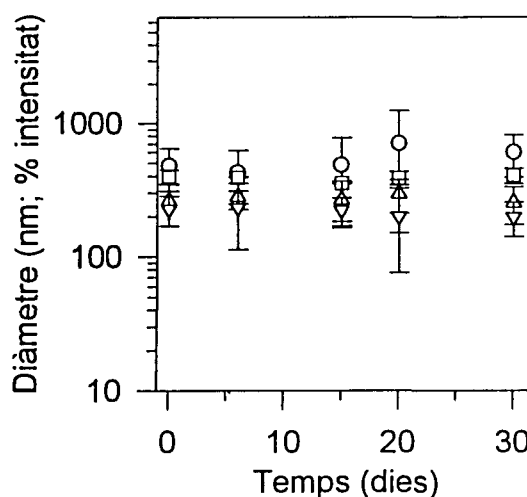


Fig. 114 Diàmetre mitjà de liposomes amb ditranol en funció del temps. Les anàlisi es realitzaren amb un Malvern Autosizer IIc. Liposomes no extrusionats (○), extrusionats fins 800 nm (□), extrusionats fins 400 nm (Δ) i estrusionats fins 200nm (▽). Totes les preparacions es conservaren a 4°C i a la foscor. (n=2).

4.3.2.2.3 ESTABILITAT DELS LIOFILITZATS.

Per tal de millorar l'estabilitat del ditranol que mostraren les preparacions anteriors, s'obtingueren 2 suspensions de liposomes de 75 mg/mL amb la mateixa quantitat de sacarosa al medi aquós (Ap. 3.2.3.4). Les preparacions foren extrusionades per membranes de 800 nm. Després de centrifugar les suspensions (1.100 x g; 2,5 min), s'analitzà el seu contingut de ditranol i s'ajustà per dilució amb tampó al 0,03 % p/p. La presència de sacarosa no causà cap variació en la relació ditranol encapsulat/fosfolípid. Les mostres, d'uns volums compresos entre

els 3 i 5 mL, es congelaren per immersió en nitrogen líquid i es liofilitzaren tot seguit. Es realitzà el mateix procés amb una mostra sense sacarosa.

A les 48 hores mostraren un aspecte correcte: una pols seca i fràgil ($0,142 \pm 0,004$ g liofilitzat/g suspensió; $n=3$), amb una riquesa de ditranol de 0,18 % p/p, i que es guardaren en la foscor a 4°C. La Fig. 115 mostra l'estabilitat química dels liofilitzats obtinguts emprant sacarosa, i els compara amb una mostra preparada sense el sucre.

A diferents intervals de temps es resospengueren fraccions dels liofilitzats emprant 6 mL H_2O /g liofilitzat. Posteriorment es quantificà la concentració de ditranol de la mostra no centrifugada i després de centrifugar-la en les condicions habituals (Fig. 116), realitzant-se també l'anàlisi del diàmetre de les vesícules (Fig. 116). La diferència de concentració entre les mostres centrifugades i les no centrifugades indica que durant la resuspensió de les mostres té lloc una pèrdua parcial del material encapsulat.

Com s'observa, els resultats no són gens satisfactoris: els liofilitzats només mostren una lleugera millora en l'estabilitat del fàrmac.

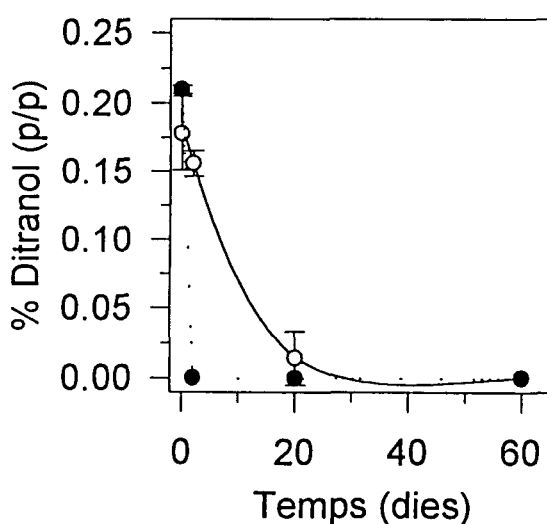


Fig. 115 Estabilitat del ditranol en mostres liofilitzades amb sacarosa (O; $n=2$) i sense sacarosa (●, $n=1$).

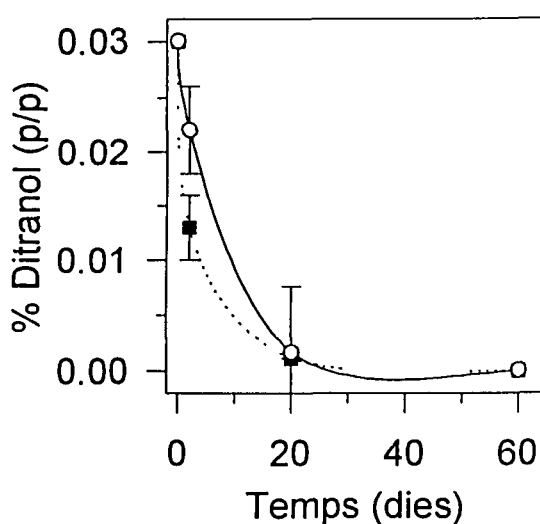


Fig. 116 Concentració de ditranol en liofilitzats resospesos no centrifugats (O; $n=2$) i centrifugats (●; $n=2$).

4.3.2.2.4 ESTABILITAT DE PRO-LIPO S AMB DITRANOL.

La incorporació en el Pro-Lipo S d'una molècula hidrofòbica permet que aquesta es distribueixi per les bicapes obertes que hi ha en el sistema ternari aigua/alcohols/fosfolípid. Aquesta mescla pot conservar-se així fins el moment en que es desitja obtenir liposomes, moment en el qual només cal afegir un medi aquós. Per aquest motiu, i donada la baixa estabilitat i encapsulació de les suspensions i liofilitzats amb ditranol, es prepararen dues

mescles de ditranol i Pro-Lipo S al 0,1 % p/p i d'una massa total entre 5 i 10 g. Aquesta mescla proporciona una relació fàrmac/fosfolípid de 3,0 mg/g, que té un rendiment d'incorporació a les bicapes d'aproximadament el 75 % (Fig. 112). Les mescles es conservaren a 4°C en la foscor.

L'estabilitat química es mostra a la Fig. 117, on s'aprecia que el sistema tampoc no resulta idoni, ja que es produeix una ràpida degradació del ditranol.

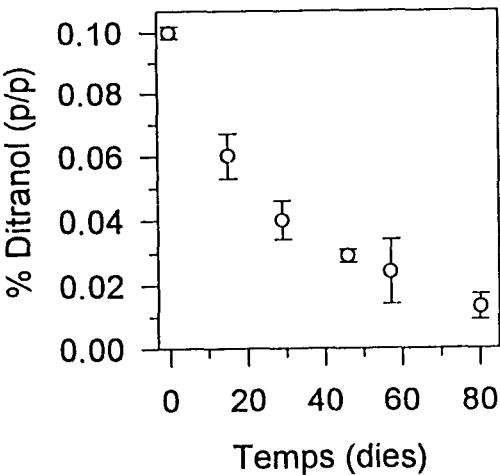


Fig. 117 Estabilitat de mescles de ditranol i Pro-Lipo S a 4°C i preservades de la llum (n=2).

4.3.2.3 INCORPORACIÓ DE DITRANOL EN LIPOSOMES DE NATIPIDE II.

El sistema Natipide II és un gel amb liposomes de diàmetre al voltant de 200 nm a una alta concentració de fosfolípid (200 mg/g). Per tal d'aconseguir una concentració de ditranol més elevada de la que s'obté amb Pro-Lipo S, es va assajar la incorporació del fàrmac al gel bé directament com a sòlid (Ap. 3.2.2.4), bé dissolt en etanol (solubilitat ~0,4 mg DT/mL etanol), amb i sense àcid salicílic, molècula emprada com a antioxidant en alguns gels i cremes comercials amb ditranol. La composició de les preparacions es mostra a la Taula 43. Les preparacions, d'una massa de 10 g, mostraren un aspecte homogeni. La relació fàrmac/fosfolípid fou de 5 mg DT/g F, valor un 6 % superior al de saturació de les membranes i que es va calcular amb les mostres obtingudes amb Pro-Lipo S.

Preparació	Natipide II (g)	Ditranol (g)	Àc. salicílic (g)	Mètode	Conc. F (mg/g)
A (n=2)	99,9	0,1	0	Addició sòlid	~200
B (n=2)	99,8	0,1	0,1	Addició sòlid	~200
C (n=2)	99,9	0,1	0	Addició dissolt	~200
D (n=2)	99,8	0,1	0,1	Addició dissolt	~200

Taula 43 Composicions dels gels de liposomes amb ditranol obtinguts amb Natipide II.

Tots els gels es guardaren a la foscor a 4°C. La concentració de ditranol de totes les preparacions disminuí des del 0,1 % p/p inicial fins al 0,005 % p/p en només 3 dies. Aquests resultats indiquen clarament que aquest mètode tampoc no és viable.

4.3.2.4 INCORPORACIÓ DE DITRANOL EN MLVs I REVs.

Aquests mètodes d'obtenció de liposomes tenen com a punt de partida l'obtenció de pel·lícules homogènies de fosfolípid i de fàrmac hidrofòbic. Aquest fet assegura la màxima incorporació de les molècules que es volen encapsular a les membranes, ja sigui en liposomes uni o multilaminars. És per aquest motiu que s'han preparat aquests dos tipus de liposomes (REVs, i MLVs) amb ditranol i en tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4 segons el descrit als apartats 3.2.2.1 i 3.2.2.2. El mètode d'obtenció de liposomes MLV evita la sonicació, un procés potencialment agressiu pel ditranol degut a la quantitat d'energia que aporta a la mostra.

Les composicions assajades foren les següents:

Tipus	EPC (g)	Ditranol (g)	Tampó (g)	Conc F. (mg/mL)
REVs (n=3)	3	0,1	qsp 100	30
MLV (n=2)	3	0,1	qsp 100	30

Taula 44 Composicions de les suspensions de REVs i MLVs obtingudes amb ditranol.

En ambdós a simple vista casos s'observà la degradació del ditranol durant el procés d'obtenció dels liposomes. Per tal d'avaluar la contribució de cada etapa a aquest fenomen, es recolliren alíquotes en diferents moments de la preparació. La quantificació es realitzà mitjançant el quocient d'absorbàncies Q% (Ap. 3.1.1.4) ja que aquest mètode no resulta afectat per les variacions de concentració que tenen lloc en emprar diferents dissolvents a cadascuna de les etapes dels processos, fet que cal tenir en compte si s'utilitza el mètode de la USP XX. D'altra banda, a les longituds d'ona a les quals es realitzen les anàlisi no hi ha interferències dels fosfolípids.

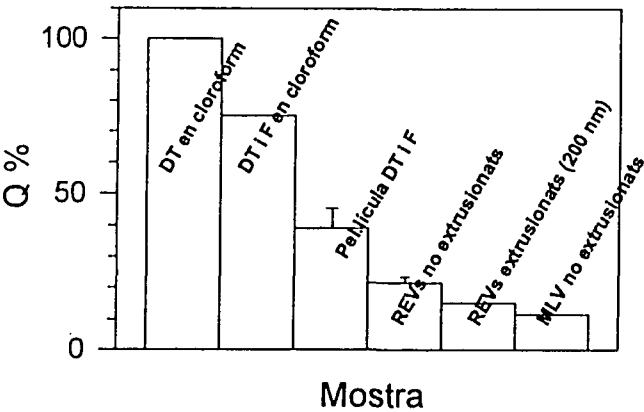


Fig. 118 Valors de Q% pel ditranol en diferents etapes d'obtenció d'MLVs (n=2) i REVs (n=2) amb el fàrmac encapsulat.

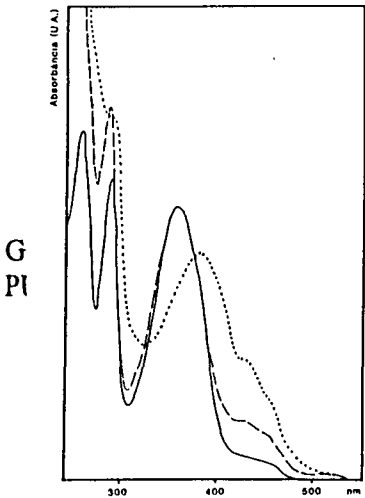


Fig. 119 Espectres UV-Vis en diferents etapes d'obtenció de liposomes MLVs amb ditranol: (—) Ditranol en CHCl₃; (----) Dissolució de ditranol i fosfolípids en CHCl₃; (····) Liposomes amb ditranol.

A la Fig. 118 es mostren els resultats. En ella es mostren els valors de Q% en algunes de les etapes de cadascun dels dos mètodes. Com s'observa, la presència de fosfolípids és un factor determinant en l'estabilitat del fàrmac: a les dissolucions clorofòrmiques de fàrmac i EPC, el ditranol es degrada ràpidament, fet que no té lloc en absència del fosfolípid durant períodes de temps molt més llargs del que representa aquesta etapa de preparació de liposomes (Fig. 110). Aquest efecte s'incrementa de manera notable en obtenir les pel·lícules necessàries per la preparació d'MLVs. En canvi, ni la sonicació ni l'extrusió representen etapes crítiques en la riquesa de ditranol de les mostres. Aquests processos causen disminucions poc acusades del valor de Q%, de manera que és possible que siguin degudes a la pròpia cinètica del procés de degradació i que s'ha iniciat a les etapes prèvies. A la Fig. 119 pot apreciar-se com els espectres de les preparacions mostraren els pics característics que apareixen durant la degradació del ditranol (Fig. 14).

4.3.2.5 ASSAIG D'IRRITACIÓ *IN VITRO*.

Es va realitzar un test d'irritació cutània *in vitro* d'acord amb el protocol descrit a l'apartat 3.1.3.5. Les formulacions assajades foren:

- crema base comercial de ditranol al 0,062 % p/p,
- suspensió de liposomes (150 mg F/mL) amb ditranol al 0,062 % p/p, obtinguts a partir de Pro-Lipo S com ha estat descrit anteriorment.

Les concentracions anteriors estigueren condicionades per la capacitat d'encapsulació del fàrmac en liposomes. És degut a això que no es pogueren emprar concentracions de ditranol de 0,1 % p/p, que és el valor corresponent a les formulacions comercials de crema.

