

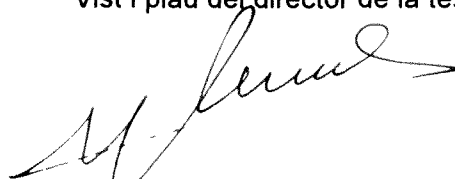
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
UNITAT DE BIOFÍSICA

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

4.3.5 EMULSIONS D'OLI DE BORRATGE (OB) ESTABILITZADES AMB FOSFOLÍPIDS (F).

Prèviament a l'obtenció d'una formulació d'oli de borratge al 2 % p/p per a l'estudi de la seva estabilitat accelerada, es determinà l'estabilitat a la centrifugació d'emulsions amb diferents relacions OB/F i processades o no en el Microfluidizer. Això permetè escollir una formulació amb una estabilitat física òptima: aquella que superés els assajos de centrifugació.

4.3.5.1 OPTIMITZACIÓ DE LES EMULSIONS

Les mescles inicials de Pro-Lipo S i OB es prepararen d'acord amb l'apartat 3 2 2 5. El medi aquós fou també fosfat 10 mM pH 7,4. La composició final de les emulsions assajades es mostra a la Taula 63:

Pro-Lipo S (g)	OB (g)	Tampó (g)	mg F/mL	OB/F p/p
16,67	2	qsp 100	50	0,4
6,67	2	qsp 100	20	1
1,33	2	qsp 100	4	5
0,667	2	qsp 100	2	10
0,333	2	qsp 100	1	20
0,222	2	qsp 100	0,67	30
0,167	2	qsp 100	0,50	40
0,133	2	qsp 100	0,40	50
0	2	qsp 100	0	x (inf)

Taula 63 Composició de les emulsions OB/F.

Cada preparació es dividí en tres parts, de manera que una d'elles correspongué a la formulació obtinguda per agitació, i les altres dues es processaren en el Microfluidizer a una

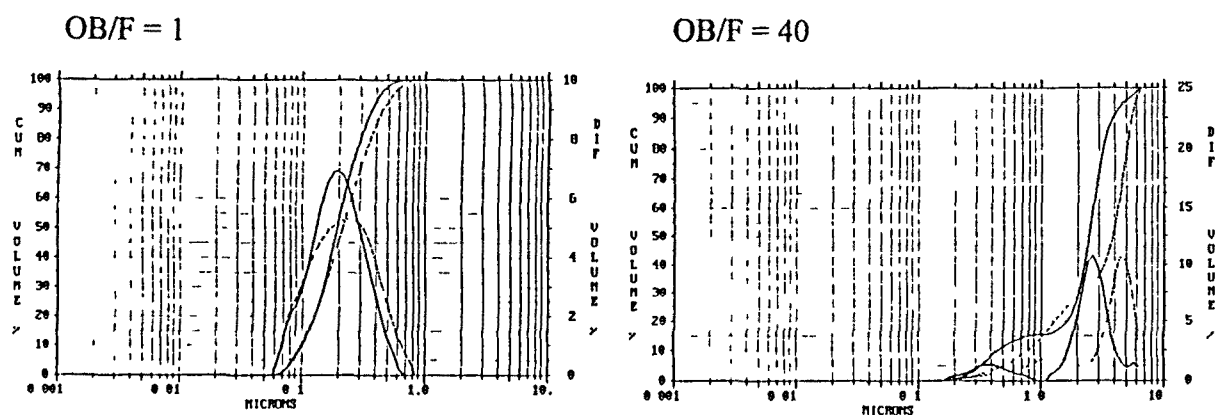


Fig. 140 Distribució de grandàries de les vesícules constituents d'emulsions d'OB en funció de la relació OB/F i del processament de la mostra: (----) 2 cicles; (—) 7 cicles.

pressió de 4 bar, obtenint emulsions tractades 2 i 7 cicles. A la Fig. 140 es mostren els diàmetres de les vesícules obtingudes amb diferents relacions OB/F en funció del seu tractament.

Totes les preparacions obtingudes per agitació i amb una relació OB/F igual o major a 5 mostraren oli sobrenedant, de manera que foren descartades com a formulació òptima (Taula 64). En centrifugar la resta de formulacions a 2000 x g durant 30 min (Ap. 3.1.2.5), es mostraren inestables les constituïdes per una relació OB/F ∞ (C2p4 i C7p4) i les de relació OB/F 0,4 i 1 obtingudes per agitació (Taula 64). La resta d'emulsions no presentà oli sobrenedant, però sí una separació de fases que depengué de la composició inicial de la següent manera:

- com més gran fou la relació OB/F, més microgotetes amb OB s'acumularen a la zona superior de les alíquotes centrifugades, arribant a formar una franja estreta i densa en les relacions majors, i presentant una part inferior lliure de microgotetes OB.
- com més gran fou la concentració de fosfolípids, més sediment de liposomes aparegué a la part inferior dels tubs.
- com més cicles fou processada la mostra, menys sediment de liposomes es formà, augmentant alhora la quantitat d'OB acumulat a la part superior

Aquest comportament posa de manifest que en processar les mostres un major número de cicles s'aconsegueix una mescla millor entre l'OB i els fosfolípids (augmenta la fase d'OB), i que com major és relació OB/F, més ràpidament té lloc la separació de fases. Com a control d'estabilitat física de les emulsions C7p4, es comparà la grandària de les vesícules de les alíquotes centrifugades i homogeneitzades per agitació amb vòrtex, amb la de les emulsions originals. El diàmetres, expressats en % vol, es mostren a la Fig. 141 S'aprecia que no hi ha canvis significatius entre els dos tipus d'emulsions en el rang de diàmetres estudiat.

OB/F	mg F/mL	Agitació	C2p4	C7p4
0,4	50	n=2	n=2	n=2
1	20	n=3	n=3	n=3
5	4	n=3	n=2	n=2
10	2	n=3	n=2	n=2
20	1	n=4	n=3	n=3
30	0,67	n=3	n=2	n=2
40	0,50	n=4	n=2	n=2
50	0,40	n=2	n=2	n=2
∞	0	n=4	n=4	n=4

Taula 64 Estabilitat física de les emulsions: (.) Amb oli sobrenedant sense centrifugació de la mostra; () Amb oli sobrenedant després de centrifugació a 2000 x g durant 30 min; () Amb oli sobrenedant després de centrifugar a 100.000 x g durant 2 h. (n: replicats)

Com assaig final d'estabilitat, s'ultracentrifugaren les preparacions que fins el moment s'havien mostrat estables en les centrifugacions a baixes g. Únicament les suspensions amb unes relacions OB/F de 0,4, 1 i 5 (C2p4 i C7p4) no presentaren oli sobrenedant per sobre de la crema de microgotetes OB/F (Taula 64). Conseqüentment, d'acord amb els resultats anteriors, s'escolli la relació OB/F=1 com a formulació òptima per a realitzar l'estudi d'estabilitat accelerada a 40°C ja que: primer, té una estabilitat física màxima en tots els assajos realitzats; segon, en ser centrifugada a 2000 x g, mostra menys separació de fases que la de relació OB/F=5; i tercer, no presenta un excés de fosfolípids innecessari com en el cas de la relació OB/F=0,4, de manera que les microgotetes OB/F s'estabilitzen amb una quantitat de fosfolípids mínima.

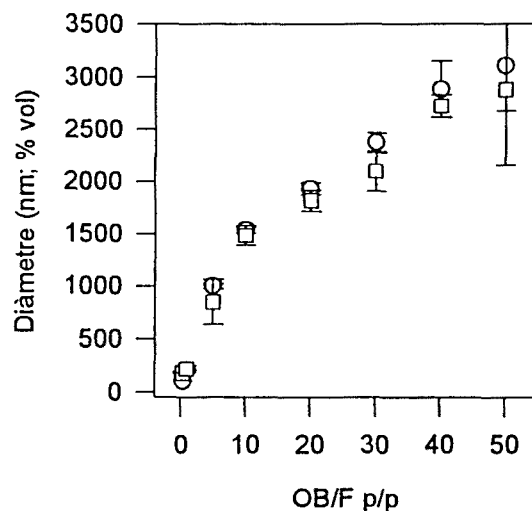


Fig. 141 Distribució de grandàries d'emulsions OB/F C7p4 no centrifugades (○), i centrifugades a 2000 x g durant 30 min i homogeneitzades posteriorment mitjançant agitació (□).

4.3.5.2 CARACTERITZACIÓ DE L'EMULSIÓ OB/F=1 p/p.

Es realitzaren dos assajos diferents per caracteritzar les diverses fases constituents d'aquest tipus d'emulsions processades al Microfluidizer C7p4: espectroscòpia d'infraroig per determinar la relació OB/F, i determinació del volum encapsulat mitjançant cromat.

L'anàlisi de grandàries de les fases que s'obtenen en ultracentrifugar les diferents emulsions proporciona el gràfic de la Fig. 142. Donada l'estructura de les microgotetes, és possible calcular el diàmetre de les mateixes a partir de la relació en pes entre els seus components tenint en compte que el fosfolípid ocupa la superfície en forma de monocapa i el triacilglicèrid l'interior (Rotenberg M. et al., 1991). Aquesta relació una té per expressió:

$$\text{Diàmetre (nm)} = 11,54 \frac{P_{TG}}{p}$$

on

p_{TG}/p_F : correspon a la relació en pes entre el triacilglicèrid (TG) i el fosfolípid (F) que constitueixen les microgotetes.

Per obtenir l'equació anterior pel sistema OB/F, ha estat necessari calcular el pes molecular de l'oli de borratge. Aquesta dada s'ha obtingut a partir de l'anàlisi de les cadenes d'àcid gras per cromatografia de gasos (Taula 65), i a partir de l'interval que proporciona l'índex de saponificació del producte inclòs en el butlletí d'anàlisi. En el primer cas, i d'acord amb

l'assignació de pics descrita a la bibliografia (Gurr I. et al., 1991; Redden P.R. et al., 1995), s'obté un pes molecular mitjà de 972 g/mol, mentre que el segon proporciona l'interval 841-935 g/mol. Donats aquests valors, al gràfic s'ha representat la recta corresponent a la mitjana entre 935 i 972 g/mol (953,5 g/mol). En el rang estudiat la diferència entre els dos valors no és relevant.

Cadena	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1	22:1	24:1
% molar	11,4	4,05	19,0	41,5	25,1	4,64	2,96	1,80

Taula 65 Composició d'acids gràsos de l'oli de borratge.

L'anàlisi de diàmetres de les fases indica l'existència de dues poblacions majoritàries: una de diàmetre mitjà de 72 nm constituïda per liposomes i que sedimenta parcialment, i una altra de microgotetes OB/F que és la que forma la crema sobrenedant. El diàmetre de les vesícules constituents de les microgotetes no es correspon amb el que caldria esperar tenint en compte la relació OB/F=1 de la mescla inicial de la formulació (Fig. 142). Per aquest motiu s'han obtingut espectres d'FTIR de les cremes amb l'objectiu de quantificar la relació OB/F en les microgotetes (Ap. 4.1.6). Paral·lelament també es realitzaren anàlisi de la fracció liposòmica de les mateixes mostres, i de l'oli sobrenedant en altres formulacions que es mostraren inestables (Taula 64). Els resultats en fracció en pes d'OB calculats a partir de la recta patró es mostren a la Taula 66, on s'ha indicat també en altres relacions OB/F.

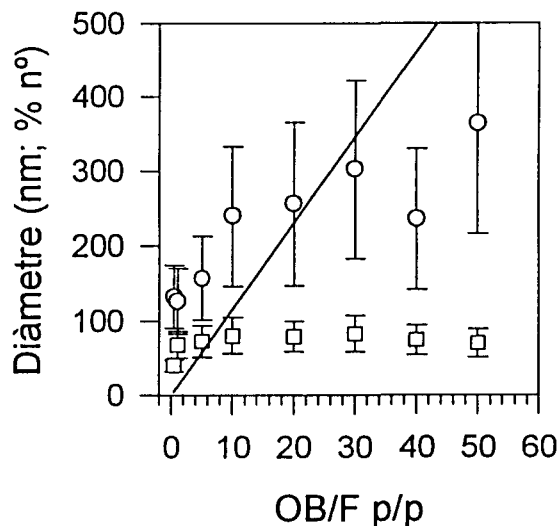


Fig. 142 (o) Diàmetre de les microgotetes OB/F obtingudes mitjançant ultracentrifugació; (□) Diàmetre de les vesícules sedimentades i de les presents en la fracció aquosa en les mateixes ultracentrifugacions; (—) Diàmetres teòrics de les microgotetes en funció de la seva relació OB/F.

Mostra	m_{OB}	OB/F p/p	OB/F mol/mol ¹
Crema sobrenedant (n=3)	0,927 ± 0,013	13,1 ± 2,4	10,3 ± 1,9
Fase aquosa i sediment (n=3)	0,0277 ± 0,0240	0,0289 ± 0,025	0,0227 ± 0,0197
Oli sobrenedant (n=4)	1,02 ± 0,044	∞	∞

Taula 66 Composició d'OB i F de les fraccions obtingudes per ultracentrifugació de mostres OB/F=1 (crema i fase aquosa) i d'altres relacions OB/F inestables (oli). m_{OB} : fracció en pes d'OB.

¹:calculat prenent com a pes molecular de l'OB 953,5 g/mol.

Com s'aprecia, la relació entre els components de la crema de microgotetes (OB/F p/p=13) és més gran que la de la formulació (OB/F p/p=1), fet que permet explicar la diferència entre el diàmetre observat i el teòric. En considerar la relació OB/F de la crema, s'obté un diàmetre teòric de 150 nm, valor proper a l'experimental, que és de 127 ± 43 nm.

L'anàlisi de la fracció amb liposomes indica que el contingut d'OB no és significativament diferent de 0. El seu valor (OB/F 2,89 % p/p) és, però, equivalent al trobat per Hamilton J.A. (1989) per liposomes d'EPC amb trioleïna o amb tripalmitina (triglicèrid/fosfolípid 3 % p/p), i proper a l'obtingut per Dahim M. et al., (1998) amb oli de llavor de soja i EPC (triglicèrid/fosfolípid 3,8 % mol/mol).

Pel que fa a l'oli sobrenedant obtingut a partir d'emulsions inestables, l'anàlisi d'FTIR confirma que aquesta fase està constituïda únicament per OB.

Per quantificar el percentatge de volum encapsulat corresponent a cada fracció de l'emulsió, s'incloué cromat 2 mM al medi aquós durant l'obenció de les emulsions OB/F=1. Una vegada ultracentrifugades i separada la crema del medi aquós i sediment, es diluïren en medi aquós amb cromat 2 mM fins el pes inicial centrifugat. D'aquesta manera s'obtingueren mostres amb microgotetes i amb liposomes per separat. Mitjançant cromatografia d'exclusió molecular es separà el crom encapsulat del no encapsulat, quantificant-se el percentatge de vesícules en la fracció que les contingué mitjançant la DO a 550 nm. El crom present es determinà per absorció atòmica. D'aquesta manera es calcularen els percentatges d'encapsulació de mostres no centrifugades, i de les corresponents fraccions amb microgotetes i amb liposomes. Els resultats es mostren a la Taula 67.

	Mostra no centrifugada	Fracció de microgotetes OB/F	Fracció de liposomes
% encapsulació (v/v)	$1,46 \pm 0,2$ (n=2)	$0,16 \pm 0,11$ (n=2)	$1,36 \pm 0,25$ (n=2)

Taula 67 Percentatges d'encapsulació d'emulsions OB/F i de les corresponents fraccions amb microgotetes i amb liposomes.

El fet de que no hi hagi diferències significatives entre la mostra no centrifugada i la corresponent fracció amb liposomes, unit a que la fracció amb microgotetes presenti uns valors que no siguin significativament diferents de zero, corrobora el fet de que la crema sobrenedant obtinguda per ultracentrifugació està constituïda únicament per microgotetes.

Com a conseqüència de la interferència de l'OB a la quantificació de F mitjançant el ferrotiocianat amònic, s'ha estimat la concentració de fosfolípids que forma microgotetes OB/F a partir de la relació OB/F de les vesícules constituents de la crema: el producte de la concentració total d'OB (~20 mg/mL) per la relació en pes F/OB a les microgotetes (Taula 66), proporciona la concentració de F que en forma part (1,5 mg F/mL). Per tant, d'aquesta manera s'estima que només al voltant del 7,5 % dels fosfolípids constitueix la monocapa de les vesícules d'OB.

4.3.5.3 ESTABILITAT DE LES EMULSIONS OB/F

Una vegada establerta la relació OB/F òptima al valor d'1, i determinada la composició d'aquest tipus d'emulsions, es prepararen formulacions amb OB al 2 % p/p en diferents formes de presentació (líquida, gel i liofilitzat) per determinar la seva estabilitat físico-química a 40°C. En tots els casos, el medi aquós de les preparacions fou tampó fosfat sòdic 10 mM pH 7,4.

La composició de la formulació líquida es descriu a la Taula 68. Una vegada obtinguda, la mescla inicial es processà en el Microfluidizer un total de 7 cicles a una pressió de 4 bar. Es prepararen dues emulsions d'uns volums mínims de 30 mL.

Pro-Lipo S (g)	OB (g)	Tampó (g)	OB % p/p	mg F/mL
6,67	2	qsp 100	2	20

Taula 68 Composició de les emulsions d'OB al 2 % per a l'estudi de l'estabilitat accelerada.

Per a l'obtenció del gel amb OB, fou necessària la preparació prèvia d'una emulsió al 2,4 % p/p d'oli processada en el Microfluidizer en les condicions descrites anteriorment (C7p4). La composició de l'emulsió es descriu a la Taula 69.

Pro-Lipo S (g)	OB (g)	Tampó (g)	OB % p/p	mg F/mL
8,0	2,4	qsp 100	2,4	24

Taula 69 Composició de les emulsions d'OB al 2,4 % necessàries per a l'obtenció de gels.

Les emulsions anteriors es mezclaren amb Carbopol 940 al 2 % (neutralitzat) en una relació emulsió/Carbopol 2% de 5,3:1 p/p. La composició final dels gels fou (Taula 70):

Pro-Lipo S (g)	Carbopol 940 %	OB (g)	Tampó (g)	OB % p/p	mg F/g
6,73	0,3	2	qsp 100	2	20

Taula 70 Composició final dels gels amb OB 2 % p/p.

S'obtingueren dues mostres, cadascuna d'un pes mínim de 80 g. Complementàriament, es preparà un gel al 0,3 % de Carbopol 940 en el mateix tampó de les emulsions. Aquest s'emprà com a blanc en el seguiment de l'índex d'oxidació i de la DO a 500 nm.

Per a l'obtenció de liofilitzats s'incloué sacarosa en el medi aquós en una proporció sacarosa/fosfolípid 1:1 p/p (Ap. 3.2.3.4). Es prepararen dues emulsions (Taula 71) que després del seu processat en el Microfluidizer (C7p4), foren liofilitzades.

Pro-Lipo S (g)	OB (g)	Sacarosa (g)	Tampó (g)	OB % p/p	mg F/mL
6,67	2	2	qsp 100	2	20

Taula 71 Composició de les emulsions prèviament a la seva liofilització.

Per tal d'obtenir un blanc amb el qual corregir l'efecte de la sacarosa en la determinació

de l'índex de Klein, es preparà un blanc substituint el Pro-Lipo S i l'OB per tampó.

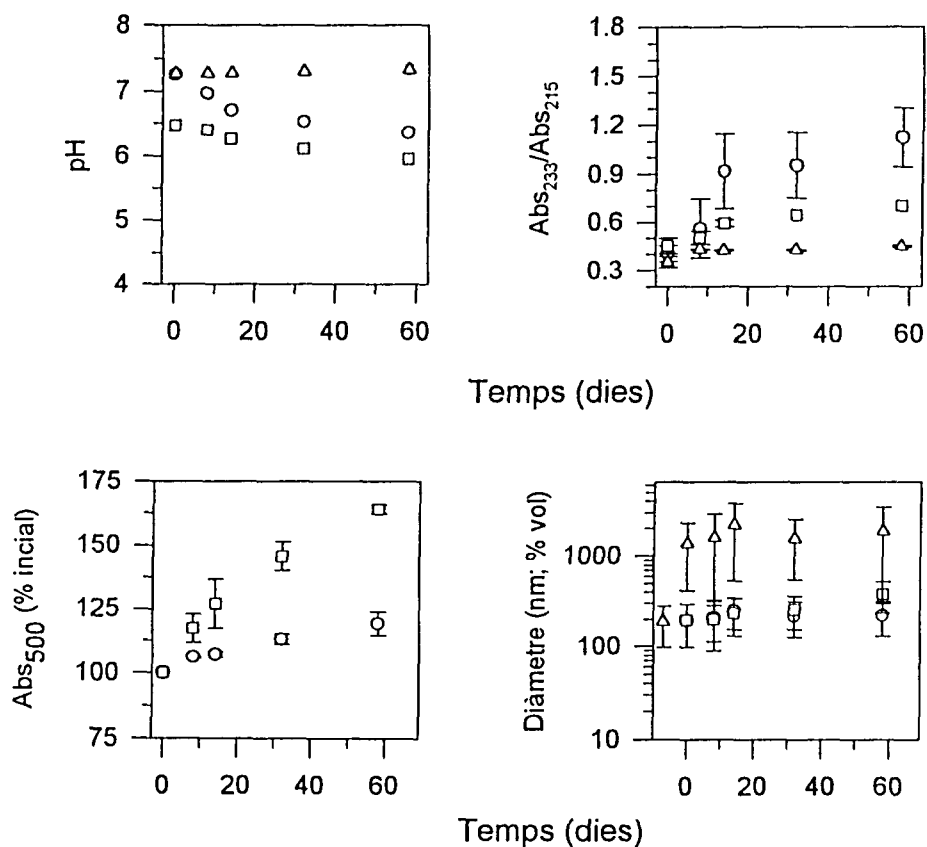


Fig. 143 Variació de diferents paràmetres físico-químics d'emulsions al 2% d'OB en presentació líquida (○), gel (□) o liofilitzada (Δ).

Els liofilitzats preparats tingueren un aspecte macroscòpic correcte: una pols seca, obtenint-se 0,0667 g pols/g emulsió. Aquesta relació indicà la quantitat d'aiguà que calgué afegir a fraccions dels liofilitzats per obtenir-ne de nou emulsions amb OB al 2 % p/p: 14 mL aigua/g liofilitzat. La pols es guardà en atmosfera de nitrogen.

