

*ELS LIPOSOMES COM A
MODEL DE MEMBRANA*

m.a. busquets i viñas

Aquesta tesina ha estat realitzada en els Laboratoris de l'Institut de Tecnologia Química (C.S.I.C.) i en el Departament de Físico Química Aplicada de la Facultat de Farmàcia de l'Universitat de Barcelona sota la direcció de Na Dra. M^a.A.Alsina, Na Dra. F.Reig i En Dr. S. García.

He d'agraïr a tots ells així com a En Dr. J.M^a. García Antón, En Dr. E.Rojas, En. J. Hernández i Borrell, al Departament de Física de L'Escola Tècnica Superior d'Enginyers Industrials i als companys del Laboratori i del Departament, quina col.laboració tant professional com humana, ha estat imprescindible per a dur a terme aquest treball.

També em cal esmentar l'aportació feta pels laboratoris Abelló que han cedit amablement el clorhidrat de naloxona, als Lab. Uquifa que ens han suministat la morfina base lliure, als Lab. Bayer que han donat la meperidina i a Calbiochem-Behring Corp. gracies als que hem tingut la dipalmitoilfosfatidilcolina.

Barcelona octubre 1985.

~~Dr. A. Burguet i Viñals~~

ALS MEUS PARES

INDEX

I.- Introducció.

1.1.- El dolor	6
1.2.- Descobriment de les encefalines	8
1.3.- El receptor opiaci	9
1.3.1.- Localització del receptor opiaci.	13
1.3.2.- Multiplicitat de receptors opiacis.	14
1.3.3.- Naturalesa química del receptor opiaci.	16
1.4.- La membrana	21
1.4.1.- Cristalls líquids	26
1.4.2.- Liposomes	33
1.5.- Anàlisi tèrmica diferencial	40
1.6.- Detecció de transicions de fase dels fosfolí- pids amb liposomes	47
1.7.- Microscòpia electrònica	49
1.8.- Estudi teòric dels compostos emprats	51
1.9.- Objectius	57

II.- Materials i mètodes

1.- Instrumentació	59
2.- Substàncies químiques	66
3.- Mètodes	
3.1.- Purificació de la lecitina	67
3.2.- Determinació quantitativa de la lecitina	71
3.3.- Mètode per l'obtenció de liposomes	74
3.4.- Mètode per l'obtenció del clorhidrat de morfina	79
3.5.- Mètode de detecció de transicions de fa- se dels fosfolípids amb liposomes	80
3.6.- Mètode de microscòpia electrònica	82
3.7.- Tècniques calorimètriques diferencials	84

III.- Resultats i discussió	
1.- Purificació de la lecitina	97
2.- Determinació del pes molecular mig de la lecitina	98
3.- Preparació i caracterització de liposomes	100
4.- Obtenció del clorhidrat de morfina	121
5.- Estudi de les interaccions lípid/molècula opiàcia.	124
IV.- Conclusions	143
V.- Bibliografia	146

INTRODUCCIO

I.- INTRODUCCIO.

1.1.- EL DOLOR.

El dolor és aquella sensació desagradable i insuportable que sovint experimenta l'home i que si bé accepta amb abnegació, busca quasi sempre una manera d'atenuar-la. Paradoxalment, per un mal tant antic i universal s'han trobat ben pocs remeis. Així, des de fa milenis és coneguda la virtut que presenten les càpsules de l'adormidera, els vulgarment coneguts "cascalls" (*Papaver somniferum*) capaços d'alleujar el sofriment. Es per això i perquè produeix eufòria també, que l'opi, extret d'aquesta planta, s'ha estat emprant com a droga contra el dolor ja des de la Grècia Clàssica.

Una data important en l'història dels anlgèssics és la de 1803 en que el farmacèutic alemany Friederich Sertürner aillà de l'opi el seu principal alcaloide, el qual anomenà morfina en honor a Morfeu el déu grec del somni. D'aquesta manera, l'ús de la morfina en substitució dels preparats de l'opi es va estendre ràpidament.

Degut a això, quan a mitjans del segle XIX es va tenir una idea clara de la toxicitat i de la capacitat d'ocasionar toxicomania per part de la morfina, aquesta droga s'havia convertit ja en un remei emprat majoritàriament en Medicina Clínica.

Les característiques d'aquesta toxicomania són les següents:

- Dependència psíquica. Es un estat caracteritzat per un desig irrefrenable de repetir les preses de producte sense que, necessàriament, hi hagi una tendència a augmentar les dosis o sense que apareixi un síndrome d'abstinència quan cessi la seva ingestió.

- Dependència física. Es un estat adaptatiu, caracteritzat per l'aparició de trastorns físics, sovint intensos quan es suspèn bruscament l'administració de la droga o quan es neutralitza la seva acció per part d'un antagonista específic. El conjunt d'aquests trastorns constitueix el síndrome d'abstinència.

- Tolerància. Es una disminució dels efectes sobre l'organisme d'una dosi fixa de droga, a mesura que es repeteix la seva administració. Aquest fenomen fa incrementar les dosis per tal d'obtenir l'efecte desitjat.

El coneixement d'aquestes propietats indesitjables així com la manca d'altres drogues que exercís la mateixa acció que els compostos opiàcics, va impulsar l'investigació amb la finalitat de descobrir opiàcics sintètics que estiguessin mancats dels seus efectes negatius. Així, el primer derivat de síntesi que va aparèixer va ésser la Petidina al 1935 a la qual han seguit molts altres, pocs però, han adquirit dret terapèutic per si mateixos. Malgrat tot, l'objectiu fonamental no s'ha aconseguit encara, de tal manera que fins aleshores no es coneix un producte analgèsic que no generi toxicomania.

1.2.- DESCOBRIMENT DE LES ENCEFALINES.

El fet de que els alcaloides pertanyents al regne vegetal com ara la nicotina, la muscarina, la morfina i l'efedrina, entre d'altres fossin capaces de substituir a molècules pròpies dels teixits animals (aceticolina, GABA, pèptids opiacis, etc) induí la recerca en aquests teixits d'alguna substància que actués com la morfina.

Així, seguint aquest raonament, el 1972, Akil trobà que estimulament electricament el periaqueducte gris del cervell es produïa en l'animal subjecte a experimentació, l'analgèsia, que alhora era antagonitzada per la naloxona (antagonista típic de la morfina). Aquest fet confirmà l'existència ja intuïda del material que, amb característiques opiàcies, era sintetitzat pel propi organisme animal. Aquest percaç conduí a Hugues al 1975, a l'aïllament del cervell de porc de dos pentapeptids de seqüències Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu i Tyr-Gly-Gly-Phr-Met, anomenats Leu-encefalina i Met-encefalina respectivament. Ambdós tenen la mateixa activitat opiàcia que la morfina, però són metabolitzats més ràpidament per hidròlisi enzimàtica el que comporta que el seu efecte sigui més breu.

Respecte al seu mecanisme d'acció, tant les encefalines com la morfina produeixen llur efecte mitjançant la seva unió amb els receptors opiacis capaços de reconèixer aquestes estructures, i per les que tenen afinitat.

Totes les esperances que des d'un primer moment suscità el descobriment de les encefalines vers el seu possible ús en clínica com a substitius de la morfina foren efímers ja que ben aviat es va veure que a més a més de la seva ràpida metabilitza-

ció, produïen també addició, de cap manera desitjable. Malgrat això, aquest descobriment palesà la possibilitat de substituir la morfina per molècules més afins als organismes animals i per tant, amb més probabilitat d'ésser metabolitzats fàcilment sense donar metabolits tòxics o anòmals.

1.3.- EL RECEPTOR OPIACI.

L'eliminació del dolor, o al menys la seva supressió parcial és un repte que té plantejada la farmacologia d'avui en dia. Són molts els derivats de tipus alcaloide i d'altres tipus dels quals es disposa pel tractament del dolor, però els efectes secundaris que presenten fan que la seva utilització sigui molt restringida i que es continui investigant sobre noves molècules què, produint els mateixos efectes beneficiosos, no ofereixin els components d'habitució, dependència i d'altre tipus.

Malgrat que actualment s'accepta que hi ha receptors farmacològics de diversa mena, l'existència dels mateixos ha estat fortament debatuda. De tota manera, el receptor opiaci és un dels més coneguts. Aprofitant aquest benentès, s'ha pensat que el seu estudi podri ésser una de les vertents a seguir alhora d'abordar la problemàtica derivada de l'habitució i dependència als opiacis.

Com altres fàrmacs, l'acció dels opiacis sobre un organisme es produeix per l'interacció físico-química d'aquests amb una o varies estructures de la membrana cel.lular de l'ésser viu, que són els anomenats receptors opiacis, desencadenant així els efectes característics.

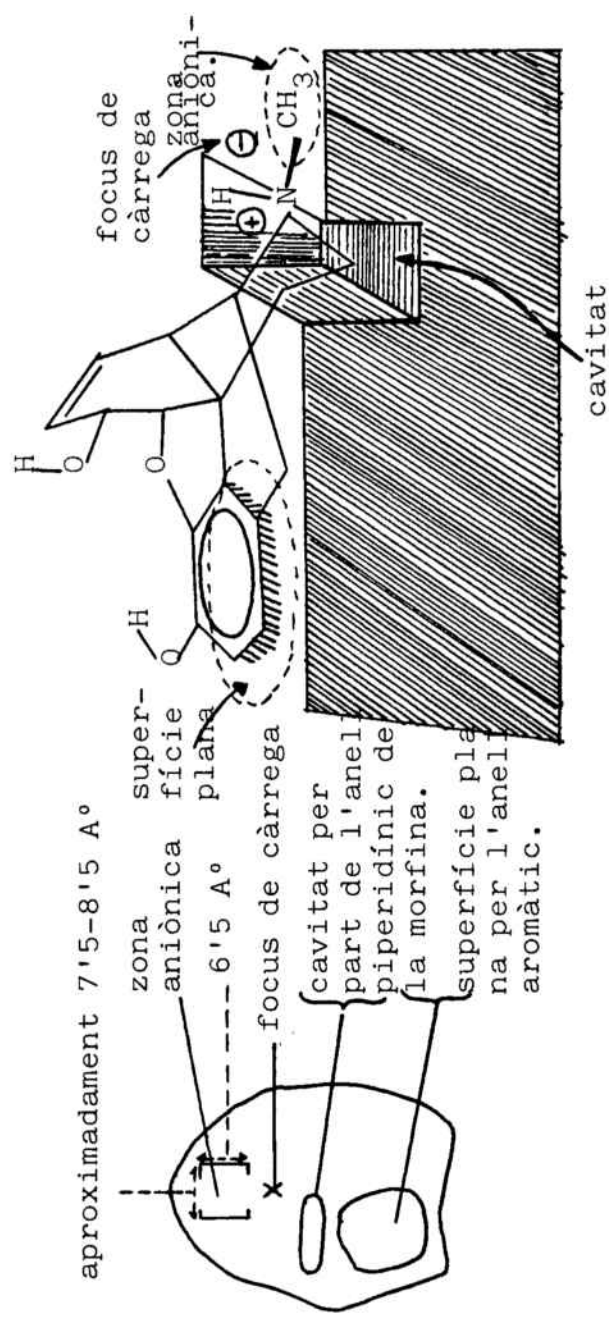


Figura 1.- Zona receptora dels analgèsics derivats de la morfina i els seus anàlegs (Beckett i Casy, 1965).

Es sap (Pert, Snyder, 1973; Simon i col., 1973; Terenius, 1973) que els receptors opiacis es troben en el sistema nerviós dels vertebrats (tant a nivell central com perifèric) en estreta relació amb segments de membrana en la fracció sinaptosòmica, el que suggereix que estan localitzats en el veïnatge de la sinapsi. L'unió dels agents opiacis al receptor és estereoespecífica, saturable i té lloc amb gran afinitat.

Donat que l'agrupació N-metil- δ -fenilpiperidina és comú als analgèsics derivats de la morfina o dels seus anàlegs, Beckett i Casy (1965) (fig.1) van proposar un model de receptor. És estàtic, inflexible, caracteritzat per les següents zones essencials:

- Estructura plana que permet l'enllaç amb l'anell aromàtic del fàrmac mitjançant forces de tipus van der Waals.
- Una zona aniònica capaç d'associar-se amb el centre bàsic del fàrmac carregat positivament.
- Una cavitat orientada de tal forma que pugui encabir la porció $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (corresponent als carbonis 15 i 16) del cicle de la piperidina, projectada per davant del pla que conté l'anell aromàtic i el centre bàsic.

Més tart i degut a l'aparició de certs analgèsics d'elevada activitat però mancats d'una estructura exactament complementaria per l'àrea de receptor esmentada, Pasternak i Snyder (1975) proposaren un model de receptor dinàmic (fig.2). Aquest model alostèric pel receptor dels opiacis adoptaria dues formes interconvertibles.

Barreja agonista-antagonista

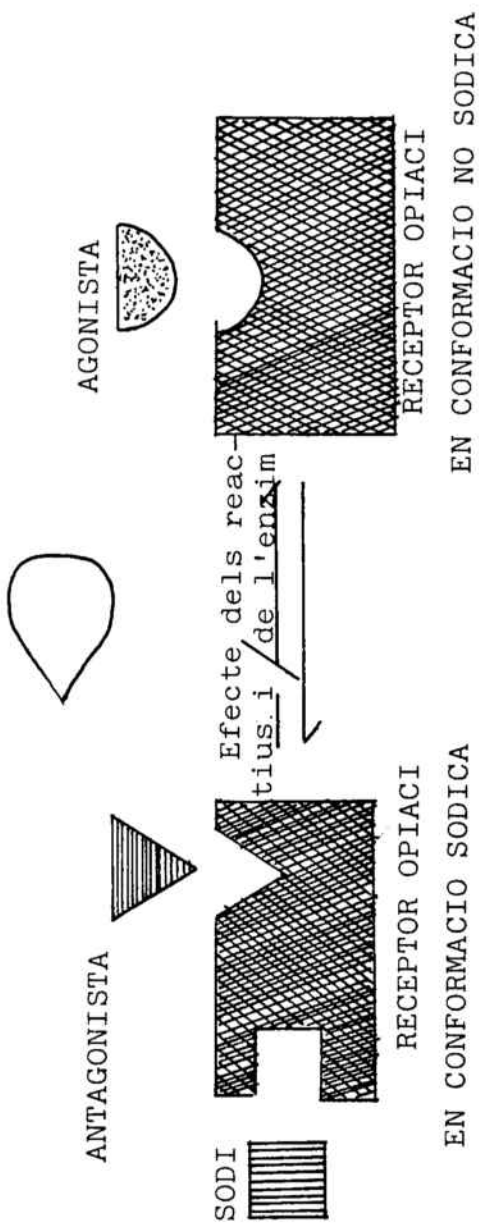


Figura 2.- Model de funcionament del receptor opiaci (Snyer, 1977)

L'hipòtesi que postula aquest model és la de que els agonistes (morfina, etorfina, levorfanol , oximorfina, etc.) i els antagonistes (nalorfina, naloxona, diprenorfina, levalorfà, etc) interactuen amb conformacions diferents del mateix receptor. El catió sodi indueix el canvi conformacional que facilita la complexació amb els antagonistes, alhora que els ions manganès, magnesi i níquel fan que el receptor agafi la conformació escai-ent per a interaccionar amb els agonistes. Es a dir, el sodi estabilitza el receptor en una conformació vers la que els antagonistes tenen gran afinitat i els agonistes la tenen baixa. En absència de sodi, el receptor adquireix una conformació tal que afavoreix la formació del complex als agonistes impedit l'unió dels antagonistes (Snyder, 1978).

En general s'accepta l'existència, la localització , la multiplicitat i altres característiques generals dels receptors opiàcis però queden per demostrar una sèrie de fets entre els que destaquen per la seva importància, la naturalesa química dels mateixos (la seva composició) i la seqüència de fets o fenòmens que s'inicien a l'unir-se l'opiàci al receptor i que indueixen la resposta o efecte farmacològic.

1.3.1.- LOCALITZACIO DELS RECEPTORS OPIACIS.

La distribució dels receptors opiàcis a nivell del sistema nerviós central té especial interès degut a que relaciona aquest tipus de receptors amb la funció cerebral. Els estudis fets mitjançant tècniques autorradiogràfiques han demostrat que els receptors opiàcis es troben molt concentrats en àrees del cervell que regulen tant funcions relacionades amb la percepció del do-

lor com del comportament. Així mateix, la localització de receptors en el sistema límbic (Snyder i col. 1974; Simon i Hiller, 1978) indicaria que poden estar relacionats amb la regulació del comportament propiament dit i també de les emocions.

Per altra banda, els receptors a nivell del tàlem, substància gris del periaqueducte i substància gelatinosa expliquen en part l'acció dels opiàcis com analgèsics.

S'han localitzat receptors opiàcis en cervell de la majoria d'animals vertebrats, però no s'en han trobat, en canvi, en els invertebrats. Adhuc els trobats en els vertebrats més inferiors presenten la mateixa especificitat d'acció opiàcia que la dels mamífers més desenvolupats.

A part de la regió cerebral, també han estat trobats receptors opiàcis a la perifèria (glandules exocrines de l'estómac i budell), éssent precisament el múscul llis longitudinal del plexe mientèric de l'ileum del conill perquè, un sistema especialment apte per a fer assatjos d'activitat farmacològica dels agents opiàcis que hom preten estudiar.

1.3.2.- MULTIPLICITAT DE RECEPTORS OPIACIS.

En els resultats obtinguts a l'experimentar els opiàcis endògens i exògens en diversos models farmacològics, s'han pogut observar un seguit d'anomalies. Aquestes consisteixen, fonamentalment en la distinta activitat de les molècules assatjades, observades en varis tipus d'experiències, es a dir, GPI (Guinea Pig Ileum), MVD (Mouse Vas Deferens), binding, etc. i àdhuc diferent capacitat de desplaçament d'uns per altres i l'antagonització

dels seus efectes mitjançant la naloxona.

Tot això ha conduït a la confirmació de la teoria empírica donada per Martin i col. (1976) de l'existència de diversos tipus de receptors opiacis en front dels quals presentarien una afinitat variable segons cadascun dels tipus de molècules assatjades.

Aquests receptors encara no són coneguts exactament avui en dia, però s'accepta que n'hi ha de variis tipus. Es parla de receptors μ , k i σ . Lord i col. al 1977 van descriure un nou receptor que estaria en el conducte deferent del ratolí i que van anomenar δ .

Els receptors de tipus μ interaccionen preferentment amb els opiacis tipus alcaloide, es a dir, de conformacions rígides (morfina, metadona, naloxona). Els σ ho fan principalment amb encefalines i endorfines. Finalment, els k s'uneixen prioritariament amb la pentazocina, la nalorfina i la ciclazocina entre d'altres.

Els receptors μ sembla que intervenen en el control de l'analgèssia supraespinal, la depressió respiratòria, l'eufòria i la dependència física. El k es considera mitjancer de l'analgèssia espinal, la miosi i la sedació mentre que el σ ho és respecte la disfòria, les al·lucinacions i l'estimulació respiratòria i vasomotora.

El grau d'especificitat d'aquests receptors no és absolut ja que interaccionen diferentment i per això els productes opiacis tenen normalment un grau diferent de propietats analgèssiques i de modificació de comportament, predominant unes o altres

segons el tipus de receptor amb el que interaccionen preferentment.

Per altra banda, resta fora de dubte la diferent distribució dels receptors en els teixits la qual cosa suposa una dificultat addicional en l'estudi del comportament farmacològic d'aquesta mena de productes en funció de la resposta del tipus de test que es realitzi.

Compost	Tipus de receptors		
	μ	k	σ
Morfina	Ag	Ag	--
Naloxona*	Ant	Ant	Ant
Pentazocina	Ant	Ag	Ag
Nalorfina	Ant	pAg	Ag
Buprenorfina	pAg	--	--

TAULA I

Ag: Agonista
 Ant: Antagonista competitiu
 pAg: Agonista parcial

* Més poderosa com antagonista dels efectes dels agonistes u que dels k o dels σ i per això es creu que té la major afinitat pel receptor μ .

1.3.3.- NATURALESA QUIMICA DEL RECEPTOR OPIACI

Una de les possibles maneres d'enfrontar la problemàtica que l'acció dels opiàcis presenta i la seva possible substitució per molècules peptídiques, és l'estudi de la composició química del receptor opiàci i de les interaccions físico-químiques que les molècules actives estableixen amb ell.

De fet, fins al moment present hi ha a la bibliografia minces referències relacionades amb l'aïllament del receptor opiàci que hagin reeixit. Sembla que en el decurs del procés que cal seguir per aïllar-lo es produeix un procés de desnaturalització i

el material obtingut no conserva de cap manera les característiques d'afinitat del receptor opiàci original.

Els primers treballs foren adreçats a determinar la naturalesa química del receptor opiàci intentant el seu aïllament a partir de membranes de cèl·lules cerebrals per tal de determinar la seva composició i estructura exacta.

En aquest sentit Simon i col. (1975) van solubilitzar amb l'ajuda d'un tensioactiu no iònic, un receptor opiàci del sistema límbic amb etorfina unida estereoespecíficament, el qual era sensible als enzims proteolítics i als reactius de les proteïnes, prova evident de la seva naturalesa proteica. També comprovaren paral·lelament que poseeix un grup SH lliure, doncs s'inactiva totalment per tractament previ amb NEMI (n-acetilmaleimida).

Lowney i col. (1974) van extreure amb una barreja de cloroform - metanol un material proteolipídic capaç de fixar agents opiàcis estereoespecíficament.

Altres recerques s'han realitzat seguint una estratègia diferent tot unint opiàcis radioactius al receptor opiàci per tal de facilitar la monitorització del procés de purificació. Els resultats però no han estat satisfactoris doncs sembla ésser que, durant el procés d'aïllament, es destrueix el receptor o al menys la seva estructura ordenada responsable de l'estereoespecificitat. En aquest sentit s'han de citar els treballs de Eli Hazum, 1978; Dawson i Kermes, 1978.

Donada l'impossibilitat fins al moment present d'aïllar el receptor opiàci com a tal, a partir de preparacions de membranes cerebrals, altres autors han seguit camins indirectes. Així, s'ha postulat que alguns dels diversos components de les membranes cel·lulars podrien ésser possibles constituents del receptor opiàci.

En aquest fet s'han basat els treballs de Loh i col.(1974) que, per una part han estudiat l'interacció de sulfàtids (ceràmid β -galactopiranososa-3-sulfat) amb agents opiàcis agonistes i antagonistes mitjançant tècniques de difracció circular i així és com han demostrat la capacitat d'alguns d'ells per a induir la formació d'estructures ordenades en la β -endorfina.

Per una altra part, els mateixos autors també han estudiat l'influència de diversos lípids (fosfatidilserina, fosfatidilinositol, entre d'altres) en la conformació de la β -endorfina. Aquests lípids àcids s'ha vist que són capaços d'induir la formació de α -hèlix en la β -endorfina, malgrat això altres lípids neutres com la fosfatidilcolina no afecten a la β -endorfina.

En concordància amb això, Craves i col. (1978) comprovaren que la presència d'anticossos de sulfat de cerebròsid inhibeix tant els efectes de la morfina com de la β -endorfina.

Una altra aportació interessant a aquest estudi ha sigut la de Cho i col. (1979) que estudien la transferència de sulfàtids des d'una solució aquosa a una fase orgànica (heptà) induïda per opiàcis. En aquests experiments es mesura la quantitat de sulfàtid transferida de la fase orgànica en funció de la quantitat d'agent opiàci, alhora que s'intenta bloquejar aquesta transfe-

rència per addició d'un tercer component (opiàci antagonista). Els resultats obtinguts indiquen que tots els opiàcis estudiats indueixen transferència i el que és més interessant, que existeix una bona correlació amb les dades obtingudes en assajos biològics.

Deslauriers (1981) ha postulat que el receptor opiàci és de naturalesa fosfolipídica i a partir d'estudis de ^{13}C i ^{31}P NMR d'opiàcis i diferents fosfolípids, ha pogut observar una major interacció de pèptids morfinomimètics amb fosfolípids àcids com la fosfatidilserina.

Recentment Marzullo indica una estreta relació entre la funció opiàcia i un mecanisme d'oxidació-reducció regulat per ions Cu^{++} .

Per una altra banda existeix l'evidència de que la microviscositat de la membrana té molt a veure amb l'afinitat específica (Rothman, 1984). Així doncs, aquesta vinculació dels lípids amb l'afinitat podria ésser deguda a que el receptor està inclòs dins d'un entorn lipídic, els canvis de fluidesa d'aquest influirien en la seva conformació (Gioannini, 1984).

Sembla cert que la naturalesa del receptor opiàci és lipoproteica (Newman, 1984; Rothman, 1984) i que la presència d'enzims que produeixen l'hidròlisi de determinats lípids (Pert, 1976; Miller, 1977) o d'anticossos (Craves, 1979) respecte d'altres lípids afecta de forma important l'afinitat de molècules opiàcies marcades pel receptor.

Per tal d'esbrinar com interaccionen les molècules biològicament actives i el seu receptor, han estat proposats els anomenats models de membranes (Nordlund, 1982; Pattus, 1983; Fendler, 1984). L'avantatge d'aquests sistemes està en que permeten treballar amb un nombre més reduït de variables alhora que proporcionen una excel·lent informació sobre les interaccions específiques que s'estableixen entre les molècules implicades en un determinat procés bioquímic.

Els liposomes i les monocapes són els models de membrana més usats en aquest tipus d'estudi i dels que segons la bibliografia consultada, s'han obtingut uns resultats més satisfactoris.

Pel que fa a les tècniques físico-químiques aplicades amb més freqüència a l'estudi de l'interacció entre receptor-molècula opiàcia cal destacar la Ressonància Magnètica Nuclear (NMR), la Ressonància d'espí Electrònic (ERS), l'Anàlisi Tèrmica Diferencial (ATD) i la fluorescència (Valic, 1979; Nichols, 1980; Fryer, 1985; Tredgold, 1985; Wilschut, 1985).

1.4.- LA MEMBRANANA.

Les membranes biològiques són barreres de permeabilitat altament selectives que regulen el pas d'ions i molècules. Estan implicades en un gran nombre de processos vitals de l'organisme tals com la regulació del volum cel.lular, el manteniment del pH i de la composició iònica intracel.lular, eliminació de substàncies tòxiques i aport d'altres necessaries; producció de gradients iònics, imprescindibles principalment, en el procés de despolarització nerviosa i muscular.

Des del punt de vista bioquímic, les membranes cel.lulars estan formades per lípids i proteïnes, variant la seva composició segons el tipus de membrana de que es tracti. Pot tenir pigments, enzims, etc. segons la seva funció específica en l'organisme. A través de la microscopia electrònica i la difracció de ratjos X, així com per estudis del comportament físico-químic de la membrana cel.lular, considerada com una interfase d'un sistema sòlid-líquid, pot accedir-se a l'estructura intrínseca de la membrana.

S'han proposat diferents models de membrana cel.lular, però el més comunment acceptat per a explicar aquesta estructura és el que es representa en la figura 3 (Singer i Nicholson, 1965). Aquest model consta d'una bicapa de molècules lipídiques, disposades amb els seus extrems hidròfobs orientats en direcció oposada a l'aigua i enfrontats entre ells tot rebutjant l'aigua. Per altra banda, els seus caps hidrofílics estan dirigits cap a l'aigua de l'interior (líquid intracel.lular) i de l'exterior de la cèl.lula (líquid extracel.lular).

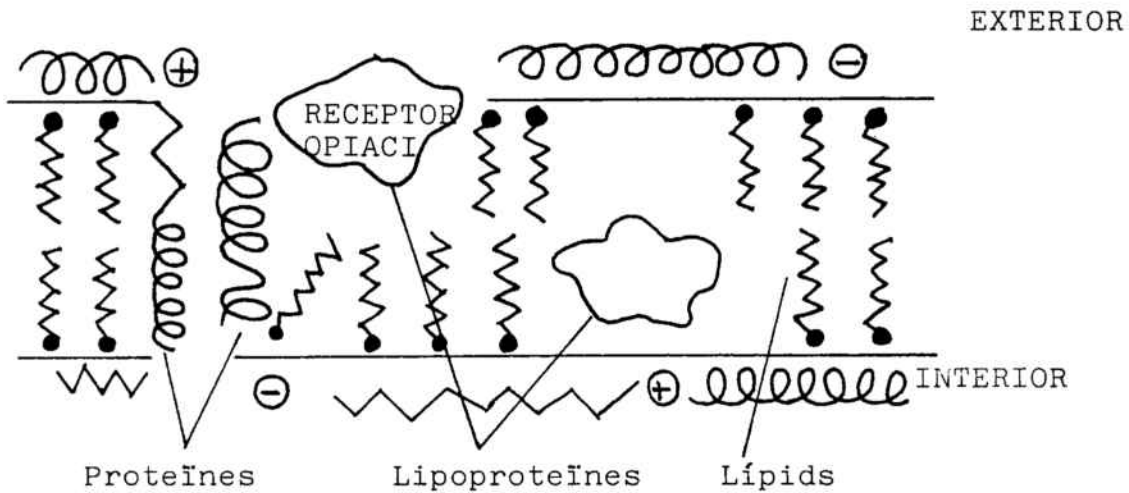


Figura 3

La part lipídica forma una autèntica matriu on les proteïnes hi són inserides. Les fraccions lipídiques de la membrana són pràcticament les mateixes per a tots els tipus de cèl·lules i el que fa una membrana cel·lular diferent d'altres són les diferents proteïnes que té associades.