Els resultats es mostren a la Fig. 120. En ells pot apreciar-se que totes les aplicacions de ditranol en liposomes originaren índexs d'irritació menors que les equivalents de crema comercial. La diferència no és, però, massa notable. Només en el cas de l'aplicació de 30 µL hi ha una gradació de lesió diferent per cada tipus de formulació: els liposomes amb ditranol causen una lesió mínima mentre que la crema se situa a la zona de lesió lleu. Cal destacar que la diferència entre els dos tractaments és menor a mida que

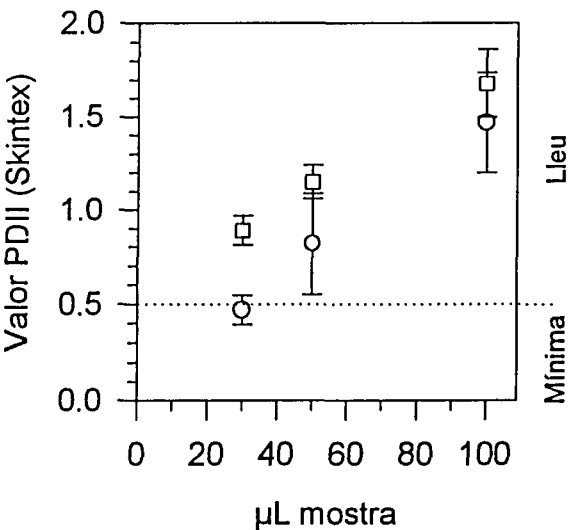


Fig. 119 Resultats del test d'irritació *in vitro* de ditranol en crema (□) i en liposomes (○).

augmenta la quantitat de mostra aplicada, de manera que, previsiblement, no es produirien diferències en aplicacions de major concentració, que són les emprades en el tractament de la psoriasi.

4.3.3 LIPOSOMES AMB HIDROCORTISONA (HC).

Com a objectiu ens proposàrem l’obtenció de suspensions de liposomes amb el 0,5 % p/p d’hidrocortisona encapsulada. En un primer apartat, es descriu la determinació de la saturació de les membranes de liposomes obtinguts amb Pro-Lipo S (Ap. 4.3.3.1.1), així com l’estabilitat de les suspensions aquoses obtingudes saturant les membranes de les vesícules, i a la meitat de la seva saturació (Ap. 4.3.3.1.2). A continuació es presenten els resultats de la incorporació en REVs, procés amb el qual s’augmenta la relació màxima hidrocortisona/fosfolípid (Ap. 4.3.3.2). Per últim, i a la vista dels resultats obtinguts, es presenten un estudis d’espectroscòpia d’infraroig amb els quals es pretèn avaluar la naturalesa de la interacció entre el fàrmac i els fosfolípids (Ap. 4.3.3.3).

4.3.3.1 INCORPORACIÓ D’HIDROCORTISONA EN LIPOSOMES DE PRO-LIPO S.

La naturalesa hidrofòbica del fàrmac determinà l’obtenció de suspensions de liposomes a partir de Pro-Lipo S tal i com es descriu a l’apartat 4.3.2.2. Per tal de caracteritzar el sistema es procedí a quantificar la màxima relació hidrocortisona/fosfolípid que pot obtenir-se a les bicapes, la dependència d’aquest valor amb el diàmetre dels liposomes, i l’estabilitat de diferents suspensions en funció de les condicions d’emmagatzegament.

4.3.3.1.1 SATURACIÓ DELS LIPOSOMES.

Tal i com es mostra a la Taula 45, es determinà la saturació de les bicapes incrementant la quantitat de fàrmac en preparacions amb la mateixa concentració de fosfolípid. A la mateixa taula també s’indiquen les quantitats dels components emprades per a la preparació de blancs. Aquests contenen la mateixa proporció d’etanol i glicerol que proporcionen els Pro-Lipo S en les mostres que sí contenen fosfolípids. Totes les preparacions s’obtingueren emprant tampó tris-HCl 10 mM, NaCl 14 mM, pH 7,4 per evitar la presència de fòsfor inorgànic i eliminar qualsevol interferència en els estudis posteriors d’FTIR.

Blanc de Pro-Lipo S ⁽¹⁾ (g)	HC (g)	Tampó (g)	Conc. F de la suspensió de la qual és blanc. (mg/mL)
11,7 (n=2)	0,5	qsp 100	50

Pro-Lipo S (g)	HC (g)	Tampó (g)	Conc. F (mg/mL)
16,7 (n=2)	0,5	qsp 100	50
16,7 (n=3)	0,25	qsp 100	50

Pro-Lipo S (g)	HC (g)	Tampó (g)	Conc. F (mg/mL)
16,7 (n=3)	0,1	qsp 100	50

Taula 45 Composició de les preparacions utilitzades per determinar la saturació de les suspensions de liposomes amb hidro cortisona. ⁽¹⁾ Quantitat de la mescla etanol/glicerol/aigua 20/10/40 p/p/p afegida a la preparació per tal d'obtenir un blanc amb la mateixa quantitat d'alcohols que les preparacions amb liposomes.

Les suspensions i blancs es processaren en el Microfluidizer un total de 3 cicles a una pressió de 3 bars (C3p3). Posteriorment es centrifugaren alíquotes a 12.500 x g durant 1 minut a 4°C, recollint-se a continuació els sobrenedants per quantificar-ne la concentració del fàrmac mitjançant HPLC (únicament a la mostra amb un 0,1 % p/p d'hydrocortisona inicial no s'observà sedimentació del fàrmac amb la centrifugació). A la Fig. 120 es mostra la concentració d'hydrocortisona en les suspensions i el rendiment d'incorporació en funció de la composició de les mescles inicials indicades anteriorment a la Taula 45. La diferència entre la concentració de saturació de les preparacions ($1,75\pm0,028$ mg HC/mL) i la del blanc ($0,449\pm0,019$ mg HC/mL) permet calcular la relació màxima fàrmac/fosfolípid: $25,8 \pm 1,17$ mg HC/g F, valor que correspon a una relació HC/F 1:19 mol/mol.

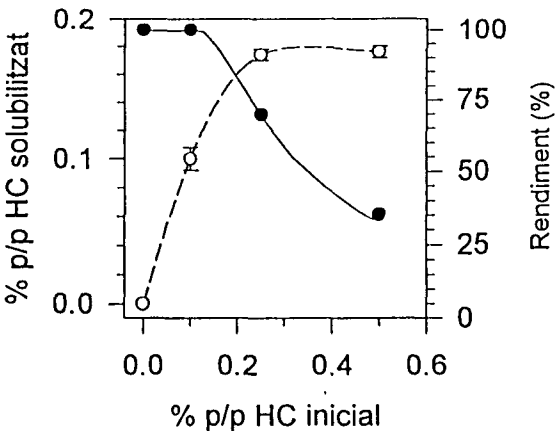


Fig. 120 Incorporació d'hydrocortisona en suspensions de liposomes amb una concentració de fosfolípids de 50mg/mL: (○) % p/p d'HC a la suspensió; (●) rendiment del procés.

4.3.3.1.2 ENCAPSULACIÓ D'HIDROCORTISONA EN FUNCIÓ DE LA GRANDÀRIA DELS LIPOSOMES.

Partint del valor de saturació del fàrmac en bicapes, es prepararen suspensions de liposomes saturats (S) i suspensions amb liposomes a la meitat de saturació (S/2). Les preparacions inicials obtingudes per agitació (Taula 46) es dividiren en quatre parts d'uns 40 mL, tres de les quals es processaren al Microfluidizer, en diferents condicions, per obtenir suspensions amb vesícules de diàmetres dissemblants.

MOSTRA	Pro-Lipo S (g)	HC (g)	Tampó (g)	Conc . F (mg/mL)
S (n=2)	16,7	0,2	qsp 100	50
S/2 (n=2)	16,7	0,1	qsp 100	50

Taula 46 Composició de les suspensions de liposomes amb HC utilitzades per obtenir vesícules de diferents grandàries.

A la Taula 47 es mostren els resultats obtinguts. Els valors de concentració d'hydrocortisona corresponen als de les mostres centrifugades en les condicions ja descrites.

MOSTRA	Tractament (cicles, pressió)	Diàmetre ± Amplada ¹ (nm; % vol)	HC % p/p	Rendiment %
S (n=2)	Agitació	602 ± 247	0,155 ± 0,0028 ²	77,5
S (n=2)	C1p0,8	470 ± 248	0,160 ± 0,0014	80,0
S (n=2)	C3p3	174 ± 135	0,174 ± 0,0049	87,0
S (n=2)	C9p4	64 ± 44	0,188 ± 0,0106 ²	94,0
S/2 (n=2)	Agitació	618 ± 313	0,105 ± 0,0014	105
S/2 (n=2)	C1p0,8	447 ± 224	0,101 ± 0,0035	101
S/2 (n=2)	C3p3	202 ± 145	0,105 ± 0,0028	105
S/2 (n=2)	C9p4	61 ± 33	0,106 ± 0,0100	106

Taula 47 Característiques de les suspensions de liposomes amb HC preparades per a l'estudi d'estabilitat. ¹: Anàlisi realitzada amb la mostra no centrifugada. ²: Amb diferències significatives entre elles.

A les mostres saturades s'observa que, en disminuir la grandària dels liposomes, hi ha un augment de la hydrocortisona encapsulada. Les úniques diferències significatives, però, es troben entre la preparació obtinguda per agitació i la processada C9p4. A partir de les concentracions d'hydrocortisona de les mostres saturades, de la solubilitat de la HC en els blancs, i de la determinació de les concentracions de fosfolípid, es calculen les relacions màximes HC/F pels diferents tipus de liposomes:

Mostra	Agitació	C1p0,8	C3p3	C9p4
mg HC/g F	22,2±1,25	22,5±1,61	25,3±1,14	28,0±0,25

Aquests resultats constaten que, en l'obtenció de liposomes amb el Microfluidizer, hi ha un augment de l'encapsulació d'HC a mida que el diàmetre de les vesícules és menor.

4.3.3.1.3 ESTABILITAT DE LES SUSPENSIONS.

Donada la baixa encapsulació de la hydrocortisona en liposomes, es prepararen dues suspensions amb la màxima relació fàrmac/fosfolípid per tal seguir la seva estabilitat. La composició inicial de les suspensions fou:

Pro-Lipo S (g)	HC (g)	Tampó (g)	Tractament	Conc. F (mg/mL)
16,7 (n=2)	0,2	qsp 100	Microfluidizer C3p3	50

Les suspensions es centrifugaren i es determinà la concentració d'HC dels sobrenedants. Posteriorment s'igualaren les concentracions d'HC de cada suspensió mitjançant dilució fins a

un valor de 0,175 % p/p, i es guardaren 25 mL en les condicions següents:

- a.- 40°C, foscor.
- b.- temperatura ambient, foscor.
- c.- 4°C en atmosfera de nitrogen, foscor.

La Fig. 121 mostra l'evolució dels diferents paràmentres físico-químics de les preparacions. Per tal de determinar si es produïa desencapsulació, les concentracions de fàrmac s'analitzaren en alíquotes sense centrifugar i centrifugades en les condicions habituals, els resultats, però, no foren significativament diferents, fet pel qual al gràfic es mostra una única mitjana que s'ha calculat a partir dels replicats centrifugats i no centrifugats. L'estudi de l'estabilitat accelerada (a) es dugué a terme durant 60 dies, període durant el qual no es produí el trencament de l'emulsió. En referència a les altres dues condicions d'emmagatzematge, els controls es realitzaren fins que les preparacions mostraren dues fases. El trencament de les

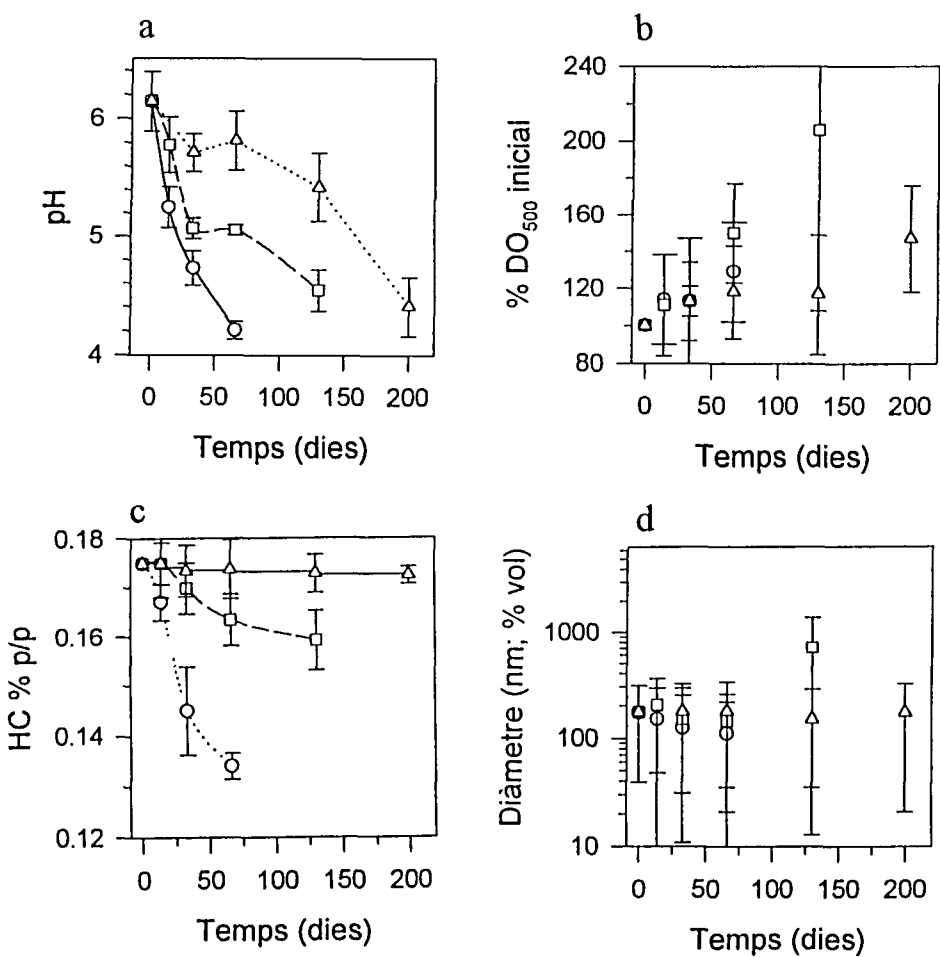


Fig. 121 a: Variació del pH (a), de la DO a 500 nm (b), de la concentració de fàrmac (c) i del diàmetre i amplada (barres d'error) (d) de les suspensions de liposomes amb HC encapsulada. Totes les mostres es conservaren en la foscor. (Δ): Mostres a 4°C; (□) Mostres a temperatura ambient; (○) Mostres a 40°C.

suspensions tingué lloc cap els 200 dies en el cas de les que es conservaren a temperatura ambient, i cap els 230 dies en el cas de les conservades a 4°C.