A la Fig. 143 es motra l'evolució de diferents paràmetres físico-químics de cada formulació, mantingudes totes en la foscor i a 40°C. Durant l'assaig cap de les mostres no presenta cap alteració de l'aspecte macroscòpic (crema, trencament, inversió de fase).

En referència al comportament del blanc de carbopol, no s'observaren variacions del pH, a diferència de les mostres amb emulsió. Pel que fa a les seves dilucions en tampó (del mateix ordre que les de les mostres amb OB), aquestes proporcionaren, durant tot el temps d'estudi, una absorbància mitjana de $0,011 \pm 0,003$, que correspon, en el cas més elevat, a un 2 % de la de les mostres amb OB. Donada aquesta relació, no es tingueren en compte els valors dels blancs en el seguiment de la DO de les mostres.

Químicament, les formulacions més estables foren les liofilitzades, que no tingueren problemes en la seva resuspensió fins el dia 60, quan van fer falta uns 10 minuts d'agitació ocasional per a la solubilització total. El diàmetre de les vesícules, però, augmentà un ordre de magnitud com a conseqüència de la liofilització, posant en evidència la formació d'agregats i de fusions entre elles. Després d'aquest procés el diàmetre es mantingué constant durant tot l'estudi d'estabilitat.

Les formulacions en gel mostren una estabilitat química millor que les líquides, però en aquest cas, a diferència dels gels amb liposomes d'apartats anteriors, presenten variacions més importants de la DO i del diàmetre de les vesícules.

Com s'observa, la variació en la DO no es correspon amb la detecció de vesícules de gran diàmetre en les anàlisi amb el Microtrack UPA 150. Aquests agregats o resultats de la fusió són visibles mitjançant microscòpia òptica de contrast de fase (Fig.144).

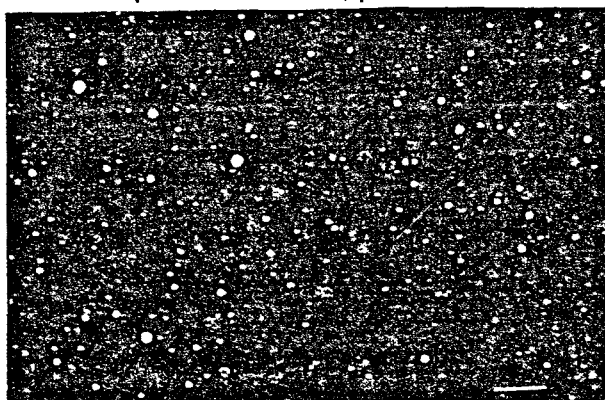


Fig. 144 Imatge de microscòpia òptica de contrast de fase en la qual s'aprecien microgotes OB/F de grandària major al micròmetre. Aquestes vesícules apareixen durant l'emmagatzematge de les emulsions. La barra indica una distància de 20 μm

5. DISCUSSIÓ

L'apartat està dividit en els següents temes:

- 5.1 Discussió dels mètodes d'anàlisi.
- 5.2 Discussió dels mètodes preparatius.
- 5.3 Discussió de suspensions i emulsions.

5.1

VALIDACIÓ DE MÈTODES D'ANÀLISI.

En el present apartat s'analitzen els resultats que fan referència a la validació de mètodes d'anàlisi nous o adaptacions d'altres ja existents. Pel que fa al quocient d'absorbàncies en el cas del ditranol (Q%, Ap. 4.1.5), a la relació entre la quantitat de fosfolípids i d'oli de borratge (Ap. 4.1.6), les dades presentades indiquen la viabilitat dels dos mètodes. La resta de procediments es comenta tot seguit.

5.1.1 DETERMINACIÓ DE L'ÍNDEX D'OXIDACIÓ.

La facilitat i rapidesa de l'obtenció d'aquest índex fan que sigui emprat amb molta assiduitat en els estudis d'estabilitat de preparacions que incorporen lípids. Malgrat aquesta freqüència d'ús, la major part de publicacions no posa de manifest les interferències degudes a la terbolesa que originen les sals dels tampons aquosos mostrades a la Fig. 30 (Bose B. i Chatterjee S.N., 1993; Landi L. et al., 1992; Misík V. et al., 1992; Misso N.L.A. et al., 1986), de manera que les lectures espectrofotomètriques es realitzen emprant etanol com a referència. Aquesta anomalia apareix fins i tot en llibres essencialment metodològics (New R.R.C., 1990). En comptades ocasions s'empra com a blanc el tampó en etanol (Lang J.K. i Vigo-Pelfrey C., 1993), no indicant-se les conseqüències de no fer-ho. En aquest cas cal tenir present que es pot produir la sedimentació de les sals presents en el medi etanòlic, fet que també produirà artefactes en la determinació de l'índex d'oxidació.

Quan s'empra l'etanol com a referència, i sempre i quan les mostres analitzades tinguin el mateix medi aquós i les dilucions en etanol siguin les mateixes, les variacions de l'índex són igualment indicatives de la degradació dels lípids. El percentatge d'oxidació, però, sí que resulta erroni, ja que l'absorbància mesurada a 233 nm no és deguda únicament als diens conjugats.

En el cas de comparar preparacions amb diferents concentracions de fosfolípids o de medis aquosos, és fa totalment necessària la correcció descrita a l'apartat 4.1.2. Degut a l'espectre que proporcionen els blancs amb tampó, no resulta prou correcta la substracció d'un valor de referència a les lectures a 233 i 215 nm, metodologia emprada per Zuidam N.J. et al. (1993).

D'altra banda, cal indicar que no s'ha determinat l'índex en les suspensions amb farmacs degut a la interferència que aquests produeixen i a que s'ha detectat que els mètodes de separació mitjançant minicolumnes cromatogràfiques Sep-pack (New R.R.C., 1990) produeixen artefactes ocasionats, provablement, al material plàstic que conté a la fase estacionària.

5.1.2 QUANTIFICACIÓ DE FOSFOLÍPIDS MITJANÇANT LA DO UV-Vis.

La determinació de la concentració de fosfolípids de les suspensions de liposomes resulta fàcil, ràpida i precisa mitjançant la mesura de la DO d'alíquotes de les mostres. La bibliografia menciona l'existència d'interval·ls de concentració en els quals la relació entre la concentració de fosfolípid i la DO és lineal (Ghosh P. i Singh U.N., 1992; New R.R.C., 1990), però no hi ha referències que aprofitin aquest fet per a la quantificació de les suspensions.

Sempre i quan no hi hagi alteracions de la distribució de grandàries dels liposomes o una absorció de la llum deguda a cromòfors, és possible aquesta aplicació en les condicions presentades a l'Ap. 4.1.4. En els resultats obtinguts, s'aprecia que les regressions són prou correctes. Però pel que fa al test de significació dels models, només en el cas dels SUVs l'error del model és comparable a l'experimental. Aquest fet no és indicatiu d'una manca d'ajust important de les rectes, ja que en tots aquests casos l'error standard del model (els residuals) és petit (Taula 4), i des del punt de vista pràctic es pot considerar que la imprecisió no és significativa (Ap. 3.3.1).

D'altra banda, l'exactitud del mètode queda provada en comparar els seus resultats amb els que proporciona l'anàlisi amb ferrotiocianat amònic (Fig. 33). S'observa que es manté fins a longituds d'ona curtes, la qual cosa permet emprar la DO per a l'anàlisi de mostres molt diluïdes i/o amb liposomes petits, els quals proporcionen poc senyal (Fig. 32).

5.1.3 VALIDACIÓ DEL CROMAT COM MARCADOR DEL VOLUM INTERN DELS LIPOSOMES.

L'ús d'aquesta molècula per determinar el volum encapsulat dels liposomes va ser una conseqüència dels problemes que es van detectar amb un marcador clàssic, la carboxifluoresceïna. Aquesta molècula és emprada àmpliament per a la caracterització de suspensions de liposomes, tant pel que fa a la determinació del seu volum encapsulat i estabilitat, com per tècniques que permeten conèixer la permeabilitat de les bicapes (New R.R.C., 1990; Mui B.S.L. et al., 1993). En emprar-la (99% puresa, Sigma) per a la determinació del volum encapsulat de liposomes obtinguts a partir de Pro-Lipo S, es va observar que el seu espectre d'absorció UV-Vis es modificava en obtenir les fraccions amb liposomes i amb la molècula no encapsulada mitjançant cromatografia d'exclusió molecular. Quan s'obtingueren dissolucions amb etanol i glicerol a una proporció igual a la present a les suspensions de liposomes, no alterà l'espectre de la carboxifluoresceïna, de manera que no es va poder determinar la causa de l'alteració. Aquests resultats contrasten amb els presentats per Perret S. et al. (1991), qui empen aquesta molècula per determinar el volum encapsulat en els liposomes obtinguts a partir de mescl·es ternàries com les constituents del Pro-Lipo S.

Consegüentment, es va fer necessari l'ús d'una altra molècula per la determinació del volum encapsulat. S'escollí el cromat degut a la seva disponibilitat i facilitat d'anàlisi. En cas de resultar apte, l'absorció atòmica en cambra de grafit permet quantificar concentracions de fins 0,5 ppb en mostres amb un volum mínim de 220 μL , de manera que amb els mitjans actuals són viables concentracions de l'anió molt inferiors a les descrites per Schullery S.E. et al. (1980).

Les Fig. 38 i 39 confirmen que aquest marcador és estable en el medi resultant dels Pro-Lipo S com a mínim fins a concentracions de 50 mg F/mL (no hi ha ni precipitació ni alteració de les sals de crom inicials). Aquest fet, juntament amb que no resulta alterat durant el processament amb el Microfluidizer (Fig. 40), permet que la seva quantificació sigui representativa del volum encapsulat en liposomes. L'ús de l'absorció atòmica per aquesta finalitat resulta òptim, ja que, en quantificar-se el crom total, les possibles modificacions del pH i/o concentració no facin necessàries les precaucions i/o correccions que caldria tenir en compte, per exemple, amb l'espectrofotometria.

Tot i que la cromatografia en capa prima posa de manifest la possibilitat d'emprar el cromat en suspensions que s'obtenen amb processos d'escalfament, els resultats no indiquen que aquest marcador pugui utilitzar-se en estudis d'estabilitat a llarg termini. *A priori*, el caràcter oxidant del Cr^{6+} desaconsella aquest ús, essent necessaris estudis d'estabilitat dels fosfolípids en presència de l'anió per determinar si n'és possible o no.

Com a molts altres marcadors, la determinació del volum encapsulat amb cromat fa necessària la separació dels liposomes que el contenen de la resta de medi aquós. Les correccions necessàries pel cas dels SUVs que s'han indicat a partir dels resultats presentats a la Fig. 41, permeten afirmar que la fuga del cromat encapsulat durant l'elució a les columnes altera els resultats en un valor del mateix ordre que el de l'error experimental, fent que no resulti important per aquelles vesícules que no presenten defectes d'empaquetament de les bicapes originats per un petit radi de corvatura.

La baixa concentració del cromat presenta avantatges sobre l'ús d'altres molècules. Per exemple, en un dels mètodes en els quals s'empra la carboxifluoresceïna, aquesta és encapsulada a concentracions que causen la pèrdua de la seva fluorescència (50-100 mM), fet que s'aprofita per quantificar la proporció no encapsulada en diluir la mostra fins a valors que permeten la lectura de la fluorescència causada per les molècules no encapsulades i, posteriorment, per quantificar la fluorescència total en trencar els liposomes. Degut a la concentració de la sonda, l'ús d'aquest tipus de tècniques no permet assegurar que els liposomes amb la sonda siguin idèntics als que s'obtenen sense ella. És per aquesta raó que es prefereix treballar amb mètodes que emprin substàncies que puguin ser detectades a molt

baixa concentració (això també és possible en el cas de la carboxifluoresceïna). Recentment Kawakami K. et al. (1999) han descrit un mètode alternatiu que permet la utilització de carboxifluoresceïna a concentracions molt menors (50-100 μM) sense necessitat de realitzar cromatografia d'exclusió molecular. Però aquesta tècnica únicament és aplicable a liposomes en estat gel, pel que la seva aplicació és molt restringida. Com s'observa, la baixa concentració del solut i l'aplicació a qualsevol tipus de liposomes es compleix plenament en el cas del cromat 2 mM.

L'ús de soluts per a la determinació del volum encapsulat presenta, però, desavantatges causats per la seva possible exclusió a l'interior dels liposomes que es pot produir durant la formació de les vesícules. Aquest fet és especialment important en el cas dels MLVs, ja que el solut no aconsegueix penetrar fins a les capes més internes dels liposomes degut a que l'aigua travessa les bicapes externes més ràpidament que el solut durant la formació de les liposomes. El resultat és que el marcador no es distribueix uniformement en cada espai aquós, de manera que el volum encapsulat experimental resulta menor que el real. Els mètodes que quantifiquen el volum encapsulat a partir del dissolvent eviten aquest error, i permeten comparar els valors reals amb els que proporcionen els mètodes de mesura de soluts.

Els valors trobats amb cromat pels liposomes a 30 mg F/mL obtinguts a partir de MLVs i extrusionats posteriorment fins 800 nm (Taula 9) són elevats en relació als que, per MLVs no extrusionats, proporcionen altres mètodes d'encapsulació de soluts ($\sim 0,5$ L/mol, Perkins W.R. et al., 1993) i propers als dels mètodes basats en la quantificació del dissolvent ($\sim 1,1$ L/mol). Tenint en compte que degut a que el volum varia amb el radi al cub cal esperar una disminució del volum encapsulat en disminuir el diàmetre dels liposomes mentre aquests siguin multilaminars, i que amb aquesta premissa l'increment del número de vesícules no compensa la disminució del volum encapsulat, el volum encapsulat experimental pels MLVs extrusionats fins 800 nm pot ser indicatiu de que té lloc poca o nul·la exclusió del cromat. Aquest fet, però, caldria confirmar-lo comparant els volums encapsulats de liposomes de les mateixes característiques (diàmetre, laminaritat i composició) obtinguts a partir de MLVs i a partir de MLVs congelats-descongelats, procés que assegura una distribució uniforme del solut en tots els compartiments aquosos dels liposomes.

5.1.4 VALIDACIÓ DEL MICROTRACK UPA 150 COM A ANALITZADOR DEL DIÀMETRE DE LIPOSOMES.

Els dos paràmetres determinants en la precisió i exactitud de les mesures de diàmetres de suspensions de liposomes han estat el temps d'anàlisi i la concentració de les mostres analitzades. El rang de diàmetres estudiat se situa des de poc més del micròmetre fins la decena de nanòmetres, d'aquesta manera queda cobert l'interval més freqüent en el qual

s'obtenen suspensions de liposomes. Per sobre d'1 μm la microscòpia òptica permet realitzar anàlisi de manera ràpida (Ap. 3.1.2.7).

Pel que fa al temps de lectura, s'ha comprovat té un efecte acumulatiu en la disminució de l'error fins a un temps mínim proper als 10 minuts. Aquesta durada de les anàlisi és sensiblement superior a la que es necessita en els aparells d'espectroscòpia de correlació fotònica en l'estudi de mostres unimodals (1-5 min). Per temps iguals o majors als 10 min, la imprecisió del Microtrack UPA 150 en la determinació del diàmetre i amplada de les suspensions depèn del propi valor del diàmetre i l'amplada (Ap. 4.1.8.1, Fig. 44). L'interval de confiança en el qual cal esperar el valor del diàmetre d'una nova lectura resulta especialment gran en el cas dels SUVs (al voltant dels 20 nm), però no implica greus mancances des del punt de vista experimental, ja que l'ordre de magnitud és el mateix, no representa diferències importants des del punt de vista pràctic tenint en compte el rang de grandàries possible dels liposomes i, a més, sempre es poden realitzar lectures replicades per tal de disminuir la imprecisió. És important tenir present que tots els intervals de confiança calculats indiquen els valors possibles al 95% de provabilitat que poden obtenir-se amb noves lectures, no amb les seves mitjanes. Per tant, es corresponen amb la imprecisió màxima de l'aparell en les condicions descrites, imprecisió que disminueix ràpidament si es realitzen varies lectures i s'obté la mitjana de totes elles. Donat el temps mínim d'anàlisi s'ha descartat aquest darrer procediment, però no deixa de ser aplicable quan calgui obtenir lectures amb una precisió major a la determinada en tot l'estudi.

En referència a l'interval de confiança de l'amplada, s'observa un comportament similar al del diàmetre: quan més uniforme és la distribució de diàmetres de la suspensió (menor amplada), menor és l'interval de confiança al 95% dins del qual cal esperar les noves lectures.

Si es realitza en quocient entre l'amplada i el diàmetre, el valor resultant és indicatiu de la dispersió de la població de liposomes en un tipus de representació concret (volum, número, àrea o intensitat). Podria pensar-se que l'error en el diàmetre i l'amplada és una conseqüència de la manca d'uniformitat de la suspensió i, per tant, estaria relacionat amb el quocient indicat anteriorment. Aquest fet no es constata a partir dels resultats obtinguts: els SUVs i els liposomes no extrusionats presenten valors similars del quocient amplada/diàmetre, mentre que l'error relatiu (interval/diàmetre o interval/amplada) és molt més gran en el cas dels SUVs. Aquest fet indica que la precisió de l'aparell no depèn de la dispersió de la població analitzada, al menys fins a una amplada propera als 900 nm (la màxima que s'ha obtingut).

A més de l'error associat al diàmetre i a l'amplada s'ha determinat, en distribucions expressades en modus standard, el de cada canal de lectura (variació en canal o tolerància, Ap. 4.1.8.2) i el global en tots el canals de lectura (variació global, Ap. 4.1.8.3). Els dos valors trobats (3,4% de tolerància i 25% de variació global) complementen al diàmetre i a l'amplada alhora de determinar si dues lectures són o no diferents. A més dels intervals considerats anteriorment, la possibilitat del programa de l'aparell de realitzar la diferència entre dues mesures permet

comprovar si es superen els límits de tolerància i de variació global. Cadascun d'ells es complementa: és possible que dues lectures presentin una variació global menor del 25% (p.ex. 18%) i que aquesta es concentri bàsicament en dos canals. Per tant, el fet que se superi en escriure la tolerància permet afirmar que les diferències són significatives, tot i que la variació global no ho detecti. Per tant, és necessari considerar el diàmetre, l'amplada, la tolerància i la variació global de manera conjunta per determinar si les diferències entre dues lectures corresponen a variacions reals de les mostres analitzades.

D'altra banda, els resultats de la precisió obtinguts amb poblacions bimodals (Ap. 4.1.8.7) són plenament satisfactoris, ja que presenten els mateixos valors que les poblacions bàsicament unimodals. En no incrementar-se l'error en el mateix temps d'anàlisi (10 min) es comprova novament que la imprecisió és independent de la dispersió (amplada) de la població, i que el temps escollit és suficient per a l'estudi de la majoria de suspensions de liposomes amb grandàries situades per sota del micròmetre. Els resultats són comparables als presentats per Kölchens S. et al. (1993) en anàlisi per espectroscòpia de correlació fotònica (ECF). Part d'aquest treball compara els diferents mètodes matemàtics aplicats en aquesta tècnica en l'estudi de mostres de làtex uni i bimodals. Pel que fa a les mostres amb una proporció similar en pes de cada població, el diàmetre de la població major (~700 nm) és assignat amb major precisió mitjançant l'ECF (-7,7% de mitjana), essent comparables els resultats de les dues tècniques en el cas de la població de diàmetre menor (~100 nm). En el cas del percentatge de cada població, no es presenten resultats equivalents a les Mescles B i C (Ap. 4.1.8.7) pels diàmetres indicats anteriorment, però els corresponents a mescles d'altres vesícules proporcionen resultats similars als del Microtrack UPA. Cal senyalar que mitjançant l'anàlisi de l'espectre de freqüències no s'obtingueren més de dues poblacions en cap les lectures amb una durada igual o major a 7,5 minuts, al contrari del que té lloc amb l'ECF, on en ocasions aparegueren més de dues poblacions, i es consideraven artefactes aquelles que constituïen menys d'un 10 % del senyal, essent, per tant, eliminades de l'anàlisi. Tenint en compte que el temps d'anàlisi que empren els autors per reduir l'error experimental de l'ECF és d'1 hora, les anàlisis de poblacions bimodals amb el Microtrack UPA 150 resulten molt més ràpides i amb una precisió i exactitud equivalents als mètodes més emprats.

Els fets exposats anteriorment junt amb la no existència de cap interacció creuada entre l'índex de càrrega o la grandària de les vesícules amb el temps d'adquisició (Ap. 4.1.8.5), aconsellen no emprar un temps menor als 10 minuts en les anàlisis de qualsevol tipus de suspensió de liposomes.

En un estudi més complet, seria necessari avaluar la capacitat del Microtrack UPA 150 en diferenciar poblacions bimodals en les quals els diàmetres de les vesícules components difereixen d'un factor menor a 2. Aquest valor és el límit que generalment s'associa a l'ECF en les mostres bimodals (Garbow N., et al., 1997; Kölchens S. et al., 1993).

Degut a que la distribució de diàmetres proporcionada pels aparells que treballen amb l'espectre de freqüències no s'obté amb cap altre restricció tret de que les vesícules tenen un moviment brownià, els resultats no inclouen cap paràmetre que indiqui si el tipus de mostra analitzat s'ajusta a les restriccions, tal i com ho fan els aparells d'espectroscòpia de correlació fotònica mitjançant l'índex de polidispersió (que a més indica en quin grau la mostra és uni o polimodal). Per tal d'establir un paràmetre que indiqui el grau de polidispersió de les mostres en les lectures realitzades amb el Microtrack UPA 150, es proposa una relació entre els diàmetres proporcionats per la distribució expressada en % vol i % número segons l'expressió:

$$d = \frac{\text{Diàm (\% núm)}}{\text{Diàm (\% vol)}} \quad \text{Eq. 22}$$

on:

Diàm (% núm) indica el diàmetre proporcionat per la distribució expressada en percentatge en número, *Diàm (% vol)* indica el diàmetre proporcionat per la distribució expressada en percentatge en volum.

Aquest paràmetre no és equivalent a l'índex de polidispersió²⁵, sinó que indica de forma simple en quin grau una població analitzada amb el Microtrack UPA 150 és o no unimodal. Donades les característiques de cada tipus de distribució (Ap. 3.1.2.8), com més diferents siguin les poblacions d'una suspensió més petit serà el quocient *d* entre els diàmetres. Per tant, aquest paràmetre oscil·la entre un valor mínim proper a zero, i un màxim d'1, valor que prendrà en mostres que donin com a resultat un únic canal de lectura (absolutament unimodals). Com a referència, les poblacions de liposomes extrusionades fins 200 o 100 nm, que són considerades distribucions unimodals, proporcionaren un valor mitjà de $d = 0,71 \pm 0,032$ (n=4).

