

Estudis d'interacció de tensioactius sintètics biocompatibles amb models de membrana. Potencial aplicació en medicina pulmonar

Neus Lozano Valdés

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



***Estudis d'Interacció de Tensioactius Sintètics
Biocompatibles amb Models de Membrana.
Potencial Aplicació en Medicina Pulmonar.***



Tesi doctoral dirigida per:

Dra. Aurora Pinazo Gassol / Dr. Ramon Pons Pons

Neus Lozano Valdés

Barcelona, Gener 2010

Programa de Doctorat “Ciència i Tecnologia de Col·loides i Interfases”

Bienni 2005-2007

5. Efecte de la Nebulització

La nebulització és la tècnica més emprada en l'administració dels tensioactius pulmonars per via respiratòria. És per aquest motiu que s'ha considerat important determinar les dimensions de les partícules dels preparats sintètics de tensioactius pulmonars, abans i després de nebulitzar, així com el del romanent al dipòsit del nebulitzador mèdic emprat, mitjançant la dispersió de llum dinàmica [Esposito F i col., 2004]. Com a preparats sintètics de tensioactius pulmonars s'han considerat els sistemes binaris formats per un tensioactiu derivat de diacilglicerols d'arginina (1414RAc i 1212RAc) i un fosfolípid amfòter (DPPC i DMPC). El fosfolípid DPPC s'ha emprat com a component majoritari dels tensioactius pulmonars i el fosfolípid DMPC com un homòleg estructural de cadena més curta.

Preparació de les vesícules catióniques XXRAc/DPPC i XXRAc/DMPC

Les vesícules mixtes formades per un tensioactiu catiónic derivat de diacilglicerols d'arginina XXRAc i per un fosfolípid amfòter s'han preparat a una concentració total de l'1% en pes, en una solució salina de 0.1 M de clorur sòdic per tal de simular les condicions fisiològiques. S'han dissolt els dos components de la mescla en etanol i posteriorment s'ha evaporat el solvent fins a sequedat obtenint-se així un film lipídic homogeni. A continuació, s'ha hidratat el film i s'ha sonicat durant 15 min, a una temperatura superior a la temperatura de transició dels components purs, afavorint la formació de vesícules mixtes. Ha estat necessari extrudir les mostres degut a la gran polidispersitat de les vesícules mixtes formades. S'ha realitzat l'extrusió un total de $5 \times 0.4 \mu\text{m}$ (filtres hidròfils *Millipore*) i $10 \times 0.22 \mu\text{m}$ -Nylon (filtres *Cameo*). Les extrusions s'han realitzat a 40 °C per totes les mescles on hi intervé tant el 1414RAc com el fosfolípid DPPC, i a temperatura ambient per la mescla 1212RAc/DMPC.

Nebulització

Per portar a terme la nebulització s'ha utilitzat el nebulitzador mèdic convencional comercial *OMRON CX3 (NE-C16)* que es mostra a la Figura 39. Les seves especificacions tècniques són: velocitat de nebulització de 0.25 ml/min, diàmetre de partícula mig de 3.8 μm (MMAD, *Mass Median Aerodynamic Diameter*), flux màxim d'aire de 10 l/min i pressió màxima d'aire de 250 kPa. Aquest nebulitzador és utilitzat per la inhalació d'aerosols en tractaments de malalties respiratòries. Produeix una

distribució de mida de partícula molt petita, permetent que l'aerosol de medicació arribi de forma efectiva i fiable als conductes respiratoris. El nebulitzador consta d'un compressor que projecta aire a través d'un petit orifici i que, a través d'un tub o dipòsit concèntric, es fa passar la solució a nebulitzar, provocant una fragmentació de les partícules i donant lloc a la formació de l'aerosol. Per recollir la fracció nebulitzada s'ha dissenyat un dispositiu capaç de condensar l'aerosol, en el qual es fa impactar l'aerosol contra un vidre que es troba a temperatura ambient.



Figura 39. Imatge del nebulitzador mèdic convencional OMRON CX3.

Imatge extreta de © 2009 OMRON HEALTHCARE EUROPE B.V.