4.3.3.2 INCORPORACIÓ D’HIDROCORTISONA EN REVs I MLVs.

La impossibilitat d’obtenir suspensions de liposomes amb el 0,5 % d’hidrocortisona a concentracions de fosfolípid moderades, portà a assajar l’encapsulació del fàrmac en REVs amb el propòsit d’afavorir la mescla del fàrmac amb els lípids. Es prepararen mostres d’un volum de 5 mL amb les següents composicions percentuals:

Mostra	EPC (g)	PA (g)	HC (g)	Tampó (g)	Conc F (mg/mL)
A (n=5)	4,75	0,25	0,5	qsp 100	50
B (n=2)	2,38	0,12	0,5	qsp 100	25
C (n=3)	0	0	0,5	qsp 100	0

Totes les preparacions s’extrusionaren fins 200 nm, excepte els blancs (mostra C) que, donat l’excés de fàrmac, es filtraren en paper Watmann nº1. Només les suspensions de liposomes amb una concentració de fosfolípids de 25 mg/mL presentaren problemes durant l’extrusió, apareixent gran quantitat hidro cortisona sòlida únicament a la membrana d’extrusió amb porus de 800 nm. Posteriorment, totes les preparacions es centrifugaren a 12.500 x g durant 1 min i a 4°C, i es dividiren en dos grups per tal de conservar-les a temperaura ambient (A:n=3; B:n=1; C:n=2) i a 4°C (A:n=2; B:n=1; C:n=1). A la Taula 48 es mostren les concentracions d’hidrocortisona en els sobenedants de les mostres menys de dues hores després d’obtenir-se, i el seu rendiment d’incorporació de l’HC.

Mostra	Conc. HC (% p/p)	Rendiment (%)
A	0,500 ± 0,02	100
B	0,173 ± 0,03	34,6
C	0,0319 ± 0,02	6,38

Taula 48 Concentració i rendiments d’incorporació d’HC a les suspensions de liposomes REVs i blancs.

A partir del valor de solubilitat proporcionat pels blancs, es pot obtenir la relació HC/F en els liposomes suposant que el medi aquós està saturat de fàrmac. Aquesta aproximació es compleix totalment en el cas de la mostra B, ja que en aparèixer l’HC a les membranes d’extrusió, es posa de manifest que n’està en excés i totes les fases de la preparació estan saturades. En el cas de la mostra A, com que no hi ha un excés d’HC (no en precipita a cap etapa de la preparació), l’aproximació anterior pot donar lloc a una estimació menor de la real si la concentració d’HC en el medi aquós és menor que la de saturació. El resultat dels càlculs proporciona les següents relacions:

Mostra	mg HC/g F	mol HC/mol F
A	93,6 ± 0,4	1/5
B	56,4 ± 1,2	1/9

Com s'aprecia, la relació HC/F de la mostra A és més d'un 60% major que la de la mostra B. Aquest fet resulta sorprenent tenint en compte que, tal i com s'ha observat experimentalment, la mostra B està saturada d'HC. La mostra A presenta una sobresaturació que no pot atribuir-se al mètode de preparació (els blancs dels REV's són de la mateixa concentració que les preparacions en aigua de l'apartat 4.2.4.3.

A les 12 hores només les preparacions A mostraren una ràpida desencapsulació d'HC que es manifestà per l'aparició d'una gran quantitat del fàrmac sòlid en el fons dels vials que les contenien. A la Fig. 122 es mostra l'evolució de la concentració d'hidrocortisona amb el temps a les mostres A, B i C, i la concentració d'HC en funció de la concentració de fosfolípid. Donat que la temperatura d'emmagatzematge no proporcionà diferències significatives es presenten les mitjanes de cada tipus de mostra. Els valors d'equilibri de la concentració d'HC de les suspensions de 50 mg F/mL (obtinguts a partir de les 24 h des de la seva preparació) permeten calcular una nova relació mg HC/g F: 45,6 ± 4,3. Aquest valor és un 19 % menor del de saturació trobat per les mostres amb 25 mg F/mL.

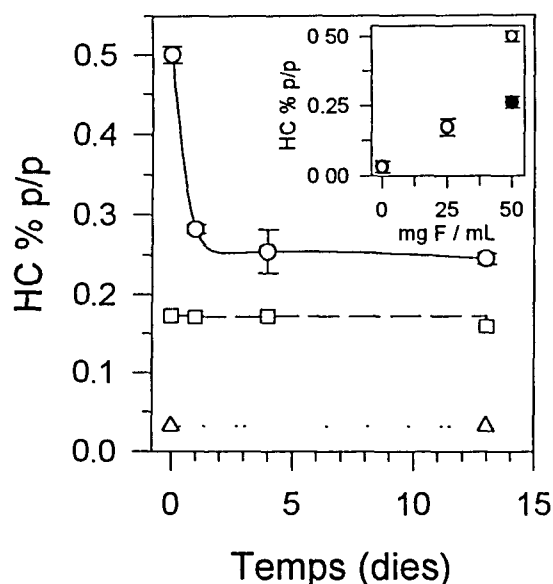


Fig. 122 Concentració d'HC en funció del temps en suspensions de liposomes REV's de 50 mg F/mL (○), 25 mg F/mL (□) i 0 mg F/mL (Δ). *Inset:* Concentració d'HC en funció de la concentració de fosfolípid en suspensions recents (○) i amb una antiguitat de quatre dies (●)

La sobresaturació inicial detectada en les preparacions A dugué a determinar-ne l'encapsulació emprant altres tècniques tant per constatar que l'excés de fàrmac no estava present en el medi aquós, com per caracteritzar la interacció fàrmac-fosfolípid. Cadascuna d'elles s'utilitzà, segons les seves característiques, per quantificar de forma directa la concentració d'HC en el medi aquós o la concentració d'HC encapsulada en liposomes.

Mitjançant ultracentrifugació i ultrafiltració es determinà la concentració d'HC en el medi aquós. La ultracentrifugació només fou útil per a l'estudi d'aquelles suspensions en les quals l'HC ha arribat a l'equilibri, ja que el temps de centrifugació mínim és de 12 hores. La cromatografia d'exclusió molecular en Sephadex G-25 i en minicolumnes de Sephadex G-50 s'empraren per quantificar, a partir de les fraccions d'elució que contenen els liposomes, la

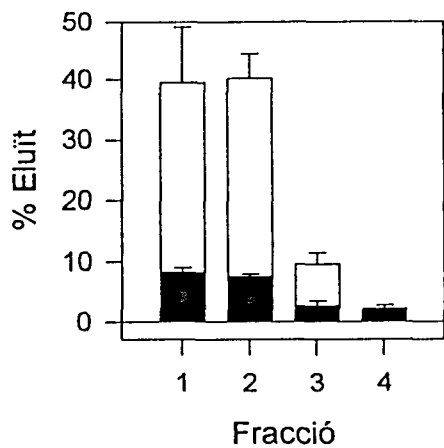


Fig. 123 Evolució dels eluïts de centrifugació en minicolumnes d'exclusió molecular de suspensions recents de REVs amb HC. (□) liposomes; (■) hidro cortisona.

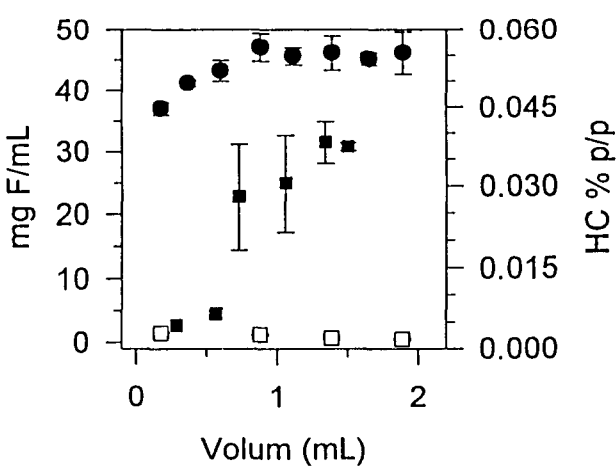


Fig. 124 Concentracions de fosfolipid i d'hydrocortisona en les fraccions obtingudes per ultrafiltració de suspensions de REVs amb HC de diferent antiguitat. (□) fosfolipid; (●) hidro cortisona (t=0); (■) hidro cortisona (t= 4 dies).

relació mg HC/g F.

A la Fig. 123 es mostra la cromatografia en minicolumnes per preparacions noves, i a la Fig. 124 es presenten els resultats de la ultrafiltració per mostres noves i amb 4 dies d'antiguitat. A la Taula 49 s'indiquen els resultats comparatius entre les diferents tècniques emprades, mostrant-se en negreta els valors experimentals a partir dels quals s'han calculat la resta de paràmetres. El percentatge d'encapsulació s'ha obtingut com el quocient entre la concentració d'HC en liposomes i la concentració total de la suspensió. Pel que fa a les fraccions d'elució cromatogràfiques, el quantifica també la concentració de fosfolípids per tal d'obtenir el quocient mg HC/g F. Les dades d'utrafiltració s'obtingueren substituint els valors experimentals a l'equació 21 descrita a l'apartat 4.2.4.5.

Taula 49

Mostra	Antiguitat (dies)	HC % p/p total	HC % p/p medi aquós	HC % p/p en liposomes	% encapsulació	mg HC/g F
CENTRIFUGACIÓ (12.500 x g; 1 min)						
A (n=5)	0	0,500±0,020	0,0319±0,002 ¹	0,468	93,6	93,6
	4	0,260±0,019	0,0319±0,002 ¹	0,228	87,7	45,6
B (n=2)	0	0,173±0,032	0,0319±0,002 ¹	0,141	81,6	56,4
	4	0,172±0,021	0,0319±0,002 ¹	0,140	81,5	56,0

1.- Valor calculat suposant una concentració d'hydrocortisona al medi aquós igual a la de saturació.

Mostra	Antiguitat (dies)	HC % p/p total	HC % p/p medi aquós	HC % p/p en liposomes	% encapsulació	mg HC/g F
EXCLUSIÓ MOLECULAR EN G-25						
A (n=3)	0	0,502±0,018	0,502	0,00	0,00	0,00
	4	0,258±0,019	0,258	0,00	0,00	0,00

EXCLUSIÓ MOLECULAR EN MINICOLUMNES						
A (n=2)	0	0,501±0,004	0,402	0,099	19,8	19,8±2,30

ULTRAFILTRACIÓ ²						
A (n=2)	0	0,500±0,003	0,0626±0,0081 (0,0537)	0,437 (0,446)	87,4 (89,2)	87,4 (89,3)
	4	0,292±0,051	0,0410±0,0059 (0,0359)	0,251 (0,256)	86,0 (87,7)	50,2 (51,2)

2.- Les fraccions ultrafiltrades, a diferència dels assajos previs amb liposomes sense hidrocortisona, presentaren una concentració de fosfolípid mitjana de 1±0,5 mg/mL. Els valors entre parèntesi s'obtenen en incloure aquesta concentració en els càlculs: (Conc. F), x mgHC/mgF+(conc. HC medi aquós)=(Conc. HC). On i correspon, segons convingui, a la mostra no ultrafiltrada o bé a les fraccions ultrafiltrades i en equilibri, de manera que s'obté un sistema de dues equacions amb dues incògnites: mgHC/mgF i (conc. HC medi aquós).

ULTRACENTRIFUGACIÓ ³						
A (n=2)	4	0,292±0,0057	0,0556±0,0081 (0,0527)	0,236 (0,239)	81,0 (81,8)	47,3 (47,9)

3.- El valor per temps zero no pot calcular-se donat que la centrifugació té una durada de més de 12 hores. La concentració de fosfolípid al sobenadant fou de 0,61 mg/mL. La correcció, indicada entre parèntesi, es realitza de la mateixa manera que s'indica anteriorment en 2.-.

Els resultats mostren que la quantificació de l'encapsulació del fàrmac en liposomes depèn del mètode emprat, fet que ha de ser conseqüència del grau d'interacció entre el fàrmac i els fosfolípids. D'altra banda, es constata que, per a la relació inicial HC/fosfolípid 1:10 p/p (Mostra A), es produeix una sobresaturació que tendeix a l'equilibri en hores.

Es prepararen suspensions de MLVs amb la mateixa composició que la Mostra A, i presentaren un excés d'HC que colapsà la membrana d'extrusió amb porus de 800 nm. La determinació del fàrmac solubilitzat permeté obtenir la proporció entre el fàrmac encapsulat i la quantitat de fosfolípids, que tingué un valor de 28,8 ± 1,66 mg HC/g F (n=2). Aquest resultat, que coincideix amb l'obtingut amb SUVs constituïts per Pro-Lipo S, posa de manifest que la sobresaturació només s'assoleix amb REVs, i que és una conseqüència de les diferents estructures que es formen a cadascuna de les etapes de preparació de liposomes per fase reversa: micel·les invertides i, amb l'evaporació de la fase orgànica, liposomes unilaminars.

4.3.3.3 ANALISI DE LA INTERACCIÓ HC-FOSFOLÍPID MITJANÇANT FTIR.

Els estudis mitjançant espectroscòpia d'infraroig es dugueren a terme en dues etapes. Inicialment s'observà el comportament de mescles del fàrmac i els fosfolípids en pel·lícules seques obtingudes sobre les finestres d'IR a partir de dissolucions en cloroform (Ap. 3.1.2.3).

Posteriorment, es realitzà el mateix procediment però emprant de partida suspensions de liposomes d'altra concentració de fosfolípid.

A la Fig. 125 apareixen els espectres de:

- a.- una mescla de fosfolípids EPC/PA 9:1 mol/mol ($n=6$),
- b.- hidrocortisona ($n=3$),
- c.- mescles amb la relació 94 mg HC / 1g F (EPC/PA 9:1 mol/mol) ($n=6$), la màxima relació determinada en la sobresaturació dels REVs.