En referència a l'efecte de la concentració de les mostres en les anàlisi, els resultats mostren que les desviacions observades no poden ser explicades ni per l'efecte de l'increment de la viscositat, ni per la disminució de la diferència dels índexs de refracció entre la finestra i la mostra. A partir del comportament observat s'han establert tres causes independents que expliquen les anomalies detectades: la pèrdua de linealitat de la relació concentració de la mostra-índex de càrrega, la disminució dels volum de dissolvent que actua com a tal, i les interaccions a llarga distància entre vesícules carregades. Cadascun d'aquests condicionants estableix les tres condicions necessàries per obtenir anàlisi sense artefactes. És important tenir en compte que el no compliment de les restriccions anteriors té lloc, per moltes mostres, dins del rang d'índex de càrrega que el fabricant considera idòni per a l'adquisició de les dades

²⁵ Per a una mateixa mostra, tampoc no són iguals els índex de polidispersió proporcionats pels diferents mètodes matemàtics de processament de la intensitat de la llum a l'espectroscòpia de correlació fotònica (Kölchens S. et al., 1993).

(interval: 0,1-1).

La primera condició no es compleix de manera estricta, sinó que les lectures poden ser correctes fins a una concentració una mica superior al límit lineal, aquest fet és especialment notable en el cas dels SUVs (Fig. 58 i 60). De forma general, s'observa que el límit superior més petit que compleix aquesta condició correspon a un índex de 0,4. Per tant, les dilucions de les mostres de liposomes que proporcionin índex compresos entre 0,1 i 0,4 se situaran dins la zona lineal de la relació. Com a mesura més segura, però, es proposa realitzar un estudi de la relació concentració-índex abans de l'anàlisi de qualsevol mostra.

L'origen de l'anomalia podria estar relacionat amb la naturalesa de les vesícules que originen la dispersió de la llum: els liposomes amb una (REVs) o poques bicapes (Pro-Lipo S), presenten intervals lineals majors que les vesícules multilaminars extrusionades fins el mateix diàmetre. L'anàlisi de l'espectre de freqüències es basa en la detecció heterodina de la llum dispersada (Ap. 3.1.2.8). Cada interfase que interacciona amb la llum incident origina part de la radiació que es dirigeix cap al detector. Degut a aquest fet, es fa necessària una correcció que té present el que s'anomena eficiència de dispersió de la llum, que és pròpia de cada vesícula, ja que en funció del seu diàmetre es poden produir interferències destructives en interaccionar el feix provinent d'una interfase amb el provinent d'una altra situada a l'extrem oposat. Aquesta correcció ja la incorpora el tractament matemàtic de l'aparell, però ho fa només pel cas de partícules sòlides, les quals presenten només dues interfases en una determinada direcció del feix de llum incident. En el cas dels liposomes multilaminars, però, és possible que el gran nombre d'interfases que els constitueixen provoquin interferències no considerades i que provoquin la pèrdua de linealitat detectada. Per aquesta raó es fa necessari un estudi més complet que determini el grau d'inexactitud provocat per la presència de vesícules multicapa en les dispersions analitzades.

La segona condició *sine qua non* per a obtenir lectures correctes fa referència a la relació entre el volum ocupat per les vesícules en suspensió i l'ocupat pel dissolvent. L'augment de la viscositat detectat en incrementar la concentració de les suspensions de liposomes posa de manifest un fenomen àmpliament estudiat en el cas de partícules esfèriques sòlides (Pusey P.N. et al., 1997; Segrè P.N. et al., 1995). En aquests casos s'ha comprovat que en disminuir la fracció en volum del dissolvent (FV_{dis}) es produeix un augment progressiu de la viscositat macroscòpica fins arribar a una solidificació de la mostra, fet que té lloc a un valor situat al voltant de $FV_{dis}=0.51$. L'augment de la viscositat s'ajusta a una sèrie truncada d'expressió:

$$v = v_0 (1 + 2,5 FV_{ves} + 6,2 FV_{ves}^2 + \dots) \quad Eq. 23$$

on:

η indica la viscositat de la suspensió

η_0 indica la viscositat del dissolvent

FV_{ves} indica la fracció en volum ocupada per les vesícules de la suspensió ($FV_{ves} = 1 - FV_{dis}$).

Empíricament s'observa que la viscositat augmenta en un factor de 2 per $FV_{ves} \sim 0,2$, i en un factor situat entre 4 i 8 per $FV_{ves} \sim 0,4$. Aquestes variacions macroscòpiques tenen el seu equivalent microscòpic en les variacions que es produeixen en els coeficients de difusió de les partícules: en augmentar FV_{ves} el coeficient de difusió disminueix, de manera que el sistema deixa de poder-se considerar constituït per partícules voltades per un líquid per esdevenir, progressivament, un conjunt de partícules voltades d'un medi constituït per altres partícules.

S'observa que l'equació 23 s'ajusta al comportament experimental observat en el cas dels liposomes (Fig. 145). Les petites diferències a concentracions elevades en el cas dels liposomes multilaminars, poden ser originades per l'exclusió de solut (Ap. 5.1.3). Conseqüentment, la variació de la viscositat que es produeix en augmentar la concentració de les suspensions de liposomes es indicativa de que també es produeixen canvis en els coeficients de difusió de les vesícules. Aquests canvis necessàriament han de modificar els resultats de les anàlisi efectuades amb el Microtrack UPA 150, ja que l'única restricció emprada en els càlculs és que les vesícules en suspensió han de tenir un moviment brownià que derivi del model de partícules independents. En modificar-se el coeficient de difusió d'Stokes-Einstein amb l'augment de concentració, també es modifica la distribució de velocitats de Maxwell-Boltzmann i, per tant, l'espectre de freqüències processat a partir de la llum detectada. Aquest fet provoca que l'aparell assigni grandàries incorrectes al considerar que el coeficient de difusió és el corresponent al de mostres diluïdes.

En el cas de suspensions constituïdes per vesícules que no encapsulen medi aquós, la FV_{dis} disminueix lentament amb la concentració. En el cas dels liposomes l'encapsulació de part del medi aquós fa que en augmentar la concentració de fosfolípids la disminució sigui més ràpida. És aquest fenomen el que explica la concentració crítica determinada en el cas del REVs.

Quan les suspensions estan formades per partícules esfèriques sòlides concentrades ($FV_{ves} > 0,35$), la bibliografia proposa un model en el qual cada partícula es troba en una capsula formada per les

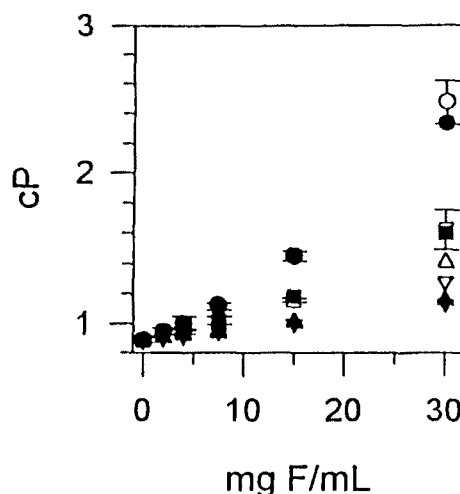


Fig. 145 Viscositats experimentals (símbols blancs) i teòriques (símbols negres) de suspensions de liposomes: (o) REV extrusionats fins 800 nm; (□) REV extrusionats fins 200 nm; (Δ) MLV (EPC) extrusionats fins 200 nm; (▽) i MLV (SPC) extrusionats fins 800 nm.

partícules veïnes. La dificultat "d'escapar" d'aquesta localització espacial és la que explica les importants variacions de la viscositat i del coeficient de difusió (Cohen E.G.D. et al., 1998). En aquest model la distància entre les superfícies adjacents és de l'ordre d'una desena part del diàmetre de les vesícules. Aquest valor, però, resulta massa petit si es compara amb la mínima distància entre liposomes (10 vegades el radi) que la bibliografia indica que ha d'haver per tal de no obtenir artefactes amb aparells d'ECF (Ostrowsky N., 1993). Aquesta diferència no ho és tal si es té en compte que per l'ECF és necessari que no es produeixin interaccions entre les vesícules, fet que ha de tenir lloc a concentracions molt menors que les que proposa el model de capsula.

Ara bé, aquest concepte serveix per calcular la distància entre liposomes en el valor crític de FV_{dis} trobat pels REVs: es pot considerar que aquests són situats en un cub de dissolvent que té per aresta a , i que aquest, alhora, està voltat d'altres cubs que també contenen, casacun, un liposoma. Aquesta simulació també ha estat emprada per Gronbech-Jensen N. et al. (1998) en l'estudi de les interaccions entre esferes carregades elèctricament. Cal tenir present que, probablement, en suspensions molt concentrades deixi de ser vàlida, ja que l'empaquetament òptim és el compacte, el qual no és compatible amb la distribució de cubs que contenen les partícules.

En la distribució espacial proposada, el cub inicial està voltat per altres 26, que són adjacents bé a les cares, a les arestes o als vètxs. Per tant, es troba en una caixa constituïda per altres unitats idèntiques a ell. Les distàncies entre el liposoma central i la resta (considerades des dels respectius centres) són de tres tipus en funció de la posició:

$$\begin{aligned} L_1 &= a && \text{per liposomes situats en un cub adjacent a una cara del cub central,} \\ L_2 &= 1,41a && \text{per liposomes situats en un cub adjacent a una aresta del cub central,} \\ L_3 &= 1,73a && \text{per liposomes situats en un cub adjacent a un vèrtex del cub central.} \end{aligned}$$

La distància mitjana entre el liposoma central i la resta serà la mitjana de totes les distàncies existents a la caixa, i es pot calcular a partir de l'expressió:

$$\bar{L} = \frac{6 a + 12 a \sqrt{2} + 8 a \sqrt{3}}{26} \quad \text{Eq. 24}$$

El valor de a es pot calcular a partir de la relació entre el volum d'un liposoma i el del cub que el conté, ja que aquest quocient és el valor crític de FV_{lip} (Ap. 4.1.8.4), valor conegut i que ha estat situat al voltant de 0,03. Per tant:

$$\frac{\frac{4}{3} \pi r^2}{a^3} = 0,03 \quad \text{Eq. 25}$$

on:

r indica el radi extern del liposoma.

El radi extern del liposoma el proporciona l'anàlisi de la suspensió considerada, expressat el resultat en percentatge en volum (el diàmetre mitjà del percentatge en volum indica la grandària de les vesícules que ocupen la major part del volum encapsulat). Expressant a en funció del radi, i substituïnt el seu valor a l'equació 24 s'obté que:

$$\bar{L} = 7,07 r \quad \text{Eq. 26}$$

Aquest valor és similar al indicat per Ostrowsky N. (1993) i permet constatar la importància de conèixer la fracció en volum de dissolvent prèviament a l'anàlisi de qualsevol mostra.

A més de la resposta del detector i de l'apropament entre els liposomes, resulta necessari conèixer les propietats elèctriques de les vesícules que s'analitzen. El moviment dels liposomes no està influït únicament pel líquid i pel grau en que aquest actua com a dissolvent: cal considerar la magnitud de les forces de repulsió electrostàtiques intervesiculars entre les bicapes carregades. Moon M.H. et al. (1998) ja han posat de manifest l'efecte de la càrrega dels liposomes en altres mètodes d'anàlisi de la seva grandària. Les característiques d'aquest tipus d'interacció s'han estudiat majoritàriament amb partícules esfèriques sòlides carregades (Bergenholtz J. i Wagner N.J., 1997; Gronbech-Jensen N. et al., 1998). En aquests sistemes són la concentració de partícules, la seva densitat de càrrega superficial, i la força iònica del medi, els paràmetres que determinen les característiques físiques de les suspensions (viscositat, coeficients de difusió, ...). En alguns casos s'han descrit interaccions atractives entre les partícules constituents de dispersions notablement concentrades..

Els resultats obtinguts en les anàlisi de suspensions de liposomes amb fosfolípids carregats negativament (aprox. 20 % mol/mol) mostren que, en aigua pura, els diàmetres proporcionats per les anàlisi no es corresponen amb els que caldria esperar com a conseqüència del mètode mitjançant el qual s'han preparat les vesícules (Fig. 60). Com que aquest fenomen té lloc a FV_{lp} menors de la crítica i dins de l'interval lineal de la relació índex-concentració, cal buscar la seva causa en la interacció elèctrica entre liposomes. Aquesta interpretació dels fets es confirma de tres maneres diferents: per la variació de la viscositat en incloure electròlits en el medi aquós de preparació de les suspensions, pels diàmetres que proporcionen les dispersions anteriors, i per la modificació del resultat que té lloc en afegir una petita quantitat d'electròlit en una mostra preparada en aigua pura.

Com s'aprecia a la Fig. 146, la desviació entre la viscositat experimental i la teòrica calculada a partir de l'Eq. 23 es fa menor en incloure electròlits en el medi de preparació. Per

tant, la repulsió entre liposomes causa un increment de viscositat que no és explicable en termes de la fracció en volum de la fase dispersa. Quan aquesta la interacció es disminueix o elimina mitjançant contraions, la viscositat experimental torna a ser dependent únicament de la relació de volums entre les fases. Com que l'excés de viscositat observat es indicatiu d'una variació dels coeficients de difusió dels liposomes, aquest fet causa l'aparició d'artefactes en les anàlisi realitzades amb el Microtrack UPA 150.

En obtenir suspensions en aigua pura, la concentració total de contraió és la mateixa que la de fosfolípids carregats. Conseqüentment, el potencial elèctric que s'extén a la fase contínua des de la monocapa externa dels liposomes disminueix més lentament del que ho fa en els casos en que s'afegeix un electròlit. Mentre que en el primer supòsit la variació és algebraica, en el segon és exponencial (Andelman D., 1995). D'acord amb la teoria de Guy-Chapman (Gennis R.B., 1989) l'addició d'un electròlit²⁶ fort 1:1 en una concentració 10 mM al sistema estudiat apantalla totalment la càrrega de les bicapes a una distància aproximada²⁷ de 8 nm. Els resultats experimentals obtinguts amb els liposomes coincideixen amb els que Cohen E.G.D. et al. (1998) obtingueren en l'estudi de esferes sòlides carregades. En ells es posa de manifest que les partícules carregades i totalment apantallades es comporten d'igual manera que les neutres.

Els càlculs anteriors de la distància d'apantallament total indiquen que, amb aquella concentració mínima d'electròlit, els factors determinants en les anàlisi de diàmetres són la linealitat del detector i la fracció en volum de dissolvent (en aquest darrer cas la distància mínima és de $7,07r$, Eq. 26). Aquesta previsió teòrica es constata en els experiments en els quals s'afegeix NaCl fins a una concentració de 12 mM. Els resultats abans i després de l'addició indiquen l'efecte de les càrregues, obtenint-se ara lectures correctes fins als límits imposats per les altres dues condicions.

Per a obtenir anàlisi correctes del diàmetre de liposomes en aigua pura i amb fosfolípids carregats (com a màxim amb un 20 % mol/mol), la concentració mínima de NaCl que cal afegir és prou petita com per no causar canvis en la distribució de grandàries de la mostra. Els resultats presentats estan d'acord amb els d'altres autors. Perkins W.R. et al. (1993) mostren que no hi ha canvis significatius de la grandària dels liposomes situats en un medi hipertònic fins a una diferència de concentració de NaCl d'aproximadament 150 mM. La major part de treballs, però, estudien l'evolució de les vesícules en medis hipotònics. En ells la resistència de les vesícules depèn de la seva grandària, essent les més petites les més resistents (Lasic D.D., 1993) i suportant diferències de concentració sempre més elevades ($650 \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1}$; Mui B.L.S. et al., 1993) que les causades per l'addició del NaCl fins 12 mM.

²⁶ La relació numèrica indica la proporció entre els cations i anions que origina la sal.

²⁷ La distància de Debye, a la qual finalitza la doble capa d'ions, és menor, de l'ordre de 3 nm.

La comparació dels resultats de les anàlisi del Microtrack UPA 150 amb altres mètodes (Ap. 4.1.8.6) constata l'exactitud de l'aparell, però és necessari comentar breument alguns aspectes. La formació de liposomes petits durant la obtenció de REV's no extrusionats (Szoka F. i Papahadjopoulos D., 1978) s'ha comprovat tant en les anàlisi espectroscòpiques com microscòpiques. Per aquesta raó els resultats s'han expressat en percentatge en volum (o massa), ja que de fer-ho en número les diferències entre cada tipus de suspensió serien poc apreciables. Les desviacions que s'aprecien en el cas de la microscòpia electrònica són explicables per la pròpia metodologia, la qual implica l'assecament de la mostra i la seva posterior exposició al buit en el microscòpi. Aquests processos fan que els resultats presentin desviacions respecte de les suspensions originals, de manera que la comparació amb les mesures del Microtrack UPA 150 és orientativa i necessita d'altres tècniques. Pel que fa al volum encapsulat teòric i experimental, les desviacions que tenen lloc en incrementar la grandària de les vesícules poden estar relacionades amb la manca d'esfericitat detectada per alguns autors en els liposomes de diàmetre gran (Mui B.L.S. et al., 1993) i amb l'existència de més d'una bicapa en aquest tipus de liposoma (Szoka F. i Papahadjopoulos D., 1978). Malgrat aquesta desviació els resultats són satisfactoris i permeten afirmar que les distribucions de grandàries proporcionades per l'aparell són prou exactes.

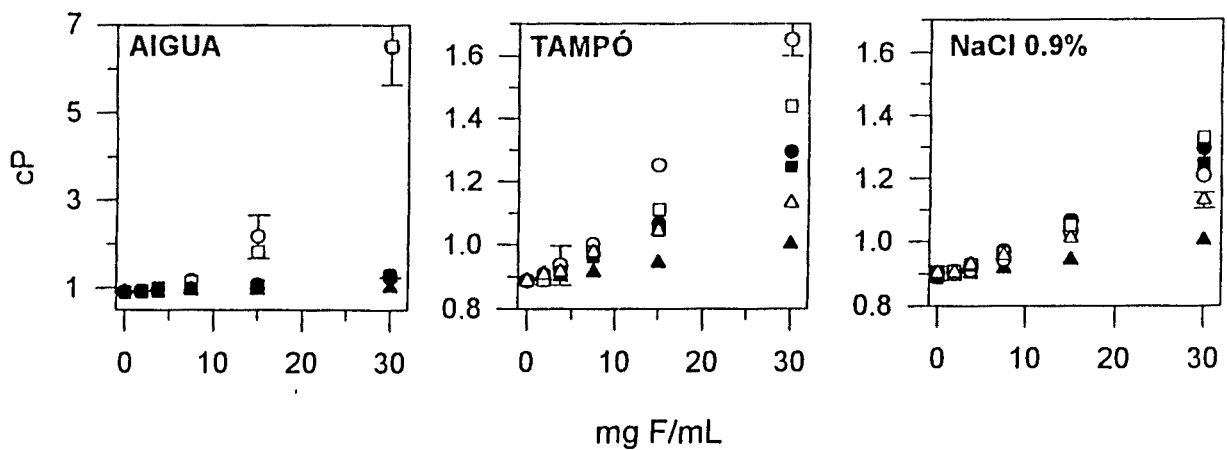


Fig. 146 Viscositats experimentals (símbols blancs) i teòriques (símbols negres) de suspensions de liposomes carregats negativament i obtinguts a partir de Pro-Lipo S: (○) extrusionats fins 800 nm; (□) extrusionats fins 200 nm; (Δ) SUVs obtinguts amb el Microfluidizer.

5.2

MÈTODES PREPARATIUS.

Els mètodes inclosos en aquest apartat són aquells que fan referència a la caracterització dels liposomes obtinguts amb el Microfluidizer, i a la liofilització i obtenció d'hidrogels amb aquests liposomes. La discussió de la resta d'apartats presentats en el capítol de resultats s'inclou, en cas necessari, en la discussió de les diferents suspensions de liposomes preparades, ja que la major part de mètodes preparatius estan adreçats a una formulació concreta.

5.2.1 OBTENCIÓ DE LIPOSOMES AMB EL MICROFLUIDIZER 110S.

La utilització d'homogenitzadors a alta pressió està molt estesa en aquells mètodes que impliquen el tractament de mostres amb processos molt energètics, com ara les emulsions. Des que Mayhew E. et al. (1984) van presentar els primers resultats en l'ús d'un d'aquests aparells (Microfluidizer) en la preparació de liposomes, la indústria ha incorporat aquesta tècnica per a la seva producció a gran escala. El resultats presentats a l'apartat 4.2.5 fan referència al Microfluidizer, però, donades les similituts amb els altres homogenitzadors d'alta pressió existents, poden, sin més no, considerar-se orientatius per a tots ells.

A l'apartat 4.2.3 es mostren que no hi ha pèrdues significatives de fosfolípid durant els processament de mostres fins a una concentració de 100 mg F/mL. Aquests resultats no coincideixen amb els presentats per Talsma H. et al. (1989). Tot i treballar amb diferents composicions de fosfolípids, les recuperacions del 73 i 25 % que detecten per mostres de 100 mg F/mL són massa diferents dels valors de la Taula 24, on, amb un únic replicat, s'obté un 95% per la mateixa concentració. Tampoc no s'ha detectat, al contrari del que afirmen els mateixos autors, la presència de petites partícules metàl·liques en cap de les suspensions obtingudes. Encara que sí que s'ha descrit el desgast de les zones dels homogenitzadors sotmeses a grans esforços (Bachmann D. et al., 1993), no es menciona cap fet similar a l'aparició de metall en cap publicació. Això, juntament amb la utilització de l'aparell en la indústria alimentària, avala les nostres observacions (Swientek R.J. 1990).

Un dels factors que s'ha mantingut constant en el disseny experimental i que pot afectar de manera important en les característiques dels liposomes és la concentració de fosfolípids de la mostra inicial. Bachmann D. et al. (1993) mostren com l'augment de concentració (10-100 mg SPC/mL) implica un augment de diàmetre de les vesícules en processar les suspensions en un homogenitzador d'alta pressió Mini-Lab 8.30. Els resultats obtinguts en l'estudi de l'efecte de

l'etanol (Taula 32) no indiquen, però, variacions importants del diàmetre en aquelles mostres exemptes d'alcohol en un rang de 10 a 40 mg SPC/mL. Per tant, en cas de detectar-se variacions en el cas de les mostres obtingudes a partir de Pro-Lipo S, aquestes serien causades per la diferent concentració d'etanol.