Els contingut proteic de les membranes cel·lulars és variable segons els tipus de que es tracti, així, la membrana de les cèl·lules nervioses són un 20% i no estan estructuralment caracteritzades. Aquestes proteïnes poden ésser extrínseques, es a dir perifèriques, o bé intrínseques seguint la terminologia de Singer (figura 4). La diferència entre unes i altres està en que les proteïnes extrínseques poden ésser eliminades de la membrana per extracció aquosa, variant la força iònica del medi o el pH, degut a que la seva unió a la membrana és de tipus electrostàtic.

Les proteïnes intrínseques es poden extreure per l'acció de tensioactius o dissolvents orgànics que solubilitzen els lípids, doncs estan localitzats en l'interior de la membrana establint unions de tipus van der Waals.

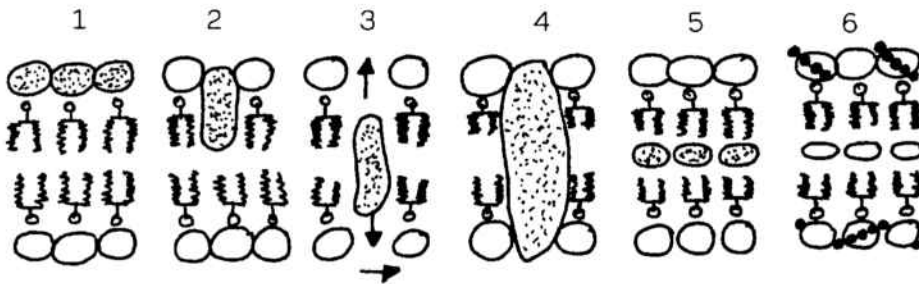


Figura 4 (models de membrana)

- 1.- Bicapa lipídica amb proteïnes associades.
- 2.- Model amb proteïnes situades en la superfície i entre la bicapa.
- 3.- Proteïna amb possibilitat de gir i difusió lateral.
- 4.- Membrana amb la proteïna prolongant-se per amunt i avall de la bicapa.
- 5.- Bicapa amb proteïna associada en una altra possible posició.
- 6.- Bicapa semblant a l'anterior amb una proteïna enrotllada en α -hèlix al voltant de la proteïna superficial.

La membrana de les cèl.lules nervioses té una composició en lípids del 80%. Els àcids grassos que constitueixen la fracció lipídica són l'oleic i l'esteàric junt amb àcids poliinsaturats que tenen un nombre de carbonis comprés entre 14 i 24.

Al llarg de la doble capa lipídica, la composició bioquímica i l'estructura físico-química presenten sensibles variacions havent-se determinat per difracció de ratjos X la presència d'estructures de cristall líquid liotròpic del tipus lípid/aigua/proteïna que permeten la transferència d'ions i el moviment de molècules.

En realitat, segons Bernal, no únicament la membrana sino tota la cèl.lula, és una estructura de cristall líquid. Com a conseqüència d'aquesta estructura específica, els fosfolípids permetrien la mobilitat de petites molècules a través de la membrana, fet que no seria possible si els fosfolípids formessin, per exemple, una estructura de gel.

Malgrat que no es coneix la naturalesa i estructura del receptor opiàci, està clar que està immers en l'estructura de la membrana nerviosa i/o forma part d'ella. Es per això que tenint en compte l'estructura d'aquesta membrana es poden establir unes primeres hipòtesis de treball que poden ajudar a un millor coneixement del receptor opiàci. Si es postula que està integrat en l'estructura i que aquesta és considerada com un cristall líquid liotròpic, es pot explicar l'interacció d'un agent opiàci amb el receptor en els següents termes:

Quan un agent opiaci agonista interacciona amb el receptor, l'estructura de cristall líquid que poseeix, es modifica en part o bé de lloc donant una estructura de cristall líquid distinta de l'original. No obstant, quan l'agent opiaci és antagonista, aquesta interacció donaria lloc a una estructura de cristall líquid completament diferent de l'originada per l'agonista.

Un intent d'aproximació a aquesta hipòtesi consisteix en preparar cristalls líquids liotròpics de diferents estructures però conegudes a la bestreta, i estudiar l'efecte que sobre aquestes estructures produeixen l'agonista i l'antagonista.

Per un cantó i tal com s'ha vist, es pot considerar la membrana sota el punt de vista de cristall líquid. Per una altra part no s'ha d'oblidar que la seva estructura també respon a una bicapa lipídica. Des d'aquesta perspectiva, quan un agent opiaci interacciona amb el receptor immers en la bicapa, ho fa únicament amb una de les dues meitats lipídiques, poguent modificar l'estat de l'empaquetament i ordenació d'aquesta estructura.

Un primer model que podria simular aquesta situació i que seria útil per a comprovar la bondat d'aquesta hipòtesi són les vesícules lipídiques o liposomes.

Amb la finalitat d'establir unes bases que ajudin a una millor interpretació dels resultats s'exposen a continuació unes breus consideracions sobre la naturalesa, formació, tipus i estructura dels cristalls líquids i dels liposomes.

1.4.1.- CRISTALLS LIQUIDS.

Aquells estats de la matèria amb graus d'ordenació molecular intermitjos, entre els de l'estat sòlid i els de l'estat líquid, han estat anomenats cristalls líquids o estats mesomòrfics de la matèria (Lehmann, 1889) i s'han classificat en dos grans grups: Termotròpics i Liotròpics.

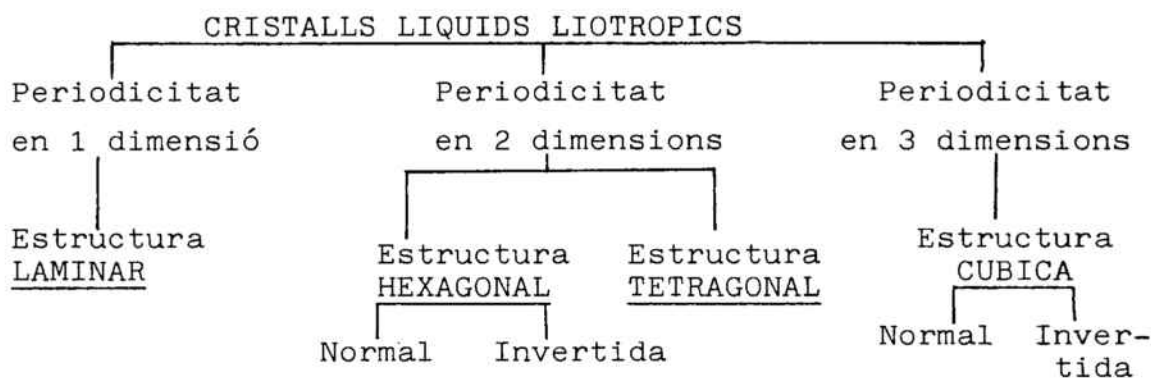
Els cristalls líquids termotròpics són els formats per l'acció de la calor en sòlids purs o en barreges de sòlids. Els liotròpics es formen per dos o més components, en el que un és un solvent, generalment aigua, en variar llurs proporcions relatives.

Com ja s'ha indicat, els cristalls líquids serveixen com a model d'estudi de la naturalesa i estructura del receptor opiàci per la qual cosa ens centrarem seguidament en el seu estudi.

a) Cristalls líquids liotròpics. Estructura i propietats.

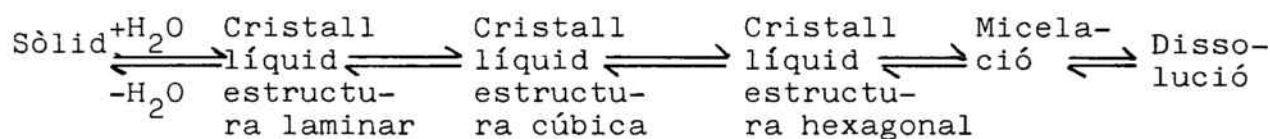
El terme cristall líquid liotròpic s'usa per a descriure "la formació d'un sistema termodinàmicament estable, resultant de la penetració d'un solvent entre les molècules d'un sistema cristal·lí". Els sistemes d'aquest tipus s'originen amb major proporció a partir de substàncies anfifíliques i aigua. Les molècules anfifíliques associades en agregats moleculars així, presenten un mínim d'energia lliure, essencialment molt semblant al del seu estat anhidre original.

Els cristalls líquids liotròpics es divideixen en varis tipus atenent principalment a la seva estructura, tal i com es mostra en l'esquema següent.



Partint d'una substància anfifílica i aigua es poden generar totes aquestes estructures de tal manera que amb proporcions adequades d'anfifil i aigua, les mesofases polimòrfiques formades presenten gradualment empaquetament molecular, laminar, cúbic i hexagonal, en ordre de major proporció d'aigua.

Aquest ordre en les mesofases es pot invertir per disminució de la quantitat d'aigua tal i com s'indica en el següent esquema:



El que vol dir que és un procés reversible.

Es important distingir entre les solucions micel·lars i les fases de cristall líquid. En les solucions micel·lars, les micel·les individuals estan dotades de llibertat de moviment i orientació en el solvent isotròpic. Contràriament, en les fases de cristall líquid no existeix un medi continuat amb partícules disperses, sino que tot el volum consisteix en una estructura rigurosament ordenada.

Es igualment important distingir entre les estructures de cristall líquid i les cristal·lines. En l'estat sòlid, la part hidrocarbonada del compost anfifílic presenta una ordenació cristal·lina característica. En un cristall líquid del mateix compost anfifílic, l'aigua addicionada provoca una alteració tal de l'estructura regular de les cadenes hidrocarbonades, que l'ordenació cristal·lina resulta inestable i es reemplaçada per una nova organització dotada de rotació lliure al llarg de la cadena hidrocarbonada, en la que prevaleix una direcció preferent. La diferència entre l'ordenació de l'estat cristal·lí i la de l'estat de cristall líquid és que el primer presenta un ordre tant a petita escala, a nivell de distàncies atòmiques, com a escala major, a nivell de dimensions moleculars. Pel contrari, en l'estructura de cristall líquid existeix desordre a petita escala i ordre a nivell de distàncies moleculars.

+Estructura laminar.

La fase cristall líquid amb estructura laminar consisteix en capes bimoleculares de compost anfifílic alternades amb capes d'aigua. Aquesta fase, presenta una consistència semi-líquida amb unes viscositats compreses entre 1 i 10 P, és transparent i òpticament anisòtropa. Es pot identificar mitjançant la microscòpia òptica amb llum polaritzada i pels espectres característics de difracció per ratjos X.

L'examen microscòpic revela una estructura característica en forma de mosaic o xarxa plana i en alguns casos poden observar-se petites unitats esfèriques òpticament actives.

La mesofase laminar, en sistemes binaris aigua-anfifílic, existeix sols per a composicions amb alt contingut en anfifílic (superiors al 50%).

Una estructura relacionada amb la fase de cristall líquid laminar és l'anomenada fase de "gel". Es tracta d'un estat intermig entre el cristal·lí i el de cristall líquid. Així, mitjançant la difracció per ratjos X, s'ha vist que es tracta d'una estructura de tipus laminar en la que les cadenes hidrocarbonades no presenten el grau de desordre característic de l'estat líquid, sino que són rígides i disposades paral·lelament les unes amb les altres. (figura 5).

+Estructura hexagonal.

En la fase de cristall líquid amb estructura hexagonal, les molècules anfifíliques formen veritables cilindres (amb la part hidròfoba dirigida cap a l'interior i la part polar cap a la superfície) disposats en forma hexagonal en un medi continu aquós. A l'examinar, a través de la llum polaritzada, una fase de cristall líquid hexagonal, s'obseva una textura en forma de ventall o angular característica. Es tracta d'una fase molt viscosa (20-45P), transparent i anisòtropa.

En sistemes binaris aigua anfifílic, la fase mesomòrfica hexagonal apareix a concentracions superiors del límit de la solució micel·lar aquosa.

En la fase de cristall líquid amb estructura hexagonal invertida (figura 6), la part interior dels cilindres està ocupada per molècules d'aigua que estan envoltades pels grups polars del compost anfifílic, quines cadenes hidrocarbonades formen la fase externa contínua entre els cilindres.

+Estructura cúbica.

Les mesofases liotròpiques cúbiques presenten molta més complexitat estructural que les de tipus laminar i hexagonal. Encara que des de fa temps s'havia establert per la difracció de ratjos X, que tenen simetria cúbica, no s'ha aconseguit encara determinar d'una forma definitiva les seves estructures.

Les fases de cristall líquid cúbiques són molt viscoses i isotròpiques pel que no presenten birrefringència a l'observar-los al microscopi a través de la llum polaritzada.

Aquesta gradual complexitat d'ordenació en l'espai (1,2 i 3 dimensions) dels empaquetaments moleculars, és ideal i no totes les substàncies anfifíliques a l'interaccionar amb l'aigua donen lloc a una successió d'estructures en funció de la quantitat de dissolvent i en la majoria dels casos sols presenten una d'elles.

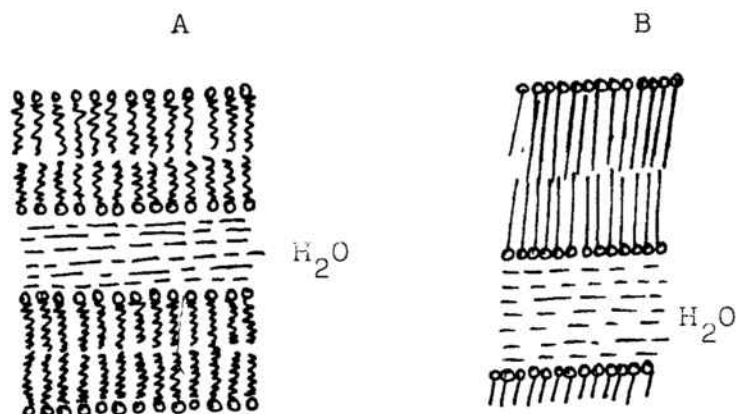


Figura 5

Esquema de l'estructura de:
 A.- cristall líquid laminar.
 B.- gel.

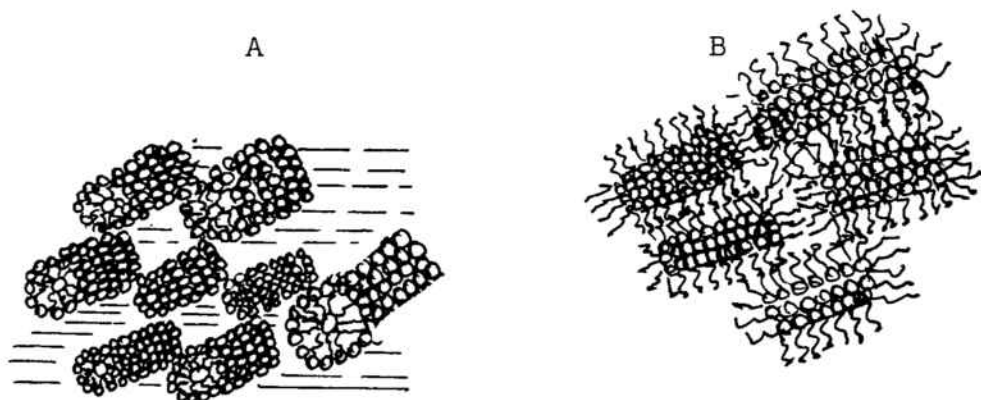


Figura 6

Esquema de l'estructura d'un cristall líquid de tipus:
 A.- hexagonal normal.
 B.- invers.

b) Cristalls líquids termotròpics (Saupe, 1974).

Com ja s'ha indicat es coneix com a cristall líquid termotròpic el que es forma per l'acció de la calor sobre sòlids purs o barreges de sòlids.

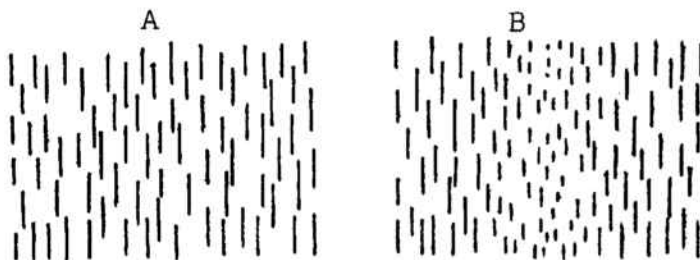
Es classifiquen en nemàtics, colestèrics i esmectics.

El terme esmectic no és específic, s'empra per anomenar aquells cristalls líquids termotròpics que no es poden incloure en cap dels altres dos grups.

Els nemàtics poden estar formats per compostos que són òpticament inactius o per modificacions de racèmics i consisteixen en molècules que tenen una conformació més o menys allargada. Una característica del model molecular nemàtic és la parcial ordenació paral·lela de les molècules amb un eix que, o bé coincideix o és molt proper a la posició intermitja del llarg eix geomètric de les molècules (figura 7. a.)

Figura 7.

Les línies representen les molècules en les seves orientacions preferents.



La distribució dels centres de gravetat és similar al d'un líquid isotròpic amorf.

Els cristalls líquids colestèrics estan formats per compostos òpticament actius o barreges òpticament actives. N'hi ha d'isomorfs i miscibles amb els nemàtics, però mentre que en aquests l'estructura equilibrada correspon a una alineació paral·lela uniforme, en els colestèrics correspon a una estructura planar uniformement enrotllada. En aquesta estructura, la direcció de l'eix òptic local és constant en plans que estan situats perpendiculars a l'eix enrotllat i gira regularment al llarg d'aquest eix tal com s'indica en la figura 7 b.

1.4.2.- LIPOSOMES.

La primera descripció de l'existència dels liposomes o vesícules lipídiques va ésser feta per Bangham al 1965. Citant les seves pròpies paraules "quan els lípids es posen en contacte amb l'aigua, l'ordenació preferent deguda a la seva estructura hidròfoba i hidròfila és de capes paral·leles". Per raons dinàmiques, és probable que en l'estat d'equilibri cada bicapa lipídica formi una membrana senzera (no havent-hi contacte entre les interfases hidrocarbó-aigua) del que es dedueix que cada compartiment aquós serà discret i aïllat dels seus veïns. L'esquema corresponent ve indicat a la figura 8.

Actualment, els liposomes són sistemes ampliament usats com a model de membrana. La seva capacitat d'introduir materials dins del compartiment intracel·lular ha fet que siguin profusament emprats en biologia i medicina. Així mateix, pel fet de poder ésser de composició lipídica variable a voluntat,

han estat citats en nombrosos treballs com un sistema per a estudiar interaccions entre lípids i molècules opiàcies o proteïnes mitjançant tècniques físico-químiques tals com l'Anàlisi Tèrmica Diferencial, Propietats òptiques, Ressonància Magnètica Nuclear, Ressonància d'espí Electrònic, etc.

a) METODES DE PREPARACIO.

Els liposomes inicialment obtinguts i descrits per Bangham al 1965, eren de tipus multilaminar, és a dir, formats per bicapes concèntriques de lípid entre les que hi havien molècules d'aigua. El seu tamany era molt heterogeni i la seva capacitat d'emmagatzematge de soluts variable. Es per això que s'han introduït una sèrie de mètodes (Szoka, 1980,1981) què, partint bàsicament del procés inicial, sotmeten els liposomes inicialment obtinguts a una sèrie de processos que condueixen a l'obtenció de poblacions més homogènies i amb major capacitat d'emmagatzematge.

A continuació, breument es consideren les més usuals:

+ Vesícules multilaminars grans (MLV) (Bangham, 1965)

Són les que s'obtenen directament per agitació en solució aquosa d'un lípid completament sec. La mostra té un aspecte lletós i per a determinats tipus d'assaig s'utilitza directament. Les seves dimensions oscil·len entre 1000 Å i 1500 Å de diàmetre (Barenholz, 1977).

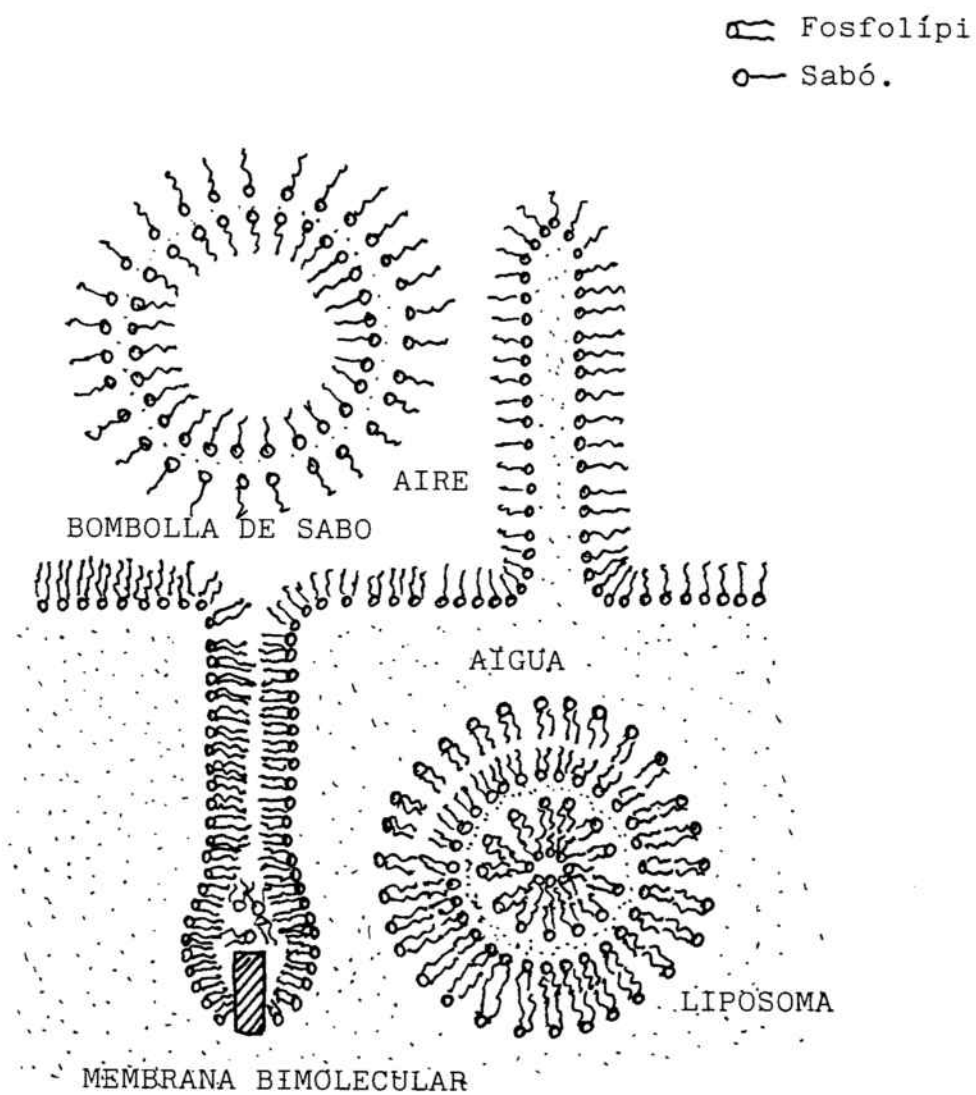


Figura 8.

+ Vesícules unilaminars petites (SUV) (SAUNDERS, 1962; Abramson, 1964)

Són les que s'obtenen a partir de les suspensions de MLV mitjançant sonicació amb sonda o bany d'ultrasons. El tamany de vesícula oscil·la entre 250 Å i 500 Å de diàmetre. Amb gel filtració en Sephadex G-50 es pot obtenir una població més homogènia de diàmetre aproximat de 250 Å (Huang, 1969). Aquest tipus de vesícules, donat el seu petit volum d'encapsulació, és poc adequat pel treball amb molècules grosses (Adrian, 1979).

+ Vesícules unilaminars grosses (LUV).

Les limitacions presentades per les SUV van estimular la posta a punt de nous procediments per a l'obtenció de vesícules unilaminars de gran tamany.

Un dels mètodes més emprats és el d'infusió (Deamer, 1976; Schieren, 1978). Consisteix en injectar una solució d'un lípid en un solvent no polar dins d'una solució aquosa a una temperatura tal, que el solvent s'evapori. Aleshores, el lípid queda en l'interfase de la bombolla de vapor i de la fase aquosa. Els liposomes obtinguts així, contenen una o poques bicapes lipídiques i el seu diàmetre ve a ésser de 1000 Å a 2000 Å.

També es poden obtenir per evaporació en fase reversa (Szoka, 1978) que consisteix en tenir el lípid dissolt en una barreja d'aigua i solvent no polar, de manera que el lípid està formant micel·les inverses. Quan el solvent no polar és evaporat al buit, les micel·les formen vesícules grans uni i oligolaminars.

b) FACTORS QUE AFECTEN L'ESTABILITAT DELS LIPOSOMES.

+ Residus de solvent.

Es precis secat el lípid al buit durant unes 12 hores per tal d'eliminar les traces de dissolvent orgànic emprat. En alguns casos es fa servir la filtració sobre gel. No obstant, és difícil conèixer la quantitat de dissolvent que encara queda en el liposoma. Certs autors recomanen afegir quantitats conegudes del solvent a la preparació dels liposomes i comprovar com afecten al paràmetre quina variació s'està estudiant.

Si es tracta de fer mesures en solució no és massa important, però en els casos d'anàlisi tèrmica diferencial, es pot observar una deriva de la línia de base deguda a l'evaporació de traces de dissolvent orgànic.

+ Presència de cations.

En alguns casos la presència de cations pot induir a l'agregació dels liposomes, observable per light scattering. Per a evitar-ho es treballa amb una certa quantitat d'EDTA.

+ Peroxidació i hidròlisi dels lípids. (Klein, 1970)

Els lípids insaturats poden experimentar oxidació en els seus dobles enllaços per efecte del O_2 de l'aire. Normalment es treballa amb lípids recentment purificats i es guarden a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ en atmosfera de nitrogen.

Per a comprovar l'extensió del procés d'oxidació es pot realitzar l'espectre de UV i examinar les absorpcions a 215 i 230 nm. Aquesta última és indicativa de la presència de peròxids.

Els lípids poden, així mateix, sofrir un procés d'hidròlisi què, alterant el seu balanç hidròfil-hidròfob, afecta l'estabilitat del liposoma. Això s'evita en gran manera emprant lípids acabats de purificar en cada experiment, cosa que es pot veure en l'apartat de mètodes.

c) INTERACCIONS DE DROGUES AMB LIPOSOMES.

Les dues aplicacions majoritàries dels liposomes han sigut com a model de membrana (per a estudiar-hi fenòmens de transport, interaccions lípid proteïna, receptors, canals iònics) i com a sistema de transport de molècules biològicament actives. En aquest segons cas és evident que les drogues polars o hidrofíliques es trobaran en l'interior aquós del liposoma i les hidrofòbiques estaran preferentment en la bicapa lipídica. La quantitat de droga polar que pot ésser emmagatzemada per unitat de pes de lípid depen de la solubilitat de la droga i del volum d'aigua encapsulada per massa de lípid. Això varia molt d'un tipus de liposoma a un altre. Aiximateix, també influeix la càrrega iònica del liposoma.

Des d'un punt de vista pràctic s'ha experimentat amb diversos tipus de drogues i de lípids a fi i efecte de trobar les condicions adequades d'ancapsulament i estabilitat.

Respecte a les drogues que afecten el sistema nerviós central hi ha treballs publicats sobre l'efecte de l'etanol en liposomes fets amb lípids cerebrals, neurolèptics com la cloropromacina, anestèsics i d'altres.

Respecte a l'ús dels liposomes per l'estudi d'interaccions molècules -receptors, cal citar els treballs de Gregoriadis, 1973; Rothman, 1973; Mayhew, 1977; Ostro, 1978, entre d'altres.

Com a criteris generals per l'elecció dels lípids constituents dels liposomes cal considerar:

-Si sols s'empren com a vehicles de transport, que siguin inerts respecte a la droga que es preten encapsular i al seu receptor, és a dir, que no interaccioni amb ells de manera específica.

- Si s'empren per a determinar estructures químiques de receptors. S'han de formar amb lípids dels que hi hagi notícia de que formen part del receptor estudiat.

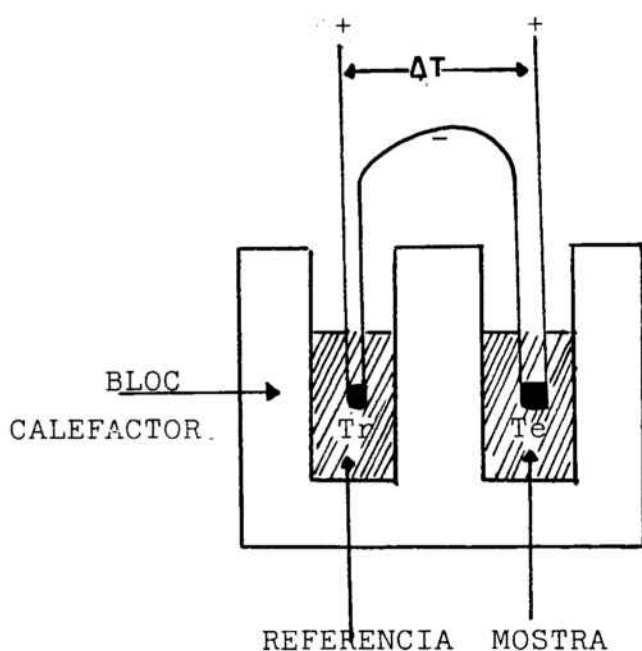
Aquest segon cas és el considerat en el present treball de licenciatura referit als receptors i drogues opiàcies. En general però, per a confirmar si existeix una interacció específica entre un determinat lípid i una droga que exerceix un efecte fisiològic en l'organisme mitjançant els liposomes com a sistema de treball, es pot atendre a diferents propietats físico-químiques dels lípids.