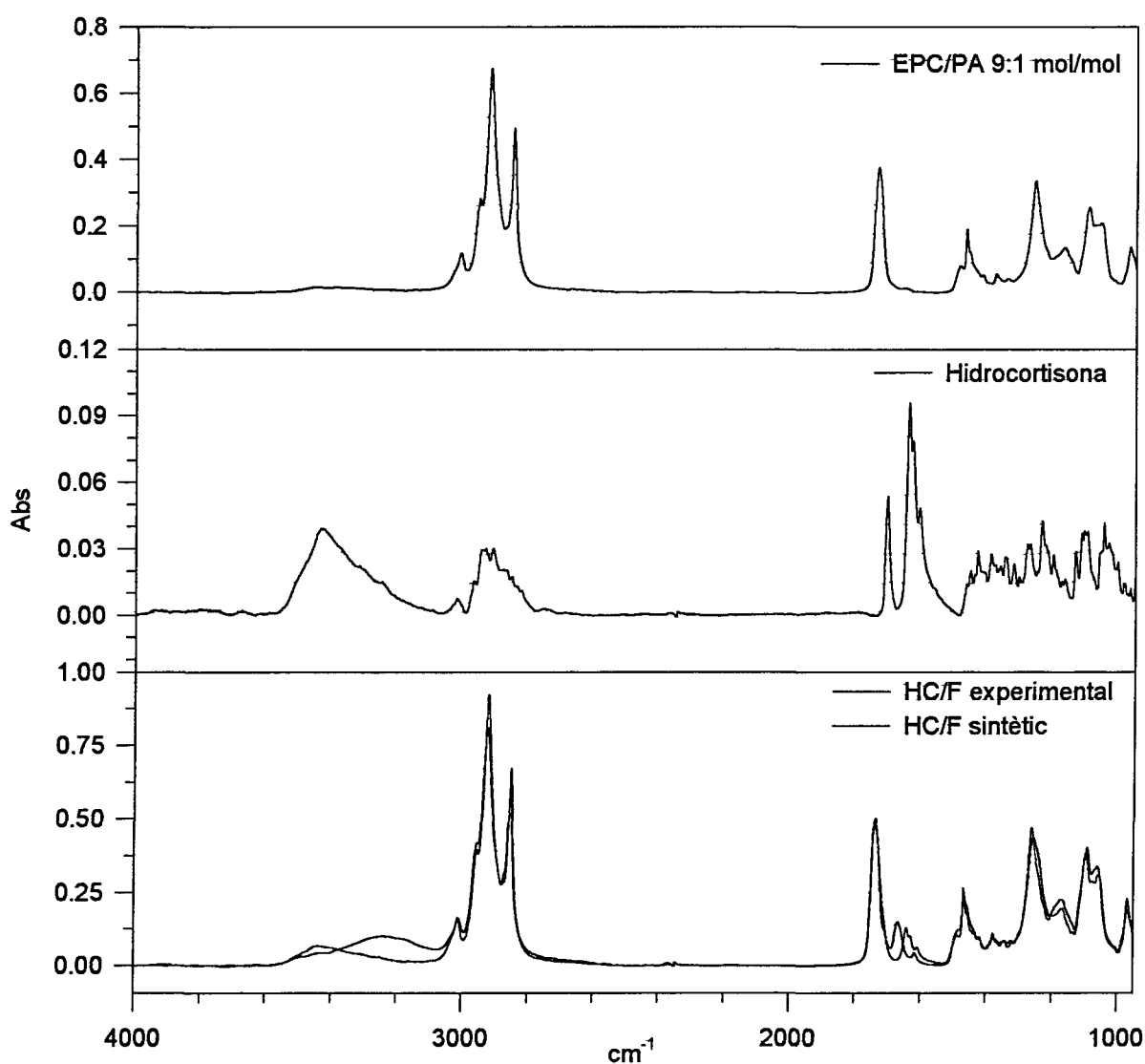


Fig. 125 Mitjanes dels espectres experimentals d'absorció d'infraroig de pel·lícules de fosfolípid ($n=6$), hidroclortisona ($n=3$), mescles HC/F ($n=6$), i espectre sintètic (suma) d'HC i F.

A la Taula 50 es mostra l'assignació d'alguns dels pics més representatius de la hidro cortisona pura i en la mescla amb els fosfolípids. Donat el solapament dels espectres de les dues molècules, s'han assignat les posicions dels màxims mitjançant la quarta derivada. Els resultats posen de manifest el desplaçament a números d'ones majors del pic corresponent al carbonil (C3) α - β -insaturat, mentre que no es produeix cap desplaçament significatiu del carbonil C20. El desplaçament del CO (C3) indica que en la mescla amb els fosfolípids aquest grup funional es troba en un entorn on l'enllaç C=O es reforça, de manera que no estableix, o ho fa en menor grau, enllaços d'hidrogen amb altres grups. El fet d'obtenir la posició mitjançant la quarta derivada, unit a que a la zona considerada no hi ha solapament entre el pic del CO (C3) de l'HC i el pic dels carbonils dels fosfolípids, permet descartar que el desplaçament sigui un artefacte originat per la superposició dels espectres.

Grup	Posició del màxim (cm ⁻¹)		
	HC pura (n=3)	Mescla experimental (n=6)	Mescla sintètica (n=3)
CO (C3)	1641,61 $\pm$ 3,26	1668,17 $\pm$ 0,43 ^s	1642,01 $\pm$ 4,50
CO (C20)	1706,60 $\pm$ 1,30	1702,70 $\pm$ 3,78	1703,89 $\pm$ 1,23

Taula 50 Assignació dels pics d'absorció a l'IR per a la HC pura, en la mescla HC/F 94:1 mg/g, i en la suma dels espectres de cada molècula en la proporció anterior (espectre sintètic). ^s: amb diferències significatives respecte la mescla sintètica (α =0,05).

S'ha realitzat la mateixa anàlisi amb els pics característics corresponents als fosfolípids. A la Taula 51 es mostra l'assignació d'aquests pics purs i en la mescla dels fosfolípids amb la hidro cortisona. S'observa que hi ha un desplaçament de la posició dels màxims d'absorbància en presència del fàrmac.

Grup	Posició del màxim (cm ⁻¹)		
	EPC/PA (n=6)	HC/EPC/PA Mescla experimental (n=6)	HC/EPC/PA Mescla sintètica (n=3)
CH ₂ (Tensió antisim.)	2921,52 $\pm$ 0,59	2924,44 $\pm$ 0,45 ^s	2921,60 $\pm$ 0,10
CH ₂ (Tensió sim.)	2851,21 $\pm$ 0,40	2852,44 $\pm$ 0,18 ^s	2851,08 $\pm$ 0,10
CO	1738,54 $\pm$ 0,54	1740,42 $\pm$ 0,73 ^s	1737,85 $\pm$ 0,44
PO (Tensió antisim.)	1261,35 $\pm$ 0,46	1258,81 $\pm$ 1,20 ^s	1261,13 $\pm$ 0,74
PO (Tensió sim.)	1296,85 $\pm$ 0,58	1093,07 $\pm$ 0,59 ^s	1096,69 $\pm$ 0,15

Taula 51 Assignació dels pics d'absorció a l'IR per a la mescla EPC/PA pura, en la mescla HC/F 94:1 mg/g, i en la suma dels espectres de cada molècula (espectre sintètic). ^s: amb diferències significatives respecte de la mescla sintètica (α =0,05). Antisim/Sim: Antisimètrica/Simètrica

Per avaluar amb major precisió si els desplaçaments són una conseqüència de la suma aritmètica dels espectres del fosfolípid i la hidro cortisona o si són deguts a la interacció entre

ambdúes molècules, s'han obtingut espectres sintètics realitzat la suma dels seus espectres purs utilitzant les relacions 188:1, 94:1, i 47:1mg HC/g F. Aquestes relacions permeten avaluar les petites heterogeneïtats que es produeixen en obtenir les pel·lícules, i que fan que la relació 94:1 mg HC/g F inicial de la mescla no sigui uniforme en tota la finestra d'infraroig. Aquest fet és important si es té present que el feix d'infraroig incident no cobreix tota la finestra. En obtenir les relacions doble i meitat de l'experimental, queden incloses en escriure les heterogeneïtats comentades.

Per aconseguir aquestes relacions, s'han emprat com a referència la intensitat del pic del grup colina dels fosfolípids a $1490,88 \pm 0,21 \text{ cm}^{-1}$ i la del CO (C20) de la hidro cortisona en la mitjana dels espectres experimentals de la mescla 94:1 mg HC/g F.

La posició del pic colina anterior no resulta afectada en les mescles amb el fàrmac ($1490,58 \pm 0,05 \text{ cm}^{-1}$), de manera que, com tampoc no hi ha solapament amb cap altre pic (Fig. 126), la seva intensitat en les mescles HC/F és proporcional a la quantitat de fosfolípids present. Això permet emprar-la com a referència per obtenir els espectres sintètics per suma dels purs.

Pel que fa a la hidro cortisona, l'únic pic amb poc solapament és el CO (C3), però aquest mostra un desplaçament important en els espectres mescla, de manera que no pot emprar-se com referent. És per això que s'ha realitzat un tractament als espectres per determinar, a partir del pic del CO (C20), la proporció de fàrmac en les mescles i obtenir així els espectres sintètics. Als espectres dels fosfolípids purs (EPC/PA), la relació d'intensitats amb el pic dels carbonils és $I_{1469} / I_{1739} = 2,220 \pm 0,012$. El valor d'aquest quocient a les mescles experimentals HC/F no és significativament diferent ($0,226 \pm 0,028$), fet que indica la poca influència del CO (C20) de la HC sobre la situació del pic dels carbonils dels fosfolípids. Per tant, la cal esperar que si es substraueix a l'espectre de la mescla HC/F la mitjana dels espectres dels fosfolípids purs amb un factor d'1 (normalitzant prèviament en ambdós les intensitats dels pics a 1739 cm^{-1} a un valor de 0,5 UA), s'obindrà un espectre diferència que mostrarà el CO (C20) de la HC. En realitzar aquesta resta, s'aconsegueix una intensitat zero en la posició a 1739 cm^{-1} , un pic poc intens a 1749 cm^{-1} , i un altre a $1711,5 \text{ cm}^{-1}$ (Fig. 126). El primer pic té el seu origen en el petit desplaçament a números d'ona majors que es detecta en el pic dels carbonils dels fosfolípids en la mescla amb HC. La seva àrea és un 3,3 % de l'àrea dels carbonils dels fosfolípids purs (Fig. 126), fet que confirma que la intensitat a 1740 cm^{-1}

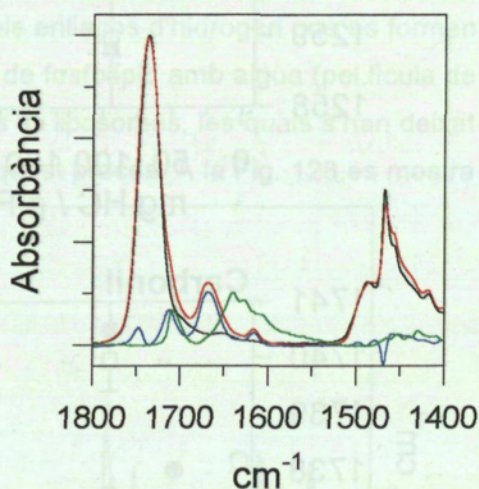


Fig. 126 Espectres d'FTIR de: (negre; A) mitjana experimental de la mescla de fosfolípids EPC/PA; (vermell; B) mitjana experimental de la mescla 94 mg HC/g F (B); (verd) mitjana experimental d'HC; (blau) resta B-A.

és deguda, en les mescles realitzades, als carbonils dels fosfolípids, com indica el quocient I_{1469} / I_{1739} . El pic a $1711,5 \text{ cm}^{-1}$ correspon al CO (C20) de la hidro cortisona en l'espectre mescla. D'acord amb la Taula 50, aquesta posició és major de la que caldria esperar ($1706,60 \pm 1,30 \text{ cm}^{-1}$), però donat que en l'anàlisi de la mescla HC/F per quarta derivada no hi ha cap desplaçament ($1702,70 \pm 3,78 \text{ cm}^{-1}$), podem atribuir aquesta desviació a l'error experimental de la substracció, assignant la seva intensitat a la del CO (C20). Així s'obté la relació d'intensitats entre un pic dels fosfolípids i d'un pic de l'HC en la mescla experimental 94 mg HC / 1 g F. El valor del quocient és:

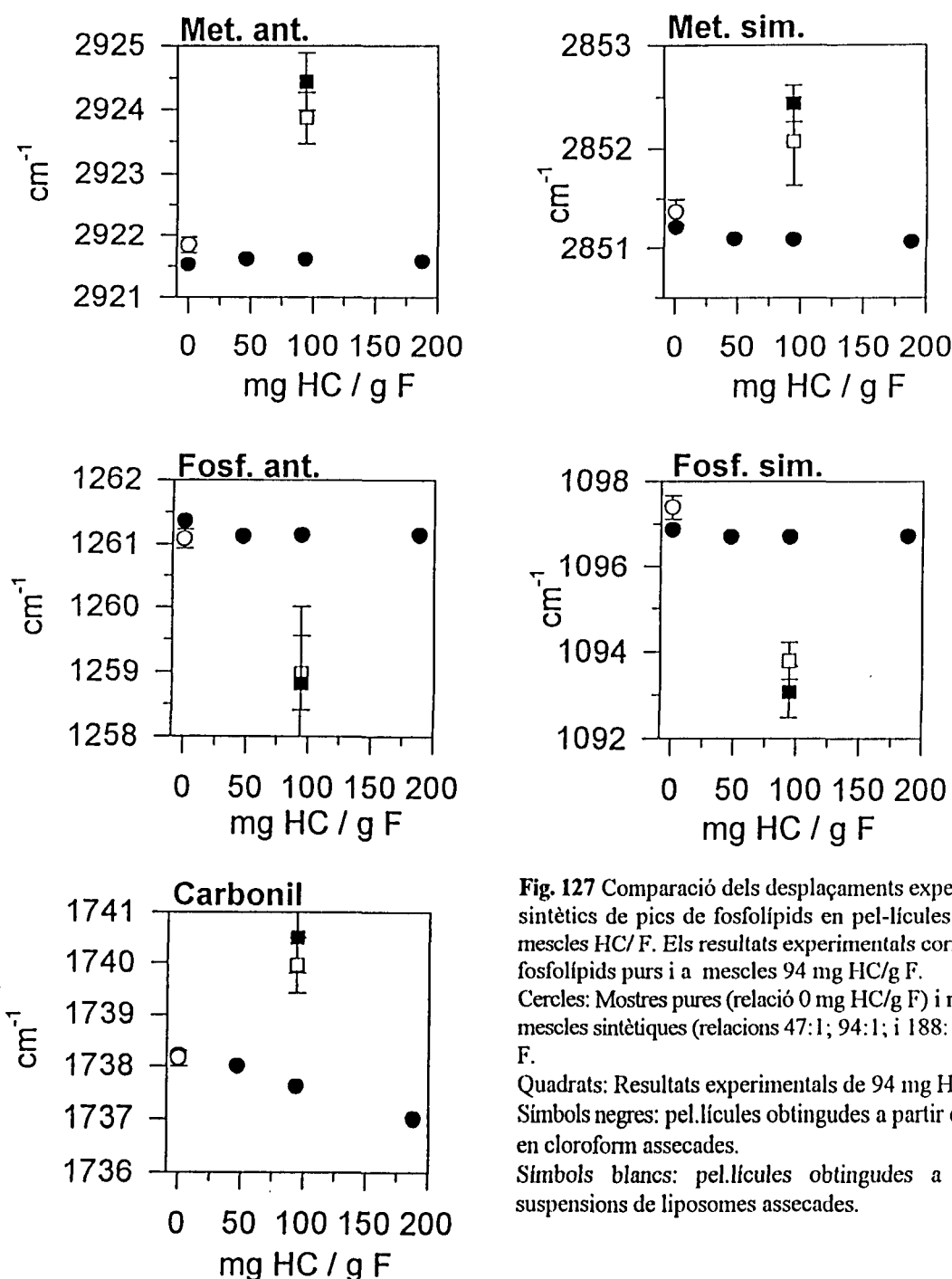


Fig. 127 Comparació dels desplaçaments experimentals i sintètics de pics de fosfolípids en pel·lícules seques de mescles HC/F. Els resultats experimentals corresponen a fosfolípids purs i a mescles 94 mg HC/g F. Cercles: Mostres purs (relació 0 mg HC/g F) i resultats de mescles sintètiques (relacions 47:1; 94:1; i 188:1 mg HC/g F). Quadrats: Resultats experimentals de 94 mg HC/g F. Símbols negres: pel·lícules obtingudes a partir de mescles en cloroform assecades. Símbols blancs: pel·lícules obtingudes a partir de suspensions de liposomes assecades.

$$\frac{I_{Colina\ F}}{I_{CO\ (C20)\ HC}} = 1,22$$

on:
 $I_{Colina\ F}$ indica la intensitat del pic del grup colina dels fosfolípids en la mescla 94 mg HC/1 g F
 $I_{CO\ (C20)}$ indica la intensitat del pic del carbonil C20 de la HC en la mescla 94 mg HC/1 g F.
Per obtenir els espectres sintètics desitjats cal que es compleixi aquesta relació, el doble o la meitat, entre els pics anteriors en la suma dels espectres purs, de manera que resulten, respectivament, les relacions 94:1, 47:1 i 188:1 mg HC/g F. Una vegada trobats els màxims dels pics mitjançant la quarta derivada, els números d'ona ens indiquen les seves situacions quan no hi ha interacció entre els fosfolípids i la hidro cortisona, tenint en compte, a més, l'efecte de les heterogeneïtats en la formació de les pel·lícules. A les taules 50 i 51 es mostren les posicions dels pics en les mescles sintètiques 94 mg HC/g F, i a la Fig. 127 es mostren totes les mecles sintètiques, els valors de les mescles experimentals, i els dels fosfolípids i HC purs. Com s'observa, les diferències experimentals no poden ser explicades com a conseqüència de la suma dels espectres, pel que podem afirmar que es produeixen interaccions entre la molècula d'HC i els fosfolípids.