Tot i la profusió de publicacions amb l'aplicació d'homogenitzadors d'alta pressió per a la obtenció de liposomes (Brandl M. et al., 1998; Brandl M. et al., 1990; Sjöström B. i Bergenstahl B., 1992) i, inclús, de nanopartícules (Lamprecht A. et al., 1999), no hi ha cap esforç dirigit a la caracterització total del procés. Els resultats de l'apartat 4.2.5 mostren que tant el disseny experimental emprat com els models matemàtics proposats descriuen el diàmetre, l'amplada, el volum encapsulat i el percentatge d'encapsulació amb precisió. La producció de liposomes a gran escala amb el Microfluidizer és reproduïble, i mitjançant el control del número de cicles, pressió, força iònica i concentració d'etanol es poden controlar les característiques de les suspensions de liposomes. En tots els ajustaments els coeficients de regressió i els respectius test són favorables, mentre que en els casos en els quals el model té manca d'ajust, aquesta no representa una desviació important a la vista de la desviació mitjana del sistema. La pressió de treball condiciona el diàmetre mínim que poden assolir els liposomes, ja que el número de cicles només causa modificacions importants en les primeres etapes del processat. Pel que fa a la força iònica, aquesta té una influència menor però significativa: en disminuir el seu valor també ho fa la grandària de les vesícules, possiblement degut a l'increment de la repulsió electrostàtica entre les bicapes. Aquests és el mecanisme proposat per Akashi K-I., et al. (1998) per explicar la formació de liposomes unilaminars i l'adhesió entre liposomes de gran diàmetre en presència de cations divalents. Els resultats obtinguts coincideixen amb els d'Isele U. et al. (1994) amb suspensions obtingudes per mescla de medi orgànic i aquós amb concentracions variables de NaCl.

Cal destacar que la majoria de les suspensions de liposomes obtingudes amb el Microfluidizer no són unimodals, sinó que la majoria presenta, en major o menor grau, dues poblacions. Tot i que l'amplada pot resultar indicativa d'aquest fet, no es posa de manifest d'una manera concluent en cap dels models matemàtics presentats, ja que el propi analitzador de partícules no ho

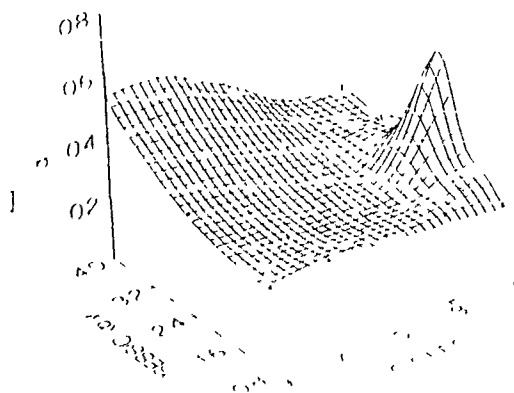


Fig. 147 Superfície de resposta que indica el grau d'unimodalitat (d) de les suspensions de liposomes obtingudes amb el Microfluidizer.

quantifica. Aquest inconvenient queda solventat amb el paràmetre proposat a l'apartat 5.1.4 (Eq. 22). A la Fig. 147 es mostra la superfície de resposta per les mostres corresponents al càlcul del volum encapsulat. El tipus de dependència de d amb els factors fa que la resposta no pugui ajustar-se a cap dels models matemàtics emprats. Com s'aprecia, hi ha dues zones principals que proporcionen poblacions unimodals. La corresponent a SUVs és una conseqüència del límit inferior de diàmetre dels liposomes: en incrementar la pressió i el número de cicles la població esdevé cada vegada més petita i homogènia. A la segona zona (C1p2) els liposomes són més grans (Diam~320 nm; Ampl ~100 nm; $d = 0,68 \pm 0,048$; $n=5$), i les condicions de cicles i pressió per a la seva obtenció depenen de les característiques de la suspensió inicial de liposomes. És possible que amb suspensions mare diferents les condicions per obtenir distribucions unimodals que no siguin SUVs canviïn o arribin a desaparèixer..

Finalment, cal indicar que existeixen homogenitzadors d'alta pressió que incorporen sistemes d'extrusió (Schneider T. et al., 1994). Conseqüentment, aquests sistemes permeten un control molt precís de la grandària dels liposomes, alhora que el producte que s'obté ja té garantia d'esterilitat. En el cas del Microfluidizer, les pròpies característiques del procés també impliquen l'esterilitat de la preparació, però aquest fet no està reconegut per la normativa vigent. D'altra banda l'aparell és apte per altres usos, fet que el diferencia d'aquells que queden limitats per causa dels filtres que incorporen. Les necessitats i de cada usuari determinaran el sistema a emprar.

5.2.2 LIOFILITZACIÓ DE LIPOSOMES.

Un dels paràmetres més estudiats en els processos de liofilització de liposomes és el percentatge de retenció del solut encapsulat que té lloc en resuspendre les mostres. En el cas en que la molècula encapsulada sigui liposoluble, resulta més interessant conèixer les variacions físiques que experimenten les vesícules, ja que una retenció important d'un marcador d'espai aquós no indica necessàriament que no s'han produït processos de fusió. Així, Harrigan P.R. et al. (1990) quantifiquen la retenció de solut en liposomes de diferents grandàries en presència de quantitats addients de trehalosa, però no determinen les variacions de grandària dels liposomes tot i mesurar el seu diàmetre després del procés d'extrusió i abans de la seva deshidratació. Amb aquesta informació s'hagués pogut determinar, per exemple, si les altes retencions (~75%) que mostren els liposomes petits (~76 nm) són causades per la conservació de la seva estructura o per processos de fusió que donarien lloc a vesícules de gran diàmetre tot conservant el marcador encapsulat, com té lloc en suspensions de SUVs (Schullery S.E. et al., 1980). D'igual manera, la poca retenció dels MLVs (<25%) podria ésser explicada entremés de disminució de diàmetre o simplement per la fuga del material encapsulat.

Els resultats presentats a les Fig. 98 i 99 indiquen que hi ha variacions molt importants

dels diàmetre en mostres de SUVs quan es liofilitzen inclús en les condicions òptimes. Per tant, en comparar-los amb els resultats de retenció presentats per altres autors, pren consistència la hipòtesi de la fússió dels liposomes, fússió que produiria una pèrdua relativament petita del material encapsulat, però importants alteracions de l'estructura original de les vesícules. Contràriament en el cas de liposomes de major grandària, les petites alteracions de l'estructura ocasionen un disminució de la retenció del solut hidrofílic. Aquest decrement pot estar associat a la formació d'estructures de menor diàmetre que es detecta mitjançant l'anàlitzador de partícules.

Conseqüentment, quan el material encapsulat es troba a les bicapes i es pretèn obtenir liofilitzats, resulta més apropiat treballar amb sistemes que, encara que mostrin variacions grans del volum encapsulat, tinguin variacions mínimes de la seva distribució de grandàries. En cas de que la grandària de les vesícules sigui un paràmetre important en l'eficàcia de les preparacions, aquesta queda garantida.

D'altra banda, és possible que la poca reorganització de les membranes ocasioni una pèrdua mínima del material hidrofòbic encapsulat. Aquest fet que es veu confirmat en la liofilització de liposomes amb HBP (Fig. 135), ja que en aquest procés hi ha una petita disminució de la quantitat de fàrmac encapsulat en els liofilitzats preparats de nou.

5.2.3 OBTENCIÓ D'HIDROGELS AMB LIPOSOMES.

La independència de la densitat òptica respecte la concentració de Carbopol en els liposomes de 800 nm i en el rang estudiat (Fig. 101a), i la invariabilitat del seu diàmetre, indiquen de manera directa i simple que els liposomes emprats no resulten alterats per la presència de l'hidrogel. En el cas dels de menor diàmetre, les necesari deduir-ho a partir de les característiques de les mesclades realitzades amb diferents proporcions de Carbopol i fosfolípids (Fig. 101b). Contràriament, la bibliografia no proporciona referències directes de l'estabilitat de les suspensions, sinó que els treballs que aporten més dades quantitatives ho fan a partir de mesures de la fuga d'algun marcador del volum intern dels liposomes.

Petelin M. et al. (1998) determinen l'estabilitat dels liposomes (constituïts per SPC, colesterol, i un derivat de l'àcid esteàric carregat negativament) en diferents gels a partir de la comparació de la fuga d'una molècula encapsulada segons la suspensió estigui o no inclosa en els gels. El gel que presenta resultats òptims està constituït per polimetil metacrilat, presentant les preparacions amb Carbopol, per períodes iguals o majors a un dia, una disminució de la quantitat de solut encapsulat. Per tant, atenent a la mesura indirecta de l'estabilitat, els resultats només són comparables amb els exposats a l'apartat 4.2.7, que corresponen a estabilitats a curt termini, i no ho són amb els de les Fig. 107 i 134, on es mostra l'estabilitat física accelerada dels liposomes amb i sense HBP en hidrogels de Carbopol del mateix tipus. Les discrepàncies entre autors són abundants, i és possible que l'estabilitat

depenhui de molts factors, ja que en el mateix treball els pitjors resultats s'obtenen amb un gel que té com a component majoritari la carboximetil cel.lulosa, mentre que Gabrijelcic V. i Sentjurc M. (1995) mostren, mitjançant la mateixa metodologia, que amb aquesta substància s'obté la màxima estabilitat dels liposomes constituïts per fosfolípids neutres i saturats. D'altra banda, Fujisawa S. et al. (1989) van determinar mitjançant ressonància nuclear magnètica que les bicapes interaccionen en major grau amb el dimer del metil metacrilat que amb el respectiu monòmer. Essent la interacció de tipus hidrofòbic, els resultats de Petelin M. amb el polímer del metil metacrilat s'allunyen del que caldria esperar.

La coincidència de resultats té lloc amb autors que només presenten resultats qualitius de l'estabilitat dels liposomes: la no alteració del diàmetre de les vesícules incloses en hidrogels de Carbopol que s'ha detectat a partir de les mesures amb el Microtrack UPA 150, també es posa de manifest en els treballs de Skalko N. et al. (1998) i de Michel C. et al. (1992), complementant-se, en aquest darrer, amb observacions de microscòpia electrònica. D'altra banda, la idoneïtat dels gels de Carbopol es veu reforçada pel fet de que no li estan descrites propietats com a tensioactiu, ja que inclús en polímers que presenten aquesta propietat a baixa concentració, els liposomes són estables quan s'incrementa la quantitat de gel com a conseqüència, segons Bochot A. et al. (1998) de la disminució de la mobilitat de les cadenes del polímer al si de la preparació.

Des del punt de vista de l'aplicació clínica, els liposomes amb principis actius resulten eficaços com a vehicles quan estan inclosos en gels de Carbopol (Esposito E. et al., 1998; Michel C. et al. 1992), fet pel qual aquest tipus de formulació resulta recomanable.

5.3

AVALUACIÓ DE LES PREPARACIONS.

En cadascun dels següents apartats es comenten els resultats obtinguts amb les preparacions amb liposomes sols, encapsulant-hi ditranol, hidrocortisona o butirat-propionat d'hidrocortisona, i amb les emulsions amb oli de borratge.

5.3.1 LIPOSOMES OBTINGUTS AMB EL MICROFLUIDIZER 110S.

Els mètodes d'anàlisi emprats en el seguiment de l'estabilitat de les suspensions s'han mostrat complementaris. En referència a l'estabilitat física, el seguiment de la densitat òptica és més sensible que el del diàmetre de les vesícules: els increments de densitat òptica de les suspensions amb SUVs no es relacionen amb la detecció de vesícules de major diàmetre en les anàlisi amb el Microtrack UPA 150. Possiblement aquest fet es degui a que els liposomes de gran diàmetre que causen els fenòmens d'agregació/fusió de SUVs (Wong M. et al., 1982) estiguin fora del rang d'anàlisi de l'aparell. Aquest fet pot explicar els resultats de Grit M. et al. (1992) en l'estudi dels diàmetres i polidispersió de liposomes a 40°C i 60°C: tot i detectar canvis en la composició química de les mostres, les anàlisi per espectroscòpia de correlació fotònica no hi detectaren alteracions. La baixa estabilitat dels SUVs els ha fet desaconsellables per a l'encapsulació de les substàncies hidrofòbiques presentades als altres apartats.

Els decrements del pH de dispersions amb lípids durant l'emmagatzematge han estat descrits anteriorment per varis autors (Talsma H. et al., 1994; Zeevi A. et al., 1994), i la majoria d'ells accepten que és una conseqüència de la formació d'àcids grassos lliures provinents de la hidròlisi dels fosfolípids (Grit M. et al., 1993a). El control del pH resulta essencial per a la conservació de les mostres, ja que el valor inicial ajustat mitjançant tampons d'elevada capacitat reguladora condiona la degradació dels fosfolípids, situant-se el pH òptim per evitar-la al voltant de 6,5 (Grit M. i Crommelin D.J.A., 1993b; Crommelin D.J.A. et al., 1994). Aquesta dependència es posa de manifest en els resultats obtinguts per Misík V. et al. (1991), en els quals es compara l'estabilitat química dels fosfolípids segons hagi o no control del pH. Els autors troben una bona correlació entre el pH i l'índex d'oxidació de mostres mantingudes a 50°C, proposant que ambdós processos posen de manifest el següent mecanisme degradatiu: l'increment de diens conjugats precedeix l'alliberament de protons al medi causat per la hidròlisi dels fosfolípids. Els resultats presentats a la Fig. 106, però, no permeten establir una relació tan directa entre la variació d'aquests dos paràmetres: les mostres conservades a 4°C presenten una important variació del pH en el transcurs d'un any, però no tenen l'increment de l'índex

d'oxidació que caldria esperar si es compara el seu pH amb el de les mostres mantingudes a 40°C. És per aquesta raó que, contràriament a les propostes de Misík, els resultats indiquen que les variacions del pH i de l'índex d'oxidació es deuen a fenòmens químics poden tenir lloc independentment un de l'altre. La no detecció de formes lises en la mostra conservada a 40°C sembla indicar que l'índex d'oxidació no és un bon indicador del grau d'hidròlisi però, en no haver-se realitzat l'anàlisi per TLC de les mostres conservades a altres temperatures, no és possible determinar totalment aquesta previsió. D'altra banda, els treballs de Zuidam N.J. et al. (1996) plantejen dubtes sobre la relació entre el pH i la formació d'àcids grassos lliures: en absència d'oxigen les mostres de liposomes sotmeses a radiació gamma no tenen variació de pH, però la degradació dels fosfolípids és del mateix ordre que en les mostres irradiades en presència d'oxigen, en les quals sí que es produeix una acidificació del medi. En tot cas, queda palès que és necessari el seguiment de tots dos paràmetres per controlar l'estabilitat química de les mostres.

A més de la temperatura, i d'acord amb l'exposat anteriorment, el pH del medi aquós i la concentració del tampó són factors determinats en l'estabilitat de les suspensions. Això no és cert només des del punt de vista químic, sino també des del físic, ja que l'augment de la força iònica del medi minva la repulsió entre liposomes carregats i afavoreix la seva agregació. La concentració del tampó té efectes contraris sobre cada paràmetre: en disminuir es perd capacitat reguladora del pH, però s'afavoreix la separació entre liposomes carregats. Per tant és necessari assolir unes condicions que situïn el sistema en un punt que equilibri tots dos fets.

En referència a les preparacions amb Carbopol 940, tots els paràmetres mostren una millora respecte de les presentacions líquides, fet pel qual es recomana la seva utilització.

L'avaluació de la capacitat hidratant de les suspensions de liposomes mitjançant mètodes no invasius posa de manifest que, amb aplicacions oclusives de 4 h, no hi ha variacions significatives ni del grau d'hidratació ni de la funció barrera de la pell. Contràriament, en les mateixes condicions l'efecte oclusiu de la crema, manifestat per l'augment del grau d'hidratació de la pell, és evident. La comparació dels resultats de les aplicacions de liposomes amb els de les aplicacions de tampó permet constatar que les variacions de TEWL detectades als 30 min, són únicament un efecte de l'adsorció/desorció de l'aigua per part de l'estrat corni. Conseqüentment, en aquestes condicions els liposomes emprats no causen ni un aport exògen d'aigua, ni un efecte oclusiu que retingui l'aigua del propi organisme. A més, en retornar als valors de TEWL inicials, es posa de manifest que no produeixen cap modificació de la funció barrera de l'estrat corni, i que qualsevol alteració de les propietats de la pell que pugui detectar-se ha de ser interpretada tenint en compte aquests fets.

L'absència d'efecte hidratant oclusiu per part del liposomes constituïts per fosfolípids en estat cristallí-liquid és compatible amb els experiments realitzats *in vitro*, i amb aplicació amb oclusió, presentats per van der Bergh B.A.I. et al. (1998). En ells es mostra que només els liposomes en estat gel s'acumulen en forma de bicapes sobre l'estrat corni, mentre que en els tractaments amb liposomes en estat cristallí-liquid apareixen modificacions a les capes internes. Aquest tipus d'interacció dels liposomes també és detectat en altres experiments *in vitro* realitzats per Kuijk-Meuwissen M. et al. (1998), però en aquest cas es dugueren a terme sense oclusió.

5.3.2 ENCAPSULACIÓ DE DITRANOL EN LIPOSOMES.

El resultat obtingut mostren que l'encapsulació d'aquest fàrmac en liposomes constituïts per fosfolípids de soja o d'ou no és viable a causa del poc grau d'encapsulació i de la baixa estabilitat que presenten les preparacions. Però aquests resultats negatius no impideix d'obtenir informació sobre les característiques dels sistemes obtinguts.

En primer lloc, el mètode emprat que ha proporcionat els millors resultats en suspensions aquoses és el basat en el sistema de Pro-Lipo S. A més, mitjançant aquest procediment, s'ha pogut determinar la màxima relació fàrmac/fosfolípid assolible (4,71 mg DT/g F). Tot i que els intents d'encapsular ditranol en diferents tipus de liposomes ja van ser publicats a principis de la dècada de 1990, la bibliografia no proporciona valors de la relació de saturació d'aquests sistemes ni del percentage encapsulat. Però a partir de les concentracions emprades en els diferents treballs es pot obtenir la relació fàrmac/fosfolípid de cadascun d'ells. Sorprenentment, els resultats dels càlculs indiquen unes relacions extremadament altes en comparació amb el valor de saturació presentat anteriorment: 50 mg DT/g F en el cas de Mahrle G. et al. (1991), i 25 mg DT/g F pel de Gehring W. et al. (1992). En els dos casos referenciats, les suspensions amb el fàrmac, que han estat preparades per un fabricant de liposomes (Natterman Phospholipid GmbH, Alemanya), tenen un 16% p/p d'etanol. Tot i que hi ha un 64 % p/p d'aigua, el medi hidròfil de les suspensions anteriors pot solubilitzar part del fàrmac, encara que ho farà en menor quantitat de la que ho faria l'etanol pur, en el qual té una solubilitat de ~0,4 mg DT/mL etanol. Per tant, la diferència entre els medis aquosos pot ser la causa de que trobem una contradicció tan notable entre les dades aquí presentades

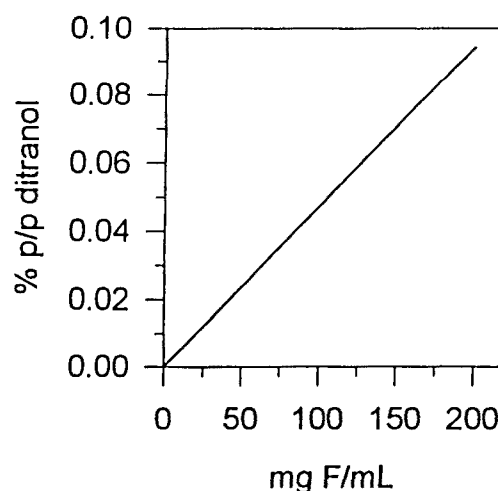


Fig. 148 Concentracions màximes de ditranol en suspensions de liposomes amb les bicapes saturades.

i les publicades²⁸. Però no tot són discrepàncies: en el cas de dispersions de niosomes, els valors de concentració assolida són més similars, i el ditranol també presenta una ràpida degradació. La bibliografia indica concentracions màximes de 0,34 mg DT/mL (van Hal D.A. et al., 1992), valor similar al de les suspensions obtingudes a partir de Pro-Lipo S.

A partir del valor experimental de saturació de les bicapes és pot obtenir el gràfic de la Fig.148, en el qual es mostra el màxim percentatge de DT en les suspensions de liposomes en funció de la concentració de fosfolípids. Com s'observa, per tal d'aconseguir formulacions al 0,1 % p/p caldrien suspensions amb, aproximadament, 210 mg F/mL. Cal tenir en compte que el rendiment de la incorporació (Fig. 112) només seria, aproximadament, del 50 %, de manera que seria necessari un procediment per tal s'obtenir el ditranol no solubilitzat. Aquesta concentració és molt elevada, i l'obtenció de suspensions d'aquestes característiques necessita de sistemes que puguin processar mostres d'elevada viscositat. Però la inestabilitat del fàrmac en les suspensions fa inútil qualsevol intent d'obtenir aquest tipus de mostres amb la intenció de comercialitzar-les. L'única possibilitat seria la preparació prèviament a la seva aplicació en les teràpies de curt temps de contacte ("Anthralin", 1990; Harris D.R., 1998). Aquesta metodologia és factible amb les mescles de Pro-Lipo S, tot i que les preparacions estarien formades per bicapes, no per liposomes, i contindrien un 20% p/p d'etanol (Ap. 4.3.2.2.4).

Els resultats obtinguts amb les preparacions de REVs i MLVs mostren que la ràpida degradació del ditranol encapsulat en liposomes està afavorida pel propi fosfolípid. Això es posa de manifest en els processos d'evaporació les mescles clorofòmiques d'ambdúes molècules (Ap. 4.3.2.4). Provablement, el desencadenant del procés sigui la presència de dobles enllaços a les cadenes d'àcid gras, ja que, d'una banda, estan descrites interaccions entre el ditranol i les membranes biològiques (Wiegrebe W. i Müller K., 1995), i a més, varis dels diversos radicals d'oxigen que produeix el ditranol són molt solubles en un entorn lipídic (Müller K., 1997a). Les observacions qualitatives de Mahrle G. et al.(1991) recolzen aquest fet, ja que la mostra més inestable de les diverses suspensions estudiades és la que incorpora oli d'origen vegetal ric en àcids grassos insaturats.

Dues són les estratègies que poden causar una millora de l'encapsulació i estabilitat del ditranol en liposomes: la modificació química del ditranol, i el canvi en els constituents de les bicapes lipídiques.