En primer lloc, si és possible, convé seleccionar una o varies drogues que s'ancorin en el mateix receptor i quina activitat farmacològica es trobi descrita a la literatura. En segon lloc, es seleccionaran un seguit de paràmetres físico-químics del lípid que poden venir afectats per l'interacció amb les drogues i que permetran treure conclusions sobre el grau d'interacció i la seva especificitat.

1.5.- ANALISI TERMICA DIFERENCIAL.

Generalitats i aspectes teorics.

L'anàlisi tèrmica diferencial consisteix fonamentalment en seguir l'evolució de la diferència entre dues temperatures, la del material estudiat i la d'una substància escollida com referència, que no ha de presentar efecte tèrmic anormal en la gamma de temperatures en que s'efectua l'estudi. En la figura següent es mostra esquemàticament el principi d'aquesta tècnica.



$$\Delta T = T_e - T_r$$

Figura 9

Es monten dos termopars en oposició i les seves soldadures es posen en contacte respectivament, amb la mostra, E i la substància de referència, R. El montatge diferencial dels termopars confereix una sensibilitat de detecció més elevada, l'anàlisi tèrmica simple (corbes de calentament). Malgrat això, presenta certes dificultats, tant de principi com experimentals. Així, la qualitat i naturalesa de l'informació obtinguda depenen del tipus d'aparell emprat i de les condicions operatives escollides.

-Fenòmens detectats per anàlisi tèrmica diferencial (ATD)

La relació $G = H - TS$, defineix l'entalpia lliure d'un sistema, en el que H és l'entalpia del sistema a la temperatura T i S és l'entropia. A una temperatura T_e , l'estat d'equilibri estable d'un sistema és aquell en que l'entalpia lliure, G, sigui mínima, i en el zero absolut la forma estable és aquella en que l'entalpia, H, sigui mínima.

En el cas del canvi d'estat d'un cos pur a pressió pràcticament constant, cas d'una transformació alotròpica la forma α estable a baixa temperatura i la β a alta temperatura estan en equilibri a la temperatura de transformació T_e .

A aquesta temperatura, les entalpies lliures són iguals: $(G_\alpha = G_\beta)_{P, T_e}$; però les seves entropies, $-S_\alpha$ i $-S_\beta$ lligades a la primera derivada de l'entalpia lliure, difereixen en $T_e \Delta S$, es a dir $(\Delta H_{\alpha \rightarrow \beta})_{T_e} = T_e \Delta S_{\alpha \rightarrow \beta} > 0$

Aquesta absorció de calor $(\Delta H_{\alpha \rightarrow \beta})_{T_e}$ a la temperatura T_e és la detectada per l'anàlisi tèrmica diferencial.

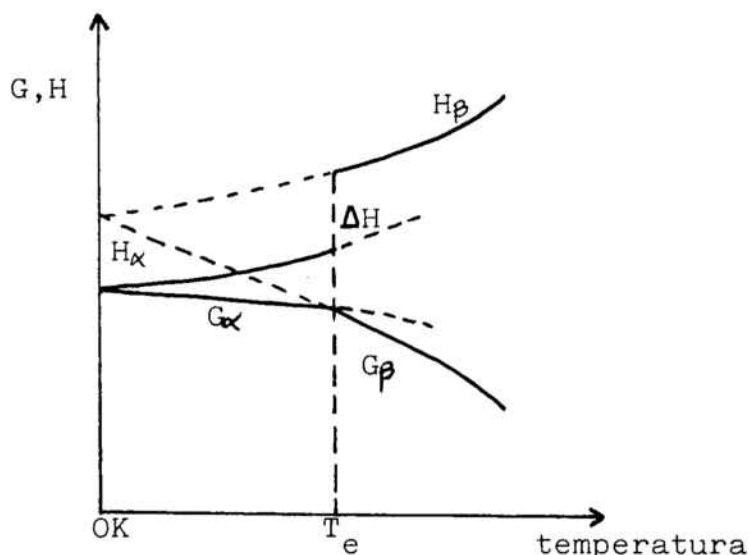


Figura 10

En les condicions habituals de l'anàlisi tèrmica diferencial, les variables considerades són la temperatura i la pressió, i la regla de les fases aplicada al sistema és $v = c + 2 - f$. En general, per a un canvi d'estat d'un cos pur, aquesta equació queda $v = 1 + 2 - 2$. El sistema té un sol grau de llibertat, és a dir, a cada valor de la pressió correspon un valor donat de la temperatura.

En el cas particular d'una experiència efectuada a la pressió atmosfèrica considerada com una constant, la temperatura resta constant durant tot el procés de transformació (fusió, solidificació, transformació alotròpica d'un cos pur), el fenomen és invariant.

Igualment en la fusió o solidificació d'un eutèctic sota una pressió, la temperatura de l'eutèctic és fixa ($v = 2+1-3=0$).

La fusió o la cristal·lització d'una solució sòlida (dos components, una fase líquida i una fase sòlida) és un fenomen divariant: $v = 2+ 2 - 2 = 2$. Per a una pressió determinada (pressió atmosfèrica) el procés s'efectua en un interval de temperatures T_i i T_f . En el moment de la cristal·lització, la temperatura T_i correspon a la formació del primer germen en el líquid, i la T_f a la desaparició de les últimes traces de líquid.

- Transicions de primer ordre.

Les transicions de primer ordre s'efectuen amb una calor latent igual a la variació d'entalpia del sistema. Per a un procés endotèrmic, la variació d'entalpia del sistema és positiva i igual a la calor absorvida pel sistema. Per a un procés exotèrmic, la variació d'entalpia és negativa i igual a la calor cedida pel sistema.

Si T_e és la temperatura de la mostra i T_r la de la substància de referència, i l'augment de temperatura s'efectua linealment, del tipus $T = \beta t$, éssent t el temps. Un fenomen endotèrmic que correspongui a una transició de primer ordre lineal, manté la temperatura T_e de la mostra constant durant tota la transformació (cas d'un fenomen de variança nul·la) mentre que la substància de referència continua augmentant la seva temperatura segons la llei inicial imposada, es a dir, que al començament del fenomen $T = T_e = T_r$ i després d'un determinat temps, $T_e = T$ i $T_r = T + \beta t$.

La senyal diferencial enregistrada $T = T_e - T_r = - \dot{t}$ seguirà un desplaçament lineal, de pendent. Quan la transició acaba, la temperatura de la mostra s'igualarà a la de la substància de referència segons un retorn exponencial a la línia de base.

La corba de ATD ha de dibuixar-se de forma que en les ordenades estigui representada la diferència de temperatures (així els efectes endotèrmics estan dirigits cap avall), i en les abscises el valor de la temperatura T .

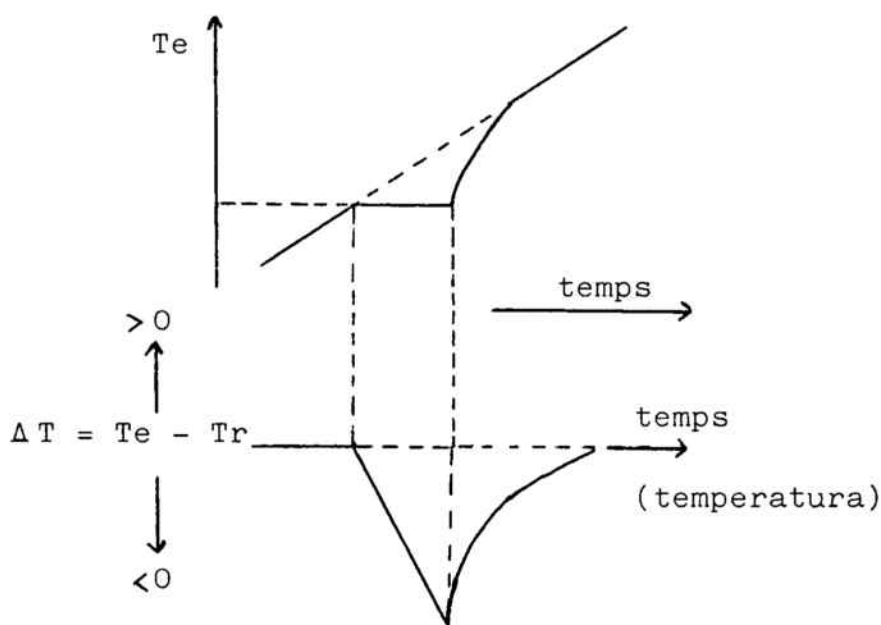


figura 11.- Anàlisi tèrmica diferencial

- Transicions de segon ordre.

Una transició de segon ordre és la que presenta una discontinuïtat en la variació de la calor específica, C_p , de la mostra lligada a la segona derivada de l'entalpia lliure. La corba de variació de la C_p en funció de la temperatura sol representar una forma peculiar. (figura 12).

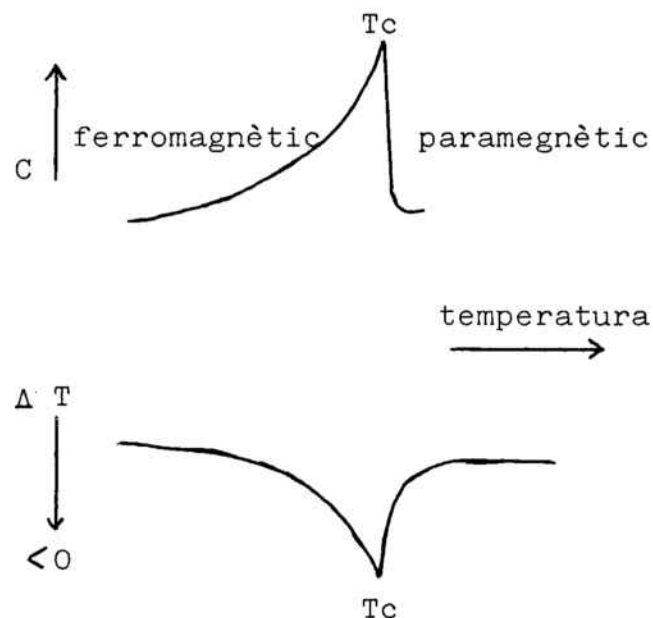


Figura 12.

La discontinuïtat en la variació de la calor específica de la mostra explica que sigui possible detectar aquest tipus de transicions per ATD. Malgrat això, són més difícils d'observar que les de primer ordre degut a l'existència de fenòmens premonitors que provoquen un esglaonament de la transformació i fan difícil la seva localització en l'escala de temperatures.

Mentre que en una transició de primer ordre la temperatura de la transformació és el començament del fenomen, en el cas d'una transformació de segon ordre, la temperatura de la transformació és la que marca la fi del fenomen.

- Transformacions que impliquen reaccions químiques amb o sense pèrdua de matèria.

El tractament termodinàmic és similar al que s'ha vist en les transicions de primer ordre. La forma de les corbes és del mateix tipus i en un procés endotermic la variació d'entalpia és positiva i igual a la calor absorvida pel sistema, encara que això no representa que tota la variació de l'entalpia sigui deguda a la reacció. Part de la calor absorvida pot ésser dissipada per altres efectes del sistema. Per això és necessari conèixer el comportament dels compostos purs.

En cas de fenòmens de deshidratació amb desplom de l'edifici estructural, ha de considerar-se la formació de nous compostos així com la descomposició, en la que el procés és complex. Poden existir una sèrie de fases intermitges que absorveixen o cedeixen calor al formar-se.

1.6.- DETECCIO DE TRANSICIONS DE FASE DELS FOSFOLIPIDS AMB LIPOSOMES.

Quan els fosfolípids estan en una distribució de bicapa, presenten transicions de fase des d'un estat de gel (sòlid a baixes temperatures) a una de cristall líquid (fluid a temperatures altes) (Chapman, 1975). Aquesta transició de fase és un procés endotèrmic i, pels fosfolípids purs, ocorre en un rang molt estret de temperatures al voltant d'una temperatura característica (T_c) o temperatura de transició. En la figura 13 es representa el canvi sofert per l'estructura de la bicapa.

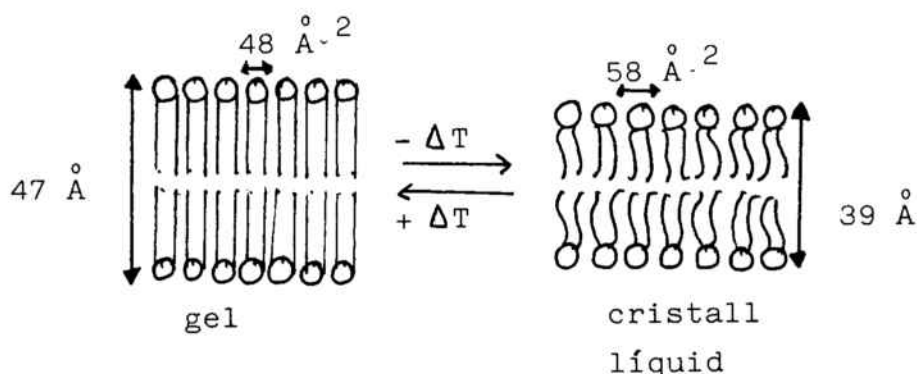


Figura 13. - Fase de transició de gel a cristall líquid.

En l'estat de gel, les cadenes d'àcids grassos estan en una conformació estesa (tot anti) i empaquetats molt apretadament. La seva llibertat de moviment està restringida. Per damunt de la T_c , les cadenes acíliques són molt més mòbils, augmenta l'àrea de la bicapa per molècula de fosfolípid i disminueix l'espessor de la bicapa. La temperatura de transició ve determinada per la naturalesa de la cadena d'àcid gras i del grup polar del fosfolípid.

En el cas de la dipalmitoilfosfatidilcolina és de 41°C. Les cadenes d'àcid gras insaturat produeixen una disminució de la temperatura de transició. Amb fosfolípids àcids, la presència de cations divalents o canvis del pH del medi poden tenir una influència considerable en la temperatura de transició.

En barreges de fosfolípids, la transició de fase té lloc en un rang de temperatures bastant ampli. En aquest interval de temperatures, es produeix una separació de fase en la que coexisteixen zones de lípid fluid i sòlid que es diferencien en la seva composició. Qualsevol preparació d'un fosfolípid d'origen natural s'ha de considerar com una barreja de molècules amb diferents cadenes d'àcids grassos.

Aquestes transicions han estat detectades per mètodes calorimètrics o espectrofotomètrics tal com es descriu en l'apartat de mètodes.

1.7.- MICROSCOPIA ELECTRONICA.

El microscopi electrònic permet aconseguir augments molt més grans respecte als donats per un microscopi òptic per gran que sigui la resolució d'aquest.

El fonament està en que enlloc de fer servir un feix de ratjos lluminosos, com en el cas del microscopi òptic, s'empren feixos d'electrons que tenen una longitud d'ona associada considerablement més petita. Així poden obtenir-se imatges separades de punts distants entre unes decenes d'Angstrom.

Enlloc de lents s'empren carrets recorreguts per corrents elèctriques apropiades, que desvien el feix d'electrons procedents d'un filament. Degut a que els electrons són molt absorbits en l'aire, s'ha d'operar en alt buit cosa que suposa un inconvenient alhora d'examinar certes preparacions com és el cas de bacteries, quines membranes cel·lulars esclaten. A més a més, el feix d'electrons, al travessar l'objecte que s'observa provoca un calentament intens.

En l'apartat de mètodes es descriuen les tècniques de tinció i els diferents sistemes d'observació al microscopi electrònic.

Tinció de liposomes.

La microscòpia electrònica ha estat aplicada des de fa temps (Bangham, 1962) a l'estudi dels liposomes. En les primeres proves s'emprà fosfotungstat potàssic pensant que preservaria les estructures lipídiques formades en presència de l'aigua. Es creia que aquesta sal era incapaç de reaccionar

amb les estructures macromoleculares proporcionant així, informació sobre la disposició tridimensional dels complexos formats. Es recolza en les variacions de densitat de la radiació electrònica incident. Això emana del fet de que l'estructura contrastada correspon a una imatge sobreposada de les dues cares de l'objecte tridimensional (Glauert, 1962).

Donat que els liposomes són esfèrics, els marges estaran més marcats per sobreimpressió de les membranes concèntriques disposades a diferents nivells. Les zones internes de les vesícules presentaran una opacitat electrònica per acúmulo de colorant en les regions hidròfiles apicals. Això explica l'imatge que presenten les micrografies electròniques on s'aprecien zones centrals fosques que impedeixen la detecció de les membranes nítidament.

Donat que els liposomes són estructures osmòticament actives (Bangham, 1967; Rendi, 1967), el fet d'emprar colorants en solució no isotònica amb la mostra de vesícules, suposa una variació del seu volum i àdhuc, la seva destrucció. El fet d'emprar solucions hipo o hipertòniques en relació a la mostra, també comporta una determinació equívoca, en el primer cas per excés en el seu tamany i en el segon per defecte.

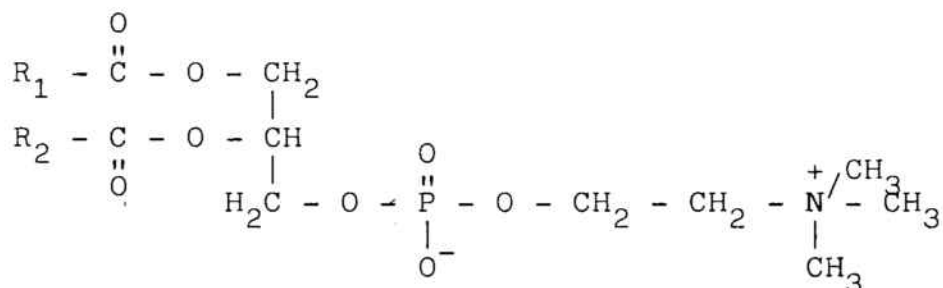
Aquest problema osmòtic pot suposar una destrucció dels liposomes, conseqüència de la qual, l'observació al microscopi serà errònia.

Per tant, quan s'analitzin estructures sensibles a l'osmolaritat del medi, és convenient emprar solucions de molibdat amònic al 2%, pH=6'8 (Munn, 1968) que s'accepta tenen propietats protectores dels sistemes lipídics làbils (Rothfield, 1967) i són útils per la tinció de liposomes (Bangham, 1964).

1.8.- ESTUDI TEORIC DELS COMPOSTOS EMPRATS

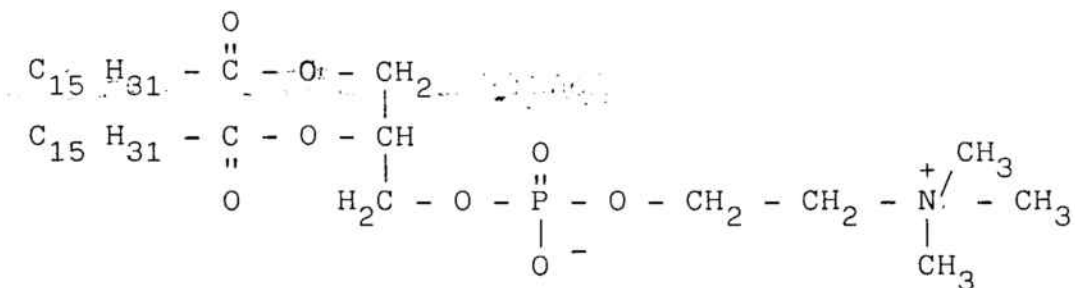
En aquest treball de licenciatura s'ha emprat com a model de membrana els liposomes i cristalls líquids. Els lípids usats han estat bàsicament la fosfatidicolina (PC) i la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).

La fosfatidilcolina és un lípid neutre, constituent majoritari de les membranes cel.lulars. Està format per una barreja d'àcids grassos de diferenta longitud de cadena així com de diferent grau de saturació. Això fa que la seva temperatura de transició (Tc) sigui baixa, -10 °C. La seva fòrmula estructural és:



S'ha escollit per tal d'establir les interaccions inespecífiques de les molècules opiàcies amb una estructura lipídica.

La dipalmitoilfosfatidilcolina és uns dels constituents de la fosfatidilcolina que segons la bibliografia té una temperatura de transició de l'ordre de 41 °C. El seu pes molecular és de 752.



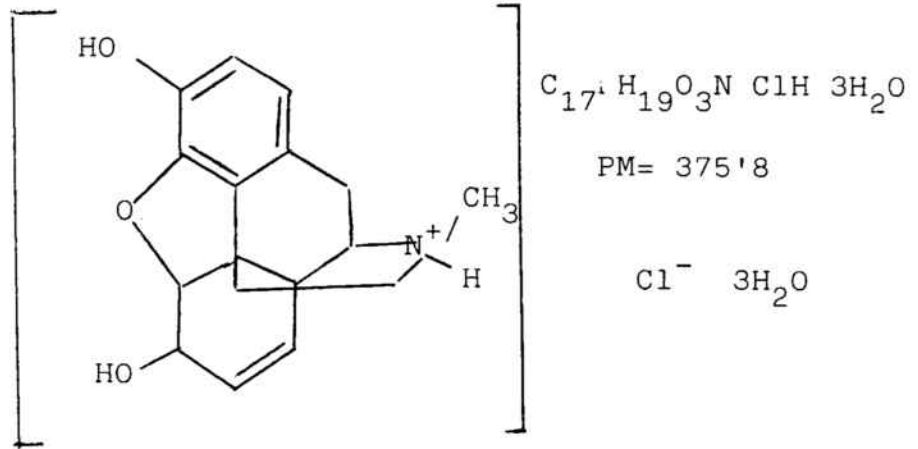
Com a molècules opiàcies s'han emprat majoritàriament el clorhidrat de morfina i el clorhidrat de naloxona. En assatjos complementaris s'ha fet servir la codeïna, l'etilmorfina (co-detilina) i meperidina (petidina).

La morfina és un alcaloide fenantrènic que s'obté de l'adormidera, científicament anomenada *Papaver somniferum*. Es un producte extret de l'opi pel que s'inclou en el grup dels opiàcies. En tre les seves accions destaca la d'analgèssia en front a dolors intensos i persistents. Petites dosis calmen el dolor, mentre que dosis més grans produeixen son. En pacients susceptibles pot causar excitació, vòmits i maretjos.

Actua deprimint el centre respiratori. També presenta una acció antitossiva. Primerament estimula el centre del vòmit per passar, seguidament, a deprimir-lo. Contrau el múscul llis del intestinal produint restrenyiment. Augmenta el to del múscul llis del tracte biliar, urèter i vesícula urinària. Es eficaç en dolors propis dels espasmes biliars, però no s'ha d'usar associada a la papaverina per ésser antagònica del seu efecte relaxador. Presenta eficàcia en dolors i estats d'excitació subsegüents a xocs, cremades i traumatismes. S'usa en l'oclusió vascular aguda d'origen coronari, pulmonar o perifèric, en aquest cas, la papaverina actua sinèrgicament. Està contraindicada en estats asmàtics (depressió respiratòria) i convulsius (degut a l'efecte estimulants medul·lar de l'alcaloide), acidosi diabètica, etc, així com en nens de menys de sis mesos.

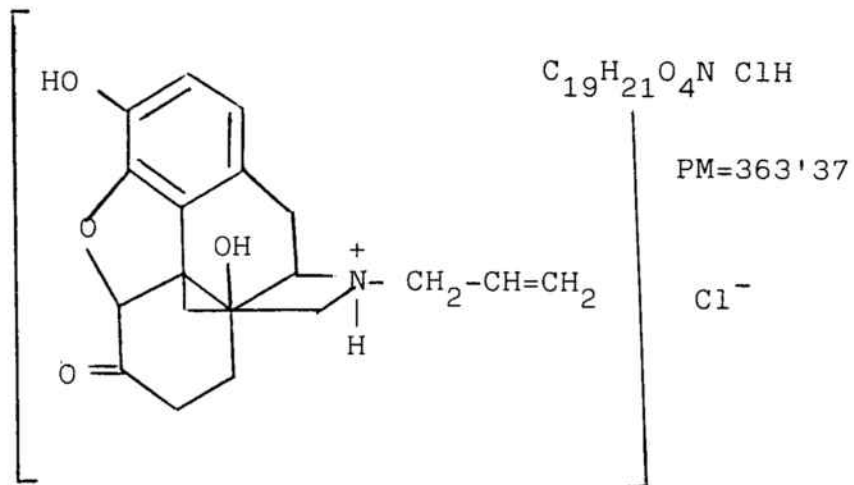
S'utilitza en forma de les seves sals solubles.

En els nostres assatjos hem utilitzat el corresponent clorhidrat.



La naloxona és el compost que més s'aproxima a un antagonista competitiu relativament pur. Les seves accions farmacològiques depenen de l'administració prèvia o no d'un agonista opiàc i del grau en que s'ha desenvolupat la dependència física a aquesta substància.

Petites dosis reverteixen o impedeixen ràpidament en l'home els efectes dels agonistes opiàcics del tipus de la morfina.

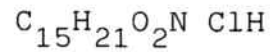
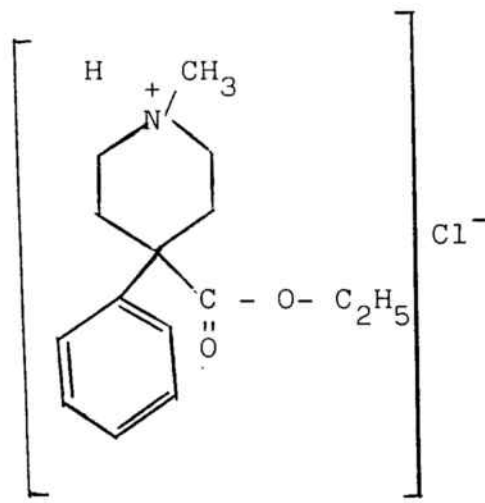


La meperidina és una droga sintètica introduïda per Eisleb i Schaumann el 1939. Tot i que químicament és molt diferent de la morfina, presenta en l'home alguns dels efectes farmacològics d'aquesta. Es lliga als receptors opiàcs exercint les seves principals accions sobre el SNC i elements neurals del budell. Es creu que l'acció analgèsica és deguda preferentment, a l'estructura metil-fenil-piperidina, que té un carboni quaternari que també existeix en la morfina, en la que l'anell piperidínic adopta forma de poltrona i es troba en un pla diferent de l'anell fenantrènic.

Presenta una acció espasmolítica deguda, en part a una deguda, en part, a una depressió parasimpaticolítica (atropínica) i sobretot, a una acció directa sobre la fibra llisa, de tipus papaverínic. Deprimeix la respiració en el mateix grau que la morfina però a dosi equianalgèsica la produeix en menor grau quan s'administra al recent nat. La seva acció és més curta que la de la morfina pel que la depressió continua del SNC sols s'aconsegueix quan la droga s'usa a intervals de 4 hores.

Els símptomes per supressió es caracteritzen per desenvolupar-se més ràpidament i ésser de menor durada, així com per l'aparició de menys efectes autonòmics referint-ho a la morfina.

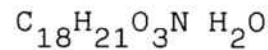
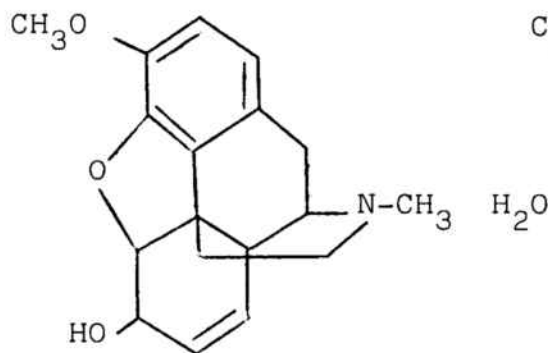
Els seus efectes indesitjables són semblants als d'aquella exceptuant que no produeix ni restrenyiment ni retenció urinària.



PM= 283'8

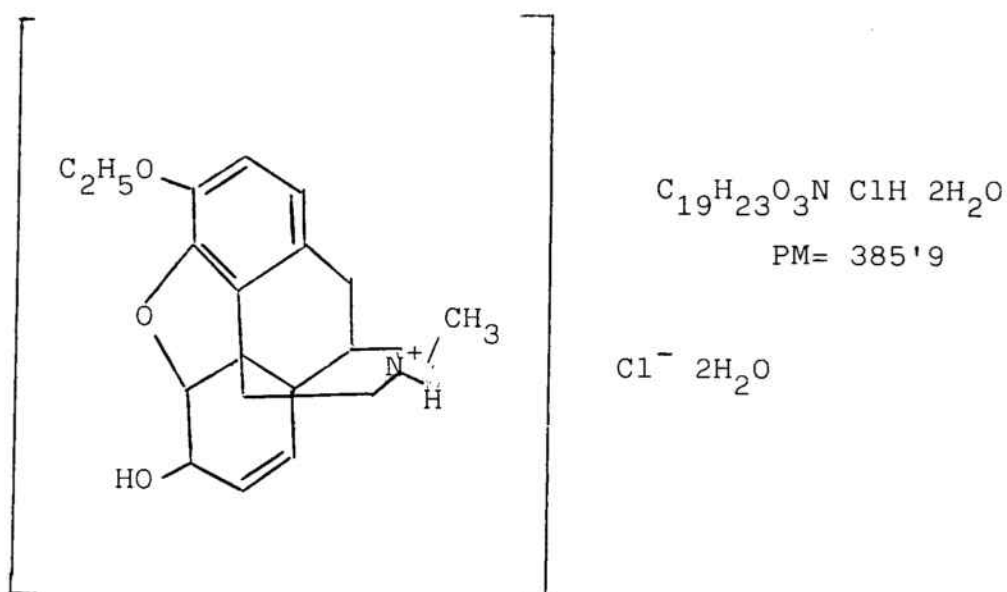
La codeïna és un alcaloide fenantrènic que també s'extreu de l'òpi. Es un antitossiu d'acció central. Calma o anul·la la tos actuant sobre el centre tossígen situat en el bulb raquídic, molt pròxim al centre del vòmit.