Efecte de la nebulització sobre les vesícules XXRAc/DPPC i XXRAc/DMPC

S'ha estudiat l'efecte de la nebulització en les dimensions de les partícules, mitjançant la tècnica de dispersió de llum dinàmica (*Malvern Autosizer 4700c PS/MV*), abans i després de nebulitzar, així com el del romanent al dipòsit del nebulitzador. Els resultats obtinguts per les mescles XXRAc/fosfolípid es mostren a la Taula 6, indicant la desviació estàndard corresponent a dos replicats. A la Figura 40 s'ha representat el diàmetre de partícula dels preparats sintètics en funció de la $\chi_{\text{tensioactiu}}$, on s'observa, a una $\chi_{\text{tensioactiu}}$ donada, que la nebulització de les mescles XXRAc/DPPC i XXRAc/DMPC no afecta de forma significativa les dimensions de les partícules.

Les diferències observades són degudes exclusivament a l'addició de tensioactiu sintètic a les vesícules dels fosfolípids. La mescla 1414RAc/DPPC presenta un diàmetre de partícula lleugerament més petit que els corresponents a cadascun dels components purs, per les tres fraccions analitzades. La mescla 1414RAc/DMPC no

presenta canvis significatius respecte a les dimensions de partícula del 1414RAc i provoca una disminució en les dimensions de partícula respecte al fosfolípid DMPC. En les mescles on hi intervé el 1212RAc, tant amb el fosfolípid DPPC com amb DMPC, presenten unes dimensions de partícula corresponents al promig dels diàmetres dels components purs. Per tant, l'addició del tensioactiu 1212RAc provoca un petit augment de la mida de partícula respecte al fosfolípid DPPC i l'addició del 1414RAc provoca una lleugera disminució respecte a la del fosfolípid DMPC.

Taula 6. Diàmetre de partícula en funció de la fracció molar de tensioactiu ($X_{\text{tensioactiu}}$), abans i després de nebulitzar, així com del romanent al dipòsit del nebulitzador.

	$X_{\text{tensioactiu}}$	Diàmetre de partícula, nm		
		Abans de nebulitzar	Després de nebulitzar	Romanent al dipòsit
<i>1414RAc/DPPC</i>	0	130 ± 2	128 ± 2	137 ± 3
	0.5	91 ± 1	97 ± 1	103 ± 1
	1	112 ± 1	112 ± 1	118 ± 2
<i>1212RAc/DPPC</i>	0	130 ± 2	128 ± 2	137 ± 3
	0.5	165 ± 4	180 ± 5	152 ± 3
	1	183 ± 5	176 ± 4	172 ± 5
<i>1414RAc/DMPC</i>	0	261 ± 12	253 ± 11	271 ± 12
	0.5	116 ± 4	113 ± 1	113 ± 1
	1	112 ± 1	112 ± 1	118 ± 2
<i>1212RAc/DMPC</i>	0	261 ± 12	253 ± 11	271 ± 12
	0.5	222 ± 7	207 ± 4	192 ± 4
	1	183 ± 5	176 ± 4	172 ± 5

El fosfolípid pur DMPC presenta un diàmetre de partícula de 261±12 nm, lleugerament superior al porus emprat en l'extrusió (220 nm). Aquest fet posa de manifest la baixa elasticitat (gran flexibilitat) del fosfolípid, propietat que ja es va observar amb l'estudi de monocapes de DMPC.