La baixa relació de saturació de les bicapes és una conseqüència de l'estructura

²⁸ D'altra banda, és necessari indicar que en el treball de Mahrle G. et al. (1991) es descriu la utilització d'una preparació que, donada la incorporació d'oli vegetal, no conté únicament liposomes (Ap. 4.2.4.4). Aquest fet és freqüent en altres treballs que, com en de Hofland H.E.J. et al. (1995), fan servir preparacions comercials, de manera que l'anàlisi dels resultats des del punt de vista de l'efectivitat dels liposomes no és correcta.

molecular del fàrmac. L'antracè i el fenantrè tenen uns coeficients de partició membrana/aigua elevats que es correlacionen amb els de partició octanol/aigua (Sikkema J. et al., 1994). Aquesta característica aportada pels anells junt amb la presència de funcions polars distribuïdes asimèticament en el cas del ditranol, el fan un candidat escaient per a la incorporació en bicapes atenent al seu caràcter amfipàtic. Els resultats de Sanders Ch. R. et al. (1993) en l'estudi de la interacció de membranes i molècules aromàtiques amfipàtiques, constaten que el ditranol té un comportament totalment contrari a l'esperat: no es capaç de reorientar les bicapes en presència d'un camp magnètic. Els autors, sense l'aportació de cap altre dada experimental, proposen varies causes: una baixa solubilitat en les bicapes, l'absència de propietats detergents, i/o una orientació diferent de l'esperada en la inclusió del fàrmac dins de la bicapa (es preveia que el pla de l'anell, en quedar paral·lel a les cadenes d'àcid gras, orientés les bicapes de manera que la seva superfície fos perpendicular al camp magnètic). Aquests fets són compatibles amb la relació de saturació DT/F calculada, i indueixen a proposar que la inclusió de fragments apolars en el ditranol milloraria la seva encapsulació. Si aquestes modificacions es realitzessin en el carboni 10 (veure annexe) inclús es podria millorar la seva estabilitat química, ja que és en aquesta posició on s'originen els radicals que porten a la seva degradació. Tot i que la bibliografia descriu l'existència d'una gran quantitat d'aquests i altres derivats (Berset J.-D. i Krebs A., 1990), i fins i tot s'aporten estudis *in vitro* d'activitat antiproliferativa de queratinòcits (Bonnekoh B. et al., 1991; Müller K. et al., 1997b), encara no s'han presentat treballs sobre la obtenció de liposomes amb aquestes molècules encapsulades.

La segona línia d'acció que es proposa per millorar els resultats d'estabilitat de les suspensions de liposomes amb ditranol és la utilització de fosfolípids saturats. Lindahl A. (1992) descriu la obtenció de cremes amb ditranol a les quals s'empren dos monoglicèrids com a fase grasa (o/w ~28 % p/p). El majoritari, amb un 21 % p/p, és el monomiristat de gliceril, que no presenta insaturacions, essent el 7 % p/p restant el monolaurat de gliceril, que en té una. En els cristall líquids que es preparen, el ditranol té una estabilitat química excel·lent durant els 18 mesos que duren els controls a 25°C, fet que indueix a pensar que la molècula no exposa el carboni 10 al medi aquós, en el qual és molt reactiu. A més, aquest tipus de formulacions disminueixen la irritació de la pell, en especial quan es convina amb la irradiació d'UVB (van der Vleuten M. et al., 1996). D'altra banda, la obtenció de suspensions estables de partícules de polivinilpirrolidona amb ditranol per part de Delneuville I. et al. (1998), també dona suport a la idea de que un medi apolar químicament inert o poc reactiu és l'entorn idoni pel ditranol.

La utilització de fosfolípids saturats enlloc dels insaturats seria un bon punt de partida per assajar noves formulacions amb liposomes. Molts dels proveïdors a gran escala de matèries primeres lipídiques ofereixen fosfolípids d'origen natural saturats catalíticament. L'alta temperatura de transició d'aquestes molècules fa que siguin necessaris processos d'escalfament

que poden resultar crítics pel ditranol. Però la utilització de reactors addients, la operació sota una atmosfera inert, i el control precís de la temperatura fan viable aquests mètodes (Lindahl A., 1992). Una altra opció seria la utilització de fosfolípids saturats de cadena curta, com la DMPC, que té una temperatura de transició de 23,5°C, la qual cosa permet treballar amb ella en estat cristall líquid a temperatura ambient. Cal tenir en compte que aquesta darrera proposició només té sentit des d'un punt de vista d'investigació bàsica, ja que els alts preus de cost d'aquest tipus de matèria primera els fan inviables per a la fabricació de productes amb finalitats comercials.

En referència a l'assaig d'irritació *in vitro*, els resultats són satisfactoris però poc concluent ja que, tot i que la bibliografia indica que els dos paràmetres són independents (Prins M. et al., 1998), és convenient comprovar si la disminució del grau d'irritació que causa la suspensió de liposomes amb ditranol, va acompanyada del manteniment de la seva activitat terapèutica. Els resultats són contradictoris als presentats per Gehring W. et al. (1992) sobre l'avaluació *in vivo* de l'eritema causat per la formulació amb liposomes i ditranol comentada a l'inici d'aquest apartat. Els autors conclouen que hi ha una potenciació de la capacitat irritant que està causada per un increment de la penetració del fàrmac a través de la pell. Però en cap cas es realitza un blanc amb el qual es posi de manifest si aquest augment és degut a l'etanol que, en un 16% p/p, forma part de la preparació.

Per tant, resulta important determinar alhora la capacitat irritant i terapèutica de les suspensions amb ditranol, efectes que estan directament relacionats amb la composició del vehicle en el qual s'incorpora el fàrmac. Tant és així que l'àcid salicílic, una molècula molt emprada com a estabilitzador del ditranol, incrementa notablement l'efecte irritant de les formulacions sense que això impliqui una major activitat terapèutica (Prins M. et al., 1998). Aquest efecte no desitjat pot evitar-se emprant vehicles en els quals el fàrmac sigui prou estable i, per tant, no necessiti d'altres components.

5.3.3 ENCAPSULACIÓ D'HIDROCORTISONA EN LIPOSOMES.

Tot i els treballs pioners de Lasch J. i Wohlrab W. que demostraven un increment del fàrmac a l'epidermis i la dermis quan s'aplicava en liposomes (Lasch J. i Wohlrab W., 1986; Wohlrab W. i Lasch J., 1987), i els posteriors on es constata que aquest efecte va acompanyat d'una absorció sistèmica menor que en el cas de preparacions convencionals (Wohlrab W. et al., 1992), no es troben referències bibliogràfiques que descriguin les característiques d'encapsulació d'aquest fàrmac ni processos de preparació tret dels tradicionals d'escala laboratori.

Els resultats presentats a l'apartat 4.3.3 mostren que la utilització convinguda de Pro-Lipo S i Microfluidizer és eficaç alhora d'obtenir a escala industrial suspensions de liposomes amb

HC encapsulada. Els beneficis de la utilització de Pro-Lipo S indiquen que és viable obtenir suspensions similars a partir de dissolucions etanòliques de fosfolípids en les quals el fàrmac també pugui solubilitzar-se, però es necessari tenir en compte que la concentració de l'alcohol és un factor determinant en el diàmetre de les vesícules (Ap. 4.2.5.3) i que els SUVs són els liposomes menys estables. D'altra banda, el procés d'homogenització podria fer possible l'ús de mescles sòlides de fosfolípids i HC, ja que s'ha constatat que en incrementar el número de cicles i la pressió de treball, la relació de saturació HC/F és la mateixa que la que s'obté en el cas d'MLVs. Aquests

resultats indiquen que el grau de mescla assolit en les pel·lícules obtingudes per evaporació del cloroform en un mètode de laboratori també es pot aconseguir a escala industrial augmentant el grau d'homogenització de la mostra (més cicles i més pressió).

L'objectiu d'aconseguir suspensions amb el 0,5 % p/p d'HC en liposomes només és possible amb concentracions de ~175 mg F/mL en sistemes saturats (Fig. 149). Cal tenir en compte que el repartiment del fàrmac entre el medi aquós i les membranes fa que l'encapsulació sigui menor del 98,3% que s'obté amb suspensions de 50 mg F/mL, ja que en augmentar la concentració de fosfolípids també ho fa la d'etanol. En cas de no treballar amb sistemes saturats, el rendiment del procés serà més gran (Fig. 120), però serà necessari augmentar la concentració de F per assolir el 0,5% p/p d'HC. A més, caldria obtenir la constant de repartiment del fàrmac entre les membranes i el medi aquós per tal de determinar el seu grau d'encapsulació. Ara bé, el fet de que es comercialitzin formulacions dins d'un rang de concentracions del 0,25-2,5 % p/p d'HC (Täuber U., 1994) fa possible suspensions comercials amb concentracions menors de fosfolípids.

D'altra banda, les relacions de saturació HC/F obtingudes amb Pro-Lipo S ($25,8 \pm 1,17$ mg HC/g F) són del mateix ordre de les que s'indiquen en altres treballs d'estudis d'efectivitat realitzats amb liposomes (24 mg HC/g F; Lasch J. i Wohlrab W., 1986) i niosomes (20 mg HC/g lípid; Waranuch N. et al., 1999), tot i que en cap d'ells s'indica el grau de saturació de les vesícules. Per aquesta raó els resultats obtinguts amb REVs són indicatius d'un procés excepcional. Aquesta excepció possibilita assolir una relació màxima que se situa entre els 100 i 200 mg HC/g F però només de manera provisional, ja que el sistema evoluciona ràpidament de manera que part d'HC encapsulada és alliberada i precipita. Per tant, només estabilitzant l'estat de sobresaturació dels liposomes seria viable l'ús d'aquest tipus de formulacions, que podrien

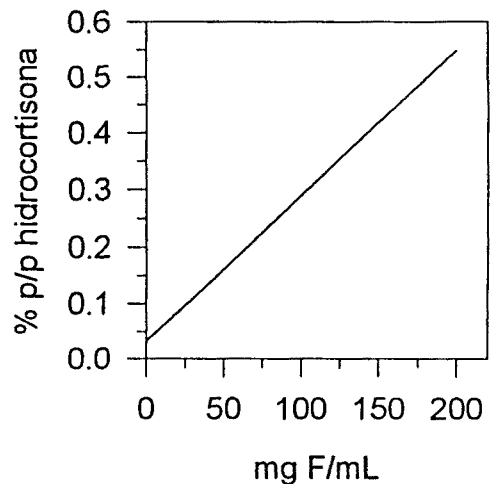


Fig. 149 Concentracions màximes d'hidrocortisona en suspensions de liposomes amb les bicapes saturades.

estar constituïdes, en el cas menys favorable, per concentracions quatre menors de fosfolípids que la requerida en el cas dels Pro-Lipo S.

És important assenyalar que hi ha dues possibilitats de producció de liposomes amb HC a gran escala amb Pro-Lipo S (o similar) i el Microfluidizer. La primera opció és realitzar-lo a la concentració final desitjada. La preparació de suspensions concentrades i saturades que servien de mare per obtenir-ne les finals, i que impliquen treballar amb volums menors, no seria d'utilitat degut a la velocitat amb la que el fàrmac fuita de les membranes quan s'altera l'equilibri entre les dues fases presents. Per tant, qualsevol procés de dilució implica un percentatge d'encapsulació menor, tot i que la concentració total d'HC seria la desitjada. Aquest fet s'ha posat àmpliament de manifest en els processos emprats per determinar els percentatges d'encapsulació de l'HC. La baixa capacitat de retenció del fàrmac és una conseqüència comú en aquelles substàncies amb poca solubilitat en aigua però que alhora presenten valors mitjans del coeficient de partició octanol/aigua (Gulati M. et al., 1998). En el cas de l'HC, el $\log P_{o/w}$ (logaritme del coeficient) té un valor d'1,6 (Waranuch N. et al., 1999), fet que explica els resultats obtinguts.

La segona opció del procés productiu és preparar mares concentrades que han de diluir-se amb el medi aquós prèviament saturat de fàrmac. D'aquesta manera, tot i que implica una etapa més, s'evita la desencapsulació del fàrmac durant la dilució, i els volums de treball són menors.

L'estabilitat física de les suspensions s'ha mostrat deficient, ja que en cap de les condicions d'emmagatzematge s'ha arribat a l'any en bon estat. Aquest fet pot indicar que el fàrmac actua com a disruptor de la membrana, de manera que seria convenient assajar l'estabilitat de liposomes que, a més, incorporeassin colesterol, molècula que actua com a estabilitzador de la bicapa.

Complementàriament és necessari l'estudi d'altres formes de presentació com són els gels i els liofilitzats.

Les anàlisi dutes a terme amb espectroscòpia d'infraroig posa de manifest l'existència d'interaccions entre l'HC i el grup fosfat dels fosfolípids en pel·lícules

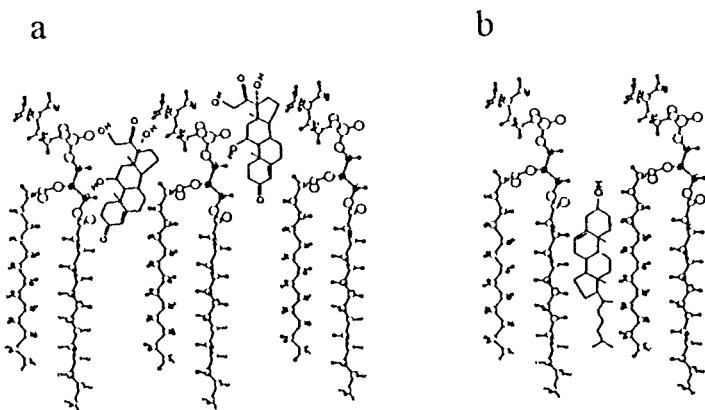


Fig. 150 a) Possibles interaccions entre la hidrocortisona i els fosfolípids. b) Situació del colesterol dins de les bicapes lipídiques.

formades per mescles de les dues molècules. Les modificacions de les posicions dels pics del fosfat són explicables per la formació d'enllaços d'hidrogen en els quals hi participen els grups alcohol del fàrmac. L'establiment d'aquestes interaccions entre l'etanol o butanol i els fosfolípids ha estat descrita per Chiou J.S. et al. (1991; 1992), i els resultats obtinguts amb l'HC són coincidents amb els presentats en els treballs citats en els següents aspectes: primer, en presència de grups alcohol es produeix un desplaçament dels pics del grup fosfat, el qual està acompanyat de l'aparició d'una banda ampla situada entre 3275 i 3235 cm^{-1} (a $\sim 3240 \text{ cm}^{-1}$ en el cas de l'HC) i que és una conseqüència del complex format pels grups alcohol i els fosfolípids; segon, el grup colina no presenta cap modificació donat que no és donador de protons; i tercer, el grup carbonil dels fosfolípids té un lleuger desplaçament cap a números d'ona més grans, originat provablement per la situació en un entorn més hidrofòbic.

A més de la formació d'enllaços d'hidrogen amb els grups alcohol, l'HC mostra un canvi en la posició del grup carbonil del carboni 3, que en les mescles amb fosfolípids deixa d'establir els enllaços intermoleculars presents a la forma sòlida. Aquest conjunt de resultats indiquen que mentre la zona amb funcions alcohol se situa en proximitat del grup fosfat dels fosfolípids, l'altre extrem de la molècula s'insereix a la regió interfacial (Fig. 150a). Per tant, la situació espacial de l'HC a les bicapes és la inversa de la que presenta el colesterol, que se situa amb la cua hidrocarbonada orientada cap a l'interior hidrofòbic (Chapman D., 1993; Gennis R.B., 1989; Slater J.C. i Huang Ch., 1992). Donat que en medis aquosos els esteroides mostren la seva incorporació a les membranes (Kühn-Velten W.N. i Kempfle M.A., 1993), i que l'HC presenta un insolubilitat total en olis, cal esperar que a les suspensions de liposomes la interacció anterior sigui la causa de l'encapsulació del fàrmac a les vesícules. La posició de l'HC en els liposomes podria ser la causa de la inestabilitat física que preenten les suspensions, ja que causa una separació dels caps polars que no és compensada a la zona hidrofòbica, contràriament al que passa amb el colesterol, que actua com a estabilitzador de les membranes.

El model proposat és coherent amb els resultats i conclusions presentats per Arrowsmith M. et al. (1983) en els estudis termodinàmics de les interaccions entre diferents esteroides i bicapes de DMPC. En ells, mitjançant la mesura dels canvis d'entropia que suposa la inserció de les molècules a les bicapes, es constata que la orientació dels ésters C-21 (acetat i butirat) de la cortisona tenen una orientació diferent a la de la molècula no esterificada, la qual és del mateix tipus que la que presenten els altres esteroides no derivatitzats estudiats (hidrocortisona, progesterona, corticosterona, desoxicorticosterona i 17α -hidroxi-11-desoxicorticosterona).

Però, d'altra banda, les conclusions presentades per Golden G.A. et al. (1998) no avalen el mecanisme d'interacció de la Fig. 150. Els autors proposen que l'HC ocupa la situació central de la bicapa i que és desplaçada cap al grup polar en augmentar la quantitat de colesterol. Ara bé, els perfils de densitat electrònica que presenten no permeten extreure tal afirmació per varies

raons. En primer lloc, s'observa que en absència d'HC el colesterol causa un augment de densitat electrònica a la zona més interna de la bicapa, que és on els autors afirmen que s'insereix el fàrmac en presència de quantitats petites de colesterol (0,2:1 colesterol/fosfolípid mol/mol). Donada la posició del colesterol a les bicapes (Fig. 150b), els resultats que presenten el que sí indiquen és que els anells de l'HC es situen a la mateixa zona que ho fan els del colesterol. En segon lloc, no exposen les raons que permeten considerar que les variacions observades són un efecte del desplaçament de l'HC i no del colesterol. I, finalment, no hi ha cap perfil de densitat electrònica realitzat en absència de colesterol, de manera que no es pot comparar la membrana fosfolipídica pura amb una que incorpori el fàrmac.

Aquests fets, conjuntament amb la ja comentada insolubilitat total de l'HC en olis, als resultats d'Arowsmith, i a les interaccions entre el fàrmac i els fosfolípids detectades per infraroig, fan inviable la localització de l'HC a la zona hidrofòbica de les bicapes, i donen suport al mecanisme d'interacció proposat.

5.3.4 ENCAPSULACIÓ DE BUTIRAT-PROPIONAT D'HIDROCORTISONA EN LIPOSOMES.

La relació màxima HBP/F assolible en els liposomes permet obtenir suspensions amb el fàrmac al 0,1% p/p, a concentracions moderades de fosfolípids, i mitjançant processos de producció a gran escala. Com en el cas de l'hidrocortisona, el fàrmac fuita dels liposomes en cas de dilució amb un medi que no estigui en equilibri amb el de la suspensió. És per aquesta raó que, en cas de preparar dispersions concentrades per tal de diluir-les posteriorment, és necessari fer-ho amb un medi que contingui el fàrmac. A la Fig. 151 es mostren les concentracions màximes assolibles en sistemes que presentin la saturació de les bicapes.

En comparació amb l'HC, la incorporació de l'HBP amb les membranes presenta dues diferències fonamentals relacionades entre si: s'encapsula una relació fàrmac/fosfolípid major ($47,9 \pm 2,1$ mg HBP/g F), i la interacció amb la bicapa és més forta, ja que mostra un fuita menor en diluir els liposomes a les cromatografies d'exclusió molecular. Evidentment aquestes diferències són conseqüència de l'esterificació a les posicions 17 i 21 (veure annexe). Aquesta estratègia és la recomanable per tal de dirigir l'encapsulació cap a les bicapes, ja que s'ha mostrat eficaç en nombroses ocasions (Gulati M. et al., 1996), i ja va ser emprada en els primers experiments

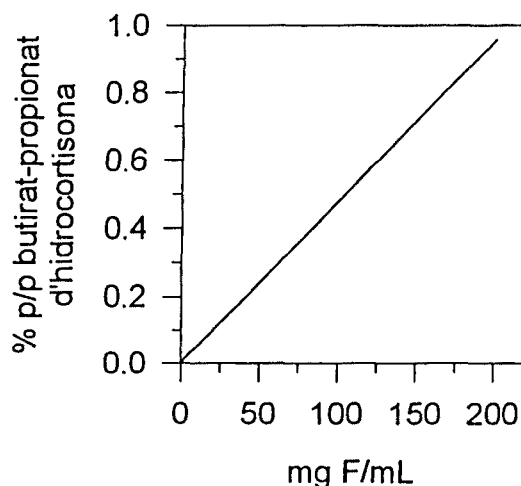


Fig. 151 Concentracions màximes de butirat-propionat d'hidrocortisona en suspensions de liposomes amb les bicapes saturades.

d'encapsulació d'esteroides realitzats per Fildes F.J.T. et al. (1978). En ells es determinà una relació màxima fàrmac/fosfolípid situada al voltant de 1:6,3 mol/mol per a l'encapsulació del 21-palmitat d'hidrocortisona en liposomes constituïts per DPPC, una relació doble de la trobada per l'HBP (1:13 mol/mol).

Generalment, la eficàcia dels fragments hidrofòbics en la millora de l'encapsulació es pot preveure mitjançant els canvis que determinen en la constant de repartiment octanol/aigua (P_{ow}) de la molècula original, ja que en la majoria de casos aquesta constant és proporcional a la de repartiment entre membranes i medi aquós. Per exemple, en els casos dels metil, etil, propil o butil p-amino-benzoats, es produeix un increment de la constant de repartiment membrana/aigua proporcional al número d'àtoms de carboni del substituent alquil (Ma L. et al., 1991). Pel cas de l'HBP, el seu $\log P_{ow}$ es pot estimar a partir del de l'HC ($\log P_{ow} = 1,6$) i de les modificacions respecte a ella²⁹. Així, la inclusió dels substituents propil i butil suposen un increment de $\log P_{ow}$ fins a un valor de 4,73 (Torres J., 1998), de manera que la molècula se situa vora de les que són considerades com altament hidrofòbiques (Gulati M. et al., 1998) i, per tant, ha de mostrar una major preferència d'inserció a les bicapes en front del medi aquós, tal i com es comprova experimentalment.