Presenta acció hipnòtica molt suau i la seva potència analgèsica és molt menor que la de la morfina. No deprimeix el centre respiratori i no disminueix la secreció bronquial. Alivia l'irritació local del tracte respiratori, pel que s'empra per la tos seca irritativa. No produeix addició.



PM=317'4

L'etilmorfina és un alcaloide fenatrènic semisintètic. Presenta acció anàloga a la codeïna. No deprimeix el centre respiratori en la proporció de la morfina i es pot usar com antitossiú en bronquitis, asma bronquial, etc. També té propietats analgèssiques i sedants, anàloques a les de la morfina, a la que pot substituir.



Opiaci	Acció analgèssica (morfina= 1)
Codeïna	0'1
Etilmorfina	0'1
Meperidina	0'1
Naloxona	----

Taula 2.

1.9.- OBJECTIUS.

En el present treball de licenciatura es proposa l'estudi de les interaccions que s'estableixen entre la fosfatidilcolina i diverses molècules opiàcies, anàlisi que s'ha dut a terme mitjançant la formació de liposomes. Emprant doncs, aquest model de membrana, s'ha determinat la seva capacitat d'encapsulació d'opiacis i aiximateix, l'influència de tals molècules en la temperatura de transició dels lípids assatjats.

L'eficàcia d'encapsulació s'ha determinat per a diversos tipus de liposomes. L'influència en els canvis de fase s'ha estudiat mesurant la variació de turbidesa (U.V.) i l'anàlisi tèrmica diferencial.

La fosfatidilcolina i la dipalmitoilfosfatidilcolina són els lípids emprats que es diferencien des del punt de vista químic en la longitud de les cadenes d'àcid gras que esterifiquen els hidroxils de la glicerina. Les interaccions que s'estableixen entre les seves molècules i les dels opiacis estudiats són en principi les mateixes. Ara bé, quan es tracta d'estudiar interaccions mitjançant propietats associades a la temperatura de transició, és molt més senzill emprar la dipalmitoilfosfatidilcolina. Així doncs, i tenint en compte a més a més que la fosfatidilcolina és molt més econòmica que l'altre lípid i que la seva purificació és relativament fàcil de realitzar, al llarg del present treball s'ha emprat solsament la dipalmitoilfosfatidilcolina en el cas de propietats depenents de la temperatura de transició i la fosfatidilcolina en tots els altres experiments.

MATERIALS I METODES

II.- MATERIALS I METODES.

1.- INSTRUMENTACIO.

Les anàlisis elementals han estat fetes en la Secció d'Anàlisi de l'Institut de Química Bioorgànica del C.S.I.C.

Les determinacions de poder rotatori específic s'han realitzat en un polarímetre PERKIN ELMER 141.

a) Equip per a l'obtenció de liposomes.

- Sonda d'ultrasons. LABSONIC 1510. (figura 14)

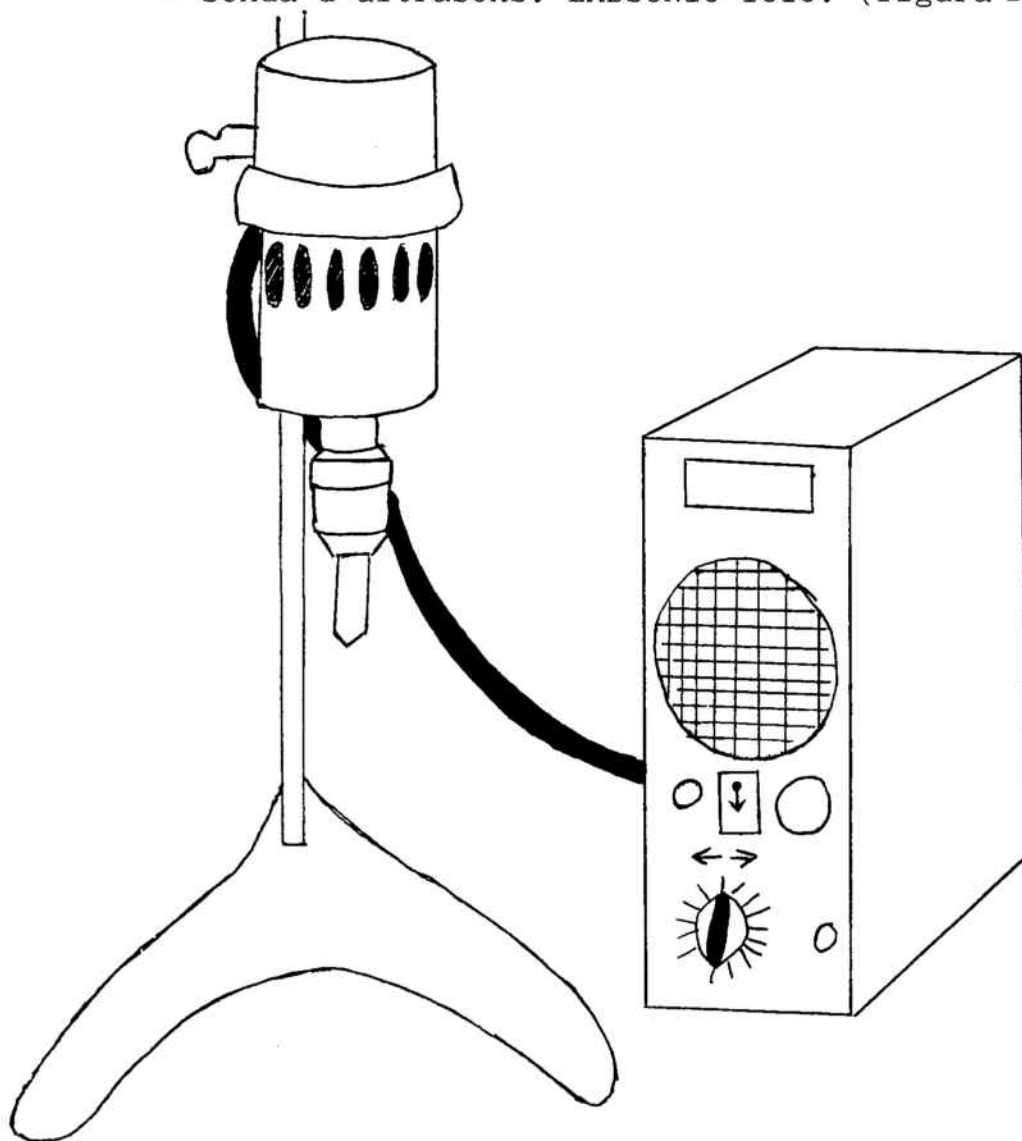


Figura 14.

- Bany d'ultrasons. SELECTA.
- Ultracentrífuga. BECKMAN L 5 - 65 B. Amb rotor SW 60 Ti
- Cromatografia de filtració sobre gel.(Figura.15)

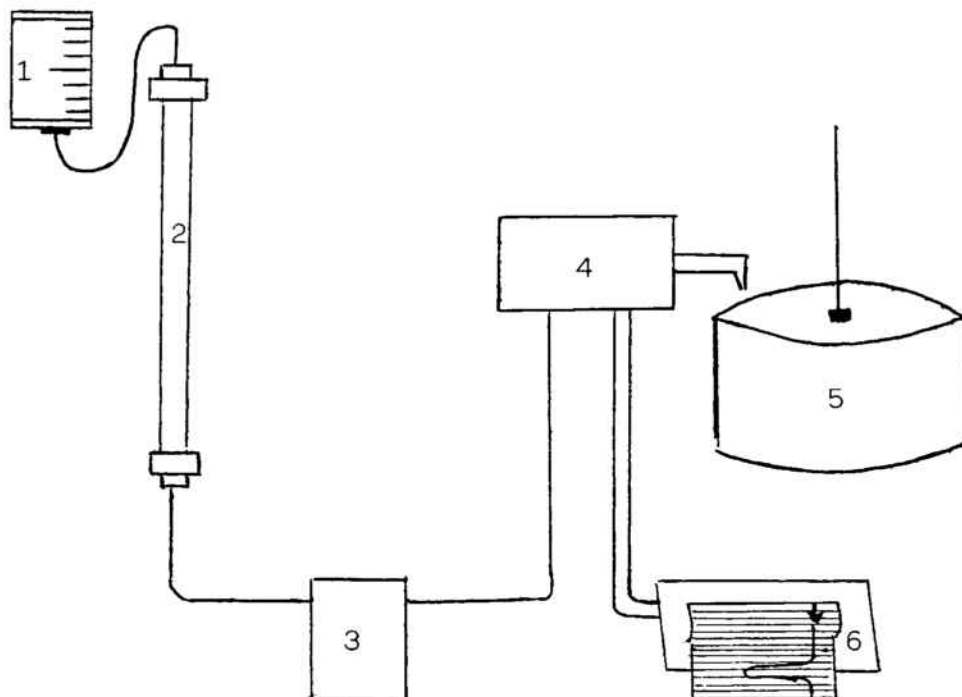


Figura 15.

- 1.- Reservori que conté l'eluent.
- 2.- Columna PHARMACIA (60 cm x 1'5 cm).
- 3.- Bomba de flux constant.
- 4.- Detector de U.V. amb filtre de 228 nm.
Marca LKB 2138 UVICORD S.
- 5.- Col·lector de fraccions.
- 6.- Registrador gràfic.

b) Espectrefotòmetre d'ultraviolat.

Les mesures d'absorció a l'ultraviolat s'han efectuat en un espectrefotòmetre marca SHIMDZU UV - 240 que està connectat a un registrador de la mateixa marca.

Les cubetes per a introduir la mostra són Pye Unicam Ltd de quars (10 mm).

Com accessori alhora de mesurar la variació d'absorència en front a la variació de temperatura, s'ha fet servir un bany termostatitzat (figura;16)

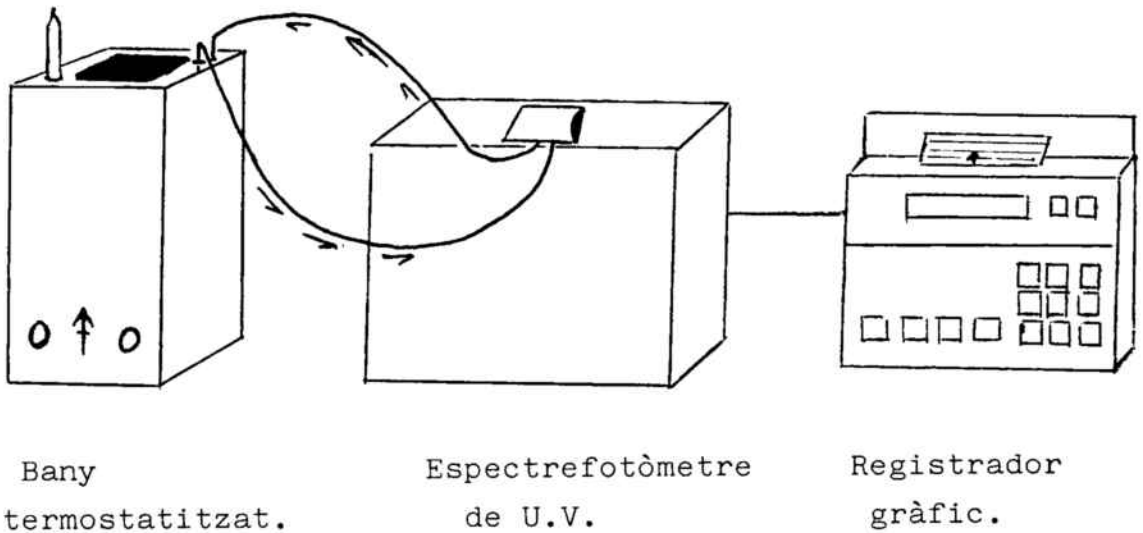


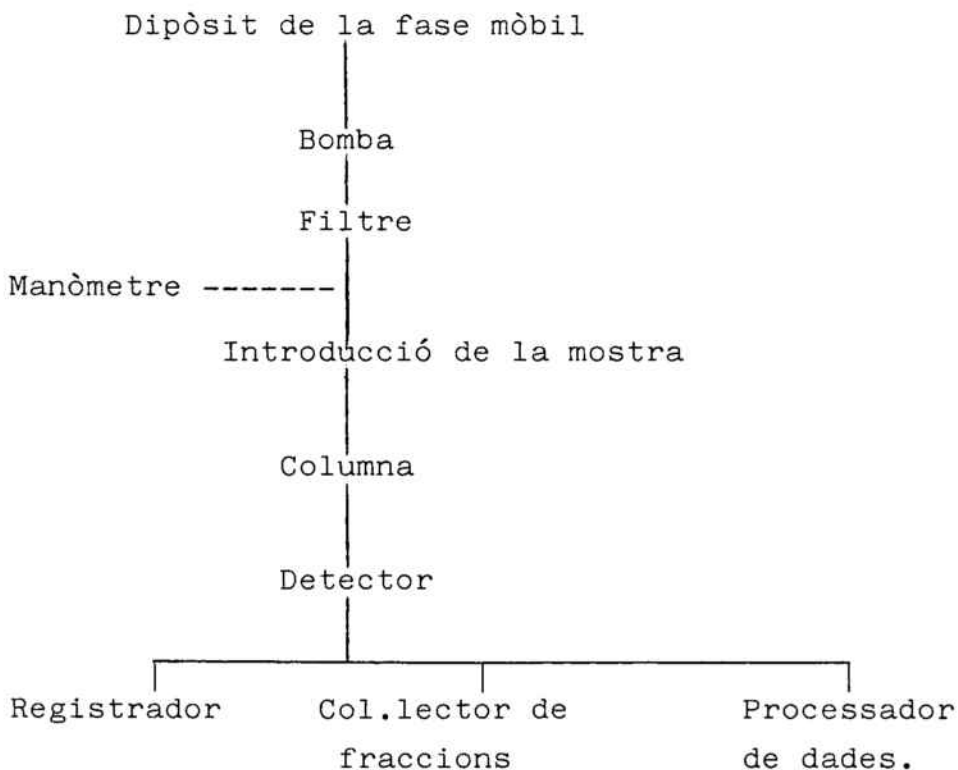
Figura 16.

c) Cromatògraf líquid d'alta resolució (HPLC)

Els components bàsics d'un equip de cromatografia líquida d'alta resolució són:

- Bomba propulsora de la fase mòbil.
- Sistema per a l'introducció de la mostra.
- Columna que contingui la fase estacionària,
- Detector.
- Equip de processament de dades per tractar les que surten del detector.
- Registrador que imprimeix la resposta donada pel detector.

Esquema funcional de la cromatografia líquida:



d) Descripció de l'equip experimental per l'anàlisi tèrmica diferencial.

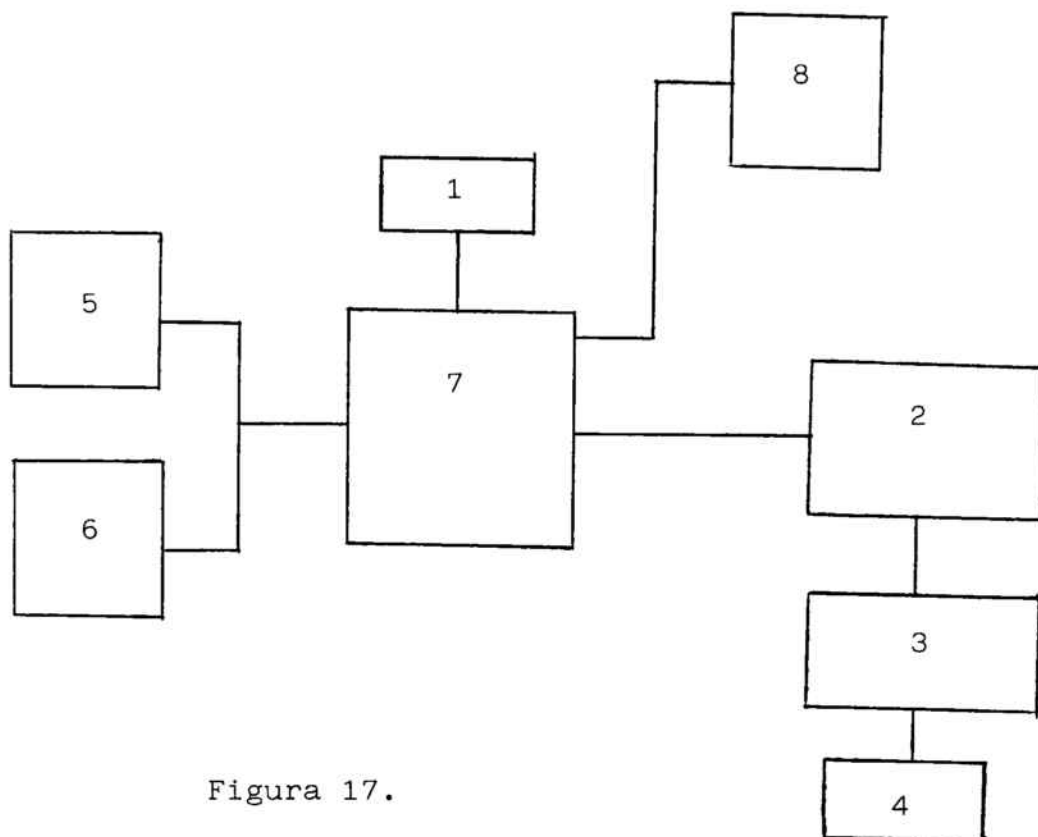
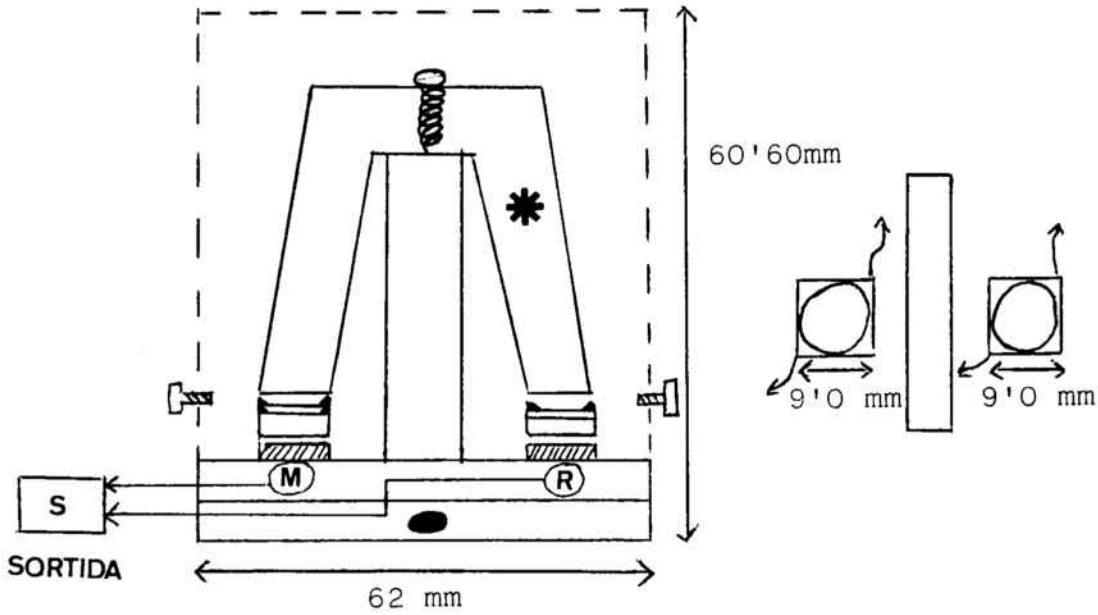


Figura 17.


- 1.- Termòmetre digital LABORTRON S.A. Resolució $\pm 0'1^{\circ}\text{C}$.
- 2.- Nanovoltímetre. KEITHLEY 181. DIGITS $6\frac{1}{2}$. Resolució $\pm 3(0) \text{ nV}$.
- 3.- Ordinador. APPLE II. Europlus.
- 4.- Plotter. HEWLETT-PACKARD 7470 a.
- 5.- Sistema criògen. Refredament mitjançant N_2 líquid.
- 6.- Sistema de calentament. Resistència calefactora (23 Ω), alimentada per una font de corrent contínua (LEYBOLD-HERAEUS) amb voltatge màxim de 30 V, regulant el pas d'intensitat amb un amperímetre digital SOLARTRON de $\pm 0'01 \text{ mA}$ de resolució.
- 7.- Calorímetre. Construït amb Cu, de pes aproximat 1'5 Kg.. El seu esquema ve representat en la figura .
- 8.- Registrador gràfic.





Vista frontal


Vista superior


Figura 18

 Termopiles = 66 termopars connectats en sèrie en cada termopila.

 Crisols per a la mostra i per a la referència.

 Sonda Pt 100 connectada al termòmetre digital.

 Peça de plàstic, per a forçar el contacte entre el crisol i termopiles.

 **S** Conjunt de cables que conté:

- Senyal diferencial que prové de les termopiles.
- Cables de la sonda de Pt connectats al termòmetre.
- Cables per a la calibració

Adquisició de dades.

La senyal diferencial procedent del calorímetre es mesura mitjançant el nanovoltímetre i una tarjeta IEEE l'envia a l'ordinador amb un període de mostreig determinat. La capacitat màxima de punts per mesura és de 6000. Les dades són emmagatzemades en discs per a un posterior tractament. La mesura de la temperatura en funció del temps permet conèixer-la en qualsevol punt de la mesura efectuada. S'empren velocitats de calentament i refredament constants.

2.- SUBSTANCIES QUIMIQUES.

2.1.- Dissolvents:

- Cloroform. CARLO ERBA
- Eter etílic. CARLO ERBA
- Metanol. PROBUS
- Aigua bidestil.lada.

2.2.- Sals i bases:

- TRIS (tris-hidroximetil-aminometà) MERCK
PM=121'14
- Sulfit sòdic anhidre. PROBUS PM= 126,05
- Bisulfit sòdic. PROBUS. PM= 104'06
- Fosfat monopotàssic. PROBUS.PM= 136'09
- Heptamolibdat amònic. MERCK.PM= 1235'86

2.3.- Acids:

- Acid perclòric al 70%. SCHARLAU.
- Acid clorhídric. 1N. PROBUS.
- Acid 1-amino-2naftol-4-sulfònic.FLUKA
PM= 239'25

2.4.- Soports cromatogràfics.

2.4.1.- Cromatografia en columna:

- Oxid d'Alumini (Alúmina) MERCK.
tamany de porus: 70-230 MESH-ATSM
- Sepharosa CL 4B. PHARMACIA

2.4.2.- Cromatografia en capa fina:

Cromatofolis Al de silicagel 60
(sense indicador de fluorescència)
per a cromatografia en capa fina
20x20cm. Espessor de la capa 0'2 mm.
MERCK

2.5.- Fosfolípids:

- Lecitina d'ou.MERCK. PM mig= 787 (PC)
- L - α - lecitina, β , γ - dipalmitoil (sintètica) (DPPC). CALBIOCHEM-BEHRING CORP.

PM=752

2.6.- Opiacis:

- Clorhidrat de morfina anhidre. PM= 321
- Clorhidrat de naloxona . $2H_2O$. PM= 363'37
- Codeïna base lliure. PM= 317'4
- Clorhidrat d'etilmorfina * $2 H_2O$ PM=385'9
- Clorhidrat de meperidina anhidre.PM=283'8

3.- METODES.3.1.- Purificació de la lecitina.(Singleton, 1965)

La fosfatidilcolina és un fosfolípid neutre anomenat comunament lecitina.

S'ailla de l'ou, de plantes i d'animals. El seu color és pràcticament blanc quan la seva obtenció és recent, però ràpidament passa de groc a marron en presència de l'aire. Això és degut a l'inestabilitat dels seus dobles enllaços en front a l'oxigen de l'aire. Es insoluble en aigua però s'emulsiona quan es posa en contacte amb ella, de la mateixa forma que si s'hi afegeix una solució de ClNa. Tampoc és soluble en acetona, olis animals i vegetals. Ho és en canvi, en cloroform, èter de petroli, èter etílic, olis minerals i àcids grassos.

La lecitina d'ou emprada, malgrat ésser de la casa MERCK, presentava algunes impureses degudes a compostos d'oxidació i altres contaminants colorejats (carotenoides). Per això va ésser necessari sotmetre-la a un procés de purificació mitjançant cromatografia en columna de la forma que es descriu a continuació.

Previament a la purificació s'ha de preparar una columna d'alúmina. Per a fer-ho es pesen 100 g d'alúmina neutra (activitat 1) als que s'hi afegixen 100 ml de cloroform. Això es passa a una columna (25 x 2'8 cm) i es va eluint amb cloroform fins la total compactació de l'alúmina (no disminueix de volum). La velocitat de percolació és de 50 ml cada 7 minuts.

Una vegada es té la columna preparada es segueixen els següents passos:

a) Introducció de la mostra.

Es dissolen 5 g de lecitina d'ou impura en 10 ml de cloroform. D'aquesta solució s'introdueixen 6 ml en la columna d'alúmina. Es fa lentament mitjançant una pipeta, apoiant el seu extrem en les parets, per a evitar remoure l'alúmina.

La penetreció total de la mostra s'aconsegueix rentant les parets de la columna amb petites quantitats de cloroform dues o tres vegades.

b) Elució.

Quan tota la lecitina ha penetrat, es comença a eluir amb cloroform. Es recullen 4 fraccions de 50 ml. Després s'elueix amb una barreja de cloroform-metanol (9:1). També s'en recullen 4 fraccions de 50 ml.

El cloroform arrastra els lípids neutres, no la lecitina. Amb una barreja cloroform-metanol surten els lípids més polars. La relació dels dissolvents (9:1) és específica per la lecitina. Si s'augmenta la concentració de metanol surten altres fosfolípids i carotenoides.

c) Detecció. (Skipski i col., 1962)

Es fa per cromatografia en capa fina en placa de sílice (una taca per cada fracció). Com a solvent s'empra una barreja de cloroform (65), metanol (25) i aigua (4). El revelat es fa amb vapors de I_2 .

Abans de realitzar la cromatografia en capa fina, és convenient deixar avançar el solvent fins que hagi recorregut tota la placa. Es retalla 1 cm de la part superior i així s'eliminen les taques degudes a impureses lipídiques del solvent o de la placa.

Es pot fer servir silicagel amb indicador de fluorescència per a revelar la placa enlloc de fer-ho amb vapors de I_2 .

d) Conservació.

S'evapora el dissolvent de les fraccions que contenen lecitina i es guarda aquesta en el congelador sota atmosfera de nitrogen.

La lecitina s'altera als pocs dies de la seva purificació si no es conserva tal com s'ha indicat. Si és així, s'ha de tornar a purificar abans d'ésser usada.

Com a norma general de treball en el present exercici de licenciatura, la lecitina ha estat purificada en petites quantitats de manera que sempre s'ha fet servir immediatament després d'ésser purificada. No obstant, quan ha sigut necessari, s'ha comprovat el seu estat de puresa mitjançant cromatografia en capa fina tal com s'ha indicat anteriorment o bé enregistrant el seu espectre de U.V. Es aquest segon cas, es prepara una solució clorofòrmica de lecitina i es llegeix la seva absorbància en un espectrofotòmetre de U.V. entre les longituds d'ona de 250 i 190 nm (Klein, 1970). Si està oxidada, apareix una corba entre 250 i 310 nm i una altra entre 200 nm i 190 nm. quan no ha sofert aquest procés sols s'aprecia aquesta última. (figura 19).