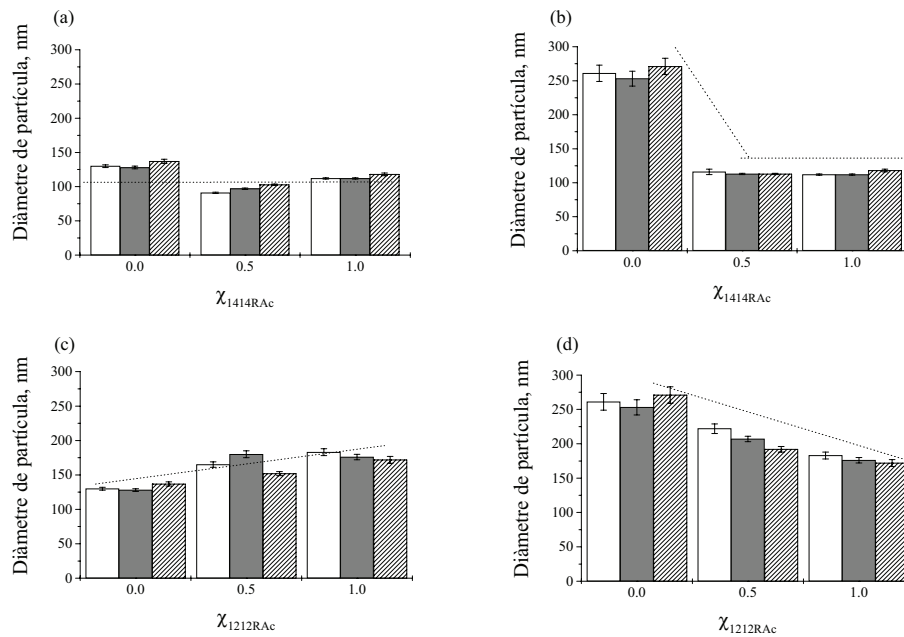


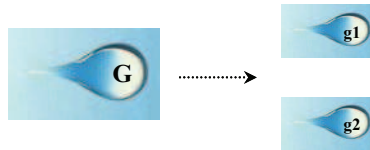
Figura 40. Diàmetre de partícula abans (blanc) i després (gris) de nebulitzar, així com del romanent al dipòsit del nebulitzador (ratllat) de les mescles (a) 1414Rac/DPPC, (b) 1414Rac/DMPC, (c) 1212Rac/DPPC i (d) 1212Rac/DMPC, en funció de la fracció molar de tensioactiu ($\chi_{\text{tensioactiu}}$).

Comparant el diàmetre de les partícules del fosfolípid DPPC (130 ± 2 nm) amb el del fosfolípid DMPC (261 ± 12 nm) s'observa que, en reduir el nombre d'àtoms de carboni de la cadena hidrocarbonada, la rigidesa de les vesícules disminueix. Aquesta tendència també s'observa pels tensioactius sintètics 1414Rac i 1212Rac, amb un diàmetre de 112 ± 1 nm i 183 ± 5 nm, respectivament.

Discussió dels resultats

Les diferències poc significatives observades en la determinació del diàmetre de les partícules al realitzar la nebulització es discuteixen a continuació, en base a l'energia implicada en el procés de nebulització i a l'energia necessària en el trencament d'una vesícula.

Energia implicada en el procés de nebulització. Una gota gran d'aigua (G) de radi R_G , que en nebulitzar es fragmenta en dues gotes idèntiques ($g1 = g2 = g$) de radi R_g ,



el volum de la gota G (V_G) serà igual a la suma dels volums de les gotes g,

$$V_G = V_{g1} + V_{g2} = 2V_g \quad (22)$$

El diàmetre de la gota g és un paràmetre conegut, proporcionat pel nebulitzador mèdic utilitzat, MMAD de 3.8 μm . Per tant el R_G s'ha calculat a partir de la següent relació,

$$\frac{4}{3} \pi R_G^3 = 2 \cdot \left(\frac{4}{3} \pi R_g^3 \right) \quad (23)$$

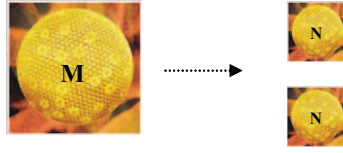
obtenint un resultat de R_G de 2.52×10^{-6} m.

L'energia implicada en el procés de nebulització vindrà donada per l'equació:

$$\Delta E = \gamma_0 \cdot \Delta A \quad (24)$$

on γ_0 és la tensió superficial de l'aigua (72.3×10^{-3} N/m), obtenint un valor d'energia de 1.49×10^{-12} J.