Obviament, l'augment de la capacitat d'inserció a les membranes va acompanyat d'una major retenció del fàrmac. Però, tot i ser més important que en el cas de l'HC, també es produeix una ràpida pèrdua del fàrmac en diluir la mostra desplaçant l'equilibri entre les dues fases presents. Per tant, la doble esterificació amb un total de set àtoms de carboni no resulta prou eficient com per assegurar la retenció total del fàrmac a la membrana. Aquesta unió feble entre les cadenes curtes i les membranes ja es va posar de manifest amb el 21-octanoat d'hidrocortisona (Shaw I.H. et al., 1976), que és desencapsulat molt més ràpidament que el 21-palmitat. Els treballs de Webb M.S. et al. (1998) constaten el mateix fet inclús amb lípids, ja que té lloc amb ceramides amb cadenes de 8 àtoms de carboni emprades com anclatge hidrofòbic del polietilenglicol (~2000 Da), però no es dona amb ceramides amb cadenes de 24 àtoms de carboni.

Per tant, sí que cal tenir en compte aquest fenomen en els processos d'obtenció de les suspensions de liposomes amb HBP, però en tractar-se de formulacions d'aplicació tòpica que no són diluïdes durant la seva aplicació, no es produiran alteracions importants fins que es modifiqui l'estructura dels liposomes en la interacció amb l'estrat corni.

La orientació de la molècula dins de la membrana és fàcilment previsible a partir de les consideracions anteriors: les dues cadenes hidrocarbonades insertades en major o menor grau a la zona hidrofòbica obliguen a l'anell a situar el grup carbonil del carboni 3 dirigit cap a la zona polar de la bicapa. Aquesta previsió es veu confirmada pels experiments d'FTIR, ja que no es

²⁹ El programa emprat per realitzar l'estimació ha estat el LOGKOW, específic per a realitzar aquesta mena de càlculs. A l'adreça <http://esc.syrres.com/~ESC/kowint.htm> es pot trobar una demostració del programa.

detecta cap modificació ni en els pics corresponents als grups fosfat dels fosfolípids, ni a la zona corresponent al grup OH del carboni 11 de l'HBP, ni en el pic dels carbonils de la mateixa molècula. Per tant, el mecanisme d'interacció entre el fàrmac i els fosfolípids ha d'ésser bàsicament hidrofòbic, contràriament al proposat per l'HC. Aquesta tesi es veu reforçada pels treballs i conclusions de Fruttero R. et al. (1998) en l'estudi de la interacció entre diferents (p-metilbenzil)-alquilamines i liposomes. Els autors proposen quatre grups fonamentals d'interacció entre les molècules estudiades i les bicapes: purament electrostàtica pels ions petits; lleugerament electrostàtica i majoritàriament hidrofòbica pels ions de massa molecular elevada; fonamentalment amb enllaços d'hidrogen i parcialment hidrofòbica per les molècules neutres i petites; i, pels compostos grans i neutres, bàsicament hidrofòbica amb la possible formació d'alguns enllaços d'hidrogen. La llargada de la cadena alquílica condiona el comportament del sistema, situant-se el valor crític en 4 àtoms de carboni. Per sobre d'aquest valor el repartiment del fàrmac entre les dues fases està dominat per l'anclatge hidrofòbic dins les membranes. Anàlogament, en el cas de l'HBP, en ser 5 els àtoms de carboni que formen part del domini hidrocarbonat de les cadenes alquíliques, es produirà un anclatge que causarà una orientació de la molècula dins la bicapa.

Els millors resultats d'estabilitat química del fàrmac s'obtenen en els liofilitzats, seguit dels hidrogels, essent les formulacions líquides les més inestables. Degut a que no es freqüent la comercialització de productes d'aplicació tòpica liofilitzats, es proposa emprar aquest sistema únicament com un mitjà de conservació de remanents que, prèvia resuspensió, poden ésser incorporats en hidrogels per obtenir preparats de forma ràpida. Cal recordar que no s'ha afegit a cap mostra cap mena de conservant³⁰, per la qual cosa cal esperar una millora en les formulacions comercials que sí els incloguin.

L'avaluació de la capacitat vasoconstrictora de l'HBP en liposomes resulta negativa, ja que amb aquestes formulacions hi ha una disminució del temps de latència i un augment de la intensitat màxima. Aquests resultats, però, no són una conseqüència del vehicle del fàrmac, sinó que tenen el seu origen en l'adsorció i desorció de l'aigua per part de l'estrat corni (Ap. 4.3.1). El flux a través de la pell del nicotinat de metil és dependent de la concentració de la dissolució aplicada (Rittirod T. et al., 1999), i és per aquesta raó que, en augmentar transitòriament i local el contingut d'aigua a les capes més externes de l'estrat corni, també ho fa la concentració del vasodilatador. El resultat es una disminució del temps de latència i, consegüentment, un augment de la quantitat de nicotinat de metil que hi arriba. L'efecte que es produeix en aplicar

³⁰ En emprar Pro-Lipo S, les suspensions de liposomes contenen els antioxidants que porta aquesta matèria primera. En concentracions de 20 mg F/mL, però, les concentracions són molt petites: ~150 ppm d' α -tocoferol, i ~75 ppm de palmitat d'ascorbil.

pegats amb el medi aquós de les suspensions posa de manifest aquesta interpretació. Degut a que les diferències entre les aplicacions amb liposomes sense el fàrmac i amb ell no són significatives (tot i que són comparables als de la crema i el control), els resultats no posen de manifest d'una manera clara la capacitat dels liposomes per actuar com a vehicle de l'HBP. Cal indicar que els percentatges d'inhibició en ambdós casos són, però, inferiors als presentats per Duteil L. et al. (1990) en un estudi del mateix tipus on s'avaluava, entre altres corticoesteroides, la hidrocortisona i el butirat d'hidrocortisona en cremes (mostraren inhibicions situades entre el 33 i 45 %).

Ara bé, tant les observacions visuals de l'enblanquiment de la pell, com els resultats histològics, confirmen que l'HBP encapsulat en liposomes actua sobre les estructures cutànies d'humans i de ratolins. Les disminucions dels gruixos dels teixits adipós i muscular indiquen que durant el temps del tractament les dues formulacions produeixen el mateix efecte. Per tant, tenint en compte que la capacitat atrofiant del fàrmac pot emprar-se com a referència de la seva eficàcia com a antiinflamatori (Penneys N.S., 1992; Surber C. et al., 1995; Woodbury R i Kligman A.M., 1992), seria convenient realitzar el mateix experiment amb tractaments més curts. D'aquesta manera es podria determinar si les suspensions de liposomes afavoreixen l'acció de l'HBP. Igualment adient resultaria mesurar l'acció vasoconstrictora del fàrmac en humans mitjançant tècniques d'espectroscòpia de reflectància, mètode no invasiu que quantifica la coloració de superfícies (Chan S.Y. i Po A.L.W., 1992; Andersen P.H., 1997).

5.3.5 OBTENCIÓ D'EMULSIONS OB/F.

La metodologia emprada per a la obtenció d'emulsions al 2 % p/p d'oli de borratge estabilitzades amb fosfolípids ha resultat eficient i pot ser transferida directament a la indústria. La seva producció pot resultar novedosa per dues raons: primera, per que no està extés el seu ús en formulacions d'aplicació tòpica; i, segona, per que s'ha demostrat que interacciona amb l'estrat corni humà (Leopold C. i Lippold B.C., 1995), a diferència de les vesícules de triacilglicèrids que no presenten fosfolípids a la seva superfície. Cal, però, comentar unes modificacions que farien el procés productiu més simple.

Com ja s'ha comentat pel cas dels liposomes, es poden emprar dissolucions etanòliques fosfolipídiques que continguin una proporció similar de fosfolípids carregats a la present als Pro-Lipo S. Aquesta matèria primera, que pot ser subministrada pel mateix fabricant dels Pro-Lipo S, implica una reducció de costos important.

D'altra banda, a la bibliografia és possible trobar preparacions que contenen una gran varietat de relacions en pes entre l'oli i les molècules estabilitzadores (tensioactius i fosfolípids). Kan P. et al. (1999) empen una relació en pes d'1,4 en emulsions que incorporen paclitaxel (un

fàrmac antineoplàsic), mentre que a les formulacions comercials destinades a suplement energètic analitzades per Férézou J. et al. (1994), les relacions van des de 8,3 fins a 25. Els motius que han determinat l'estudi de'emulsions amb una relació inicial OB/F=1 han estat exposat a l'apartat 4.3.5.1. Ara bé, tenint en compte que cap de les formulacions assajades no ha presentat separació de fases, seria convenient augmentar la relació OB/F emprada en les mescles inicials. El motiu d'aquesta afirmació és que les anàlisi d'FTIR mostren que hi ha un excés de fosfolípids que, en no formar part de la monocapa que estabilitza les microgotetes OB/F, constitueixen liposomes, de manera que només un 7,5 % dels fosfolípids actua com a estabilitzador de l'emulsió. Com s'ha comentat, aquest excés evita que s'observi una separació de fases important durant els assajos de centrifugació, condició indispensable per comercialitzar un producte d'aplicació tòpica, però donat que durant els estudis d'estabilitat accelerada no s'ha produït aquest fenomen, seria convenient estudiar el comportament físic de les emulsions preparades amb una relació OB/F p/p inicial de 5. Aquestes, com les OB/F =1, no presenten oli sobrenedant després de la ultracentrifugació, fet que indica una bona estabilitat de l'emulsió.

Pel que fa a les característiques de les microgotetes OB/F obtingudes, resulten diferents de les presentades per Férézou J. et al. (1994) en l'estudi de les formulacions preparades per Kabi-Pharmacia. En el nostre cas la relació molar OB/F és de 10, mentre que en les mostres comercialitzades és d'aproximadament 20. Aquestes diferències són, probablement, una conseqüència del mètode de preparació, ja que les grandàries de les microgotetes també resulten diferents (~127 nm i ~350 nm respectivament). Per tant, en variar el diàmetre de les vesícules s'ha de produir també una variació de relació entre els seus components (Ap. 4.3.5.2).

En referència a l'estabilitat de les diferents formulacions, i tal com era d'esperar, són els liofilitzats el tipus de presentació que proporciona una major estabilitat química de l'OB. Es produeix, però, un augment del diàmetre de les microgotetes OB/F, de manera que els diàmetres de les vesícules de les resuspensions es situen per sobre del micròmetre i són observables per microscòpia òptica. Aquestes variacions són del mateix ordre que les mesurades per Bamba J. et al. (1995) en processos de congelació previs a la liofilització d'emulsions o/w que contenen sucres a la fase aquosa i tensioactius com estabilitzants de la fase oliosa. Aquest augment de la grandària de les vesícules també té lloc a les mostres líquides i, en major grau, als hidrogels. Donat que el 20 % dels fosfolípids emprats estan carregats negativament i que la força iònica del tampó és petita, l'única possibilitat a assajar per tal de millorar l'estabilitat de les preparacions no liofilitzades és incorporar glicerol al medi aquós. En augmentar la viscositat de la fase contínua disminueix el nombre de xocs entre vesícules i, consegüentment, s'alenteixen els processos d'agregació i fusió.

6. CONCLUSIONS

Pel que fa al procés d'obtenció de liposomes amb el Microfluidizer 110S,

* el control de la pressió, del número de cicles i de la força iònica del medi permeten determinar amb precisió les característiques de les suspensions que s'obtenen.

Pel que fa a la determinació de la grandària de liposomes amb el Microtrack UPA 150,

* les anàlisi són exactes i precises sempre que:

- i/ el temps de lectura sigui igual o major a 10 minuts,
- ii/ la concentració de les mostres es situï dins de l'interval lineal de la relació índex de càrrega-concentració,
- iii/ la fracció en volum del dissolvent d'una mostra sigui igual o superior a 0,97,
- iv/ s'apantallin les càrregues dels liposomes carregats elèctricament.

Pel que fa a les suspensions de liposomes obtingudes amb el Microfluidizer 110S a partir de Pro-Lipo S,

* a excepció dels SUVs, resulten estables en medi líquid, en hidrogels, i en liofilitzats en els quals la relació sacarosa/fosfolípid p/p sigui igual o major a 1:1.

* no mostren un efecte hidratant oclusiu en tractaments de 4 hores de durada amb pegats.

Pel que fa a l'encapsulació de ditranol (DT) en liposomes obtinguts amb Pro-Lipo S,

* la relació màxima d'encapsulació del fàrmac és de 4,74 mg ditranol / g fosfolípid. Conseqüentment, són necessàries concentracions mínimes de l'ordre de 210 mg fosfolípid/ mL per assolir formulacions amb un 0,1 % p/p de fàrmac encapsulat.

* el fàrmac encapsulat presenta una estabilitat química molt baixa tant en medis líquids com en liofilitzats, per la qual cosa les preparacions no resulten viables.

* les suspensions de liposomes amb DT mostren, a igualtat de concentració, un grau d'irritació menor que la crema comercial emprada com a referència.

Pel que fa a l'encapsulació d'hidrocortisona (HC) en liposomes obtinguts amb Pro-Lipo S,

* la relació màxima d'encapsulació del fàrmac és de 25,8 mg hidrocortisona / g fosfolípid. Conseqüentment, són necessàries concentracions mínimes de l'ordre de 175 mg fosfolípid/ mL per assolir formulacions amb un 0,5 % p/p de fàrmac encapsulat.

* les suspensions de liposomes amb HC encapsulada presenten una estabilitat màxima inferior a l'any conservades a 4°C i en la foscor. L'efecte disruptor del fàrmac fa necessària una modificació química per tal de fer viables les formulacions.

* el fàrmac interacciona amb el grup fosfat dels fosfolípids establint enllaços d'hidrogen. La interacció és feble en medi aquós, i causa una ràpida desencapsulació de l'HC quan la mostra és diluïda en un medi aquós que no presenta HC en equilibri amb les bicapes.

Pel que fa a l'encapsulació de butirat-propionat d'hidrocortisona (HBP) en liposomes obtinguts amb Pro-Lipo S,

- * la relació màxima d'encapsulació del fàrmac és de 47,9 mg hidrocortisona / g fosfolípid. Conseqüentment, són necessàries concentracions mínimes de l'ordre de 20 mg fosfolípid/ mL per assolir formulacions amb un 0,1 % p/p de fàrmac encapsulat.
- * la màxima estabilitat química de l'HBP en liposomes té lloc en preparats liofilitzats.
- * l'HBP no interacciona amb el grup fosfat dels fosfolípids, de manera que s'inserta a la part hidrofòbica de les bicapes.
- * en aplicacions oclusives de 4 hores de durada en humans, no produeix una vasoconstricció significativa mesurable mitjançant VLD, i com a conseqüència de l'adsorció/desorció d'aigua per part de l'estrat corni, es detecta una alteració de la funció barrera de la pell.
- * en aplicacions no oclusives en ratolins *hairless* Skh-HR durant 15 dies causa atròfia cutània. Conseqüentment, els liposomes actuen com a vehicle del fàrmac, el qual penetra dins la pell.
- * les formulacions obtingudes són una alternativa viable a les presentacions clàssiques.

Pel que fa a les emulsions d'oli de borratge (OB) al 2% p/p estabilitzades amb fosfolípids (F) obtinguts amb Pro-lipo S,

- * poden obtenir-se a gran escala amb el Microfluidizer 110S, essent les més estables les que tenen una relació OB/F p/p igual o menor a 5:1.
- * les obtingudes amb una relació OB/F p/p 1:1 amb el Microfluidizer a una pressió de 4 bar i en 7 cicles, presenten, tot i produir-se parcialment una fusió de les vesícules olioses, una bona estabilitat física a 40°C, tant en les formes de presentació líquida, d'hidrogel o liofilitzada. Són per tant, viables per a l'aplicació tòpica.

5. REFERÈNCIES

- ABOOFAZELI R., LAWRENCE M.J. 1993. "Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. I Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-alcohol-isopropyl myristate." *International Journal of Pharmaceutics*, 93:161-175.
- AHL P.L., CHEN L., PERKINS W.R., MINCHEY S., BONI L.T., TARASCHI T.F., JANOFF A.S. 1994. "Interdigitation-fusion: a new method for producing lipid vesicles of high internal volume." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1195: 237-244.
- AHN B.N., KIM S.K., SHIM CH.K. 1995. "Proliposomes as an intranasal dosage form for the sustained delivery of propranolol." *Journal of Controlled Release*, 34: 203-210.
- AKASHI K.-I., MIYATA H., ITOH H., KINOSITA K. 1998. "Formation of giant liposomes promoted by divalent cations: critical role of electrostatic repulsions." *Biophysical Journal*, 74: 2973-2982.
- ALBIOL M. 1973. "Teoría de emulsiones. Fisicoquímica. Emulsionantes." III Curso de ciencia cosmética. Sociedad de químicos cosméticos de España.
- ALLEN T.M. 1998. "Liposomal drug formulations." *Drugs*, 56(5): 747-756.
- AL-MESAHAL M., KHIDR S.H., BAYOMI M.A., AL-ANGARY A.A. 1998. "Oral administration of liposomes containing cyclosporine: a pharmacokinetic study." *International Journal of Pharmaceutics*, 168: 163-168.
- ANDELMANÇ D. 1995. "Electrostatic properties of membranes: the Poisson-Boltzmann theory." *Structure and Dynamics of Membranes*, 1B: 603-642. Editat per Lipowsky R, Sackmann E. Elsevier Science B.V. Amsterdam.
- ANDERSEN P.H. 1997. "Reflectance spectroscopic analysis of selected experimental dermatological models with emphasis on cutaneous vascular reactions." *Skin Research and Technology*, Suppl. 1(3): 28-58.
- "ANTHRALIN." National Psoriasis Foundation, Inc., Portland, Oregon, EEUU. 1990.
- ARROWSMITH M., HADGRAFT J., KELLAWAY I.W. 1983. "Thermodynamics of steroid partitioning in dimyristoylphosphatidylcholine liposomes." *Biochimica et Biophysica Acta*, 750: 149-156.
- BACHMANN D., BRANDL M., GREGORIADIS G. 1993. "Preparation of liposomes using a Mini-Lab 8.30 H high-pressure homogenizer." *International Journal of Pharmaceutics*, 91:69-74.
- BAMBA J., CAVÉ G., BENSOUDA Y., TCHORELOFF P., PUISIEUX F., COURRAZE G. 1998. "Cryoprotection of emulsions in freeze-drying: freezing process analysis." *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 21(15): 1749-1760.
- BANGHAM A.D., STANDISH M.M., WATKINS J.C. 1965. "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids." *Journal of Molecular Biology*, 13: 238-252.
- BAREL A.O., and CLARYS P. 1995a. "Comparison methods for measurement of transepidermal water loss." *Handbook of non-invasive methods and the skin*: 179-184. Serup J. & Jemec GBE., CRC Press Inc.
- BAREL A.O., and CLARYS P. 1995b. "Measurement of epidermal capacitance." *Handbook*

of non-invasive methods and the skin: 165-170. Serup J. & Jemec GBE., CRC Press Inc.

BARENHOLZ Y, GIBBES D., LITMAN B.J., GOLL J., THOMPSON T.E., CARLSON F.D. 1977. **"A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles."** *Biochemistry*, 16 (12): 2806-2810.

BATZRI S., KORN E. 1973. **"Single bilayer liposomes prepared without sonication."** *Biochimica et Biophysica Acta*, 298:1015-1019.

BERSET J.-D., KREBS A. 1990. **"Synthesis and characterization of new 10-acyl derivatives of the antipsoriatic agent dithranol: coupling products of dithranol with all-trans-retinoic acid, 13-cis-retinoic acid and an aromatic analogue of retinoic acid: all-trans-9-(4-methoxy-2, 3, 6-trimethylphenyl)-3, 7-dimethyl-nona-2, 4, 6, 8-tetraenoate."** *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 65(11): 290-297.

BERGENHOLTZ J. i WAGNER N.J. 1997. **"Self-diffusion in dispersions of charged colloidal spheres by generalized hydrodynamics."** *Physica A*, 235: 34-47.

BERLINER D., JENNINGS-WHITE C., LAVKER R.M. 1991. **"The human skin: fragrances and pheromones."** *Journal of Steroid Biochemical and Molecular Biology*, 39(4B):671-679.

BIRCHER A., DE BOER E.M., AGNER T., WAHLBERG J.E, SERUP J. 1994. **"Guidelines for measurement of cutaneous blood flow by laser Doppler flowmetry."** *Contact Dermatitis*, 30: 65-72.

BLUME G., CEVC G., CROMMELIN M.D.J.A., BAKKER-WOUDENBERG I.A.J.M., KLUFT C., STORM G. 1993. **"Specific targeting with poly(ethylene glycol)-modified liposomes: coupling of homing devices to the ends of the polymeric chains combines effective target binding with long circulation times."** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1149: 180-184.

BOCHOT A., FATTAL E., GULIK A., COURRAZE G., COUVREUR P. 1998. **"Liposomes dispersed within a thermosensitive gel: a new dosage form for ocular delivery of oligonucleotides."** *Pharmaceutical Research*, 15(9): 1364-1369.

BODDÉ H.E., PECHTOLD L.A.R.M., SUBNEL M.T.A., HAAN F.H.N. 1992. **"Monitoring in vivo skin hydration by liposomes using infrared spectroscopy in conjunction with tape stripping."** *Liposomes Dermatics*, 137-149. Editat per Braun-Falco O., Korting H.C., Mailbach H.I. Springer-Verlag. Berlin.

BONNEKOH B., TANZER H., SEIDEL M., GEISEL J., MERK H.F., MAHRLE G., WIEGREBE W. 1991. **"Structure-function relationship of new anthralin derivatives assayed for growth inhibition and cytotoxicity in human keratinocyte cultures."** *Archiv der Pharmazie (Weinheim)*, 324: 899-906.

BOSE B. i CHATTERJEE S.N. 1993. **"Effect of UV-A on the linolenic acid micelles."** *Radiation Research*, 133: 340-344.

BRANDL M., BACHMANN D., DRECHSLER M., BAUER K.H. 1990. **"Liposome preparation by a new high pressure homogenizer Gaulin Micron Lab 40."** *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 16(4): 2167-2191.

BRANDL M., GREGORIADIS G. 1994. **"Entrapment of haemoglobin into liposomes by the dehydration-rehydration method: vesicle characterization and in vivo behaviour."** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1196:65-75.