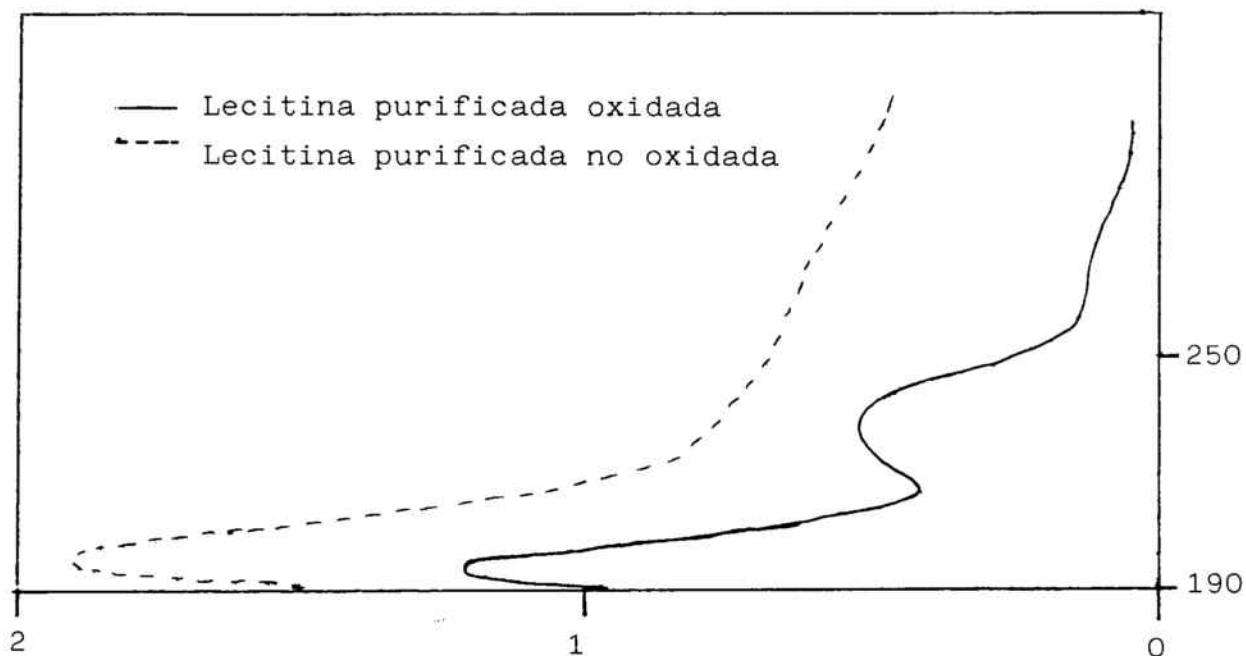


Figura 19.

3.2.- Determinació quantitativa de la lecitina.

L'anàlisi quantitativa estandar de la lecitina es realitza mitjançant una valoració del contingut en fòsfor d'aquest fosfolípid. Així doncs, és necessari realitzar previament una corba patró de fòsfor (Mètode Fiske-Subbarov modificat per Bartlett, 1959).

Els reactius necessaris per aquesta valoració són:

+ Reactiu de Fiske: Es parteix d'una solució de bisulfit sòdic al 15% a la que s'hi afegeixen 0'5 g de sulfit sòdic i 0'25 g d'àcid 1-amino-2-naftol-4-sulfònic.

S'agita i es deixa tota una nit a la nevera. El dia següent es filtra obtenint-se una solució de color groc transparent.

+ Solució d'heptamolibat. Es prepara una solució d'heptamolibat amònic al 5%.

3.2.1.- Corba patró. (Bartlett, 1959; Goñi, 1977; Böttcher, 1961).

Es prepara una solució mare de fosfat que conté 10 mg de fosfat monopotassic per 100ml d'aigua bidestil.lada.

1 ml de la solució mare es passa a un matrau aforat de 10 ml enrasant fins a tal quantitat amb aigua bidestil.lada. D'aquesta nova solució, es pasen a uns tubs aforats de 10 ml: 0'1, 0'3, 0'5, 0'7, 0'9, 1, 2 i 3 ml que corresponen a les següents quantitats en μg : 1, 3, 5, 7, 9, 10, 20 i 30 respectivament.

Es reserva una tub per a posar aigua de la mateixa que serà emprada durant tot el procés, que sofrirà el mateix tractament que els altres tubs i que, per tant, servirà de blanc.

S'addiciona a cada tub 1'2 ml d'àcid perclòric al 70%. Seguidament, es col.loquen els tubs en un bany d'oli a 180°C durant 90minuts. Passat aquest temps, es treuen del bany i es deixen refredar. A continuació s'hi afegeixen 0'4 ml del Reactiu de Fiske i 0'4 ml d'una solució d'heptamolibdat amònic al 5%. S'enrasen els tubs amb aigua bidestil.lada fins a 10 ml i es porten a un bany d'aigua uns 20 minuts, fins que el color es mantingui estable..

Finalment es treuen del bany, es deixen refredar, s'agiten i es llegeix l'absorbància de cadascun en un espectrefotòmetre de U.V. a 830nm.

Notes.

- El fosfat que es fa servir en aquesta prova s'introdueix previament, en un dessecador fins l'obtenció de pes constant.

- Tot el material que es fa servir ha de tractar-se abans amb mescla cròmica per tal d'eliminar qualsevol indicatiu de fosfat.

3.2.2.- Quantificació del fòsfor de la lecitina.

El fòsfor de la lecitina es quantifica mesurant-lo colorimètricament.

Com a mètode s'utilitza el mateix que per a l'obtenció de la corba de fosfat inorgànic (Bartlett, 1959). En aquest cas, la digestió àcida oxida el fòsfor orgànic a fòsfor inorgànic. Això es posa en evidència perquè la solució, inicialment fosca, a mida que el procés d'oxidació avança, va aclarint-se fins a quedar transparent i incolora.

Previament s'ha de calcular la relació aproximada fòsfor-lecitina per tal de que el fòsfor que contingui la lecitina emprada en l'assaig, estigui comprés en l'interval de concentracions del fosfat usat alhora de fer la corba patró.

1 àtom de fòsfor equival a 1 mol de lecitina, per tant, 31 g de fòsfor (PM) equivalen a 787 g de lecitina (PM mig).

Es partirà d'una solució de lecitina que contingui una quantitat de fòsfor equivalent a 10 $\mu\text{g/ml}$.

$$787/31 = 25'41 \text{ g lecitina/ g de fòsfor.}$$

Si es volen preparar 100 ml d'una solució de lecitina que compleixi aquesta relació s'en hauran de pesar 25'04 mg.

Degut a que la lecitina no és hidrosoluble es prepara una solució clorofòrmica de la mateixa.

Es posen 0'1, 0'3, 0'5, 0'7, 0'9, 1, 2 i 3 ml de la solució clorofòrmica en tubs aforats de 10 ml i s'evapora el dissolvent en un dessecador al buit. Després es segueix el mateix procediment que en el cas de l'obtenció de la corba patró.

3.3.- Mètode per l'obtenció de liposomes.

S'han emprat tres mètodes diferents per a obtenir liposomes de diferent tamany i distinta homogeneïtat de mostra a fi de comprovar l'incidència d'aquests factors en la capacitat d'encapsulació.

3.3.1.- Preparació de liposomes multilaminars.

(Wilschut, 1982)

Es formen espontaniament per hidratació d'un fosfolípid sec. Es parteix de 100 μ mols de lecitina (78'8mg) que es depositen en un matrau rodó petit. S'hi afegeixen 2 o 3 ml de cloroform per a dissoldre-la. S'evapora el dissolvent de forma que quedi una fina pel·lícula de lípid per les parets del matrau. Seguidament s'hi addicionen 10 ml de la solució amortidora (TRIS HCl, pH= 7'4) contenint segons el cas la droga que es vulgui encapsular, i es barreja amb l'ajuda d'un bany d'ultrasons. S'obté una solució lletosa de color blanc.

Les vesícules resultants són bastant heterogènies respecte al tamany i nombre de capes (lameles) per partícula. Les més grans comprenen varis μ m de diàmetre.

3.3.2.- Preparació de liposomes unilaminars.

Partint de liposomes multilaminars i per tal de formar-ne d'unilaminars (SUV) es fa previament, una sonicació amb sonda d'ultrasons. Així es redueix el tamany de les vesícules disminuint alhora el nombre de bicapes que tenien les de partida. S'obté una població bastant homogènia de vesícules petites unilaminars. En realitat també resta una petita proporció de MLV.

Un cop acabada la sonicació, en el fons del tub apareixen partícules metàl·liques procedents de la sonda de titani.

Per tal de separar les SUV dels altres components de la dispersió, es sotmet la mostra a una ultracentrifugació.

Finalment i per assegurar que les vesícules siguin homogènies es realitza una cromatografia de gel filtració del sobrenadant del tub de centrifugació. També es fa en el cas de que es vulgui encapsular alguna substància en el seu interior, a fi de separar la que s'ha encapsulat de la que resta lliure.

a)Sonicació en fred. (Barenholz, 1977; Sheetz, 1972)

El contingut del baló es passa a un tub especial de sonicació. Aquesta solució es sonica uns 20 minuts, a intervals de 2 a 3 minuts. La sonicació ha de fer-se de forma intermitent per a evitar que la temperatura augmenti massa. i perquè l'estructura de les bicapes es reordeni.

La sonicació ha de fer-se a una temperatura per sobre de la temperatura de transició de fase del lípid (T_c).

En cas de la lecitina d'ou, $T_c = -10^\circ\text{C}$. Si es fa per sota d'aquesta temperatura, les vesícules resultants tenen defectes estructurals en les bicapes (Lawaczeck, 1976). Són inestables i altament permeables.

El tub que conté la solució a sonicar està immers en una barreja refrigerant (aigua i sal). Una vegada acabat el procés la solució presenta un aspecte molt més transparent.

b) Centrifugació. (Barenholz, 1977; Barrow, 1980; Wilschut, 1982).

Per tal d'obtenir una dispersió homogènia, es procedeix a fer una centrifugació amb una ultracentrífuga (SW 60Ti).

El temps emprat per a dur-la a terme és de 3 hores a $159.000 \times g$ (equivalen a 39.346 RPM)

Les RPM es calculen, sabent el n° de g , a partir d'una fórmula establerta pel model de centrífuga que s'ha fet servir:

$$\text{RCF} = 1212 \times r \left(\frac{\text{RPM}}{1000} \right)^2$$

$r =$ radi, en aquest cas
val 91'7...

$\text{RCF} = n^\circ$ de g

c) Columnació.

Es fa amb una columna PHARMACIA de $60 \times 1'5$ cm que s'omple en les seves $2/3$ parts amb Sepharosa CL 4B.

Com eluient es prepara una solució amortidora 5 mM de TRIS i s'ajusta a $\text{pH} = 7'4$ amb HCl 1N.

Amb una pipeta i amb molta cura per tal de no remoure el gel, s'hi tira 1 ml del sobrenadant de la solució de liposomes que ha sofert el procés complet. Es recullen fraccions de, aproximadament, 1'3 ml.

S'analitzen les fraccions que presenten absorció a 228 nm per cromatografia en capa fina després d'haver-les reunit i concentrat.

El revelat de la placa es fa amb I_2 i posterior carbonització, procés que consisteix en polvoritzar una solució d'àcid perclòric al 40% i calentar, posteriorment, a 110°C.

Notes

+ La disminució de la turbidesa al formar-se els liposomes pot ésser deguda a :

- que s'hagin format vesícules molt petites.
- que es formin poques vesícules de gran tamany.

+ Si es vol introduir en el liposoma substàncies hidrofíliques, aquestes s'han de dissoldre en aigua. Si es volen introduir compostos hidrofòbics, es dissolen en cloroform i es barregen amb la dissolució del fosfolípid en cloroform.

Si es tracta de substàncies amfipàtiques, es dissolen en un tensioactiu, s'ajunta a una dissolució del fosfolípid en el tensioactiu, eliminant-se després aquest.

+ En el cas de que es vulguin encapsular substàncies lipofíliques enlloc o a més a més d'evaporar al rotavapor, es convenient liofilitzar. Així s'afavoreix la formació de liposomes perquè la resuspensió en aigua és més fàcil, doncs els sòlids que s'obtenen són més esponjosos i homogenis.

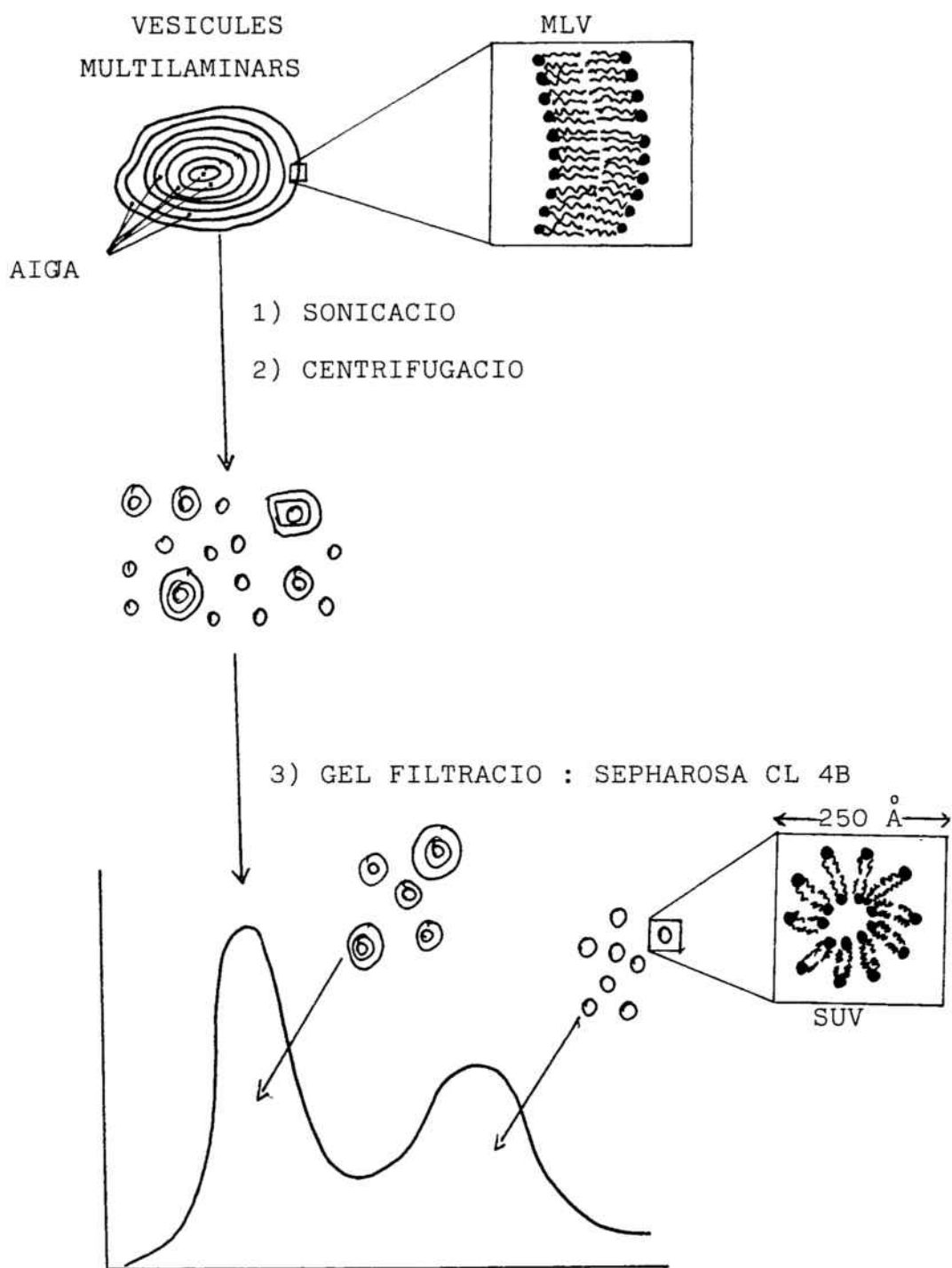


Figura 20.

Representació esquemàtica del procés complet d'obtenció de SUV.

3.4.- METODE PER L'OBTENCIO DEL CLORHIDRAT DE MORFINA.

La morfina base és insoluble en medis aquosos el que implica que no pugui ésser usada com a tal en assa jos "in vivo" i treballant amb solucions aquoses. Això ha fet que en els nostres experiments empresim el corresponent clorhidrat.

El clorhidrat de morfina és molt soluble en aigua i bastant en cloroform. Es presenta en forma d'agulles sedoses i lluents, generalment masses feltrades, tallades en forma de cub o en pols blanc cristal·lí. Es inodor i de sabor amarg.

S'ha partit de morfina base lliure que s'ha sotmés als següents tractaments:

3.4.1.- Anàlisi elemental.

Una alíquota de la morfina base de partida es sotmet a una anàlisi elemental (combustió) per tal de comprovar la seva puresa. Atés que els valors obtinguts es desvien lleugerament dels teòrics, i que per al tipus d'estudi que es preten realitzar requereix substàncies molt pures, es va optar per recristal·litzar la mostra mitjançant la formació del clorhidrat.

3.4.2.- Obtenció del clorhidrat.

La morfina base previament pesada, es dissolt en metanol. S'hi afegeix una quantitat equimolecular de ClH 1N. Es concentra evaporant en un rotavapor. Quan s'ha evaporat part del dissolvent, s'hi addiona èter etílic gota a gota, fins que la terbolesa és constant. Es posa a la nevera perquè cristal·litzi. Quan ho ha fet, es filtra i s'asseca el precipitat en un dessecador al buit.

3.4.3.- Determinació de la puresa del clorhidrat.

- Anàlisi elemental.
- Rotació òptica.
- Cromatografia en capa fina.
- Absorció al U.V.

3.5.- METODE DE DETECCIO DE TRANSICIONS DE FASE DELS FOSFOLIPIDS AMB LIPOSOMES.

Les transicions de fase que poden presentar-se es detecten per varis mètodes. En aquest treball s'han emprat des dels més complexes, ATD, fins als que, partint d'una tècnica més simple, no estan exents de credibilitat científica com són els mètodes turbidimètric i òptic.

3.5.1.- Mètode turbidimètric.

La transició de fase de gel a cristall líquid suposa un augment de l'àrea el que fa suposar que hi haurà un increment en el volum dels liposomes. Aquests efectes poden detectar-se per una disminució de la turbidesa que pot observar-se en un espectrefotòmetre termostatitzat.

- Tècnica per a detectar les transicions de fase de la fosfatidilcolina i la dipalmitoilfosfatidilcolina amb substàncies opiàcies.

Es preparen liposomes de la composició desitjada amb una concentració total en lípid de 25 mM, resuspès en una solució amortidora de TRIS - ClH, pH= 7'4 que conté o no, segons l'assaig, la droga quina interacció es vol estudiar. Es deixen establir com a mínim dues hores abans de realitzar l'experiment.

S'afegeixen alíquotes de les suspensions de liposomes a la cubeta de l'espectrefotòmetre on s'han termostatitzat 3 ml de la solució amortidora de TRIS-ClH 5mM. La quantitat de liposoma afegida ha d'ésser tal que donguin una absorbància aproximada de 0'5 a 430 nm. A continuació es fa un escombrat de temperatures anotant la densitat òptica obtinguda en cadascuna d'elles. El control de la temperatura es fa constantment, en l'interior de la cubeta mitjançant un termopar. Quan acaba l'assaig s'anota la variació de l'absor ància en funció de la temperatura, determinant-se, així, la temperatura de transició.

3.5.2.-Mètode òptic.

- Observació en un microscopi òptic de llum polaritzada.

Es prepara una mostra que contingui lecitina anhidra sola o bé amb la substància opiàcia quina influència s'estuif. La relació lípid droga és de 25/1.

- Observació en un microscopi òptic termostatitzat.

Les mateixes mostres preparades per l'observació esmentada en l'apartat anterior s'analitzen en un microscopi dotat d'un accessori calefactor.

3.6.- METODE DE MICROSCOPIA ELECTRONICA.

En el camp de la microscòpia electrònica es consideren dos mètodes depenent del tipus de material que s'estudí. Són la microscòpia electrònica de transmissió i la de rastreig.

La primera es fonamenta en el bombardeig de la mostra per un feix electrònic de forma que les diferents regions es distingeixen segons la seva capacitat de difondre els electrons.

La segona es basa en un escombrat de la superfície del material per un feix fi d'electrons.

Qualsevol material que es vulgui observar s'ha de deshidratar, doncs el aigua es volatilitzaria degut a que els electrons es desplacen del filament emissor fins la mostra en condicions de buit (de $1 \cdot 10^{-7}$ mm Hg fins $1 \cdot 10^{-3}$ mm Hg)

Per tal de centrar l'objecte d'aquest estudi, cal esmentar la tècnica de tinció negativa (aplicada a les biomembranes).

L'aventatge d'aquesta tècnica està en la seva sencillesa.

Es barreja la suspensió que es vol estudiar amb una solució aquosa del colorant negatiu. Una gota d'aquesta mescla es deposita sobre el suport del microscopi (reixeta metal·lica) assecant-se després d'haver passat el temps necessari per la fixació de la mostra.

Segons indica Dourmashkin, (1962) és una tècnica aplicable a l'estudi de membranes donat que el límit de resolució és, aproximadament, de 10 A°.

Com a colorant s'usa quasi sempre la sal d'un metall pesat (sal sòdica o potàssica de l'àcid fosfotungstic, acetat d'urani, molibdat amònic, etc) que difon per les parts aquoses dels components de la mostra. Degut a aquesta forma d'actuar,

es dubta sobre la correcció de la terminologia emprada, doncs hi ha els que defensen l'ús de colorant mentre que altres prefereixen el terme fixador.

Efectuat aquest procés, apareixen dos tipus de regions, unes transparents (parts hidròfobes) on no ha arribat el colorant i unes electrodenses (parts hidròfiles) que reflexen la presència de metalls pesats.

Es una tècnica important en quan a que proporciona informació sobre l'estructura de la membrana.

Com tota tècnica presenta una sèrie d'inconvenients tals com la penetració massiva de colorant cosa que suposa un augment d'espessor i per tant, un error en l'observació. També es produeix una alteració macromolecular que és inevitable.

3.7.- TECNiques CALORIMETRIQUES DIFERENCIALS.

La finalitat dels sistemes tèrmics diferencials és la d'enregistrar les variacions d'una magnitud física de la mostra que s'assagi, referides a una altra substància que actua de referència (per la seva naturalesa inert i de característiques tèrmiques conegudes), quan ambdós són calentats o refredats a velocitat controlada. Aquests sistemes poden classificar-se en tres classes: DTA clàssic, DTA Boersma i DSC.

En els sistemes DTS clàssic i DTA Boersma, tant la mostra com la referència són calentades per una sola font de calor. Les temperatures són mesurades per termoparells introduïts en la mostra i en la referència (clàssic) o bé posats en contacte amb els crisols que contenen el material (Boersma).

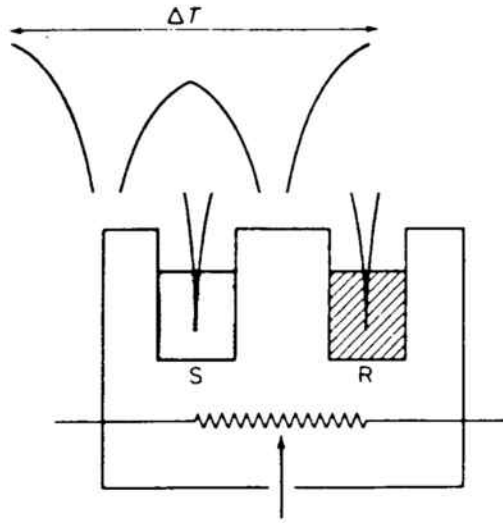
Mitjançant un registrador gràfic analògic, o bé per un ordinador per adquisició de dades, digitalment i posterior representació s'obté un gràfic que té en ordenades la diferència de temperatures, $T = T_S - T_R$, entre la mostra i la referència, i en abscises el temps (o temperatura de la referència o bloc).

La magnitud T en un cert instant, suposant la massa de les substàncies constant, és proporcional a:

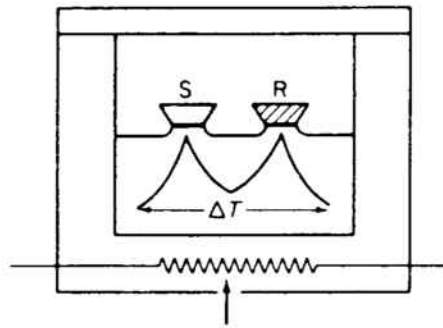
1.- Canvi d'entalpia.

2.- Capacitat calorífica.

3.- La resistència tèrmica total al flux calorífic, que depen de la naturalesa de la mostra, de la forma en que es descomposa el material en el crisol i de la superfície de contacte entre la mostra i el crisol, variant a més a més amb la temperatura.

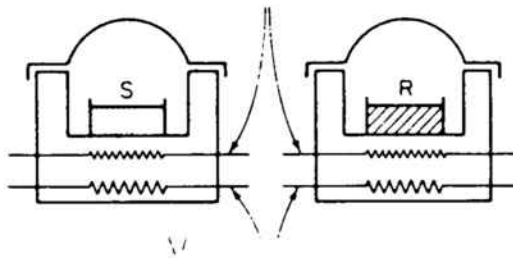


Font de calor simple:
DTA clàssic



Font de calor simple:
DTA Boersma.

Sensors de Pt



Calefactors individuals:
DSC

Figura 21.

El fet de que la ressitència tèrmica variï amb la temperatura implica que la constant de calibració del sistema (relació entre la superfície del pic i l'energia posada en joc en el procés) també ho faci. Per tant, no pot fer-se una simple conversió de l'àrea del pic a unitats d'energia.

En el contacte dels sensors de temperatura amb els cisols en el mètode Boersma, es fa amb la finalitat de reduir l'efecte de les variacions de la ressitència tèrmica produïdes per la mateixa mostra i obtenir així, resultats quantitativament més significatius. (figura 21)

La diferència fonamental entre els sistemes ATD i DSC es triba en que l'última tècnica es basa en calentar la mostra i la referència mitjançant elements calefactores individuals. Per una banda es controla la temperatura mitja de forma que la temperatura de la mostra i la de la referència augmenta a una velocitat predeterminada que és enregistrada. Per un altre cantó, es controla la diferència de temperatura entre la mostra i la referència de forma que si es produeix alguna variació, deguda a una reacció exotèrmica o endotèrmica de la mostra, es modifica la potència d'entrada amb la finalitat d'anular tal diferència. Aquest procés o principi s'anomena "balanç nul" de temperatura. En aquest mètode, el senyal produït és proporcional a la diferència de calor d'entrada a la mostra i a la referència, dH/dt , enregistrant-se alhora la temperatura de la mostra i de la referència.

Per anàlisis qualitatives, els resultats, tant per ATD com per DSC, són molt semblants. En general, els sistemes de ATD tenen un major rang de temperatures que les de DSC. Malgrat això, a velocitats de calentament molt petites, la tècnica de

de DSC dóna millors resultats (0'5 °K/ minut).

3.7.1.- Factors experimentals que afecten els mètodes de ATD.

a) Factors relacionats amb l'instrumentació.

- Crisols. La seva forma i dimensions venen determinades pels portacrisols que estan fixes en els aparells al contrari del anteriors que són mòbils. La seva naturalesa depen de la de la mostra (caràcter químic del producte a estudiar, domini de temperatura, tipus d'atmosfera, etc) Els més emprats són els metàl·lics i de ceràmica.

- Porta crisols. Simetria del montatge. El portacrisols fixa la posició dels crisols respectant la simetria del montatge. Aquesta fa que el flux tèrmic es reparteixi homogèniament, per això, els materials usats preferentment són metàl·lics.

- Termoparells. La seva elecció ve determinada pel rang de temperatures de treball, atmosfera emprada, poder termoelèctric, sensibilitat, duració de les experiències (envelliment dels termoparells), etc.

b) Factors relacionats amb l'atmosfera de treball propera a la mostra.

Existeixen tres tipus d'atmosfera:

- Estàtica, despreciant els moviments de convecció en l'interior del calorímetre.

- En desplaçament, deguda a la creació d'un flux de gas en l'interior.

- Dinàmica, en la que el flux de gas travessa la massa dels especímens emprats.

Un quart tipus d'atmosfera a considerar és el buit.

El fet de treballar amb un determinat tipus d'atmosfera té un paper important en l'interpretació del fenomen, doncs per atmosferes dinàmiques, la temperatura del pic del termograma és inferior a la trobada en atmosferes estàtiques degut a l'arrosegada d'energia.

En el sistema emprat en aquest treball, s'utilitza atmosfera d'aire i degut al petit volum intern del calorímetre (es desprecien els efectes de convecció) es pot considerar com estàtica.

b) Factors relacionats amb la mostra.

L'àrea del pic d'un termogram de ATD és proporcional a la quantitat de substància que sofreix transformació. Per tant, a major massa de substància, majors pics, però també gradients de temperatura més grans. Originen possibles faltes d'equilibri en la mateixa mostra donada la seva dimensió finita.

El tamany del gra o textura de la mostra és un altre factor que altera els termogrames. El fet de compactar les mostres, per tal de localitzar-los més a prop dels termoparells, suposa l'obtenció de pics més aguts. Tant el tamany de gra com la compactació repercuteixen en la densitat aparent de les substàncies i per tant, en la seva difusivitat tèrmica.

Si les capacitats calorífiques de la mostra i la referència són molt diferents, el desplaçament de la línia de base respecte de la seva posició de zero serà gran, poguent presentar una deriva important i requerir més temps per aconseguir el regim estacionari. Per tal d'evitar aquest efecte, la substància de referència ha de tenir una capacitat calorífica propera a la de la mostra i ésser inert en el rang de temperatures on la mostra sofreix transició, per tal de no enmascarar la senyal diferencial.

c) Factors relacionats amb la referència.

L'elecció de la referència està limitada a un nombre restringit de substàncies que siguin inerts en el rang de temperatures i atmosfera de treball, i que tingui una difusivitat tèrmica mitja.