Un altre aspecte a destacar dels espectre de la mescla HC/F és l'aparició d'una banda ampla situada entre 3500 i 3100 cm^{-1} , el màxim d'absorció de la qual es troba a 3236 cm^{-1} . Com s'observa a la Fig. 125, aquesta banda no és conseqüència de la suma dels espectres de les molècules de la mescla, i la seva situació indica l'existència d'enllaços d'hidrogen en els que participen els grups OH de la hidro cortisona. En aquestes mescles, l'únic grup funcional dels fosfolípids capaç d'establir ponts d'hidrogen que mostra un desplaçament cap a número d'ona més petits, és el fosfat. Per aquest motiu, com a model dels enllaços d'hidrogen que es formen entre aquest grup i els grups OH, s'han emprat mescles de fosfolípid amb aigua (pel·lícula de 0,3-4 mg fosfolípid / 100 $\mu L\ H_2O$) i suspensions concentrades de liposomes, les quals s'han deixat assecar dins l'espectròmetre adquirint espectres durant aquest procés. A la Fig. 128 es mostra

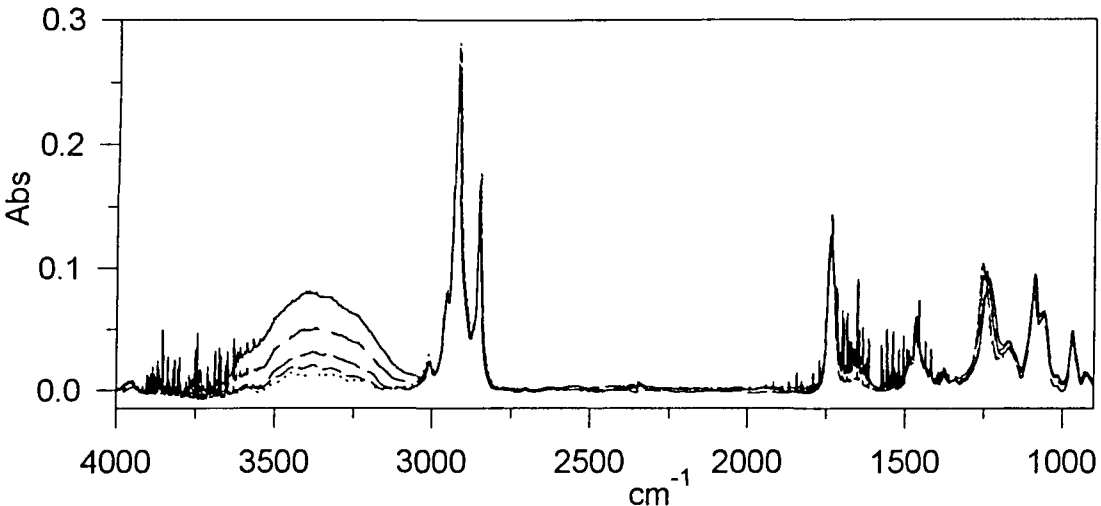


Fig. 128 Espectres d'absorció a l'infraroig d'una pel·lícula d'EPC/PA humida i assecada progressivament dins l'espectròmetre.

una sèrie d'espectres resultants. S'observa l'aparició d'una banda ampla centrada cap a 3350 cm^{-1} , característica dels grups OH de l'aigua formant ponts d'hidrogen. Per tenir una referència del grau d'humitat de les mostres s'ha calculat el quocient entre la intensitat a 3236 cm^{-1} i la intensitat de la tensió antisimètrica dels metils (2922 cm^{-1}) quan la mostra està seca. En cas d'emprar les intensitats de la tensió asimètrica quan la mostra no està seca, les variacions d'intensitat tenen, en el rang d'humitats estudiat, un coeficient de variació del 4% respecte del valor d'intensitat mitjà. A la Fig. 129 es mostra la posició dels grups fosfat de les mostres en funció de grau d'humitat descrit anteriorment. En els mateixos gràfics es mostren les posicions dels fosfats corresponents a les pel·lícules seques de les mescles HC/F 94:1 mg/g, tenint com a valor d'abscises el quocient entre la intensitat a 3236 cm^{-1} i la intensitat a 2922 cm^{-1} . Aquest quocient, donat que hi ha la petita banda d'absorció a 3236 cm^{-1} , pot estar afectat per la variabilitat del 4 % del denominador, però aquest error és menor a l'error experimental, que està indicat al gràfic mitjançant la desviació standard amb les barres d'error. Com s'observa, les localitzacions dels punts corresponents a les mescles HC/F dins dels gràfics, es solapen amb les corbes obtingudes a partir de les mostres humides que no tenen el fàrmac, i que tenen el mateix valor d'abscises.

Per completar l'estudi es realitzà el mateix procés d'obtenció de pel·lícules de fosfolípids i de mescles 94 mg HC/g F partint de suspensions aquoses de liposomes a alta concentració i deixant-les assecar dins l'espectròmetre. L'objectiu fou comprovar si en les fases cristal·lines que s'assoleixen en les mostres seques, i que han estat originades per les fases laminars de les bicapes dels liposomes, es produeixen els mateixos desplaçaments que en les obtingudes a partir de dissolucions clorofòrmiques. Aquests concentrats s'obtingueren bé per ultrafiltració (recollint la part no filtrada que colapsa la membrana), bé per ultracentrifugació (utilitzant el

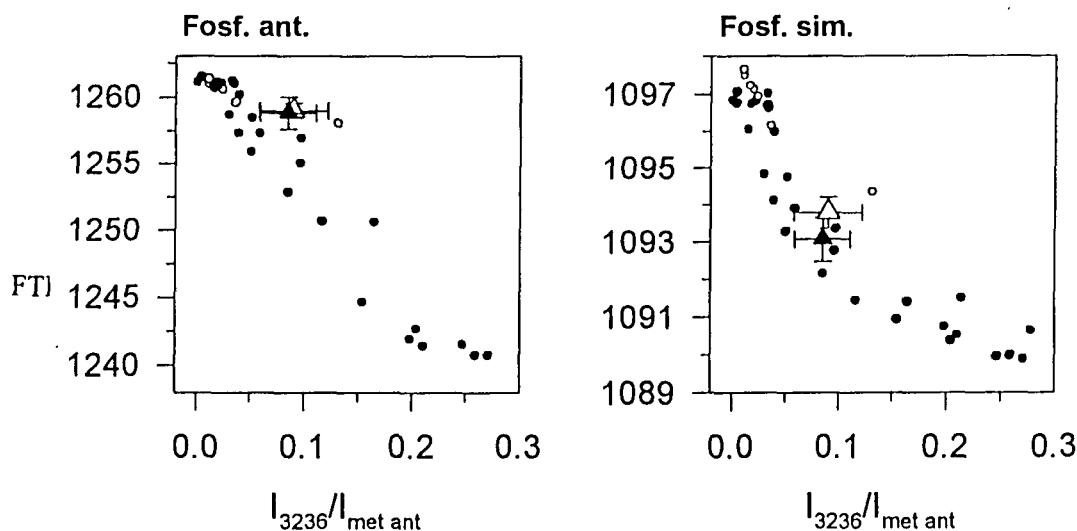


Fig. 129 (○): Variació de la posició dels pics de tensió antisimètrica i tensió simètrica del grup fosfat dels fosfolípids en funció de la quantitat d'aigua de la mostra. (Δ): Posició dels mateixos pics en mescles seques de 94 mg HC/g F. Símbols negres: pel·lícules obtingudes a partir de dissolucions en cloroform. Símbols blancs: pel·lícules obtingudes a partir de suspensions de liposomes.

pellet). Els tipus de mostres estudiats foren preparacions sobresaturades, obtingudes per ultrafiltració (n=3), i preparacions saturades (n=2), obtingudes per ultrafiltració i per ultracentrifugació (el temps necessari per a la ultracentrifugació fa que només es pugui obtenir preparacions d'aquest tipus).

Els resultats es mostren a la Fig. 129. Donat que no hi hagueren variacions significatives entre les pel·lícules que s'obtingueren a partir de suspensions saturades i sobresaturades, els resultats que es presenten són les mitjanes de totes les mostres. Pel que fa a la comparació amb els resultats de les pel·lícules d'origen clorofòrmic, s'aprecia que els desplaçaments del grups dels fosfolípids en les mescles foren del mateix ordre, fet que es repetí amb la posició del CO (C3) de la hidrocortisona ($1669,25 \pm 0,23 \text{ cm}^{-1}$).

4.3.4 LIPOSOMES AMB BUTIRAT-PROPIONAT D'HIDROCORTISONA.

Per tal d'obtenir liposomes amb butirat-propionat d'hidrocortisona (HBP) encapsulat al 0,1 % p/p es partí de Pro-Lipo S com a matèria primera. Inicialment es caracteritzà el sistema trobant la relació màxima fàrmac/fosfolípid (Ap. 4.3.4.1.1). La possibilitat d'encapsular el corticoide a la concentració desitjada va dur a l'estudi de l'estabilitat de les suspensions en diferents condicions de temperatura, avaluant-se també l'efecte de la saturació de les bicapes (Ap. 4.3.4.1.3). Es prepararen altres tipus de formulacions: hidrogels (Ap. 4.3.4.1.4) i liofilitzats (Ap. 4.3.4.1.5) determinant-se també, en aquests casos, la seva estabilitat.

D'altra banda, es realitzà un estudi d'infraroig per tal de caracteritzar la interacció fàrmac-fosfolípids (Ap. 4.3.4.2).

Finalment, l'avaluació de l'eficàcia de suspensions de liposomes amb l'HBP encapsulat es portà a terme mitjançant dues tècniques: velocimetria de laser Doppler (Ap. 4.3.4.3), i estudis histològics (Ap. 4.3.4.4).

4.3.4.1 INCORPORACIÓ D'HBP EN LIPOSOMES DE PRO-LIPO S.

El mètode de preparació de les suspensions de liposomes és el descrit a l'Ap. 4.3.2.2. La caracterització dels liposomes es dugué a terme mitjançant la determinació de la màxima relació fàrmac/fosfolípid assolible en liposomes, la variació d'aquest valor en funció del diàmetre de les vesícules, i l'estabilitat de diversos tipus de preparacions: suspensions, gels i liofilitzats.

4.3.4.1.1 SATURACIÓ DELS LIPOSOMES.

Com a etapa prèvia a la determinació de la incorporació de l'HBP en liposomes, es quantificà la concentració màxima a la qual el fàrmac és soluble en el medi aquós de les suspensions obtingudes en tampó fosfat sòdic 10 mM, pH 7,4. Per aquest fi es prepararen blancs amb la mateixa concentració d'alcohols (etanol i glicerol) que proporcionen les suspensions de liposomes que s'obtenen amb Pro-Lipo S. Tots els blancs, de composició inicial descrita a la Taula 52, es processaren en el Microfluidizer un total de 3 cicles a una pressió d'entrada de 3 bars (C3p3). L'excés de fàrmac sòlid que presentaren les preparacions s'eliminà per centrifugació a baixes g quantificant-se a continuació la concentració de fàrmac en el sobrenedant mitjançant HPLC. Els

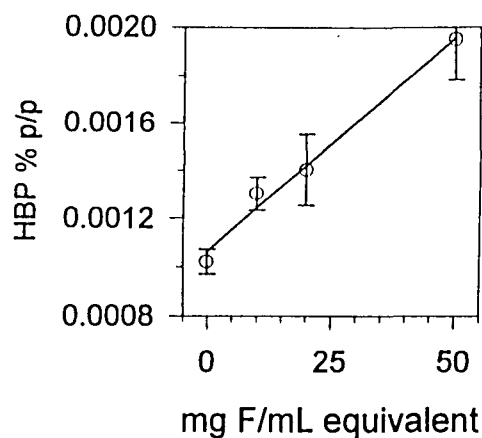


Fig. 130 Concentració d'HBP a saturació en medi aquós en funció de la quantitat d'alcohols (etanol i glicerol) presents al medi. Degut a que les suspensions de liposomes obtingudes a partir de Pro-Lipo S presenten alcohols a la fase aquosa, en els blancs representats s'expressa la concentració d'alcohols com la concentració de fosfolípids que l'origina.

resultats, que es mostren a la Fig. 130, posen de manifest que la concentració de saturació del fàrmac en el medi aquós depèn de la quantitat d'alcohols presents en el medi, la qual, com ja s'ha indicat, varia en funció de la concentració final de fosfolípids.

Blanc de Pro-Lipo S ⁽¹⁾ (g)	HBP (g)	Tampó (g)	Conc. F de la suspensió de la qual és blanc. (mg/mL)
2,34 (n=3)	0,2	qsp 100	10
4,67 (n=4)	0,4	qsp 100	20
11,7 (n=3)	0,4	qsp 100	50

Pro-Lipo S (g)	HBP (g)	Tampó (g)	Conc. Flip (mg/mL)
3,33 (n=1)	0,20; 0,044; 0,022	qsp 100	10
6,67 (n=3)	0,40; 0,20; 0,10; 0,05	qsp 100	20
16,7 (n=1)	0,40 ; 0,25 ; 0,15	qsp 100	50

Taula 52 Composició de les preparacions utilitzades per determinar la saturació de les suspensions de liposomes amb HBP. ⁽¹⁾ Quantitat de la mescla etanol/glicerol/aigua 20/10/40 p/p/p afegida a la preparació per tal d'obtenir un blanc amb la mateixa quantitat d'alcohols que les preparacions amb liposomes.