Energia necessària pel trencament d'una vesícula. Una vesícula de tensioactiu/fosfolípid de radi R_M formada per M molècules, que en nebulitzar es fragmenta en dues vesícules idèntiques de radi R_N , cadascuna formada per N molècules,



l'àrea de la vesícula M vindrà donada per la suma de les àrees de les vesícules N ,

$$M = 2N, \quad \frac{8\pi R_M^2}{A_0} = 2 \cdot \left(\frac{8\pi R_N^2}{A_0} \right) \quad (25)$$

on A_0 és l'àrea per molècula del tensioactiu/fosfolípid, obtenint la següent relació entre els radis de les vesícules,

$$R_M = \sqrt{2} \cdot R_N \quad (26)$$

La diferència de potencial químic estàndard per molècula, en funció de la dimensió de la vesícula en què es troba [Jung HT i col., 2001], ve donada per l'expressió,

$$\Delta\mu_{M,N}^0 = \mu_N^0 - \mu_M^0 = \frac{8\pi\kappa \cdot \left(1 - \frac{R_N}{R_M}\right)^2}{N} = \frac{8\pi\kappa \cdot \left(1 - \frac{R_N}{\sqrt{2} \cdot R_N}\right)^2}{N} = \frac{8\pi\kappa \left(1 - \frac{1}{\sqrt{2}}\right)^2}{N} \quad (27)$$

La diferència de potencial químic estàndard per vesícula, suposant una formació espontània de les vesícules ($10 k_B < \kappa < 40 k_B T$), on $\kappa \sim 25 k_B T$,

$$M \cdot \Delta\mu_{M,N}^0 = \frac{8\pi\kappa \left(1 - \frac{1}{\sqrt{2}}\right)^2}{N} \cdot 2N = \frac{8\pi\kappa (\sqrt{2} - 1)^2}{2} \cdot 2 \quad (28)$$

on k_B és la constant de Boltzmann i T la temperatura de treball en Kelvin. La diferència de potencial químic estàndard calculat és de 4.43×10^{-19} J/vesícula.

Per tant, l'energia implicada en el procés de nebulització, 1.49×10^{-12} J, és molt més gran que l'energia requerida per trencar una vesícula, 4.43×10^{-19} J. A partir d'aquests resultats teòrics, caldria esperar diferències significatives en les dimensions de les vesícules en generar l'aerosol, però els resultats obtinguts no ho corroboren. Tres possibilitats que justificarien aquest comportament són les següents:

a) La baixa concentració de vesícules per gota. Si imaginem que en el procés de nebulització es formen dues gotes a partir de migpartir una, es trencarien només les vesícules que es trobessin a la part central, essent el nombre total de vesícules en una gota de nebulitzat un nombre gran, i per tant l'efecte relatiu serà petit. A continuació es mostren els càlculs realitzats per estimar la fracció de vesícules unilamelars presents en una gota d'aigua i el nombre de vesícules per gota.

Considerant l'exemple de vesícules de DPPC (dispersió de l'1% en pes) de radi R_M , i suposant un gruix de la bicapa (d_B) de 4.5 nm [Balgavy P i col., 2001], el volum de la bicapa (V_B) d'una vesícula unilaminar vindrà donat per la següent relació,

$$V_B = V_{ext} - V_{int} = \frac{4}{3} \pi R_N^3 - \frac{4}{3} \pi (R_N - d_B)^3 \quad (29)$$

on V_{ext} és el volum extern de la bicapa i V_{int} el seu volum intern. El V_B calculat correspon a 5.4×10^{-22} m³/vesícula.

El volum calculat d'una gota d'aigua un cop nebulitzada, $V_g = \frac{4}{3} \pi R_g^3$ correspon a 3.35×10^{-17} m³/gota. La fracció de vesícules presents en una gota d'aigua, $\frac{c}{V_B} V_{ext} \times 100$, ha donat un valor del 8%, i per tant, el número calculat de vesícules de DPPC en una gota de l'aerosol, $\frac{V_g}{V_B} \cdot c$, correspon a 620 vesícules/gota, demostrant així la baixa concentració de vesícules en una gota d'aerosol.

b) Poca viscositat del medi. La poca viscositat del medi aquós podria ser la responsable de la poca efectivitat per transmetre a la vesícula l'energia generada en el procés de nebulització.

c) Impediment de la transmissió efectiva de cisalla a la gota per l'efecte de la tensió superficial de l'aigua. En impactar una gota d'aigua amb la superfície sòlida en el procés de nebulització, la tensió superficial de l'aigua actuarà com una "pell" protectora de la solució, impedit que la cisalla efectiva a l'interior de la gota sigui important.

En tot cas, si el nombre de vesícules fos petit però el seu radi fos molt gran, l'efecte del nebulitzat s'esperaria que fos superior a l'obtingut experimentalment en aquesta tesi.