El tamany del gra i les seves propietats tèrmiques han d'ésser el més semblant possible als de la mostra. Malgrat això, sempre hi haurà una diferència en la difusivitat, que encara que sigui petita, evolucionarà amb la temperatura i serà causa de deriva en la línia de base.

d) Factors experimentals.

El factor més important que afecta la forma i posició dels pics en els termogrames de ATD, és la velocitat d'escalfament i refredament. Aquesta ha de mantenir-se constant en una experiència doncs la seva variació provoca una deformació en els termogrames.

A velocitats d'escalfament elevades, les transicions es produeixen a una temperatura més alta i es completen en menys temps, obtenint així, pics més alts i estrets, presentant una pendent més acusada en el tram inicial del procés que en el final, sense variar, però, l'àrea del pic.

Emprant velocitats d'escalfament o de refredament més suaus, s'aconsegueix una disminució dels gradients de temperatura de la mostra, una major estabilització de la línia de base i una millor separació dels processos tèrmics propers entre si. Contràriament, els pics són més amples i baixos, fent més difícil la seva localització donat que pot confondre's amb l'evolució de la línia de base.

Treballant amb masses de mostra elevades, poden emprar-se velocitats baixes, així, encara que el procés sigui més baix, l'efecte tèrmic (proporcional a la massa) serà el suficientment gran per a ésser detectat.

3.7.2.- Proporcionalitat àrea pic- energia bescanviada

Els resultats quantitativs que poden obtenir-se d'un termograma de ATD, es basen en la proporcionalitat existent entre l'àrea del pic i l'efecte tèrmic degut al fenomen estudiat.

S'han fet molts estudis sobre models teòrics basats en:

- Transferències de calor (balanços energètics).

Com les teories de Speil, Kerr i Kulp, Vold, Kessis.

- Propagació de calor en la mostra, com les de Soulé, Boersma i Ozawa.

Amb tots els models s'arriba a una relació semblant entre l'àrea del pic i l'efecte tèrmic que representa.

* Teoria de Kerr i Kulp

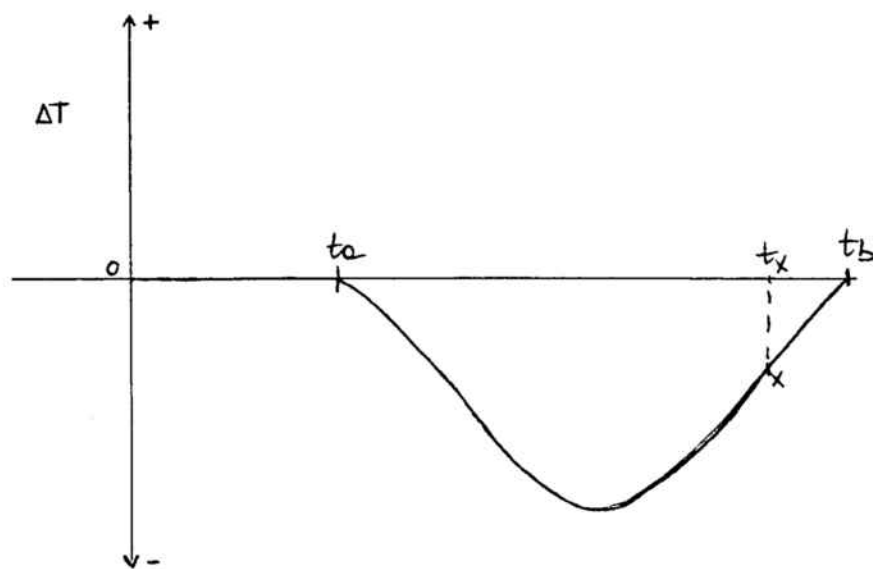


Figura 22.

Termograma de ATD que expresa la senyal diferencia i en funció del temps.

Per a $t < t_a$ i $t > t_b$, $T=0$, pel que les temperatures de mostra i senyal són iguals.

Entre t_a i t_b es produeix, en aquest cas, un procés exotermic.

Si s'escull un punt x , el balanç energètic a partir de t_a és:

$$m_m c_m (T_m - T_0) = m \int_{t_a}^{t_x} \frac{dQ}{dt} dt + K_m \int_{t_a}^{t_x} (T_B - T_m) dt \quad \underline{\text{mostra}}$$

$$m_r c_r (T_r - T_0) = K_r \int_{t_a}^{t_x} (T_B - T_r) dt \quad \underline{\text{referència}}$$

dQ = calor absorbida per unitat de massa de mostra en dt .

K_m = coeficient de transferència de calor entre el bloc i la mostra.

K_r = idem entre bloc i referència.

T_B = temperatura del bloc.

T_m = " " mostra.

T_r = " " referència.

T_0 = " de la mostra i referència per a $t = t_a$.

c_m = calor específica de la mostra.

c_v = " " " " referència.

Suposant que $m c_r = m c_m$, i imposant que la geometria de m i r són iguals, restant les dues equacions:

$$m_m c_m (T_m - T_r) = m \int_{t_a}^{t_x} \frac{dQ}{dt} dt - K_m \int_{t_a}^{t_x} (T_m - T_r) dt$$

Prenent com a límits d'integració t_a i t_b , es a dir, tot l'interval del procés, i considerant que en $t=t_a$ i $t=t_b$,

$T_m = T_r$, obtenim:

$$m \Delta q = K_m \int_{t_a}^{t_b} \Delta T dt = K_m A$$

On A és l'àrea del pic.

Descomposant K_m com $g \cdot K$, éssent K el coeficient de conductivitat tèrmica i g el coeficient geomètric de forma, s'arriba a:

$$m \Delta g = g K \int_{t_a}^{t_b} \Delta T dt$$

d'on es veu que l'àrea del pic és proporcional a la massa de substància per a un fenomen tèrmic determinat (Δq) i per a un dispositiu determinat (g). Aquesta proporcionalitat varia d'una mostra a una altra si es varia la conductivitat tèrmica (K).

S'ha suposat que la temperatura és uniforme tant en la mostra com en la referència, coeficients de transferència de calor iguals (el que implica la mateixa geometria), tamany de gra, mateixa variació de conductivitat amb la temperatura i que les capacitats calorífiques són constants.

Teoria de Boersm

El seu model es basa en un bloc metàl·lic de gran conductivitat per tal d'aconseguir homogeneïtat de temperatura, amb dues cavitats per allotjar els crisols.

La temperatura de referència és:

$$\rho C_p \left(\frac{\delta T_r}{\delta t} \right) - K_r \nabla^2 T_r = 0 \quad K_r \approx K_m \approx K$$

$$\text{i en la mostra} \quad \rho C_p \left(\frac{\delta T_m}{\delta t} \right) - K_m \nabla^2 T_m = \left(\frac{\delta Q}{\delta t} \right)$$

éssent ρ la densitat, c_p la calor específica i q la calor de transformació per a unitat de volum.

Restant les dues equacions:

$$\rho C_p \left(\frac{\delta T}{\delta t} \right) - K \nabla^2 (\Delta T) = \frac{\delta Q}{\delta t}$$

integrant des de t_1 a t_2 (on $T=0$) s'obté $-K \nabla^2 \int_{t_1}^{t_2} (\Delta T) dt = q$

suposant cavitats esfèriques, aplicant transformades de Gauss en un volum V de radi a , s'obté:

$$\int_{t_1}^{t_2} \Delta T dt = \frac{Q a^2}{2K}$$

retroçant novament la proporcionalitat entre àrea de pic i calor implicada en el procés.

3.7.3.- Calibració.

La calibració consisteix en el coneixement de la sensibilitat K que és la relació entre l'àrea del termograma i l'energia posada en joc $\left(\frac{mV \cdot s}{J} \right)$, en funció de la temperatura i del tipus i geometria del crisol. Per a fer-ho, s'introdueix el crisol escollit una resistència de fil de Constatan d'uns 56Ω aproximadament, a temperatura ambient. Es fa passar per ella un puls de 20 mA i de 40 s de duració. Es mesura l'intensitat mitjançant una resistència patró de $1000 \Omega (\pm 2 \text{ m}\Omega)$, així com la diferència de potencial en la resistència calefactora, el que permet conèixer amb precisió la potència elèctrica (ordenada del puls). La duració d'aquest és mesurada amb un comuta-

dor de 10^{-2} s de resolució que permet trobar l'energia dissipada per efecte Joule.

L'estudi analític del termograma proporciona el valor de l'àrea de la resposta del calorímetre, i per tant, és possible conèixer la sensibilitat com el quosient entre l'àrea del termograma en unitats de mV.s i calor de termogènesi en Julis.

Repetint el procés per a un cert nombre de temperatures, s'obté la sensibilitat en funció d'aquella, en el rang desitjat.

Donat que el pols generat és ràpid, (40s), i que la velocitat de calentament o refredament es la calibració és de 0.2 °C/minut, **es pot** suposar que el procés és isoterm, i per tant, la mesura de la sensibilitat en cada punt té una única temperatura associada que cau dins de la resolució del termòmetre digital emprat. (± 0.1 °C).

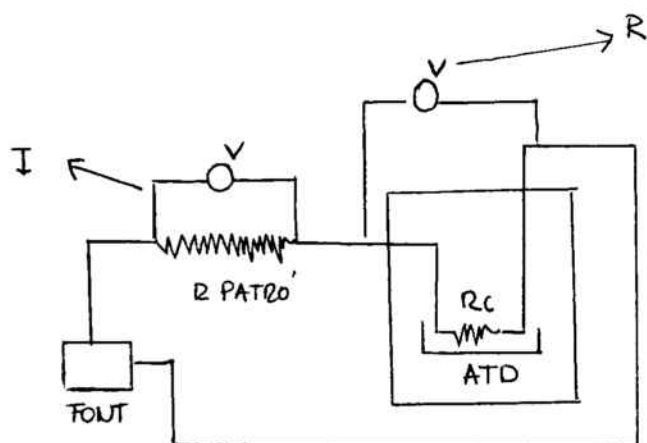


Figura 23.

RESULTATS

I

DISCUSSIO

III.- RESULTATS I DISCUSSIO.

1.- Purificació de la lecitina.

Seguint el procediment descrit en el punt 3.1. de la part de materials i mètodes, s'ha columnat 2'9758 g de lecitina d'ou impura i s'en han obtingut 2'6349. El rendiment és del 88'54%.

Per assajar la seva puresa es fa una cromatografia en capa fina i es calcula el Rf que en aquest cas és de 0'2428.

També es fa una lectura la l'espectrefotòmetre de U.V. entre les longituds d'ona de 300 nm i 190 nm, d'una solució clorofòrmica de lecitina. S'obté el següent registre que indica l'absència del procés d'oxidació (apartat 3.1.d).

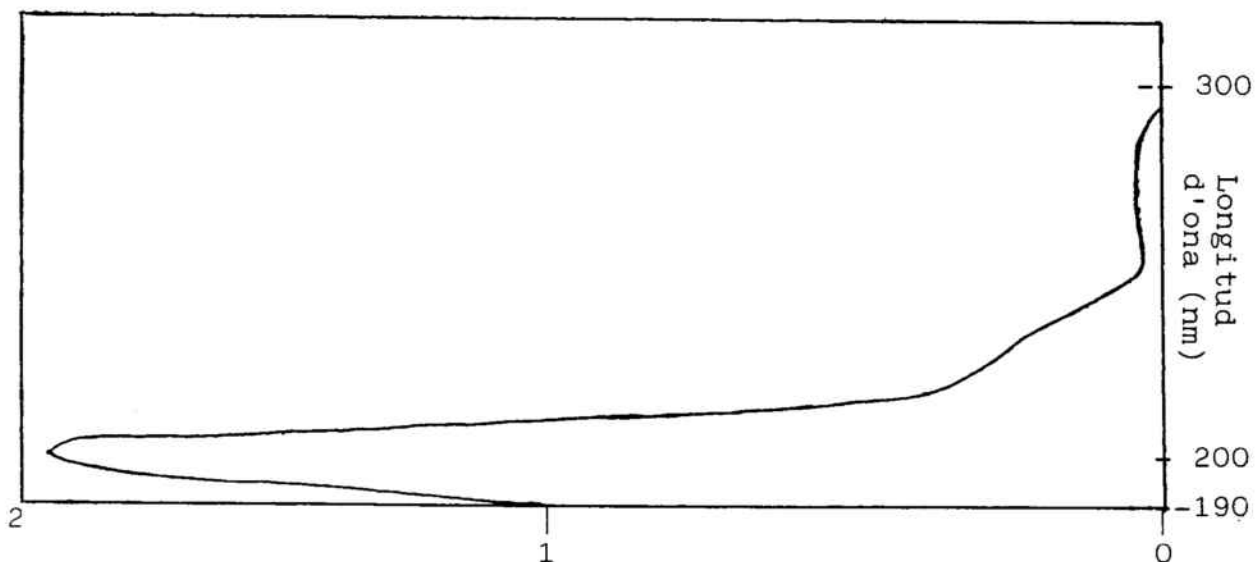


Figura 24

2.- Determinació del PM mig de la lecitina.

Previament es va efectuar la corba patró de fosfat inorgànic. El pes de fosfat monopotàssic va ésser 10'8 mg/100 d'aigua bidestil.lada. Aquesta solució es va emprar com a solució mare a partir de la que es van fer diferents dilucions quines concentracions estan en la taula 3.

Concentració	Absorbància 830nm
1'08	0'021
3'09	0'056
5'40	0'088
7'56	0'129
9'72	0'171
10'80	0'201
14'04	0'259
16'20	0'289
21'60	0'380
32'40	0'618
43'20	0'753

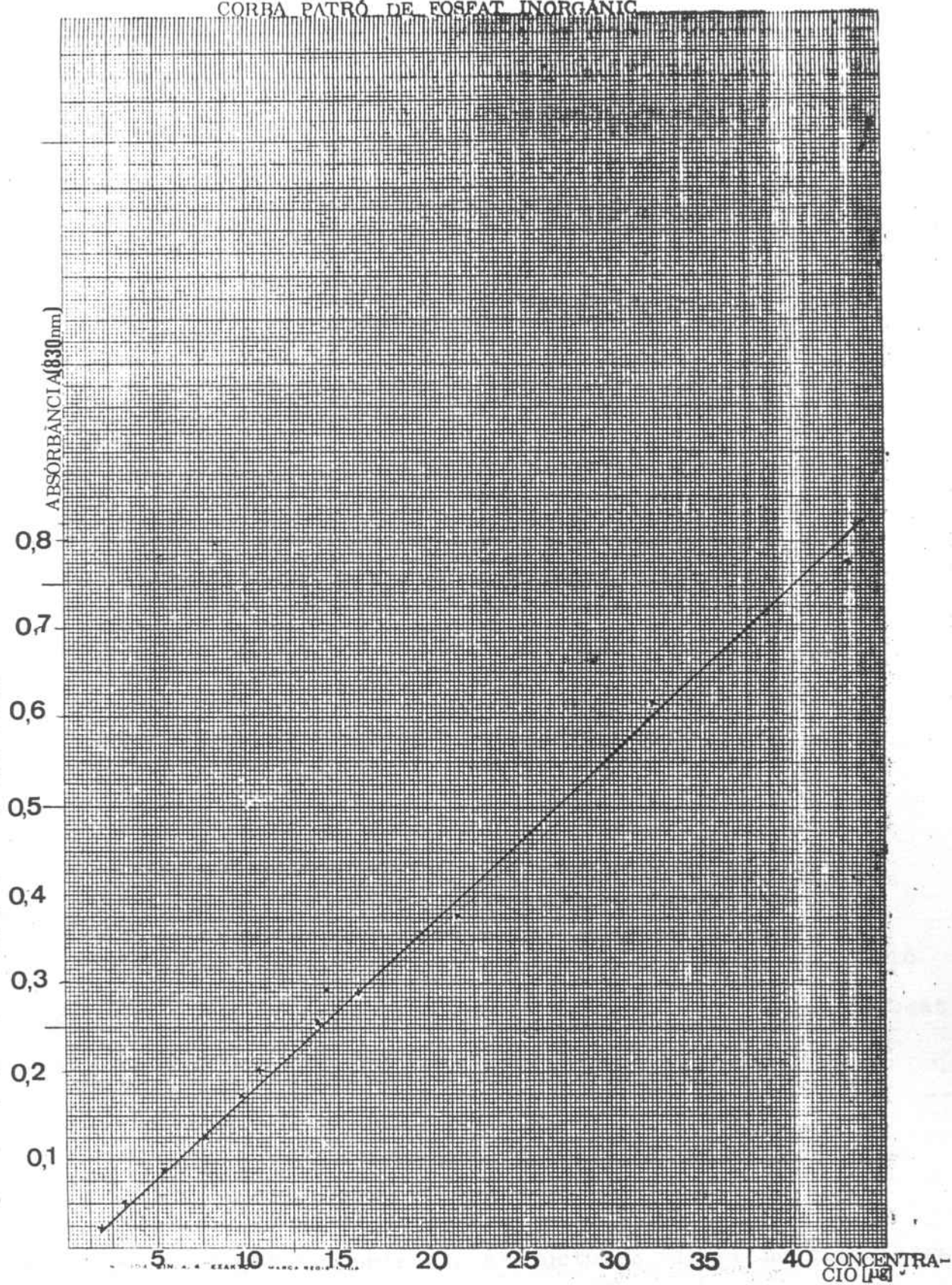
taula 3

La lectura de l'absorbància es va fer en un espectrofotòmetre de U.V. a 830 nm.

La recta ve representada en la figura 2.

En quan a la prova per a determinar el PM mig de la lecitina es va partir d'una dissolució clorofòrmica de lecitina contenint 0'0242 g que equivalen a 0'95 mg de fòsfor (4'17 mg de fosfat monopotàssic). Seguint el mètode analític descrit en la part de materials i mètodes, s'ha obtingut un PM mig de la lecitina igual a 789.

CORBA PATRÓ DE FOSFAT INORGÀNIC



3.- Preparació i caracterització de liposomes.

Es va partir de 76 mg de lecitina que es van sotmetre a processos de sonicació amb sonda i centrifugació. 1 ml del sobrenadant del tub de centrifugació es va sotmetre a una columnació (gel filtració) amb Sepharosa CL 4B. L'aspecte del registre ve donat en la figura .

La quantitat de lecitina aïllada en forma de liposomes unilaminars suposa un 60% de la població total de liposomes.

De manera paral·lela a l'absorció al U.V. a 228nm, s'ha anat controlant l'elució dels liposomes per cromatografia en capa fina. En la figura 3 en mostra un dels cromatogrames obtinguts. El màxim de lecitina, en forma de SUV, surt entre els tubs 45 i 65 que representa un volum de 26 ml.

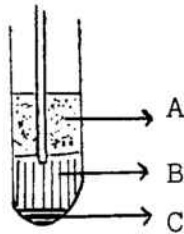


Figura 25.-Representació esquemàtica de la distribució del fosfolípid en el tub de centrifugació una vegada efectuat aquest procés.

S'aprecien tres zones ben diferenciades:

Regió A: conté una població homogènia de vesícules de tamany petit.

Regió B: Conté les estructures "large multilaminars" i una gran varietat de vesícules de diferents tam anys (alt nivell de light scattering).

Regió C: conté una sèrie d'anells concèntrics fàcilment apreciables. Uns estan constituïts per partícules que s'han després de la sonda durant el procés de sonicació (titani, principalment). Altres estan formats per fosfolípid dispersat.

Resultats HPLC.

Les diferents fraccions que presenten absorbància a 228 nm es reuneixen i es liofilitzen. Seguidament es dissolen en 2 ml de metanol i s'en injecta una alíquota en l'aparell de HPLC.

Es recullen 3 fraccions per opiaci:

- 1.- Liposomes sense opiaci.
- 2.- liposomes amb opiaci.
- 3.- Opiaci lliure no encapsulat.

Previament s'han passat per HPLC totes les molècules que s'han emprat a posteriori per a fer liposomes, a fi de determinar el seu temps de retenció. Totes les dades obtingudes estan representades en la taula .

Les dimensions de la columna emprada que conté la fase estacionària són : 12'5 x 0'46 cm (diàmetre intern). Està empaquetada amb Spherisorb ODSZ de 5 μm (C_{18}): S'ha treballat a temperatura ambient i a un flux de 1 ml/minut.

El procediment seguit ha estat el següent:

Fase mòbil: Acetonitril i aigua amb 0'05% d'àcid trifluoroacètic (45:55).

S'ha lligit a una longitud d'ona de 215 nm.

Segons els resultats dels registres de HPLC, s'ha pogut deduir que sols s'encapsula en l'interior dels liposomes de lecitina, el ClH de morfina. Es l'única molècula opiàcia que es detecta en la segona fracció liposòmica. Això ratifica els resultats obtinguts per capa fina, segons els que s'aprecien dues taques (morfina i lecitina) en la mostra corresponent a la segona fracció obtinguda de la columnació dels liposomes de morfina ClH, mentre que en cap de les altres fraccions apareixen dues taques.

Aixímateix, en els registres de HPLC, s'indica el lloc on hauria d'haver sortit la molècula opiàcia si s'hagués produït encapsulació.

Taula 4.

Molècula opiàcia	*Tr(min)	+T'r	°K
Codeïna	4'2	2'9	2'23
Etilmorfina	4'2 6	2'9 4'7	2'23 3'61
Meperidina	14'8	13'5	10'38
Morfina	2'7	1'4	1'07
Naloxona	4	2'7	2'07

*Tr= temps de retenció, temps que tarden els components de la mostra en sortir de la columna i passar pel detector.

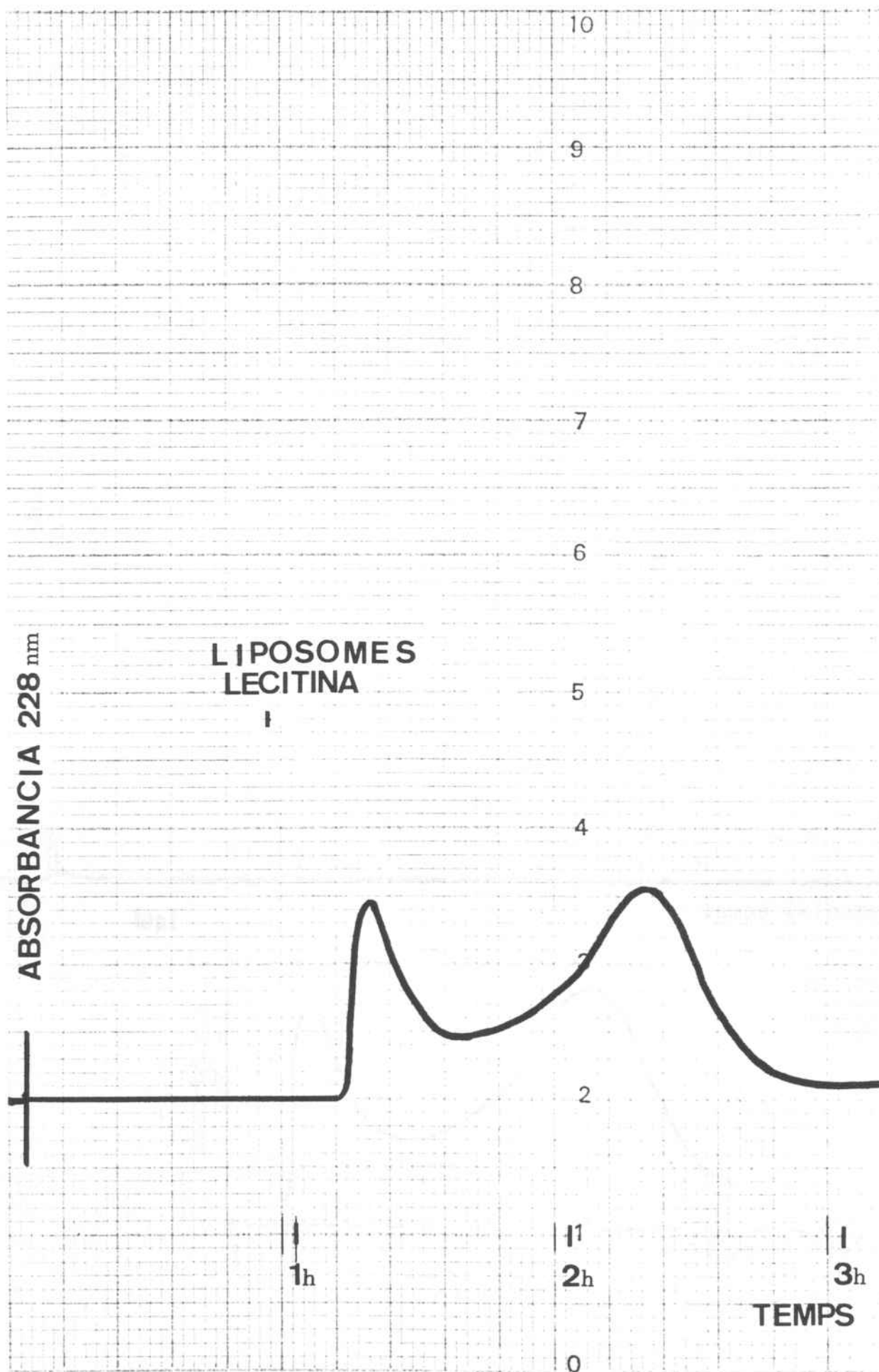
+T'r= temps de retenció corregit, temps que les molècules del solut romanen estàtiques en la fase estacionària.

°K= factor o relació de capacitat.