La saturació de les suspensions de liposomes per part del fàrmac es determina incrementant la quantitat d'HBP en suspensions amb la mateixa concentració de fosfolípids. La composició inicial de les preparacions, processades al Microfluidizer i centrifugades en les mateixes condicions que els blancs, es mostra a la Taula 52. A la Fig. 131 apareixen els resultats de la incorporació de l'HBP a les suspensions en funció de la concentració inicial d'HBP

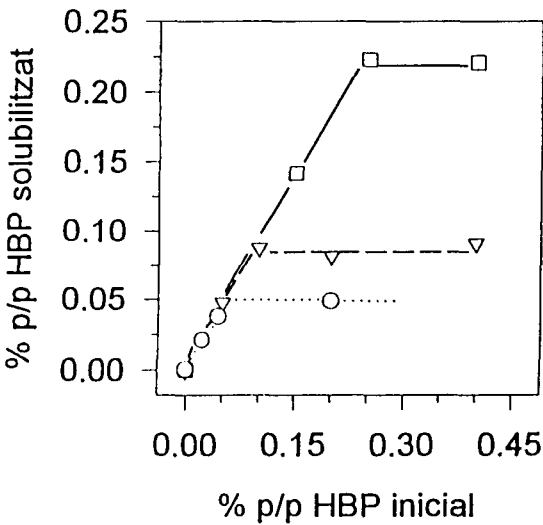


Fig. 131 Concentració d'HBP en suspensions de liposomes de diferents concentracions de fosfolípid, en funció de la concentració inicial del fàrmac en la preparació: (○) 10 mg F/mL; (▽) 20 mg F/mL; (□) 50 mg F/mL;

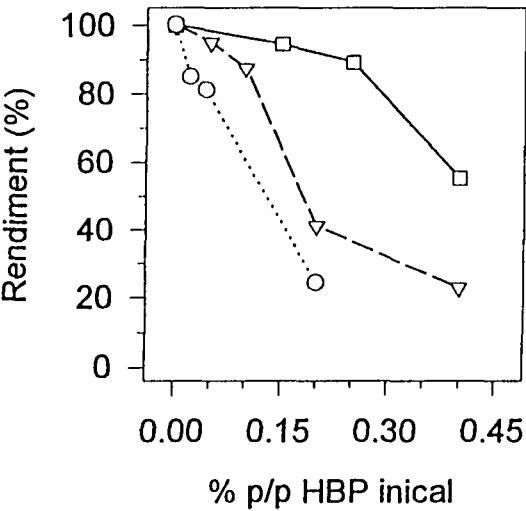


Fig. 132 Rendiments de la solubilització d'HBP en suspensions de liposomes de diferents concentracions de fosfolípid, en funció de la concentració inicial del fàrmac en la preparació: (○) 10 mg F/mL; (▽) 20 mg F/mL; (□) 50 mg F/mL;

a la preparació. Complementàriament, a la Fig. 132 es mostra el rendiment dels processos anteriors. S'aprecia que en tots els casos s'arriba a saturar el sistema, de manera que és possible calcular la màxima relació fàrmac/fosfolípid a partir de la diferència de concentracions entre les suspensions saturades, de la concentració dels corresponents blancs, i de la concentració de fosfolípid de les suspensions. Aquest valor és de $47,9 \pm 2,1$ mg HBP/g F que correspon a una relació HBP/F 1:13 mol/mol.

La presència d'etanol en els Pro-Lipo S fa possible que la incorporació del fàrmac en els liposomes depengui de la seva solubilització en el medi líquid de la matèria primera: si part de l'HBP no es solubilitza a la mescla inicial, tampoc no s'incorporarà a les bicapes i sedimentarà en diluir la preparació en l'etapa de formació de les vesícules. *A priori* aquesta possibilitat és factible com a conseqüència de la solubilitat de l'HBP en l'etanol al 33 % p/p en aigua ($\sim 1,5$ mg/mL; Tanaka S. et al., 1986), i en cas tingués lloc es podria incrementar l'encapsulació del fàrmac afegint més etanol a la mescla inicial de Pro-Lipo S i HBP. A partir de les proporcions mostrades a la Taula 52 es poden calcular les quantitats màximes d'HBP que podrien solubilitzar-se en la mescla etanol/aigua present si els altres components de la mescla no interferissin en aquest procés: les preparacions amb 3,33, 6,67 i 16,7 g de Pro-Lipo S serien capaces de solubilitzar 3,2, 6,4 i 16 mg d'HBP respectivament (càlculs realitzats sense considerar el glicerol present en el Pro-Lipo S, en el qual el fàrmac és molt menys soluble). Les quantitats reals màximes poden ser encara més petites com a conseqüència de la partició de l'etanol entre el medi aquós i les bicapes ja existents (Chiou J.-S. et al., 1992; Perret S. et al., 1991). Per aquesta raó s'ha determinat si un increment de la proporció d'etanol a la mescla inicial augmenta la relació màxima HBP/F calculada anteriorment.

El procés s'ha dut a terme amb tres replicats amb una relació Pro-Lipo S/HBP/Etanol a la mescla inicial de 2:0,06:1,18 p/p/p. En aquestes condicions es donen les següents condicions: en primer lloc, la relació etanol/aigua és del 66% p/p (contabilitzant el propi dels Pro-Lipo S), i en aquesta mescla la solubilitat de l'HBP és de ~ 150 mg/mL, la qual cosa implica que tot l'HBP pot solubilitzar-se a la mescla aquosa. En segon lloc la relació HBP/F és de 100 mg/g, molt més gran que la de saturació trobada anteriorment, per tant, si la dissolució en les mescles amb Pro-Lipo S no era completa, ara es veurà incrementada la relació HBP/F en els liposomes. I per últim, la relació en pes entre els components fa que el sistema mostra una única fase homogènia (Fig. 9), ja que la proporció d'etanol a la mescla inicial és del 49 % p/p.

A la mescla anterior i després de 15 min d'agitació, s'afegí aigua progressivament fins obtenir una suspensió amb un 2% d'etanol. Els tres replicats el processaren en el Microfluidizer (C3p3) i es centrifugaren per tal d'eliminar l'HBP no solubilitzat. Es realitzà el mateix procés amb un blanc sense fosfolípids i amb les quantitats d'etanol i glicerol que proporcionen la quantitat de Pro-Lipo S emprada a les mostres anteriors.

Les anàlisi per HPLC proporcionaren les quantitats d'HBP en mostres i blanc ($0,373 \pm$

0,012 mg/mL i 0,025 mg/mL respectivament). La concentració d'HBP a les mostres és un 55 % de la que proporcionaria la solubilització total del fàrmac (0,673 mg/mL), per tant, les bicapes estan en una situació de saturació. La diferència de concentracions entre mostres i blanc proporcionarà la concentració d'HBP solubilitzat en els liposomes, que és de $0,348 \pm 0,012$ mg/mL. Del quocient amb la concentració de fosfolípid de les suspensions (6,74 mg F/mL) s'obté la relació fàrmac/fosfolípid a les vesícules, que resulta: $51,6 \pm 1,6$ mg HBP/g F (1/13 mol:mol). Els resultats indiquen que la quantitat d'etanol present a les mescles inicials d'HBP amb Pro-Lipo S és suficient per dissoldre el fàrmac, de manera que la seva incorporació a les bicapes fosfolipídiques no es veu alterada per un augment de la quantitat d'alcohol en la primera etapa de la preparació.

4.3.4.1.2 ENCAPSULACIÓ D'HBP EN FUNCIÓ DE LA GRANDÀRIA DELS LIPOSOMES.

Per determinar la possible influència del diàmetre dels liposomes en l'encapsulació del fàrmac es prepararen a partir de Pro-Lipo S, en tampó fosfat sòdic 10 mM, pH 7,4, i mitjançant agitació (Taula 53), dues suspensions de liposomes saturats (S) i dues amb liposomes a la meitat de saturació (S/2) amb una concentració d'HBP final que de 0,1 % p/p.

MOSTRA	Pro-Lipo S (g)	HBP (g)	Tampó (g)	Conc. F (mg/mL)
S (n=2)	6,70	0,100	qsp 100	20
S/2 (n=2)	13,4	0,100	qsp 100	40

Taula 53 Composició de les suspensions de liposomes amb HBP utilitzades per obtenir vesícules de diferents grandàries.

Cada preparació es dividí en 4 parts d'uns 40 mL i, de cadascun d'aquests grups, 3 foren processades en el Microfluidizer. Les condicions de pressió d'entrada i número de cicles s'escolliren de forma tal que els liposomes de cada suspensió foren de diferent diàmetre, abarcant el màxim rang de grandàries. Prèviament a la determinació de la concentració del fàrmac per HPLC, cada suspensió es centrifugà en les condicions adients per a l'eliminació del fàrmac en excés no solubilitzat. Els resultats es mostren a la Taula 54.

MOSTRA	Tractament (cicles, pressió)	Diàmetre ± Amplada ¹ (nm; % vol)	HBP % p/p	Rendiment %
S (n=2)	Agitació	625 ± 294	0,0797 ± 0,0043	79,7
S (n=2)	C1p0,8	422 ± 229	0,0810 ± 0,0013	81,0
S (n=2)	C3p3	225 ± 145	0,0955 ± 0,008	95,5
S (n=2)	C9p4	54,7 ± 41,5	0,0989 ± 0,004	98,9
S/2 (n=2)	Agitació	693 ± 350	0,0990 ± 0,0014	99,0
S/2 (n=2)	C1p0,8	446 ± 275	0,100 ± 0,0077	100

MOSTRA	Tractament (cicles, pressió)	Diàmetre ± Amplada ¹ (nm; % vol)	HBP % p/p	Rendiment %
S/2 (n=2)	C3p3	174 ± 132	0,102 ± 0,0021	102
S/2 (n=2)	C9p4	36,0 ± 13,6	0,108 ± 0,0049	108

Taula 54 Característiques de les suspensions de liposomes amb HC preparades per a l'estudi d'estabilitat. ¹: Anàlisi realitzada amb la mostra no centrifugada.

Com en el cas de la hidrocortisona, a les mostres saturades hi ha un augment del fàrmac encapsulat a mida que les vesícules són de menor grandària. En aquest cas, però, no hi ha diferències significatives entre vesícules, saturades o no saturades, de diferents grandàries.

A partir de les concentracions d'HBP de les mostres saturades i de la solubilitat de l'HBP en els blancs equivalents a 20 mg F/mL (0,0014 % HBP p/p), es calculen les relacions màximes HBP/F pels diferents tipus de liposomes:

Mostra	Agitació	C1p0,8	C3p3	C9p4
mg HC/g F	39,1±2,15	39,8±0,65	47,1±4,0	48,7±2,0

Aquests resultats posen de manifest que, a mida que la mostra és sotmesa un processos d'homogenització més intensos, hi ha un augment de l'encapsulació d'HBP.

Per tal de comparar el comportament de l'HBP encapsulat amb el de la HC, es van cromatografiar en columna d'exclusió molecular alíquotes de la suspensió de liposomes C3p3 amb HBP a saturació. Una vegada analitzades les fraccions amb liposomes, s'obtingué un valor d'HBP encapsulat a la mostra inicial de només 0,028 % p/p. D'acord amb aquests resultats la saturació de les bicapes tindria lloc a una relació 14 mg HBP/g F. Com en el cas de la hidrocortisona, els resultats obtinguts amb aquesta tècnica posen de manifest que la interacció fàrmac-fosfolípids és feble, de manera que la dilució de la mostra afavoreix la sortida de l'HBP de les membranes.

4.3.4.1.3 ESTABILITAT DE LES SUSPENSIONS.

L'encapsulació d'HBP en liposomes permet obtenir suspensions que contenen el fàrmac al 0,1 % p/p tant amb vesícules amb les bicapes saturades com no saturades. Per aquest motiu, es prepararen suspensions a una concentració d'HBP major de 0,1 % p/p i amb diferents concentracions de fosfolípid, de manera que les bicapes estigueren saturades i a la meitat de la concentració de saturació (Taula 55). Després de processar les mostres en el Microfluidizer (C3p3), les suspensions, d'uns 100 mL de volum, es centrifugaren per eliminar l'excés de fàrmac. A continuació es valorà la concentració dels sobrenedants i es diluïren amb el tampó de preparació (fosfat sòdic 10 mM, pH 7,4) fins a una concentració final d'HBP de 0,1 % p/p.

Mostra	Pro-Lipo S (g)	HBP (g)	Tampó (g)	Tractament
S (n=2)	7,37	0,110	qsp 100	Microfluidizer C3p3
S/2 (n=2)	14,7	0,110	qsp 100	Microfluidizer C3p3

Taula 55 Composició de les suspensions preparades per a l'estudi d'estabilitat.

Cadascuna de les preparacions es dividí en tres parts i es guardaren en les següents condicions:

- a.- 40°C, foscor.
- b.- temperatura ambient, foscor.
- c.- 4°C en atmosfera de nitrogen, foscor.

La Fig. 133 mostra l'evolució dels diferents paràmentres físico-químics de les suspensions. Per tal de determinar si es produïa desencapsulació, s'analitzaren les concentracions de fàrmac en alíquotes sense centrifugar i centrifugades en les condicions habituals. Les concentracions d'HBP a les alíquotes no centrifugades foren 1,04±0,06 (n=50) vegades més elevades que les de les no centrifugades, però donada la poca diferència entre elles, s'han representat conjuntament en els gràfics. L'estudi de l'estabilitat accelerada (a) es dugué a terme durant 60 dies, i la resta durant un període una mica superior a l'any. Únicament a les suspensions amb liposomes saturats i emmagatzemades a temperatura ambient es produí, cap als 240 dies des de la seva preparació, el trencament de l'emulsió.

4.3.4.1.4 ESTABILITAT DELS HIDROGELS.

Prèviament a la obenció dels gels, es prepararen suspensions de liposomes saturats (S) d'HBP i a la meitat de saturació (S/2) en tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4 (Taula 56)

Mostra	Pro-Lipo S (g)	HBP (g)	Tampó (g)	Tractament
S (n=2)	9,38	0,14	qsp 100	Microfluidizer C1p2
S/2 (n=2)	18,8	0,14	qsp 100	Microfluidizer C1p2

Taula 56 Composició de les suspensions preparades per a l'estudi d'estabilitat de gels.

Les suspensions, una vegada centrifugades i determinada la concentració de fàrmac per HPLC, s'ajustaren mitjançant dilució amb tampó a una concetració final d'HBP de 0,119% p/p. En realitzar la mescla amb Carbopol 940 al 2% p/p neutralitzat en una relació suspensió/Carbopol 2% 5,3:1 p/p, s'obtingueren gels amb una concentració d'HBP de 0,1 % p/p i de composició:

Mostra	Pro-Lipo S (g)	Carbopol 940 %	HBP (g)	Tampó (g)
S (n=2)	6,76	0,3	0,1	qsp 100
S/2 (n=2)	13,5	0,3	0,1	qsp 100

Taula 57 Composició dels gels amb liposomes i HBP.