- BRANDL M., DRECHSLER M., BACHMANN D., TARDI C., SCHNIDTGEN M., BAUER K.H. 1998. "Preparation and characterization of semi-solid phospholipid dispersions and dilutions thereof." *International Journal of Pharmaceutics*, 170: 187-199.
- BUBOLTZ J.T., FEIGENSON G.W. 1999. "A novel strategy for the preparation of liposomes: rapid solvent exchange." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1417:232-245.
- CARBAJO J.M., CORTÉS A.M., SUÁREZ I. 1993. "Curso de formación continuada en dermofarmacía." *El Farmacéutico*, 127:73-78.
- CEVC G., BLUME G. 1992. "Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1104:226-232.
- CEVC G. 1995. "Material transport across permeability barriers by means of lipid vesicles." *Structure and Dynamics of Membranes*, 1A: 465-488. Lipowsky R, Sackmann E. Ed. Elsevier Science B.V. Amsterdam.
- CHAN S.Y., PO A.L.W. 1992. "Quantitative skin blanching assay of corticosteroid creams using tristimulus colour analysis." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 44: 371-378.
- CHAPMAN D. 1993. "Lipid phase transitions." *Biomembranes. Physical Aspects*. Editat per Shinitzky M. Editorial VCH. Weinheim.
- CHIOU J.-S., KUO C.-C. LIN S.H., KAMAYA H., UEDA I. 1991. "Interfacial dehydration by alcohol: hydrogen bonding of alcohols to phospholipids." *Alcohol*, 8: 143-150.
- CHIOU J.-S., KRISHNA P.R., KAMAYA H., UEDA I. 1992. "Alcohols dehydrate lipid membranes: an infrared study on hydrogen bonding." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1110: 225-233.
- CHOI M.J., HAN H.S., KIM H. 1992. "pH-Sensitive liposomes containing polymerized phosphatidylethanolamine and fatty acid." *Journal of Biochemistry*, 112: 694-699.
- COHEN E.G.D., VERBERG R., DE SCHEPPER I.M. 1998. "Viscosity and diffusion in hard-sphere-like colloidal suspensions." *Physica A*, 251: 251-265.
- COLLINS D., LITZINGER D., HUANG L. 1990. "Structural and functional comparisons of pH-sensitive liposomes composed of phosphatidylethanolamine and three different diacylsuccinylglycerols." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1025:234-242.
- CORNELL B.A., MIDDLEHURST J., SEPAROVIC F. 1980. "The molecular packing and stability within highly curved phospholipid bilayers." *Biochimica et Biophysica Acta*, 598: 405-410.
- CORTESI R., ESPOSITO E., GAMBARIN S., TELLOLI P., MENEGATTI E., NASTRUZZI C. 1999. "Preparation of liposomes by reverse-phase evaporation using alternative organic solvents." *Journal of Microencapsulation*, 16(2):251-256.
- CROMMELIN D.J.A., GRIT M., TALSMA H., ZUIDAM N.J. 1994. "Liposomes as carriers for drugs and antigens: approaches to preserve their long term stability." *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 20(4): 547-556.
- CROWE J.H., CROWE L.M., CHAPMAN D. 1984. "Preservation of membranes in

anhydrobiotic organisms: the role of trehalose." *Science*, 223: 701-703.

CROWE L.M., CROWE J.H. 1991. **"Stabilization of dry liposomes by carbohydrates."** *Development of Biological Standard*, 74: 285-294.(International Symposium on Biological Product Freeze-Drying and Formulation. Bethesda, USA, 1990)

DAHIM M., GUSTAFSON J., PUISIEUX F., OLLIVON M. 1998. **"Solubilization of phospholipid/triacylglycerol aggregates by non-ionic surfactants."** *Chemistry and Physics of Lipids*, 97: 1-14.

DELNEUVILLE I., DECHESNE J.P., DELATTRE L. 1998. **"Preparation and study of the characteristics of dithranol:polyvinylpyrrolidone coevaporates."** *International Journal of Pharmaceutics*, 168: 109-118.

DE LA MAZA A., CODERCH L., MANICH A.M., MARTÍ M., SERRA S., PARRA J.L. 1998. **"Optimization of a wool dyeing process using a azoic 1:2 metal complex dye by means of commercially available liposomas."** *Textile Research Journal*, 68: 635-642.

DE LUCA M., ROCHA-FILHO P., GROSSIORD J.L., RABARON A., VAUTION C., SEILLER M. 1991. **"Les émulsions multiples."** *International Journal of Cosmetic Science*, 13:1-21. (REVIEW).

DEMEL R.A., DOREPAAL E., EBSKAMP M.J.M., SMEEKENS J.C.M., DE KRUIJFF B. 1998. **"Fructans interact strongly with model membranes."** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1375: 36-42.

DEMING S.N., MORGAN S.L. 1987. **"Experimental design: a chemometric approach."** *Data Handling in Science and Technology*, vol 3. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.

DITTMER J.C., LESTER R.C. 1964. **"A simple specific spray for detection of phospholipids on thin layer chromatograms."** *Journal of Lipid Research*, 5: 149-172.

DUEÑAS P., LAGUNAS T., SABÉS M. 1997. **European Patent Application. Application number 97100166.4-2113.**

DUTEIL L., QUEILLE C., PONCET M., ORTONNE J.P., CZERNIELEWSKI J. 1990. **"Objective assessment of topical corticosteroids and non-steroidal anti-inflammatory drugs in methyl-nicotinate-induced skin inflammation."** *Clinical and Experimental Dermatology*, 15: 195-199.

EGBARIA K., WEINER N. 1990. **"Liposomes as a topical drug delivery system."** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 5: 287-300.(REVIEW).

ELIAS P.M. 1992. **"Percutaneous Absorption."** *Pharmacology of the skin*. Editat per Hasan Mukhtar. CRC Presss, Inc. Boca Ratón (EEUU).

ESPOSITO E., ZANELLA C., CORTESI R., MENEGATTI E., NASTRUZZI C. 1998. **"Influence of liposomal formulation parameters on the in vitro absorption of methyl nicotinate."** *International Journal of Pharmaceutics*, 172: 255-260.

FÉRÉZOU J., LAI N.-T., LERAY C., HAJRI T., FREY A., CABARET Y., COURTIEU J., LUTTON C., BACH A. 1994. **"Lipid composition and structure of commercial parenteral emulsions."** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1213: 149-158.

FILDES F.J.T., OLIVER J.E. 1978. **"Interaction of cortisol-21-palmitate with liosomes**

examined by differential scanning calorimetry." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 30: 337-342.

FORTIN A., SHAHUM E., KRZYSTYNIAK K., THÉRIEN H.M. 1996. "Differential activation of cell-mediated immune functions by encapsulated and surface-linked liposomal antigens." *Cellular immunology*, 169:208-217.

FRUTTERO R., CARON G., FORNATTO E., BOSCHI D., ERMONDI G., GASCO A., CARRUPT P.-A., TESTA B. 1998. "Mechanisms of liposomes/water partitioning of (p-methylbenzyl)alkylamines." *Pharmaceutical Research*, 15(9): 1407-1413.

FUJISAWA S., KADOMA Y., KOMODA Y. 1989. "Nuclear magnetic resonance spectroscopic studies of the interaction of methyl methacrylate and ethylene dimethacrylate with phosphatidylcholine liposomes as a model for biomembranes." *Biomaterials*, 10: 51-55.

GABRIJELCIC V., SENTJURC M. 1995. "Influence of hydrogels on liposome stability and on the transport of liposome entrapped substances into skin." *International Journal of Pharmaceutics*, 118: 207-212.

GABRIJELCIC V., SENTJURC M., SCHARA M. 1994. "The measurement of liposome entrapped molecules' penetration into the skin: A 1D-EPR and EPR kinetic imaging study." *International Journal of Pharmaceutics*, 102: 151-158.

GARBOW N., MÜLLER J., SCHÄTZEL K., PALBERG T. 1997. "High-resolution particle sizing by optical tracking of single colloidal particles." *Physica A*, 235: 291-305.

GEHRING W., GHYCZY M., GLOOR M., SCHEER T., RÖDING J. 1992. "Enhancement of the penetration of dithranol and increase of effect of dithranol on the skin by liposomes." *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, 42(II), 7: 983-985.

GENNIS R.B. 1989. "Biomembranes. Molecular structure and function." Editat per Cantor Ch. R. Springer-Verlag. New York.

GIDDINGS J.C. 1993. "Field-flow fractionation: analysis of macromolecular, colloidal, and particulate materials." *Science*, 260: 1456-1465.

GOLDEN G.A., RUBIN R.T., MASON R.P. 1998. "Steroid hormones partition to distinct sites in a model membrane bilayer: direct demonstration by small-angle X-Ray diffraction." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1368: 161-166.

GOSH P. i SINGH U.N. 1992. "Liposomes shrinkage and swelling under osmotic-diffusional stress: evaluation of kinetic parameters from spectrophotometric measurements." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1110: 88-96.

GREGORIADIS G. 1995. "Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems." *Trends in Biotechnology*, 13:527-537.(REVIEW).

GREGORIADIS G., GURSEL I., GURSEL M., McCORMACK B. 1996. "Liposomes as immunological adjuvants and vaccine carriers." *Journal of Controlled Release*, 41:49-56.

GRIT M., CROMMELIN D.J.A. 1992. "The effect of aging in the physical stability of liposome dispersions." *Chemistry and Physics of Lipids*, 62: 113-122.

GRIT M., ZUIDAM N.J., UNDERBERG W.J.M., CROMMELIN D.J.A. 1993a. "Hydrolysis of

partially saturated egg phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions and the effect of cholesterol incorporation on hydrolysis kinetics." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 45: 490-495.

GRIT M., CROMMELIN D.J.A. 1993b. "The effect of surface charge on the hydrolysis kinetic of partially hydrogenated egg phosphatidylcholine and egg phosphatidylglycerol in aqueous liposome dispersions." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1167: 49-55.

GRONBECH-JENSEN N., BEARDMORE K.M., PINCUS P. 1998. "Interactions between charged spheres in divalent counterion solution." *Physica A*, 261: 74-81.

GUESSANT C., MARTY J.-P., DUPONT CH. 1993. "Evaluation de la barrière cutanée chez l'homme par deux méthodes non-invasives (vélocimétrie laser Doppler et chromamétrie)." *International Journal of Cosmetics Science*, 15: 89-99.

GULATI M., GROVER M., SINGH S., SINGH M. 1998. "Lipophilic drug derivatives in liposomes." *International Journal of Pharmaceutics*, 165: 129-168. (REVIEW).

GURR I., HARWORD J.C. 1991. "Lipid Biochemistry." Editorial Chapman & Hall. Londres.

HAMILTON J.A. 1989. "Interaction of triglycerides with phospholipids: Incorporation into bilayer structure and formation of emulsions." *Biochemistry*, 28: 2514-2520.

HARASHIMA H., HIRAIW A T., OCHI Y., KIWADA H. 1995. "Size dependent liposomes degradation in boold: *in vivo/in vitro* correlation by kinetic modeling." *Journal of Drug Targeting*, 3:253-261.

HARLETT F.R., WATTON J., KRYGSMAN P. 1991. "Vesicle sizing." *Biophysical Journal*, 59: 357-362.

HARRIGAN P.R., MADDEN T.D., CULLIS P.R. 1990. "Protection of liposomes during dehydration or freezing." *Chemistry and Physics of Lipids*, 52: 139-149.

HARRIS D.A., BASHFORD C.L. 1987. "Spectrophotometry and Spectrofluorimetry, a practica approach." IRL Press. Oxford.

HARRIS D.R. 1998. "Old wine in new bottles: the revival of anthralin." *Cutis*, 62(4): 201-203.

HARVIE P., WONG F.M.P., BALLY M. 1998. "Characterization of lipid DNA interactions. I. Destabilization of bound lipids and DNA dissociation." *Biophysical Journal*, 75:1040-1051.

HAZEMOTO N., HARADA M., SUZUKI S., KAIHO F., HAGA M., KATO Y. 1993. "Effect of phosphatidylcholine and cholesterol on pH-sensitive liposomes." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 41(6):1003-1006.

HOFLAND H.E.J., BOUWSTRA J.A., BODDÉ H.E., SPIES F., JUNGINGER H.E. 1995. "Interactions between liosomes and human stratum corneum in vitro: freeze fracture electron microscopical visualization and small angle X-ray scattering studies." *British Journal of Dermatology*, 132: 853-866.

ISELE U., VAN HOOGEVEST P., HILFIKER R., CAPRARO H.-G., SCHIEWECK K., LEUENBERGER H. 1994. "Large-scale production of liposomes containing monomeric zinc phthalocyanine by controlled dilution of organic solvents." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(11): 1608-1616.

JIN R.J., HUSTER D., GAWRISCH K., NOSSAL R. 1999. "Light scattering characterization of extruded lipid vesicles." *European Biophysical Journal*, 28: 187-199.

KAN P., CHEN Z.-B., LEE C.-J., CHU I.M. 1999. "Development of nonionic surfactant/phospholipid o/w emulsion as a paclitaxel delivery system." *Journal of Controlled Release*, 58: 271-278.

KAWAKAMI K., NISHIARA Y., HIRANO K. 1999. "Determination of the entrapped volume of liposomes: dilution method." *Analytical Biochemistry*, 269: 139-142.

KLEIN R.A. 1970. "The detection of oxidation in liposome preparation." *Biochimica et Biophysica Acta*, 210: 486-489.

KÖLCHENS S., RAMASWAMI V., BIRGENHEIER J., NETT L., O'BRIEN D.F. 1993. "Quasi-elastic light scattering determination of the size distribution of extruded vesicles." *Chemistry and Physics of Lipids*, 65: 1-10.

KOMATSU H., OKADA S. 1995. "Increased permeability of phase-separated liposomal membranes with mixtures of ethanol-induced interdigitated and non-interdigitated structures." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1237: 169-175.

KORGEL B.A., VAN ZANTEM J.H., MONBOUQUETTE H.G. 1998. "Vesicle size distributions measured by flow field-flow fractionation coupled with multiangle light scattering." *Biophysical Journal*, 74: 3264-3272.

KRETSCHMAR M., NICHTERLEIN T., HANNAK D., HOF H. 1996. "Effects of amphotericin B incorporated into liposomes and in lipid suspensions in the treatment of murine candidiasis." *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, 46(II):711-715.

KUEMPEL D., SWARTZENDRUBER D.C., SQUIER Ch.A., WERTZ P.W. 1998. "In vitro reconstruction of stratum corneum lipid lamellae." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1372: 135-140.

KUKSIS A. 1992. "Yolk lipids." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1124:205-222. (REVIEW).

KULKARNI S.B., BETAGERI G.V., SINGH M. 1995. "Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes." *Journal of Microencapsulation*, 12(3):229-246.(REVIEW).

KÜHN-VELTEN W.N., KEMPFLE M.A. 1993. "Characterization of the hydrophobic interaction of steroids with endoplasmic reticulum membranes by quenching of 6,8(14)-bisdehydro-17 α -hydroxyprogesterone fluorescence." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1145: 185-190.

LAMPRECHT A., UBRICH N., HOMBREIRO PÉREZ M., LEHR C.-M., HOFFMAN M., MAINCENT P. 1999. "Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization-emulsification." *International Journal of Pharmaceutics*, 184: 97-105.

LANDI L., CABRINI L., FIORENTINI D., STEFANELLI C., PEDULLI G.F. 1992. "The antioxidant activity of ubiquinol-3 in homogeneous solution and in liposomes." *Chemistry and Physics of Lipids*, 61: 121-130.

LANG J.K. i VIGO-PELFREY C. 1993. "Quality control of liposomal lipids with special emphasis on peroxidation of phospholipids and cholesterol." *Chemistry and Physics of Lipids*, 64: 19-29.

LASCH J., WOHLRAB W. 1986. "Liposome-bound cortisol: A new approach to cutaneous therapy." *Biomedical et Biochimica Acta*, 45(10): 1295-1299.

LASIC D.D. 1993. "Liposomes, from physics to applications." Elsevier Science B.V. Amsterdam.

LASIC D.D. 1996. "Doxorubicin in sterically stabilized liposomes." *Nature*, 380: 561-562.

LASIC D.D. 1998. "Novel applications of liposomes." *Trends in Biotechnology*, 16(7): 307-321. (REVIEW).

LEIGH S. 1985. **European Patent Application. Application number 85301602.0.**

LEOPOLD C.S., LIPPOLD B.C. 1995. "An attempt to clarify the mechanism of the penetration enhancing effects of lipophilic vehicles with differential scanning calorimetry (DSC)." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 47: 276-281.

LEVENE P.A., ROLF I.P. 1921. "Structure and significance of the phosphatides." *Physiological Reviews*, 1(3): 327-393. (REVIEW).

LEVEQUE J.C. 1989. "Cutaneous investigation in health and disease." Marcel Dekker Inc.

LIDGATE D., TRATTNER T., SHULZ R., MASKIEWICZ R. 1992. "Sterile filtration of a parenteral emulsion." *Pharmaceutical Research*, 9(7):860-863.

LINDAHL A. 1992. "Embedding of dithranol in lipid crystals." *Acta Dermato-Venereologica* (Stockh), Suppl. 172: 13-16. (Nordic Dithranol Symposium, Sep. 12-13, 1991).

MA L., RAMACHANDRAN C., WEINER N.D. 1991. "Partitioning of a homologous series of alkyl p-aminobenzoates in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes: effect of liposome type." *International Journal of Pharmaceutics*, 77: 127-140.

MAHRLE G., BONNEKOH B., GHYCZY M., WIEGREBE W. 1991. "Stability of anthralin in liposomal phospholipids." *Archives of Dermatological Research*, 283: 483-484.

MAITANI Y., HAZAMA M., TOJO Y., SHIMODA N., NAGAI T. 1996. "Oral administratios of recombinant human erythropoietin in liposomes in rats: Influence of lipid composition and size of liposomes on bioavailability." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(4):440-445.

MAMAN N., BRAULT D. 1998. "Kinetics of the interactions of a dicarboxylic porphyrin with unilamellar lipidic vesicles: interplay between bilayer thickness and pH in rate control." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1414: 31-42.

MANIBHAI PATEL H. 1985. **UK Patent Application. GB 2.143.433A.**

MAYHEW E., LAZO R., VAIL W.J., KING J., GREEN A.M. 1984. "Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier." *Biochimica et Biophysica Acta*, 775:169-174.

McELRATH M.J. 1995. "Selection of potent immunological adjuvants for vaccine construction." *Cancer Biology*, 6:375-385.

MEUNIER-DURMORT C., FERRY N., HAINQUE B., DELATTRE J., FOREST C. 1996. "Efficient transfeer of regulated genes in adipocytes and hepatoma cells by the combination of liposomes and replication-deficient adenovirus." *European Journal of Biochemistry*, 237:660-

667.

MICHEL C., PURMANN T., MENTRUP E., SEILLER E., KREUTER J. 1992. "Effect of liposomes on percutaneous penetration of lipophilic materials." *International Journal of Pharmaceutics*, 84: 93-105.

MILLER K.W., SMALL D. 1982. "The phase behavior of triolein, cholesterol, and lecithin emulsions." *Journal of Colloid and Interface Science*, 89(2): 466-478.

MISÍK V., SVAJDLENKA E., FILÍPEK J., GERGEL D., ONDRIAS K. 1991. "Inhibition of lipid peroxidation of lecithin liposomes kept in a pH-stat system near neutral pH." *Free Radical Research Communications*, 15(3): 159-165.

MISÍK V., GERGEL D., ONDRIAS K. 1992. "Dependence of peroxidation of lipid liposomes on buffer composition." *Pharmazie*, 47: 64-65.

MISSO N.L.A., JONES G.P., PALEG L.G. 1986. "Effects of phospholipid oxidation on the indole-3-acetic-acid-facilitated transport of Pr^{3+} ions into phosphatidylcholine vesicles." *Biochimica et Biophysica Acta*, 861: 1-8.

MOON M.H., PARK I., KIM Y. 1998. "Size characterization of liposomes by flow field-flow fractionation and photon correlation spectroscopy. Effect of ionic strength and pH of carrier solutions." *Journal of Chromatography A*, 813: 91-100.

MORI A., KENNEL S.J., HUANG L. 1993. "Immunotargeting of liposomes containing lipophilic antitumor prodrugs." *Pharmaceutical Research*, 10(4): 507-514.

MUI B.L.S., CULLIS P., EVANS E.A., MADDEN T.D. 1993 "Osmotic properties of large unilamellar vesicles prepared by extrusion." *Biophysical Journal*, 64: 443-453.

MÜLLER K., SCHUSTER A. 1990. "Solubilization of multilamellar liposomes of egg yolk lecithin by the bile salt sodiumtaurodeoxycholate and the effect of cholesterol - a rapid-ultrafiltrations study." *Chemistry and Physics of Lipids*, 52:111-127.

MÜLLER K. 1997a. "Antipsoriatic and proinflammatory action of anthralin." *Biochemical Pharmacology*, 53: 1215-1221.

MÜLLER K., PRINZ H., GAWLIK I., ZIEREIS K., HUANG H.-S. 1997b. "Simple analogues of anthralin: unusual specificity of structure and antiproliferative activity." *Journal of Medicinal Chemistry*, 40(23): 3773-3780.

NAGASE H., UEDA H., NAKAGAKI M. 1998. "Temperature change of the lamellar structure of DPPC/disaccharide/water systems with low water content." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1371: 223-231.

NEW R.R.C. 1990. "Liposomes, a practical approach." Oxford University Press.

OESTMAN E., LAURIJSEN A.P., HERMANS J., PONEC M. 1993. "Skin barrier function in healthy volunteers as assessed by transepidermal water loss and vascular response to hexyl nicotinate: intra- and inter-individual variability." *British Journal of Dermatology*, 128: 130-136.

OSTROWSKY N. 1993. "Liposome size measurements by photon correlation spectroscopy." *Chemistry and Physics of Lipids*, 64: 45-56.

PENNEYS N. S. 1992. "Animal models for testing topical corticosteroid potency: a review and some suggested new approaches." *International Journal of Dermatology*, Suppl. 1: 6-8.

PERKINS W.R., MINCHEY S.R., AHL P.L., JANOFF A.S. 1993. "The determination of liposome captured volume." *Chemistry and Physics of Lipids*, 64: 197-217.

PERRET S., GOLDING M., WILLIAMS W.P. 1991. "A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications -Characterizations of the liposomes." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 43 (3): 154-161.

PETELIN M., SENTJURC M., STOLIC Z., SKALERIC U. 1998. "EPR study of mucoadhesive ointments for delivery of liposomes into the oral mucosa." *International Journal of Pharmaceutics*, 173: 193-202.

PIDGEON CH., MCNEELY S. 1987. "Multilayered vesicles prepared by reverse-phase evaporation: liposome structure and optimum solute entrapment." *Biochemistry*. 26(1): 17-29.

PINNADUWAGE P., SCHMITT L., HUANG L. 1989. "Use of quaternary ammonium detergent in liposomes mediated DNA transfection of mouse L-cells." *Biochimica et Biophysica Acta*, 985:33-37.

PINNAGODA J. 1995. "Measurement of the transepidermal water loss." *Handbook of non-invasive methods and the skin: 173-178*. Serup J. & Jemec GBE., CRC Press Inc.