Molècula opiàcia	volum fraccions (ml)			mg opiaci	mg lecitina
	1	2	3		
Codeïna	10'4	20'8	32'5	1'02	7'50
Etilmorfina	6'5	22'1	26	1'30	7'60
Meperidina	7'8	18'2	26	1'10	7'34
Morfina	6'5	19'5	28'6	1'19	7'76
Lecitina	9'1	19'5	----	----	7'70

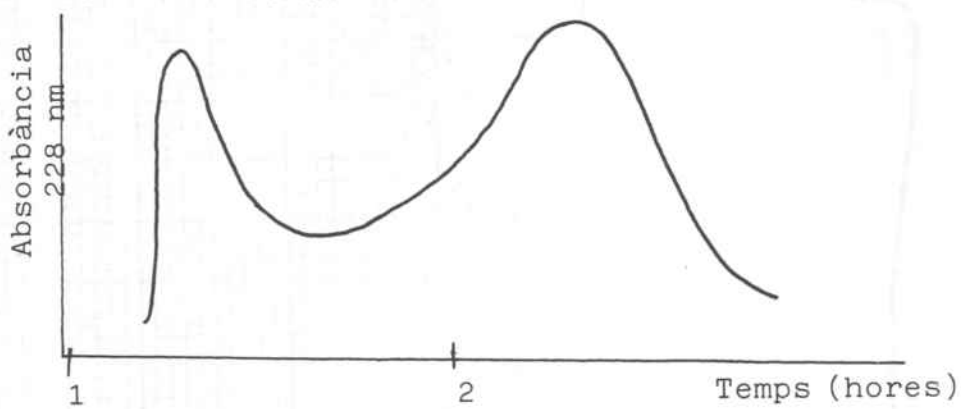
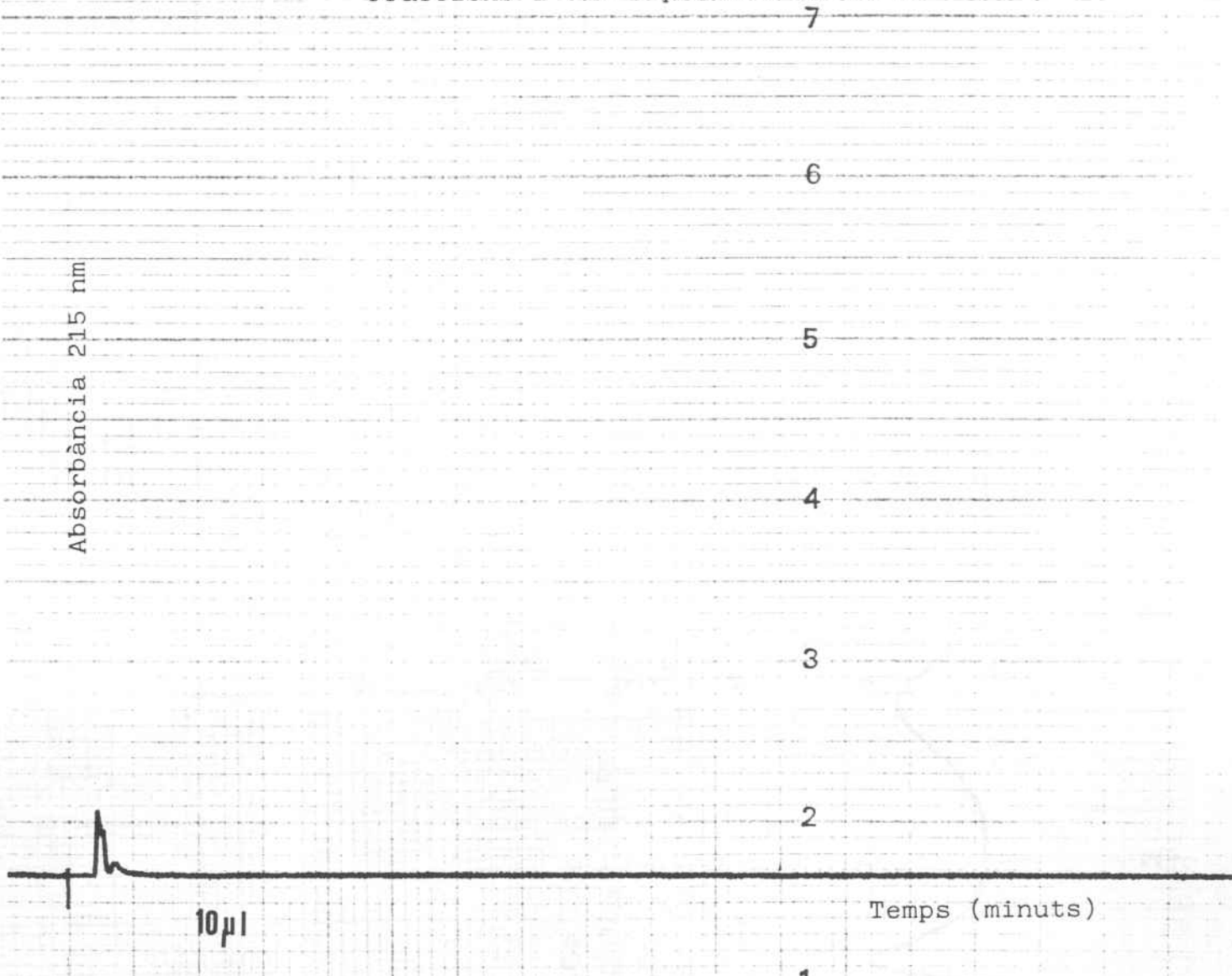
Taula 5

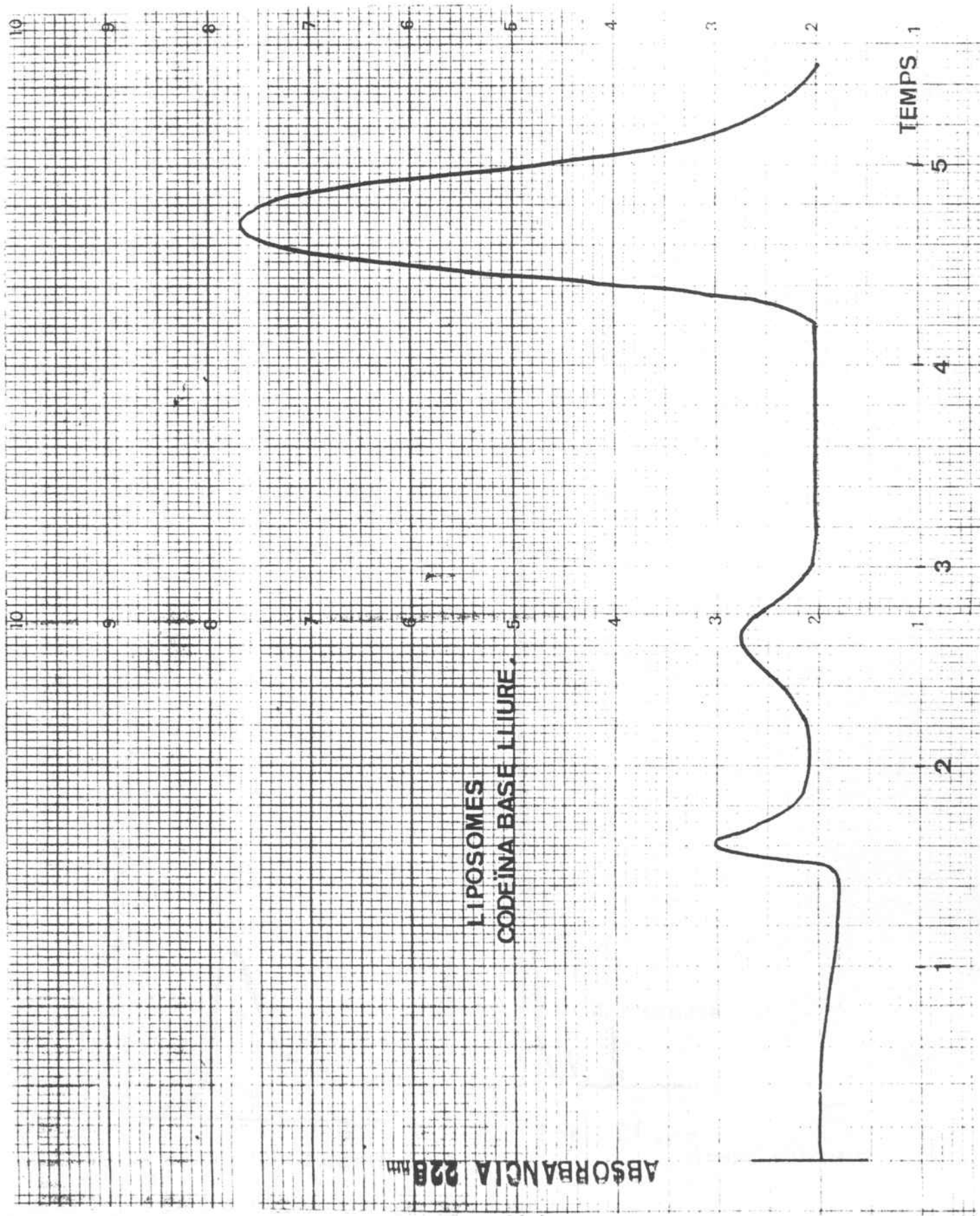
A continuació, hom pot observar els registres obtinguts al fer la cromatografia sobre gel filtració i els obtinguts al passar les diferents fraccions per HPLC. Comparant aquestes amb els registres abans esmentats.



Fraccions 1 i 2 liposomes lecitina

Absorbància 215 nm



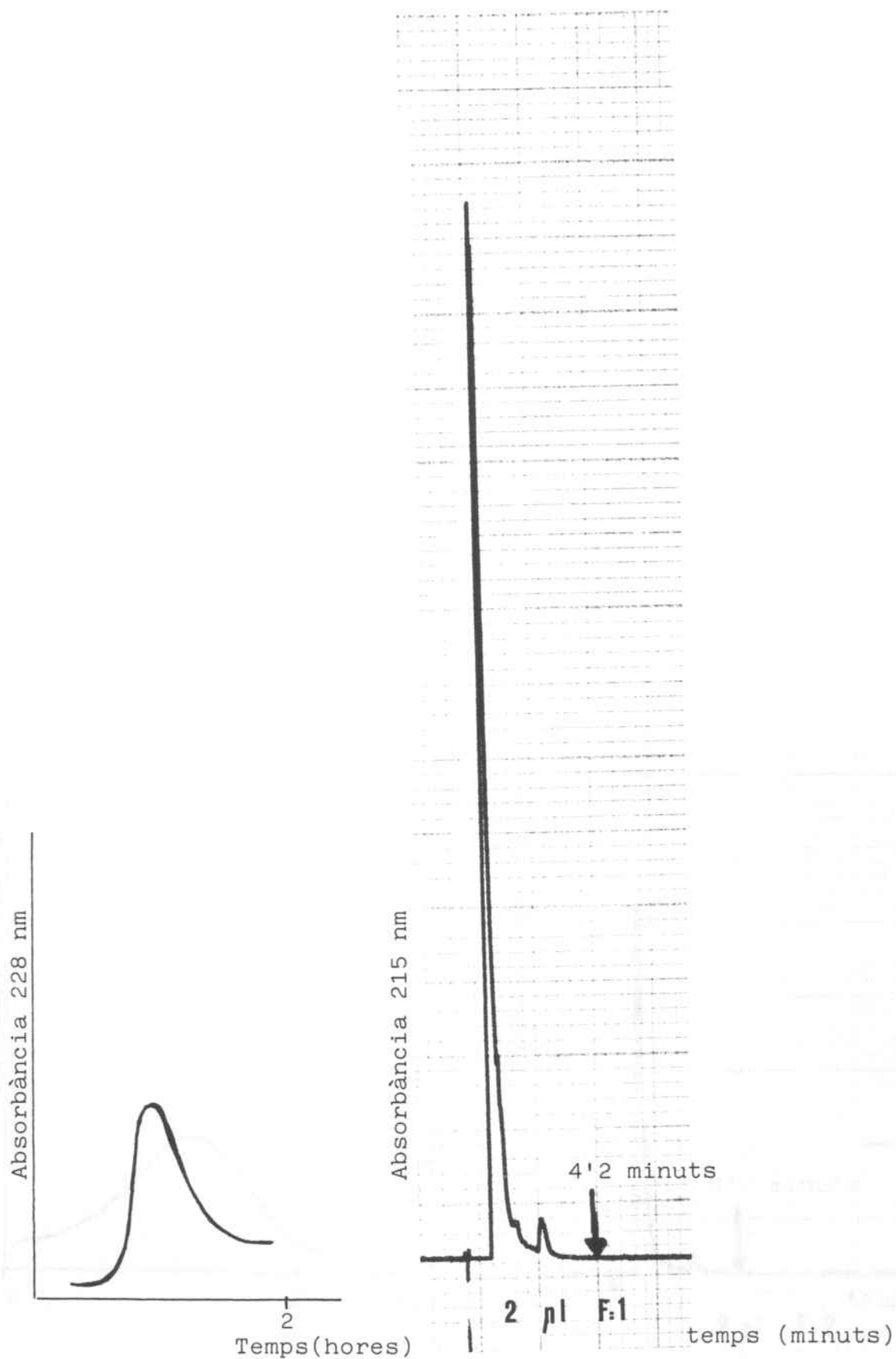


LIPOSOMES
CODEINA BASE LLIURE.

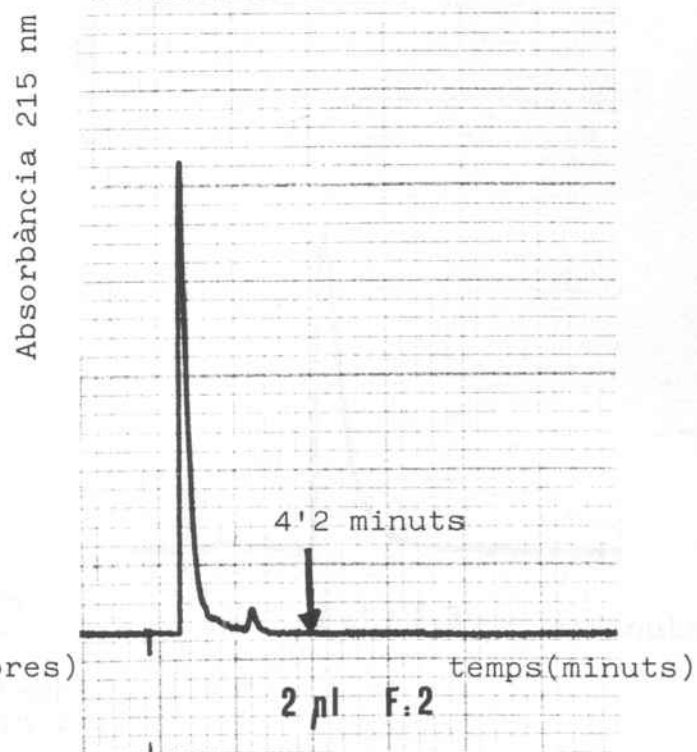
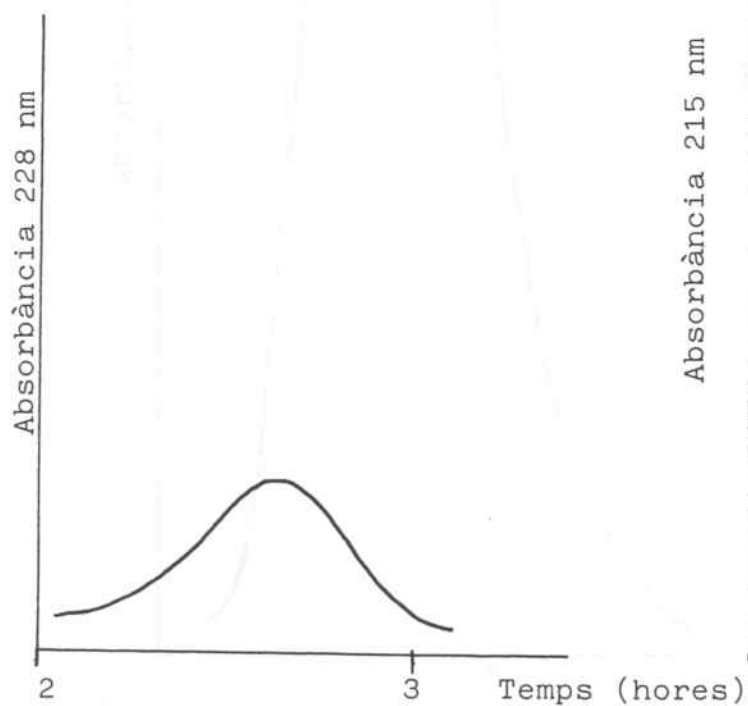
ABSORBANCIA 228 nm

TEMPS

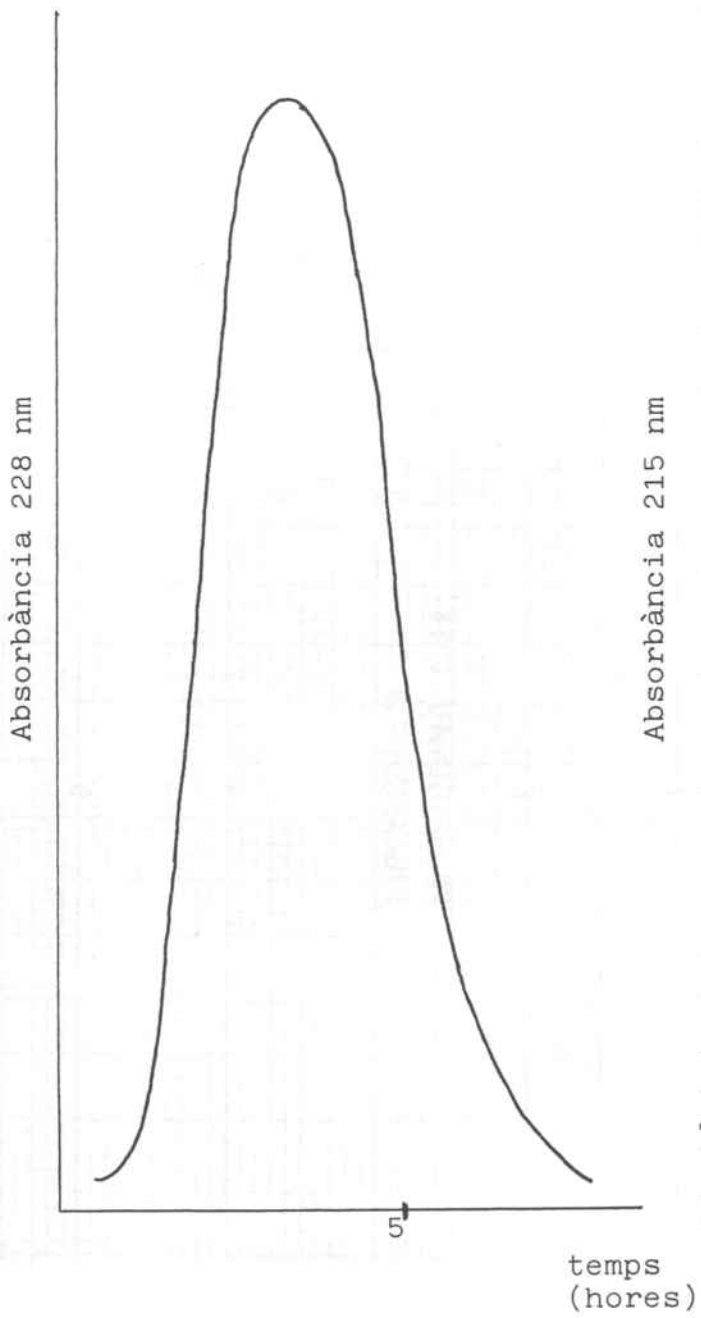
1ª Fracció liposomes Codeïna base lliure



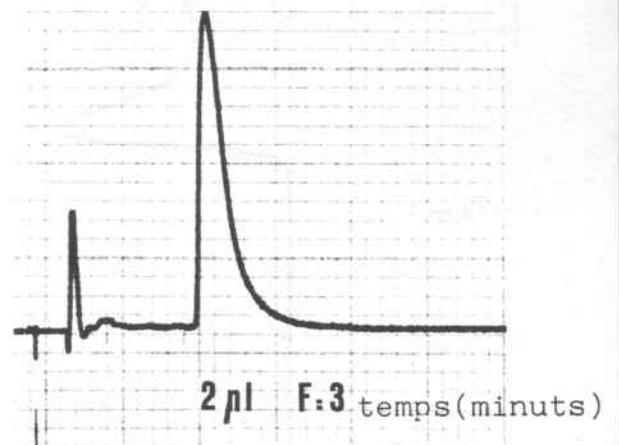
2^a Fracció liposomes
Codeïna base lliure

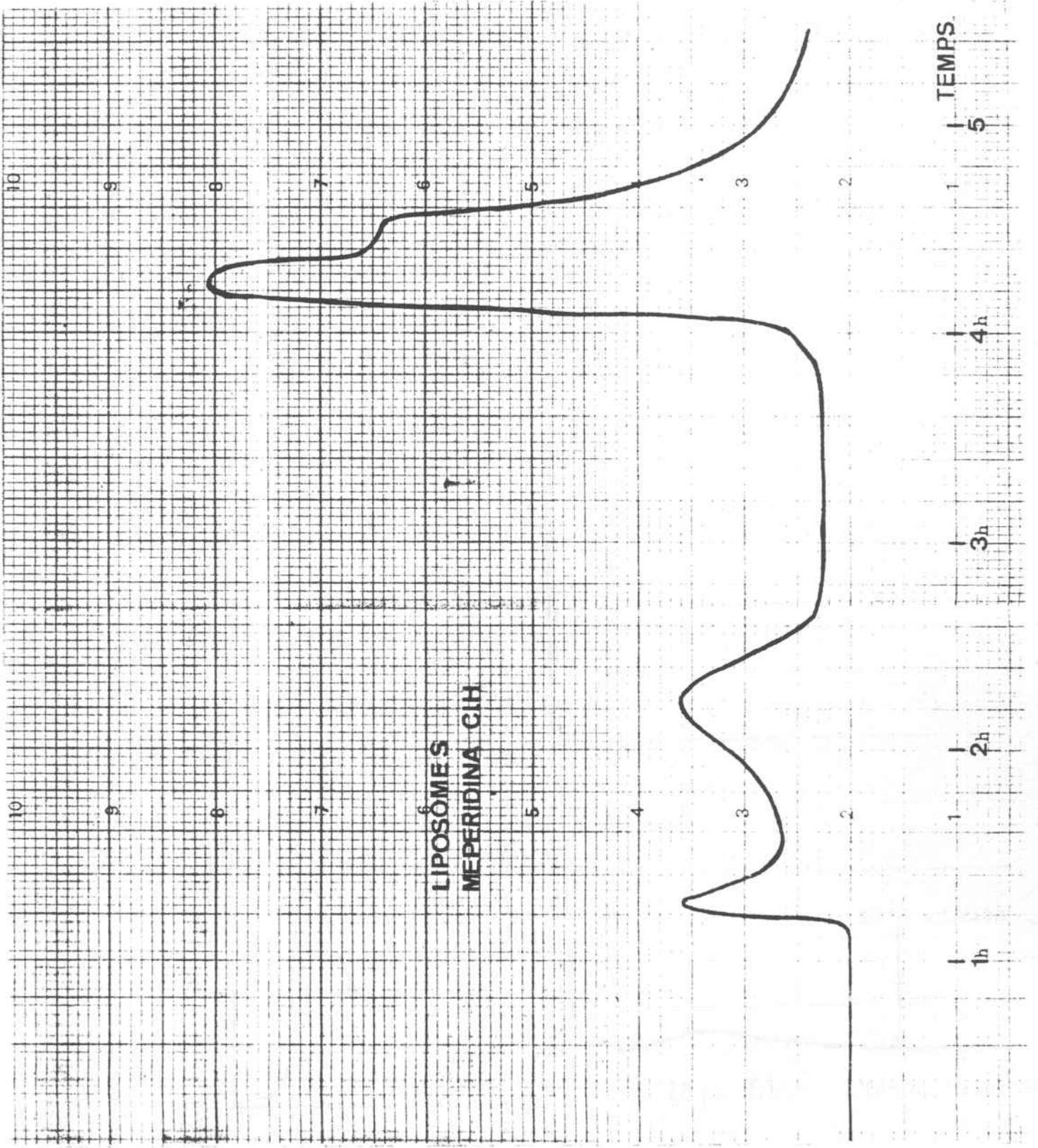


3^a Fracció liposomes Codeïna
base lliure.