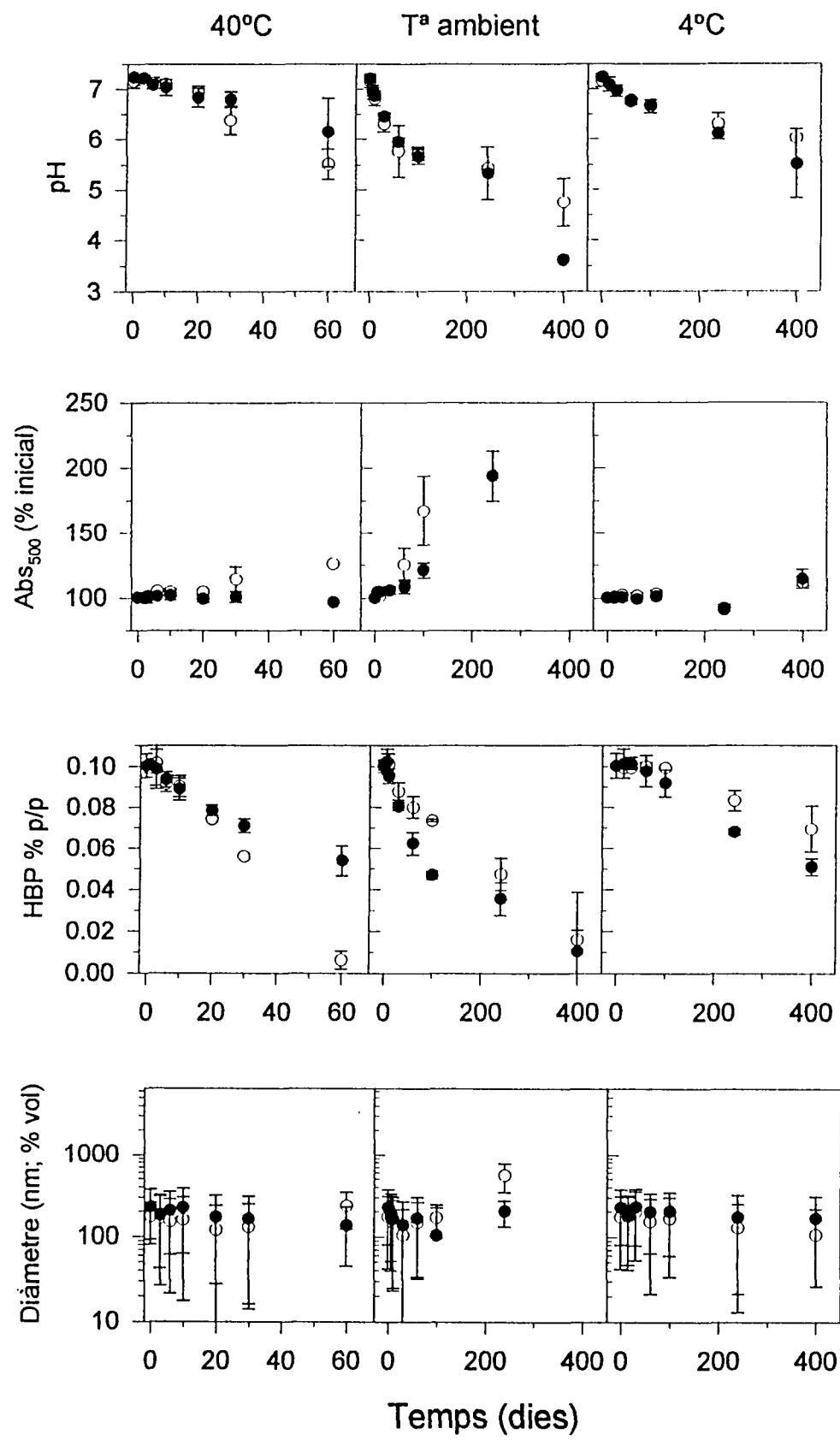


Fig. 133 a: Variació del pH, de la DO a 500 nm, de la concentració de fàrmac, i de la grandària dels liposomes (diàmetre $\pm$ amplada) de suspensions amb HBP. Símbols negres: mostres amb liposomes saturats amb HBP. Símbols blancs: mostres amb liposomes a la meitat de saturació d'HBP.

Es determinà l'estqabilitat accelerada (a 40°C, fosc) de cada gel. També es prepararen gels de Carbopol al 0,3 % p/p en el mateix tampó amb els quals es realitzarà el seguiment de la DO a 500 nm. D'aquesta manera es comprovà que les possibles variacions no fossin degudes a canvis de les propietats de l'hidrogel. Els resultats es mostren a la Fig. 134. Durant l'estudi d'estabilitat el blanc no mostrà, a la mateixa dilució que les mostres, cap interferència significativa en la DO a 550 nm. D'altra banda, el seu pH es mantingué constant.

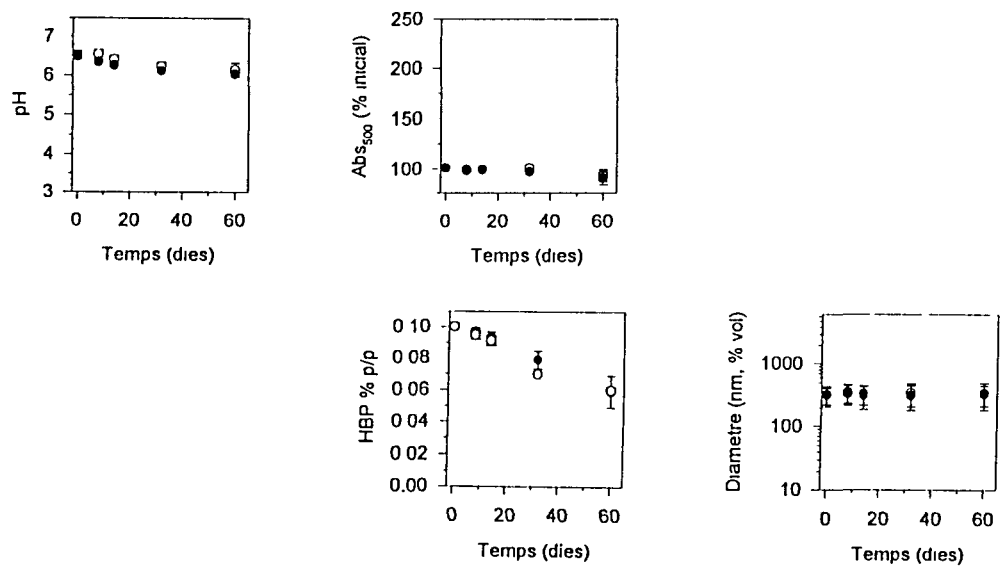


Fig. 134 a: Variació del pH, de la DO a 500 nm , de la concentració de fàrmac i de la grandària del liposomes (diàmetre ± amplada) de gels amb liposomes amb HBP encapsulat. Símbols negres: mostres amb liposomes saturats amb HBP Símbols blancs: mostres amb liposomes a la meitat de saturació d’HBP.

4.3.4.1.5 ESTABILITAT DELS LIOFILITZATS.

S’obtingueren liofilitzats a partir de suspensions de liposomes amb HBP al 0,1 % p/p, saturats (S) i a la meitat de saturació (S/2), incloint-hi sacarosa com a crioprotector. La composició i mètode d’obtenció de les suspensions es mostra a la Taula 58.

Mostra	Pro-Lipo S (g)	HBP (g)	Sacarosa (g)	Tampó (g)	Tractament
S (n=2)	6,70	0,100	2	qsp 100	Microfluidizer C1p2
S/2 (n=2)	13,4	0,100	4	qsp 100	Microfluidizer C1p2

Taula 58 Composició de les suspensions preparades per a l’estudi d’estabilitat de liofilitzats amb HBP.

Els liofilitzats, amb l’aspecte macroscòpic d’una pols seca i trencadissa, es guardaren a 40°C, a la fosc, i en atmosfera de nitrogen, per tal de realitzar un control de degradació accelerada. Durant el procés de liofilització es detectà una degradació mitjana del fàrmac en totes les mostres del 4,8 % (std=2,5, n=4). Aquest fet origina que les primeres mostres resospeses (temps= 0 dies) presentin una quantitat de fàrmac menor al 0,1 % p/p. Aquest efecte pot corregir-se liofilitzant suspensions que continguin el fàrmac en una concentració 1,05

vegades major de la desitjada.

Per a l'avaluació del liofilitzat, a intervals de temps escollits es resospengueren porcions de la pols afegint-hi aigua. La relació aigua/liofilitzat fou, en el cas de les mostres de liposomes saturats, 14,5:1 mL/g, i per les mostres amb liposomes a meitat de saturació, 7,91:1 mL/g. Una vegada resospeses, les alíquotes es centrifugaren per tal d'eliminar el possible fàrmac desencapsulat. Els resultats dels controls físico-químics es mostren a la Fig. 135.

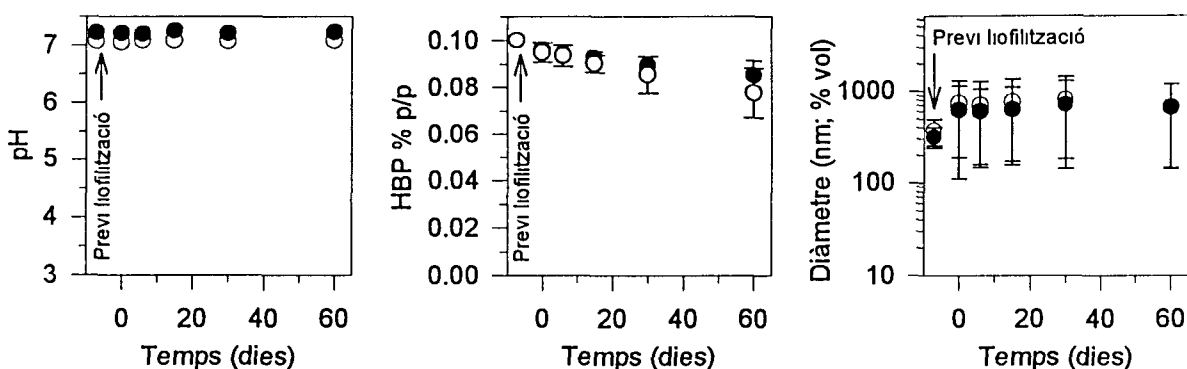


Fig. 135 a- Variació del pH, de la concentració de fàrmac, i de la grandària dels liposomes (diàmetre +- amplada) en suspensions amb HBP obtingudes a partir de mostres liofilitzades. Símbols negres: mostres amb liposomes saturats amb HBP. Símbols blancs: mostres amb liposomes a la meitat de saturació d'HBP.

4.3.4.2 ANALISI DE LA INTERACCIÓ HBP-FOSFOLÍPID MITJANÇANT FTIR.

Els estudis mitjançant espectroscòpia d'infraroig es realitzaren en pel·lícules seques obtingudes sobre finestres d'IR a partir de dissolucions en cloroform d'HBP i de fosfolípids.

A la Fig. 136 es mostren els espectres de:

- butirat-propionat d'hidrocortisona (n=3),
- mescles amb la relació 48 mg HBP / 1g F (EPC/PA 9:1 mol/mol) (n=4), la màxima relació determinada en la saturació dels liposomes.

A la Taula 59 es mostra l'assignació dels dos pics més representatius de l'HBP pur i en la mescla amb els fosfolípids. Donat que es produeix un solapament entre els pics de cadascuna de les dues molècules, s'han assignat les posicions dels màxims mitjançant la quarta derivada. Els resultats posen de manifest que no es produeix cap desplaçament significatiu del grup CO (C3).

Grup	Posició del màxim (cm ⁻¹)		
	HBP pur (n=3)	Mescla experimental (n=4)	Mescla sintètica (n=3)
CO (C3)	1667,85 ± 0,74	1669,40 ± 0,35	1668,06 ± 0,32
CO (C20)	1729,83 ± 0,05	ND	ND

Taula 59 Assignació dels pics d'absorció a l'IR per a l'HBP pur, en la mescla HC/F 48:1 mg/g, i en la suma dels espectres de cada molècula en la proporció anterior (espectre sintètic). ND: No detectat.

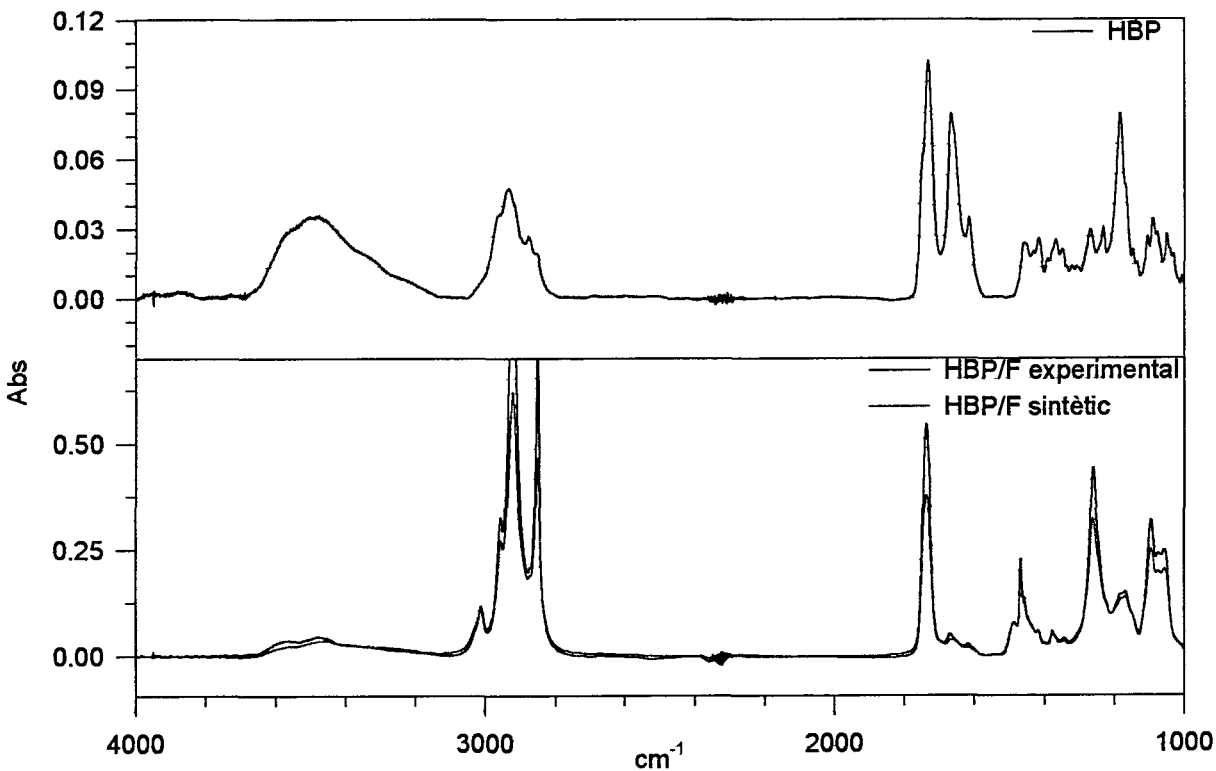


Fig. 136 Mitjanes dels espectres experimentals d'absorció d'infraroig d'HBP (n=3), mescles HBP/F (n=4), i espectre sintètic (suma) d'HBP i F.