PLANAS M.E., GONZALEZ P., RODRIGUEZ L., SANCHEZ S., CEVC G. 1992. "Noninvasive percutaneous induction of topical analgesia by a new type of drug carrier, and prolongation of local pain insensitivity by anesthetic liposomes." *Anesth Analg*, 75: 615-621.

PONS M., FORADADA M., ESTELRICH J. 1993. "Liposomes obtained by the ethanol injection method." *International Journal of Pharmaceutics*, 95:51-56.

POTTS R.O., BOMMANNAN D.B., GUY R.H. 1992. "Percutaneous Absorption." *Pharmacology of the skin*. Editat per Hasan Mukhtar. CRC Presss, Inc. Boca Ratón (EEUU).

PRINS M., SWINKELS O.Q.J., KOLKMAN E.G.W., WUIS E.W., HEKSTER Y.A., VAN DER VALK P.G.M. 1998. "A blind study to asses the role of the cream formulation." *Acta Dermato-Venereologica (Stockh)*, 78: 262-265.

PUSEY P.N., SEGRÈ P.N., BEHREND O.P., MEEKER S.P., POON W.C.K. 1997. "Dynamics of concentrated colloidal suspensions." *Physica A*, 235: 1-8.

REDDEN P.R., HUANG Y.S., LIN X., HORROBIN D.F. 1995. "Separation and quantification of the triacylglycerols in evening primrose and borage oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography." *Journal of Chromatography A*, 694:381-389.

REDZINIAK G., MEYBECK A. 1985. *Production of pulvulent mixtures of lipidic and hydrophobic constituents*. United States Patent. Patent number 4.508,703.

REGNAULT C., BENOIST C., FESSI H., ROCH-ARVEILLER M., POSTAIRE E., HAZEBROUCQ G. 1996. "Preparation of superoxide dismutase entrapped in ceramide-containing liposomes for oral administration." *International Journal of Pharmaceutics*, 132:263-266.

RIETSCHER R.L., SPENCER T.S. 1990. "Methods for cutaneous investigation." Marcel

Dekker Inc.

RITTIROD T., HATANAKA T., KAGAMI N., KATAYAMA K., KOIZUMI T. 1999. "Simultaneous transport and metabolism of nicotinic acid derivatives in hairless mouse skin." *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 22(3): 305-309.

ROTENBERG M., RUBIN M., BOR A., MEYUHAS D., TALMON Y., LICHTENBERG D. 1991. "Physico-chemical characterization of Intralipid™ emulsions." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1086:265-272.

SACKMANN E. 1985. "Physical foundations of the molecular organization and dynamics of membranes." *Biophysics*, 425-465. Editat per Hoope W., Lohmann W., Markl H. i Ziegler H. Springer-Verlag. Berlin.

SANDERS II CH.R., SCHAFF J.E., PRESTEGARD J.H. 1993. "Orientation behavior of phosphatidylcholine bilayers in the presence of aromatic amphiphiles and a magnetic field." *Biophysical Journal*, 64: 1069-1080.

SCHNEIDER T., SACHSEE., RÖBLING G., BRANDL M. 1994. "Large-Scale production of liposomes of defined size by a new continuous high pressure extrusion device." *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 20(18):2787-2807.

SCHNEIDER T., SACHSEE., RÖBLING G., BRANDL M. 1995. "Generation of contrast-carrying liposomes of defined size with a new continuous high pressure extrusion method." *International Journal of Pharmaceutics*, 117:1-12.

SCHREIER H., MOBLEY W.C., CONCESSIO N., HICKEY A.J., NIVEN R.W. 1994a. "Formulation and in vitro performance of liposome powder aerosols." *S.T.P. Pharma Sciences*, 4(1):38-44.

SCHREIER H., BOUWSTRA J. 1994b. "Liposomes and niosomes as topical drug carriers: dermal and transdermal drug delivery." *Journal of Controlled Release*, 30: 1-15.(REVIEW).

SCHULLERY S.E., SCHMIDT C.F., FELGNER P., TILLACK T.W., THOMPSON T.E. 1980. "Fusion of dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles." *Biochemistry*, 19: 3919-3923.

SEGRÈ P.N., MEEKER S.P., PUSEY P.N., POON W.C.K. 1995. "Viscosity and Structural relaxation in suspensions of hard-sphere colloids." *Physical Review Letters*, 75(5): 958-961.

SERUP J., JEMEC J.B.E. 1995. "Handbook of non-invasive methods." C.R.C. Pres. Inc.

SHAW I.H., KNIGHT C.G., DINGLE J.T. 1976. "Liposomal retention of a modified anti-inflammatory steroid." *Biochemical Journal*, 158: 473-476.

SHORT S.M., PAASCH B.D., TURNER J.H., WEINER N., DAUGHERTY A.L., MRSNY R.J. 1996. "Percutaneous absorption of biologically-active interferon-gamma in a human skin graft-nude mouse model." *Pharmaceutical Research*, 13(7): 1020-1027.

SIKKEMA J., BONT J.A.M., POOLMAN B. 1994. "Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes." *Journal of Biological Chemistry*, 269(11): 8022-8028.

SJÖSTRÖM B., BERGENSTAHL B. 1992. "Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions. I Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate." *International Journal of Pharmaceutics*, 84:107-116.

SJÖSTRÖM B., WESTESEN K., BERGENSTAHL B. 1993. "Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions. II Characterization of cholesteryl acetate particles." *International Journal of Pharmaceutics*, 94:89-101.

SKALKO N., CAJKOVAC M., JALSENJAK I. 1998. "Liposomes with metronidazole for topical use: the choice of preparation method and vehicle." *Journal of Liposome Research*, 8(2): 283-293.

SLATER J.C., HUANG CH. 1992. "Lipid bilayer interdigitation." *The Structure of Biological Membranes*. Edited by Yeagle Ph. CRC Press. Boca Raton. (EEUU).

SONG Y.K., LIU D. 1998. "Free liposomes enhance the transfection activity of DNA/lipid complexes *in vivo* by intravenous administration." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1372: 141-150.

STEIN J., SMITH G. 1982. "Techniques in lipid and membrane biochemistry. Part I. Phospholipids." Elsevier/North-Holland Scientific Publishers Ltd.

STEWART J.C.M. 1980. "Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate." *Analytical Biochemistry*, 104: 10-14.

SURBER C., ITIN P.H., BIRCHER A.J. 1995. "Topical corticosteroids." *Journal of the American Academy of Dermatology*, 32: 1025-1030.

SWIENIEK R.J. Juny 1990. " 'Microfluidizing' technology enhances emulsion stability." *Food Processing*.

SZEBENI J., FONTANA J.L., WASSEF N.M., MONGAN P.D., MORSE D.S., DOBBINS D.E., STAHL G.L., BÜNGER R., ALVING C.R. 1999. "Hemodynamic changes induced by liposomes and liposome-encapsulated hemoglobin in pigs." *Circulation*, 99(17): 2302-2309.

SZOKA F., PAPAHDJOPOULOS D. 1978. "Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation." *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 75: 4194-4198.

TADROS T.F. 1992. "Future developments in cosmetic formulations." *International Journal of Cosmetic Science*, 14:93-111.(REVIEW).

TAGAMI H. 1994. "Quantitative measurements of water concentration of the stratum corneum *in vivo* by high-frequency current." *Acta Dermato-Venereologica (Stockh)*, Suppl. 185: 29-53.

TAGAMI H. 1995. "Measurement of electrical conductance and impedance." *Handbook of non-invasive methods and the skin*: 159-164. Serup J. & Jemec GBE., CRC Press Inc.

TAHARA Y., FUJIYOSHI Y. 1994. "A new method to measure bilayer thickness: Cryo-electron microscopy of frozen hydrated liposomes and image simulation." *Micron*, 25(2): 141-149.

TALSMA H., ÖZER A.Y., VAN BLOOIS L., CROMMELIN D.J.A. 1989. "The size reduction of liposomes with a high pressure homogenizer (Microfluidizer™). Characterization of prepared dispersions and comparison with conventional methods." *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 15(2): 197-207.

- TALSMA H., VAN STEENBERGEN M.J., BORCHERT J.C.H., COMMELIN J.A. 1994. "A novel technique for the one-step preparation of liposomes and nonionic surfactant vesicles without the use of organic solvents. Liposome formation in a continuous gas stream: the 'Bubble' method." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(3): 276-280.
- TANAKA S., TAKASHIMA Y., TSUNODA K., TAKAHASHI M., YAMAGUCHI H., TSUCHIYA S. 1986. "Physicochemical properties and solubility of hydrocortisone butyrate propionate." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 34(3): 1235-1241.
- TAÜBER U. 1994. "Dermatocorticosteroids: structure, activity, pharmacokinetics." *European Journal of Dermatology*, 4: 419-429.
- THÉRIEN H.M., SHAHUM E. 1996. "Differential biodistribution of encapsulated and surface-linked liposomal antigens." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1280:91-97.
- TORCHILIN V.P. Juny 1996. "Liposomes as delivery agents for medical imaging." *Molecular Medicine Today*, 242-249.(REVIEW).
- TORRES J. 1998. Comunicació personal. (Departament de Bioquímica, Cambridge, Anglaterra).
- TOUITOU E., ALHAIQUE F., DAYAN N., RICCIERI F., LEVI-SCHAFFER F. 1994. "Caffeine liposomal systems for topical use: preparation, characterization, and skin permeation behavior." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(9):1189-1192.
- TRAINER M.N., FREUD P.J., LEONARDO E.M. 1992. "High-concentration submicron particle size distribution by dynamic light scattering." *American Laboratory*, 37:34-39.
- TRUBETSKOY V.S., TORCHILIN V.P. 1996. "Polyethyleneglycol based micelles as carriers of therapeutic and diagnostic agents." *S.T.P. Pharma Sciences*, 6(1):79-86.
- TURÁNEK J. 1994. "Fast-protein liquid chromatography system as a tool for liposome preparation by the extrusion procedure." *Analytical Biochemistry*, 218 (2): 352-357.
- UNGER E., FRITZ TH., SHEN D.K., LUND P., SAHN D., RAMASWAMI R., MATSUNAGA T., YELLOWHAIR D., KULIK B. 1994. "Gas filled lipid bilayers as imaging contrast agents." *Journal of Liposome Research*, 4(2): 861-874.
- VAN DEN BERGH B.A.I., SALOMONS-DE VRIES I., BOUWSTRA J.A. 1998. "Interactions between liposomes and human stratum corneum studied by freeze-substitution electron microscopy." *International Journal of Pharmaceutics*, 167: 57-67.
- VAN DER VLEUTEN M., GERRITSEN M.J.P., DE JONG E.M.G.J., ELBERS M., DE JONGH G.J., VAN DE KERKHOF. 1996. "Novel dithranol formulation (Micanol): the effects of monotherapy and UVB combination therapy on epidermal differentiation, proliferation and cutaneous inflammation in psoriasis vulgaris." *Acta Dermato-Venereologica (Stockh)*, 76: 387-391.
- VAN HAL D.A., BOWSTRA J.A., JUNGINGER H.E. 1992. "Preparation and characterization of a new dermal dosage-form for the antipsoriatic drug dithranol, based on non-ionic surfactant vesicles." *European Journal of Pharmacy and Biopharmacology*, 38(2), 47S.
- VAN KUIJK-MEUWISSEN M.E.M.J., JUNGINGER H.E., BOUWSTRA J.A. 1998. "Interactions between liposomes and human skin in vitro, a confocal laser scanning microscopy study." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1371:31-39.

VEMURI S., YU CH-D., PUSHPALA S., ROOSDORP N. 1991. "Drug release rate method for a liposome preparation." *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 17(2):183-192.

VIVIANI M.A., RIZZARDINI G., TORTORANO A.M., FASAN M., CAPETTI A., ROVERSELLI A.M., GRINGERI A., SUTER F. 1994. "Lipid-based amphotericin B in the treatment of cryptococcosis." *Infection*, 22:137-142.

WARANUCH N., RAMACHANDRAN CH., WEINER N.D. 1999. "Controlled topical delivery of hydrocortisone and manitol via select pathways." *Journal of Liposome Research*, 9(1): 139-153.

WEBB M.S., SAXON D., WONG F.M.P., LIM H.J., WANG Z., BALLY M.B., CHOI L.S.L., CULLIS P.R., MAYER L.D. 1998. "Comparison of different hydrophobic anchors conjugated to poly(ethylene glycol): effects on the pharmacokinetics of liposomal vincristine." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1372: 272-282.

WEINER N.D., RAMACHANDRAN C., LIEB L.M. EGBARIA K. 1994. "Deposition of liposomally associated substances in the skin strata and pilosebaceous structures." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(9): 1196-1199.

WIEGREBE W., MÜLLER K. 1995. "Treatment of psoriasis with anthrones-chemical principles, biochemical aspects, and approaches to the design of novel derivatives." *Skin Pharmacology*, 8: 1-24.

WILKINSON J.B. 1973. "Harry's cosmeticology." Leonard Hill Books. Int.Text book C.L. Londres.

WOHLRAB W., LASCH J. 1987. "Penetration kinetics of liposomal hydrocortisone in human skin." *Dermatologica*, 174: 18-22.

WOHLRAB W., LASCH J., LAUB R., TAUBE C.M., WELLNER K. 1992. "Distribution of liposome-encapsulated ingredients in human skin ex vivo." *Liposomes Dermatics*, 215-225. Editat per Braun-Falco O., Korting H.C., Mailbach H.I. Springer-Verlag. Berlin.

WOODBURY R., KLIGMAN A.M. 1992. "The hairless mouse model for assaying the atrophogenicity of topical corticosteroids." *Acta Dermato-Venereologica* (Stockh), 72: 403-406.

WOODLE M.C., LASIC D.D. 1992. "Sterically stabilized liposomes." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1113: 171-199. (REVIEW).

WONG M., ANTHONY F.H., TILLACK T.W., THOMPSON T.E. 1982. "Fusion of dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles at 4°C." *Biochemistry*, 21: 4126-4132.

YAMAMOTO Y., NIKI E., KAMIYA Y., SHIMASAKI H. 1984. "Oxidation of phosphatidylcholines in homogeneous solution and in water dispersion." *Biochimica et Biophysica Acta*, 795: 332-340.

YAROSH D., BUCANA C., COX P., ALAS L., KIBITEL J., KRIPKE M. 1994. "Localization of liposomes containing a DNA repair enzyme in murine skin." *The Journal of Investigative Dermatology*, 103(4): 461-468.

YOSHIKAWA W., AKUTSU H., KYOGOKU Y. 1983. "Light-scattering properties of osmotically active liposomes." *Biochimica et Biophysica Acta*, 735: 397-406.

ZEEVI A., KLANG S., ALARD V., BROSSARD F., BENITA S. 1994. "The design and characterization of a positively charged submicron emulsion containing a sunscreen agent." *International Journal of Pharmaceutics*, 108: 57-68.

ZELLMER S., PFEIL W., LASCH J. 1995. "Interaction of phosphatidylcholine liosomes with the human stratum corneum." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1237: 176-182.

ZUIDAM N., LEE S.S.L., CROMMELIN D.J.A. 1993. "Sterilization of liposomes by heat treatment." *Pharmaceutical Research*, 10(11): 1591-1596.

ZUIDAM N., VERSLUIS C., VERNOOY E.A.A.M., CROMMELIN D.J.A. 1996. "Gamma-irradiation of liposomes composed of saturated phospholipids. Effect of bilayer composition, size, concentration and absorbed dose on chemical degradation and physical destabilization of liposomes." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1280: 135-148.

8. ANNEXES

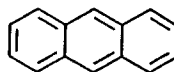
ANNEXE A / Abreviacions.

Ampl:	desviació standard de la distribució de diàmetres d'una població de liposomes (Ap. 3.1.2.8)
<i>d</i> :	quocient entre el diàmetre mitjà expressat en percentatge en número i expressat en percentatge en volum (Ap. 5.1.4, Eq. 22).
DA:	dantrona.
Diam:	diàmetre mitjà d'una població de liposomes.
DMPC:	dimiristoilfosfatidilcolina.
DO:	densitat òptica.
DPPC:	dipalmitoilfosfatidilcolina.
DT:	ditranol (o antralina).
ECF:	espectroscòpia de correlació fotònica.
EPC:	fosfatidilcolina d'ou.
HBP:	butirat-propionat d'hidrocortisona.
HC:	hidrocortisona (o cortisol).
HPLC:	cromatografia líquida d'alta resolució.
F:	fosfolípid.
FI:	força iònica.
FTIR:	espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier.
FV_{dis}	fracció en volum de dissolvent.
FV_{lip}	fracció en volum de liposomes.
FV_{ves}	fracció en volum de les vesícules.
GL:	graus de llibertat.
<i>log</i> :	logaritme decimal.
LPC:	lisofosfatidilcolina.
LUVs:	liposomes (vesícules) unilaminars grans.
min:	minut/s
MLVs:	liposomes (vesícules) multilaminars (Ap. 3.2.2.1).
OB:	oli de borratge.
PA:	àcid fosfatídic.
PC:	fosfatidilcolina (o lecitina).
PE:	fosfatidiletanolamina.
ppb:	parts per bilió.
ppm:	parts per milió.
$P_{o/w}$:	coeficient de partició octanol/aigua.
Q%:	relació percentual entre el quocient d'absorbàncies del ditranol a 355 i 430 nm en un dissolvent, i el mateix quocient en cloroform (Ap. 3.1.1.4 i Ap. 4.1.5).
qsp:	quantitat suficient per.
REVs:	liposomes (vesícules) obtingudes per evaporació en fase reversa (Ap. 3.2.2.2).
SAC:	Sacarosa.
SPC:	fosfatidilcolina de soja.
SS:	sumatori de quadrats.
TLC:	cromatografia en capa prima.
UAB:	Universitat Autònoma de Barcelona.
USP XX:	XX ^a Farmacopea dels Estats Units d'Amèrica.
UV-Vis:	ultraviolat-visible.
VLD:	velocimetria de làser Doppler.

ANNEXE B / Fórmules i dades físico-químiques.

ANTRACÈ:

Fòrmula:

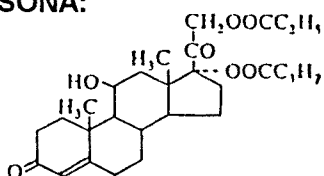


Massa molecular: 178,2 Da
Solubilitat en aigua: $2,24 \cdot 10^{-7}$ mg/mL

ANTRALINA: Veure ditranol.

BUTIRAT-PROPIONAT D'HIDROCORTISONA:

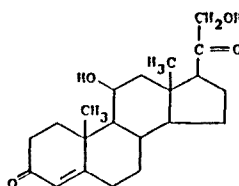
Fòrmula:



Massa molecular: 488,6 Da
Punt de fusió: 117-124°C
Solubilitat en aigua: $1,19 \cdot 10^{-2}$ mg/mL

CORTICOSTERONA:

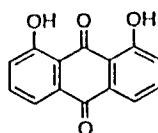
Fòrmula:



Massa molecular: 346,5 Da

DANTRONA:

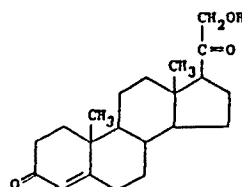
Fòrmula:



Massa molecular: 240,2 Da
Punt de fusió: 193-197°C
Solubilitat en aigua: $1,56 \cdot 10^{-3}$ mg/mL

DESOXICORTICOSTERONA:

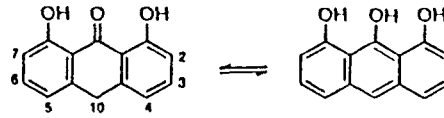
Fòrmula:



Massa molecular: 330,5 Da

DITRANOL (antralina):

Fòrmula:



Massa molecular:

226,2 Da

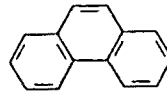
Punt de fusió:

176-181°C

Solubilitat en aigua:

 $1 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-4}$ mg/mL**FENANTRÈ:**

Fòrmula:



Massa molecular:

178,2 Da

Solubilitat en aigua:

 $1,4 \cdot 10^{-7}$ mg/mL**FOSFATIDILCOLINA D'OU (lecitina):**

Massa molecular (mitjana):

~750 Da

(New R.R.C. 1990)

Densitat de les bicapes:

1,0135 g/mL

(New R.R.C. 1990)

1,056 g/mL

(Yoshikawa W. 1983)

Índex de refracció:

1,42

(Hallett F.R. 1991)

1,6

(Kölchens S. 1993)

1,497

(Yoshikawa W. 1983)

Liposomes grans:

Amplada de la bicapa:

4,57 nm

(Cornell B.A. 1980)

3,51 nm

(Pidgeon Ch. i McNeely S. 1987)

3,45 nm

(Tahara Y. i Fujiyoshi Y. 1994)

Àrea del cap polar ($L\alpha$):0,725 nm²

(Cornell B.A. 1980)

0,720 nm²

(Rotenberg M. 1991)

Forma:

esfèrica

(Cevc G. 1995; Lasic D.D. 1993;

Ostrowsky N. 1993)

esfèrica

només en

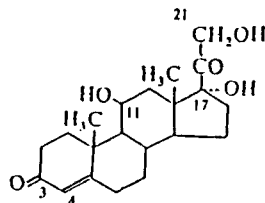
aigua pura

(Jin R.J., 1999; Mui B.L.S. 1993;

Perkins W.R. 1993).

HIDROCOTISONA (cortisol):

Fòrmula:



Massa molecular:

362,5 Da

Punt de fusió:

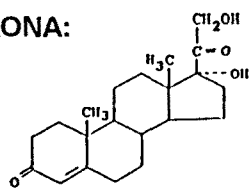
212-213°C

Solubilitat en aigua:

0,3-0,4 mg/mL

17 α -HIDROXI-11-DESOXICORTICOSTERONA:

Fòrmula:

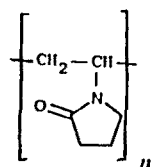


Massa molecular:

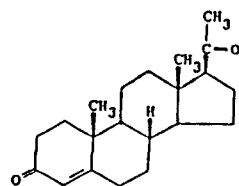
346,5 Da

LECITINA: Veure fosfatidilcolina d'ou.**POLIVINILPIRROLIDONA:**

Fòrmula:

**PRESSIÓ:** 1 bar = 14,5 PSI = 10×10^4 Pa = 0,9869 Atm**PROGESTERONA:**

Fòrmula:



Massa molecular:

314,5 Da



Servei de Biblioteques

Reg. 150045 9796

Sig. TUAB/4761

Ref. 12500