Com en el cas de la HC, s'ha realitzat la mateixa anàlisi amb els pics característics corresponents als fosfolípids. A la Taula 60 es mostra l'assignació d'aquests pics purs i en les mescles amb l'HBP. S'observa que, tret de grup CO, no hi ha cap desplaçament de la posició dels màxims d'absorbància en presència del fàrmac.

Grup	Posició del màxim (cm ⁻¹)		
	EPC/PA (n=6)	HBP/EPC/PA Mescla experimental (n=4)	HBP/EPC/PA Mescla sintètica (n=5)
CH ₂ (Tensió antisim.)	2921,52 ± 0,59	2922,18 ± 0,29	2921,67 ± 0,07
CH ₂ (Tensió sim.)	2851,21± 0,40	2851,59 ± 0,18	2851,35 ± 0,17

Grup	Posició del màxim (cm ⁻¹)		
	EPC/PA (n=6)	HBP/EPC/PA Mescla experimental (n=4)	HBP/EPC/PA Mescla sintètica (n=5)
CO	1738,54 ± 0,54	1737,82 ± 0,05	1737,77 ± 0,33
PO (Tensió antisim.)	1261,35 ± 0,46	1261,20 ± 0,46	1261,90 ± 0,34
PO (Tensió sim.)	1296,85 ± 0,58	1096,86 ± 0,18	1097,11 ± 0,25

Taula 60 Assignació dels pics d'absorció a l'IR per a la mescla EPC/PA pura, en la mescla HC/F 48:1 mg/g, i en la suma dels espectres de cada molècula (espectre sintètic).
Antisim/Sim: Antisimètrica/Simètrica.

Per comprovar si la suma dels espectres provoca per sí mateixa algun desplaçament, s'han obtinguts espectres sintètics equivalents a la mescla HC/F 48:1 mg/g realitzant la suma dels espectres purs dels fosfolípids i de l'HBP (corregits cadascun d'ells pel factor adient per emular la seva proporció).

Com en el cas de la HC, l'HBP no presenta absorció a la 1490 cm⁻¹ (Fig. 137), fet pel qual de nou l'absorbància en aquesta posició s'ha emprat com a referència per determinar la proporció de fosfolípid en la mescla.

Donat que el pic CO (C3) de l'HBP no es desplaça en les mescles, la seva intensitat ha servit de referència per mesurar la proporció del fàrmac. Aquesta intensitat, però, ha estat prèviament corregida restant-li la petita contribució d'absorbància corresponent als fosfolípids purs, contribució que té per valor 0.233 unitats d'absorbància a 1669 cm⁻¹ per cada unitat d'absorbància a 1490 cm⁻¹ que tingui la mescla (Fig. 137).

D'aquesta manera s'obté la relació d'intensitats entre un pic dels fosfolípids i d'un pic de l'HBP en la mescla experimental 48 mg HC/ 1 g F. El valor del quocient és:

$$\frac{I_{Colina\ F}}{I_{CO\ (C3)\ HBP}} = 2,44$$

on:
I_{Colina F} indica la intensitat del pic del grup colina dels fosfolípids en la mescla 48 mg HC/1 g F
I_{CO (C3)} indica la intensitat del pic del carbonil C3 de l'HBP en la mescla 48 mg HC/1 g F.

Així, per obtenir els espectres sintètics desitjats, cal que es compleixi aquesta relació entre els pics anteriors en la suma dels espectres purs. Una vegada trobats els màxims dels pics mitjançant la quarta derivada, els números d'ona ens indiquen les seves situacions quan no hi ha interacció entre els fosfolípids i l'HBP. A les taules 59 i 60 es mostren les posicions dels pics dels espectres sintètics corresponents a una relació 48 mg HBP/g F. Com s'observa, al igual que en els espectres experimentals, no hi ha variacions significatives de les posicions dels pics dels fosfolípids i HBP.

En referència a la zona d'absorció dels grups OH, no s'aprecia cap variació entre l'HBP pur i la mescla amb els fosfolípids. Paral·lelament, com ja s'ha observat, els pics dels grups fosfat dels fosfolípids tampoc no tenen cap variació de la seva posició, de manera que podem afirmar que no s'estableixen enllaços d'hidrogen entre aquests i l'OH de l'HBP. A més, en els espectres experimentals, el quocient d'absorbàncies representat a la Fig. 129 val $0,0301 \pm 0,033$, fet que situa la posició dels grups fosfats d'aquestes mescles assecades a la zona corresponent als fosfolípids purs i secs, a diferència del que té lloc amb la HC.

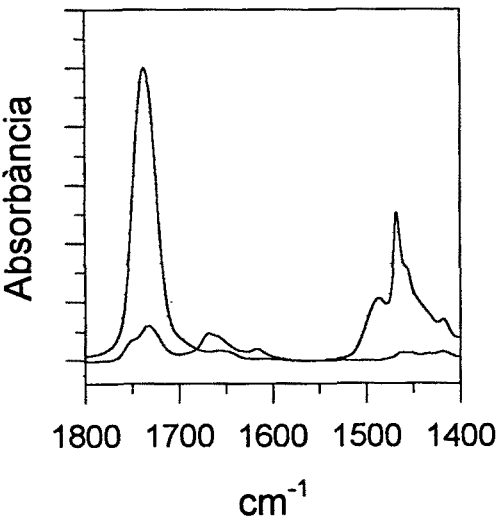


Fig. 137 Espectres d'FTIR de: (negre) mitjana experimental de la mescla de fosfolípids EPC/PA; (vermell) mitjana experimental d'HBP.

4.3.4.3 CAPACITAT VASOCONSTRICTORA DE L'HBP EN LIPOSOMES.

Els valors absoluts dels paràmetres estudiats mitjançant aquesta tècnica(t_0 i ΔI) mostraren una gran variabilitat en funció del subjecte en estudi. Així, prèviament a l'anàlisi de les dades, aquestes es van normalitzar emprant els valors del(s) blanc(s) del propi individu com a referència. Els resultats es mostren a la Taula 61.

Paràmetre	Tractament				
	Blanc	Isdinium HBP 0,1% p/p	Liposomes HBP 0,1 % p/p	Liposomes	Medi aquós liposomes
t_0	100 ± 23 (10)	100 ± 11 (7) ²	58,3 ± 10 (7) ^{1,2}	59,4 ± 29 (6) ^{1,2}	58,2 ± 26 (5) ^{1,2}
ΔI	100 ± 23 (10)	77 ± 26 (7) ²	114 ± 22 (6)	132 ± 35 (7) ²	112 ± 32 (5)

Taula 61 Resultat de l'estudi, per velocimetria de làser Doppler, de la capacitat d'inhibició de l'HBP de la urticària de contacte causada amb nicotinat de metil. Es mostren les mitjanes i la seva desviació standard, entre parèntesi s'indiquen els replicats.

¹: Amb diferències significatives respecte el blanc. ²: Amb diferències significatives respecte Isdinium. ($\alpha=0,05$)

Els resultats indiquen una disminució de la funció barrera de la pell al nicotinat de metil en els tractaments amb liposomes i amb el respectiu medi aquós. En tots aquests casos el nicotinat de metil triga menys temps en originar la vasodilatació (com a mitjana, i en valor absolut, 2,0 min front dels 3,44 min dels blancs). Pel que fa a la resposta originada pel vasodilatador, únicament el tractament amb liposomes (placebo) té diferències significatives respecte el blanc. Cap dels dos tractaments amb HBP és estadísticament diferent del blanc, però el seu comportament és ben diferent. Mentre la crema amb HBP disminueix la vasodilatació

respecte el blanc en un valor d'un 23 %, els liposomes amb HBP mostren un increment d'un 14 % respecte el valor de referència. D'altra banda, si es comparen els resultats dels tractaments amb liposomes entre ells, s'aprecia que de nou hi ha una tendència a la disminució de la vasodilatació en presència del fàrmac (-18%).

Cal destacar que en el tractament amb liposomes amb HBP, visualment s'observa un clar enblanquiment de la pell abans de l'aplicació del nicotinat de metil (com en el cas de l'Isdinium), fet que posa de manifest la vasoconstricció originada pel fàrmac (Fig. 138). Així, l'increment de la resposta que es detecta en els tractaments amb liposomes, cal atribuir-la a un major flux de nicotinat de metil durant el minut que dura la seva aplicació a la pell.

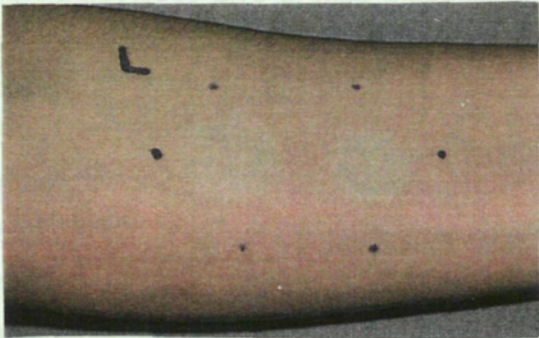


Fig. 138 Enblanquiment de la pell causat per l'aplicació de pegais oclusius amb HBP encapsulat en liposomes (L) o en crema durant 4 h.

4.3.4.4 CAPACITAT ATROFIANT DE L'HBP EN LIPOSOMES.

Donats els resultats poc concluent de la VLD, s'ha emprat la capacitat atrofiant de l'HBP per determinar si el fàrmac és alliterat a la pell en aplicar-hi suspensions de liposomes amb HBP encapsulat, comparant-se els resultats amb els proporcionats per una crema amb el fàrmac (Isdinium).

A la Fig. 139 es mostren unes imatges representatives dels talls histològics de cada grup. Pel que fa als valor numèrics, en tots els casos la variabilitat entre mostres fou igual o superior a l'error de la mesura (Ap. 4.1.10). A la Taula 62 es mostren els valors histomètrics de l'anàlisi.

	Gruix epidermis (µm)	nº de capes cel.lulars	Gruix dermis (µm)	Gruix teixit adipós (µm)	Gruix teixit muscular (µm)	nº de sebòcits per camp
Control (n=6)	12,0 ± 1,7	2,1 ± 0,3	175 ± 16	234 ± 40	140 ± 44	41 ± 5
Isdinium (n=4)	12,2 ± 1,8	2,1 ± 0,1	157 ± 21	105 ± 11 ¹	71,2 ± 6,5 ¹	44 ± 1
Liposomes (n=4)	13,0 ± 1	2,3 ± 0,4	156 ± 19	118 ± 23 ¹	70,6 ± 15 ¹	45 ± 4

TAULA 62 Comparació dels paràmetres histològics dels tractament d'HBP en crema o en liposomes. (mitjana ± std)

¹: Amb diferències estadísticament significatives respecte al control (α= 0,05).

Com s'aprecia, els únics paràmetres que mostren diferències significatives respecte del grup control són els gruixos del teixit adipós i el del muscular, essent, en els dos casos, un 50 % menors. Els resultats posen de manifest que els liposomes actuen com a vehicles de l'HBP per aplicació tòpica. Els dos tractaments resulten, però, equivalents, no resultant significatius

els increments en el número de capes cel.lulars ni el del gruix de la epidermis que proporcionen el tractament amb liposomes.

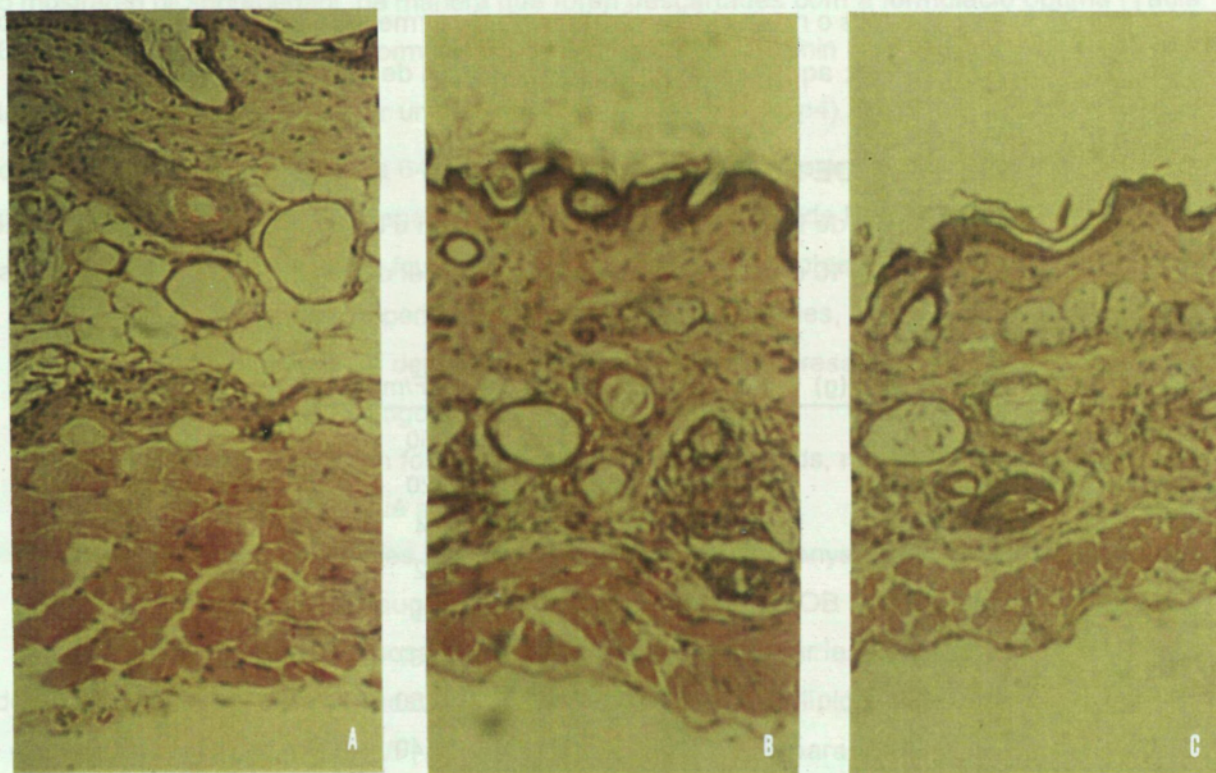


Fig. 139 Talls histològics de l'avaluació de la capacitat atrofiant de l'HBP. a) Control, b) Isdinium (HBP 0,1 % p/p), c) liposomes (HBP 0,1 % p/p).