Absorbància 215 nm

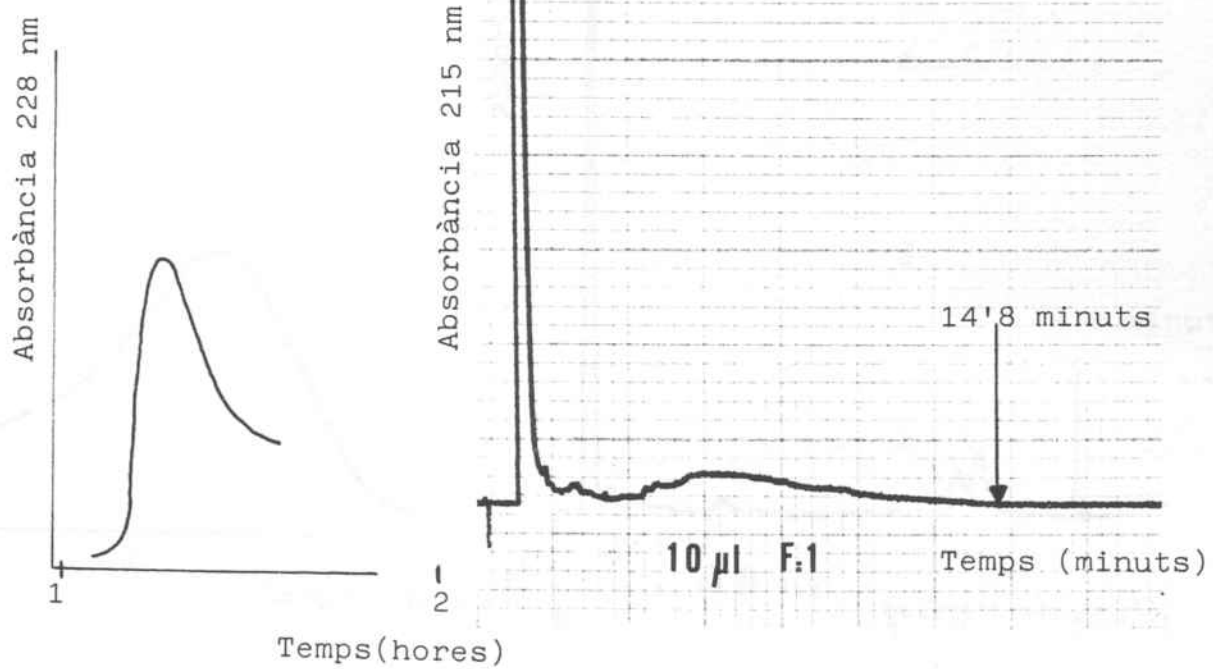




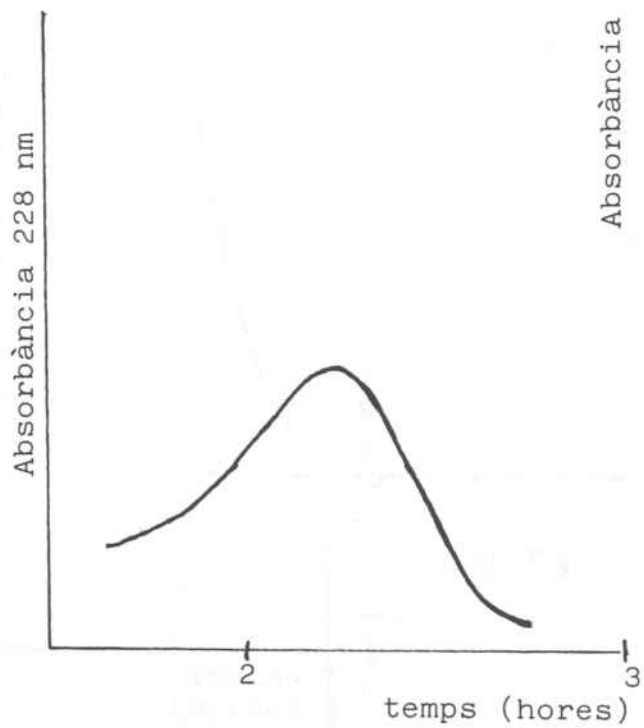
LIPOSOMES
MEPERIDINA ClH

TEMPS

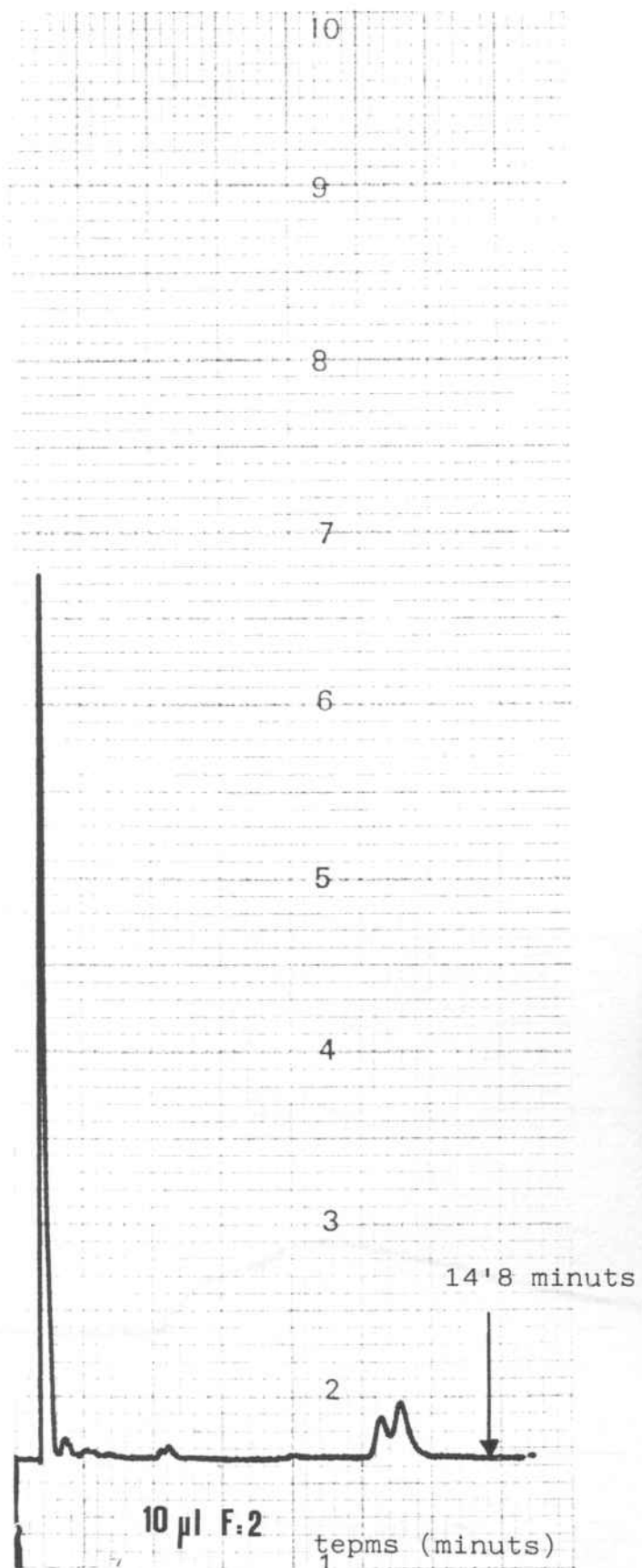
1^a Fracció liposomes
Meperidina ClH



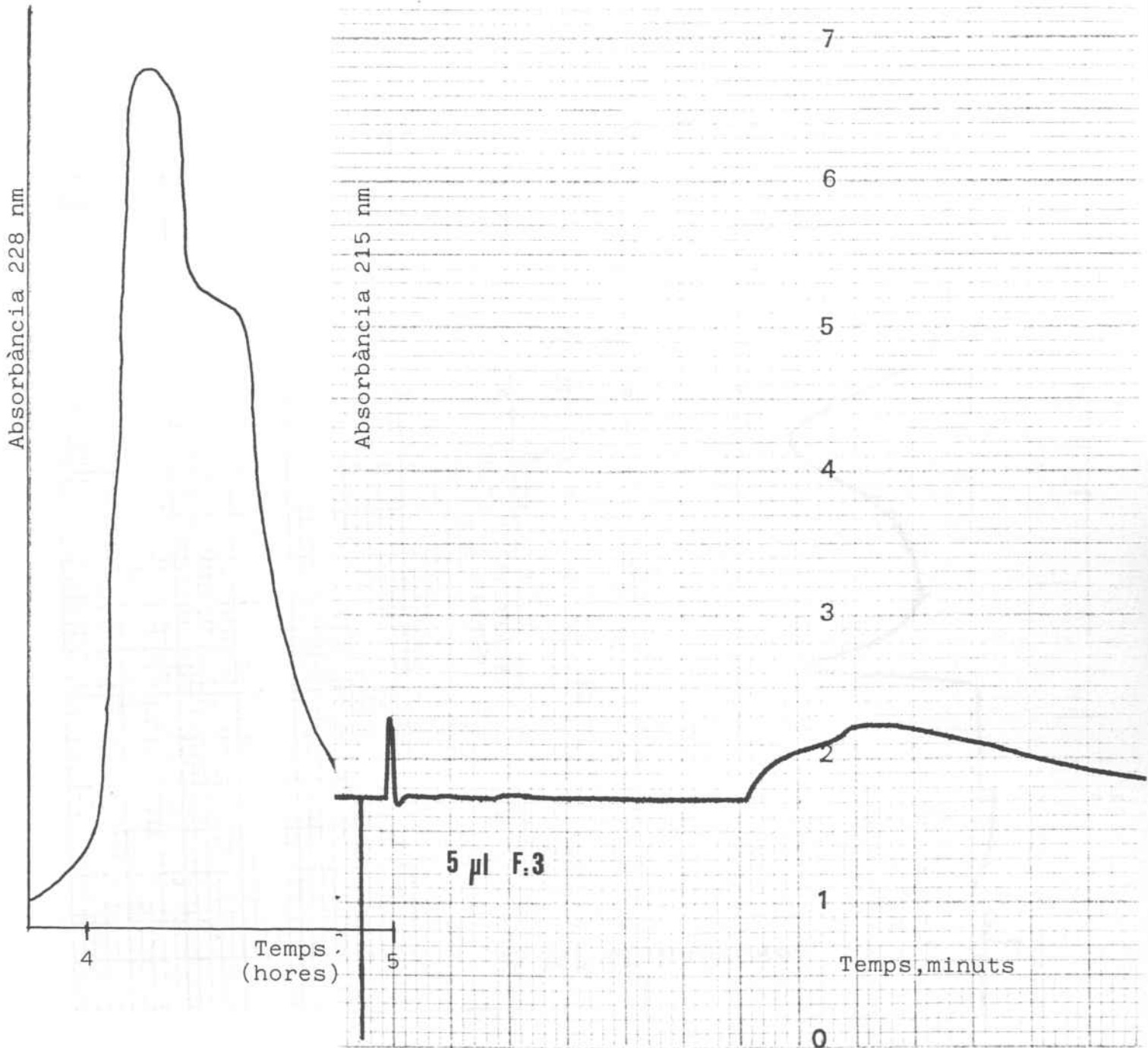
2^a Fracció liposomes
Meperidina ClH

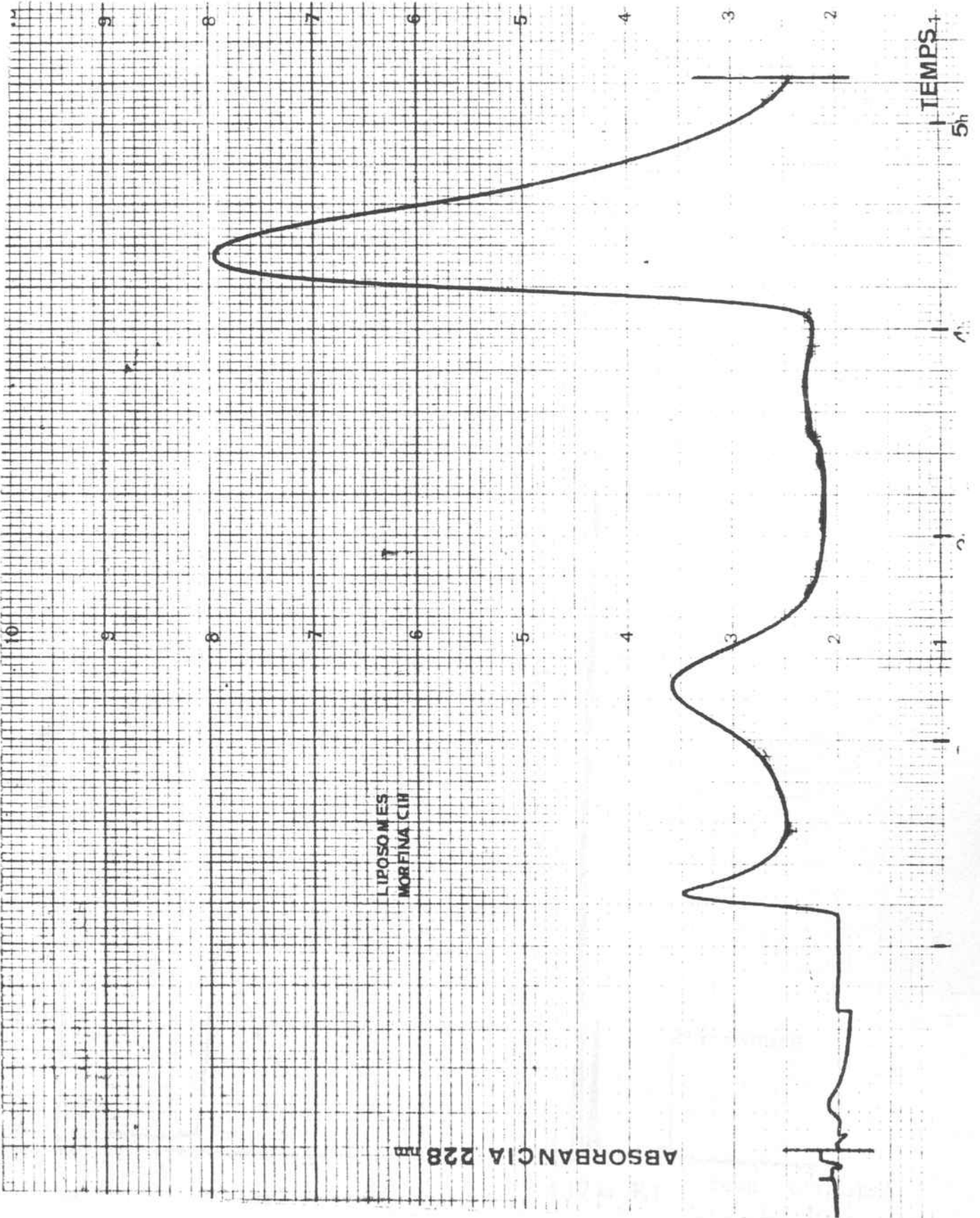


Absorbància 215 nm

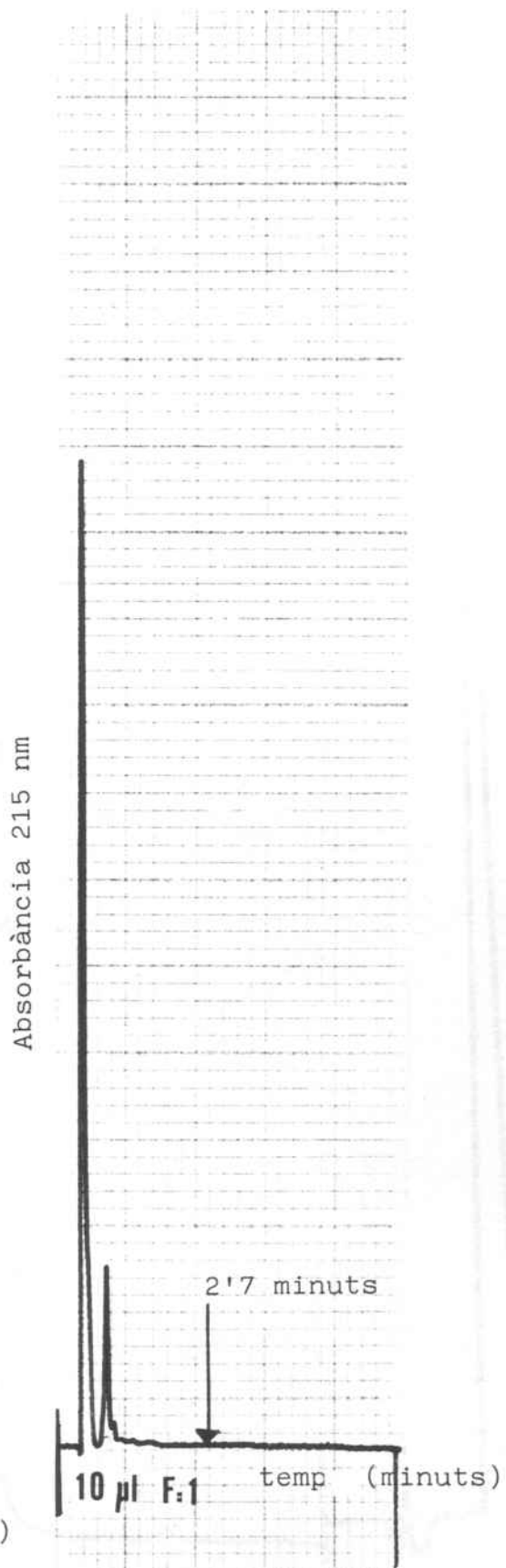
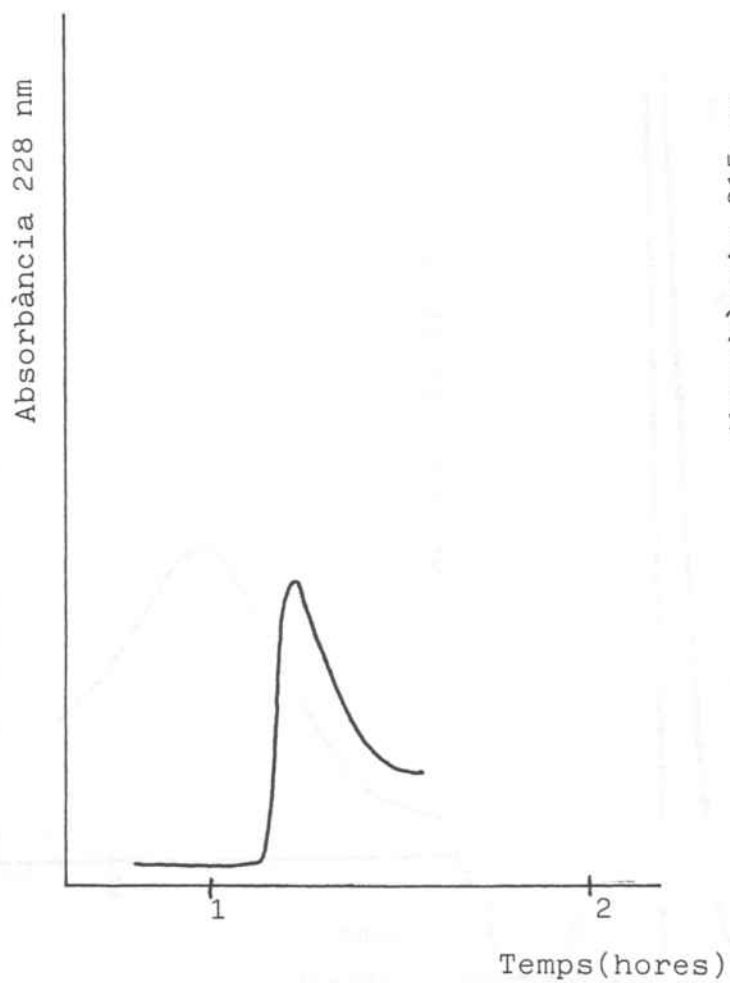


3^a Fracció liposomes Meperidina ClH

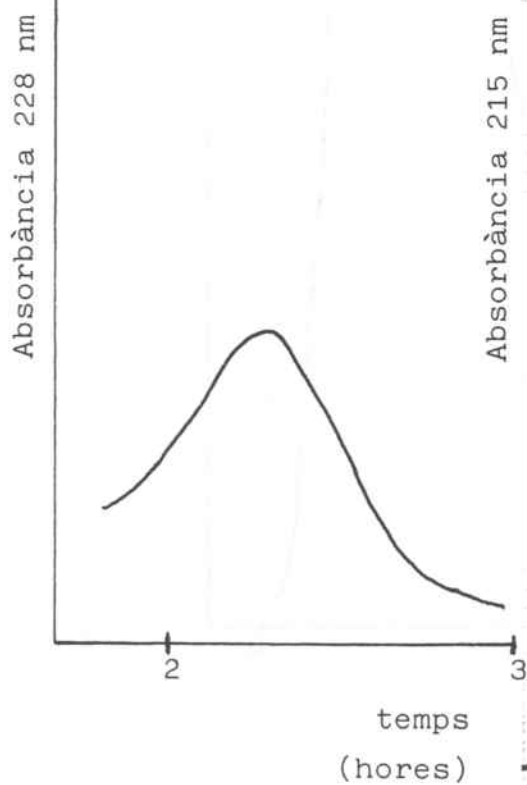




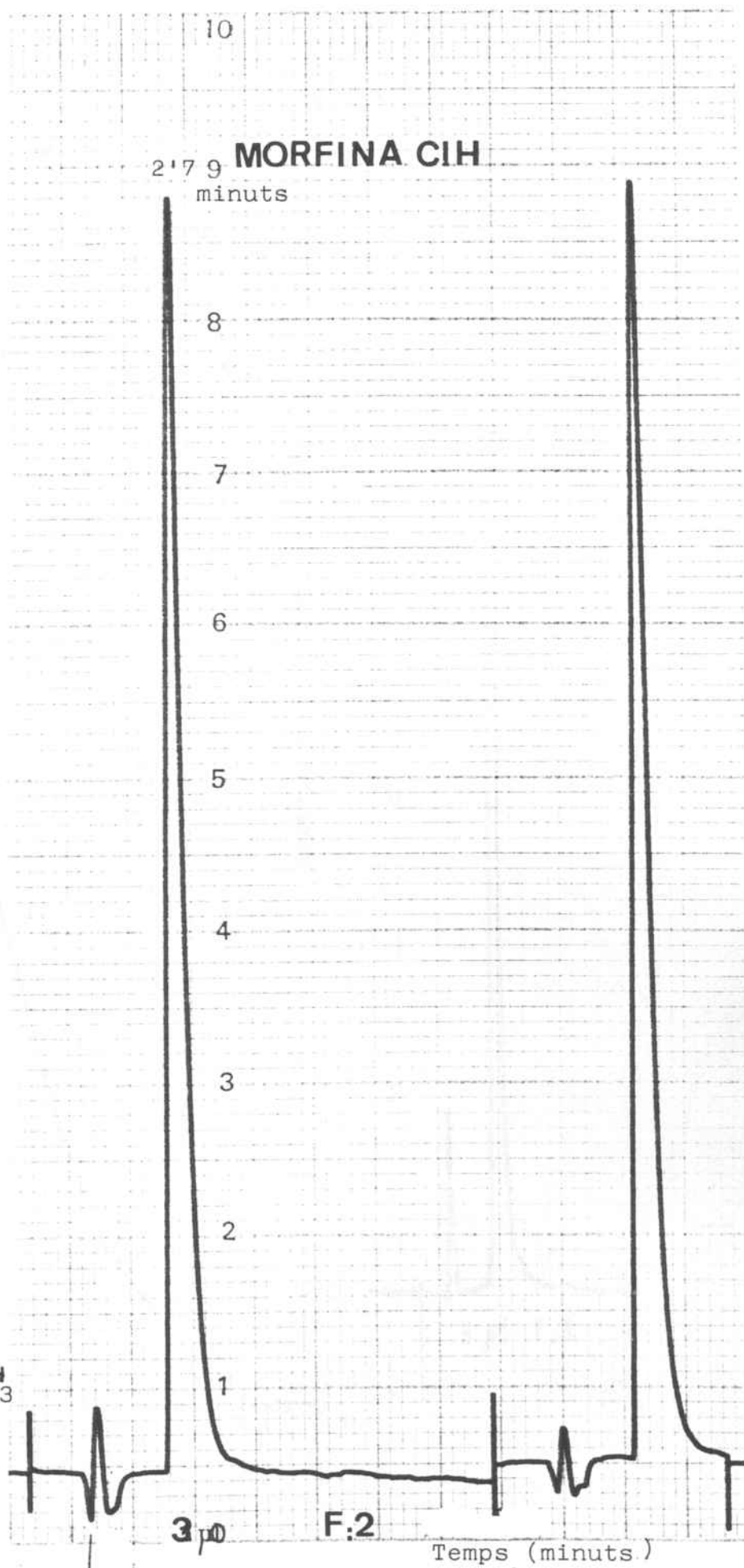
1ª Fracció liposomes
Morfina ClH



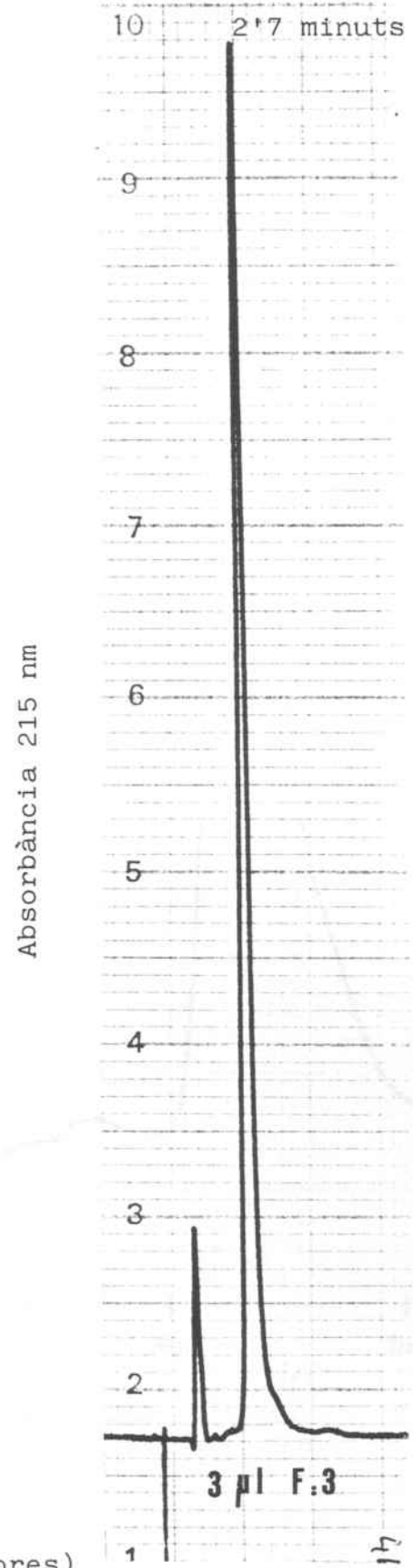
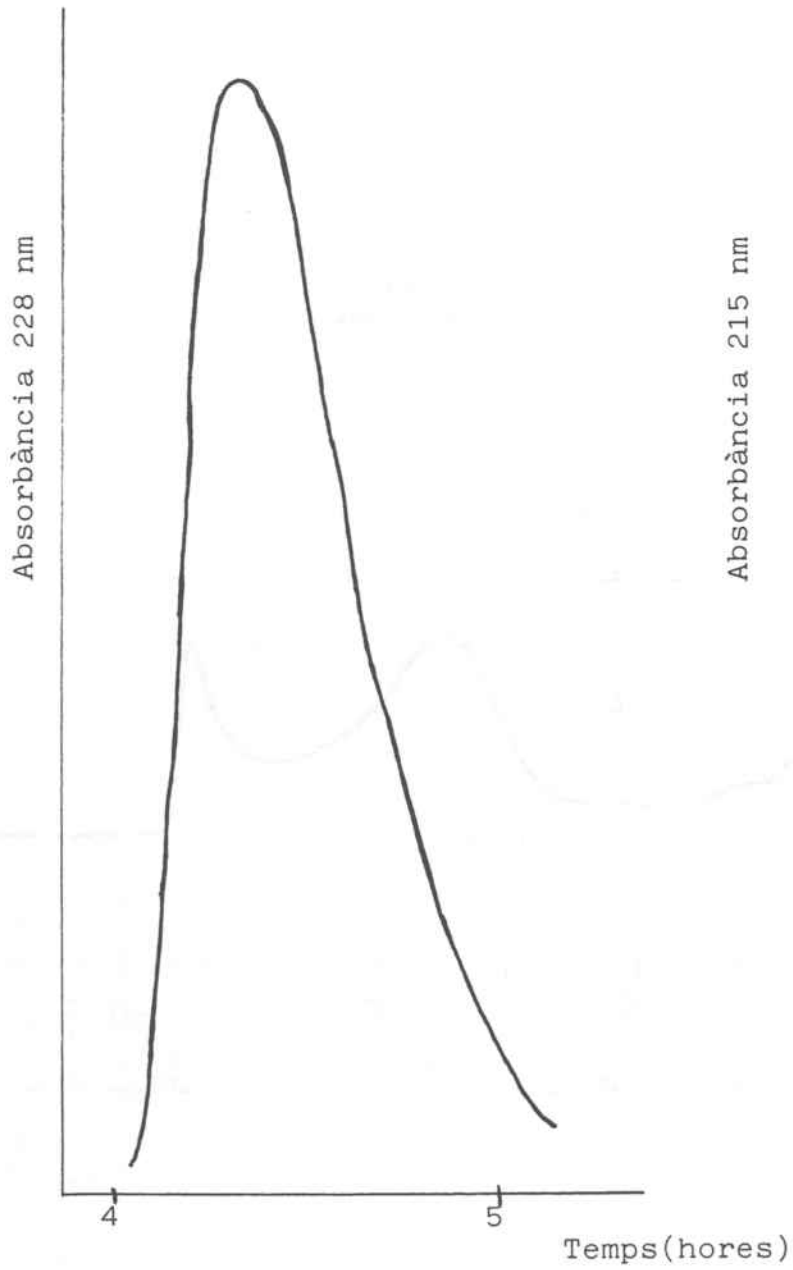
2^a Fracció liposomes
Morfina ClH



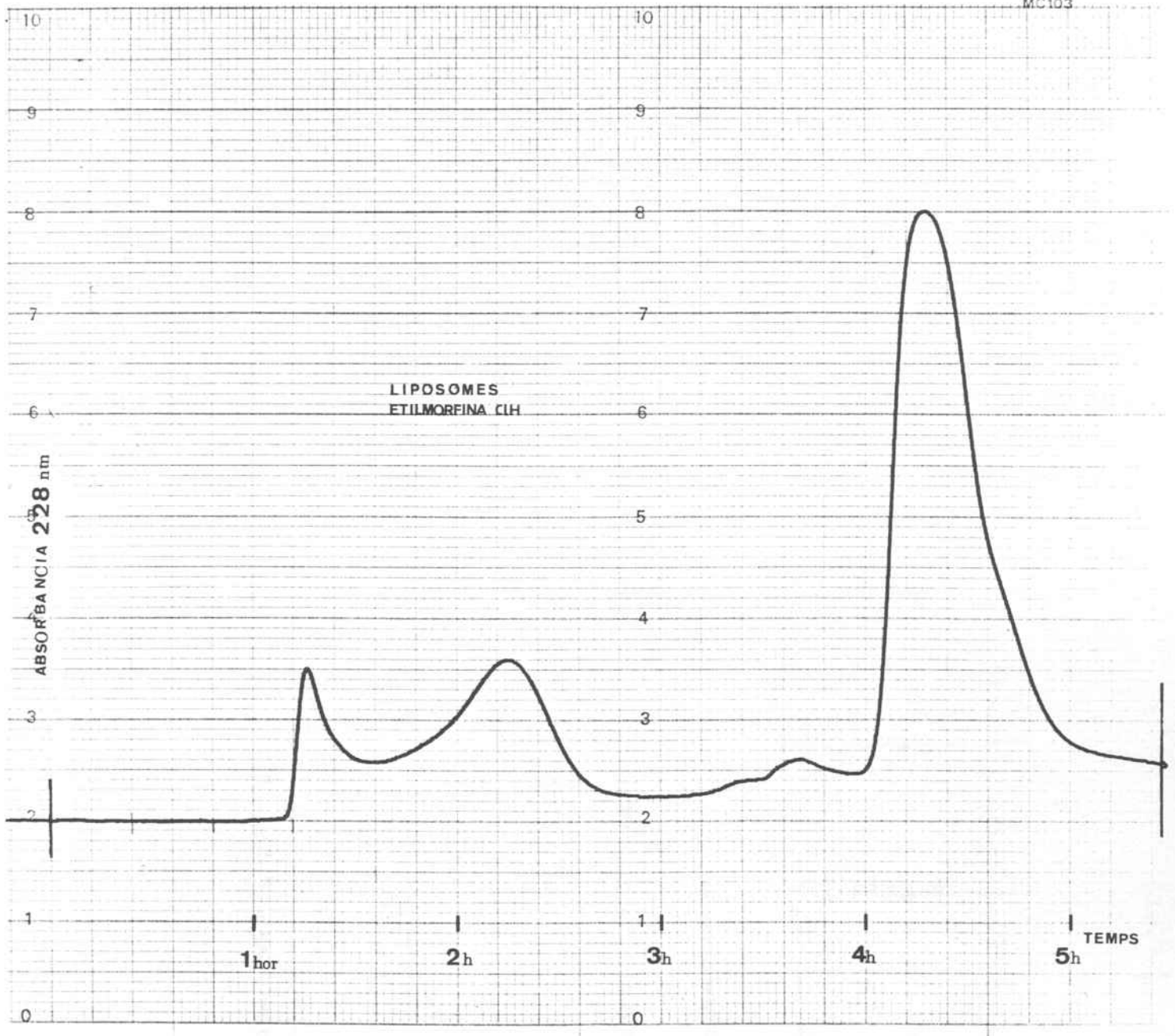
Absorbància 215 nm



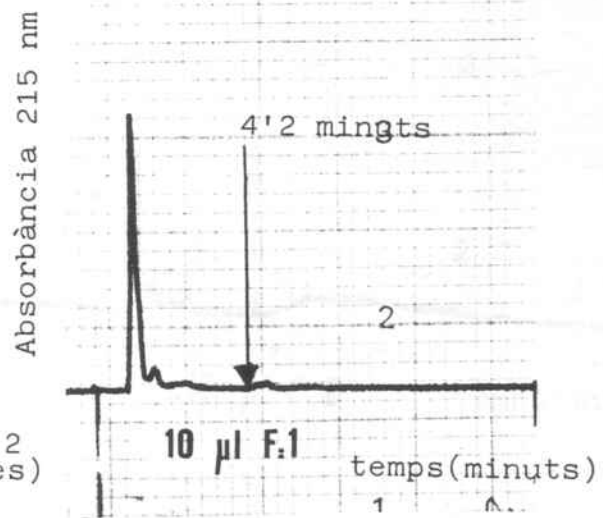
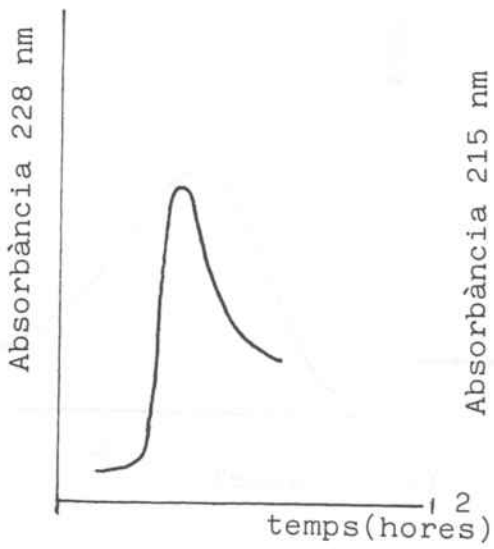
3^a Fracció liposomes
Morfina ClH



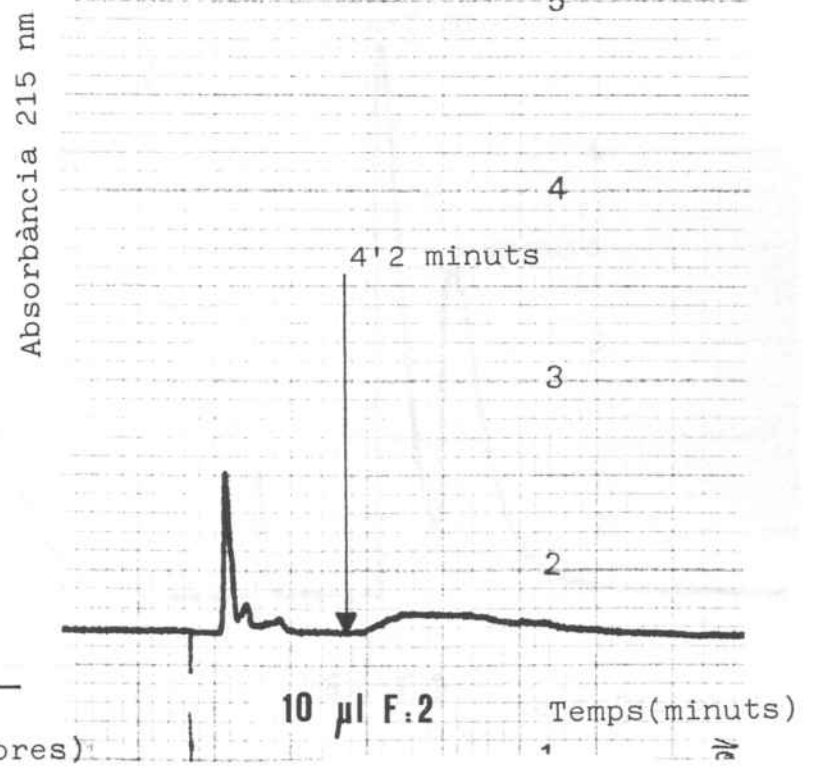
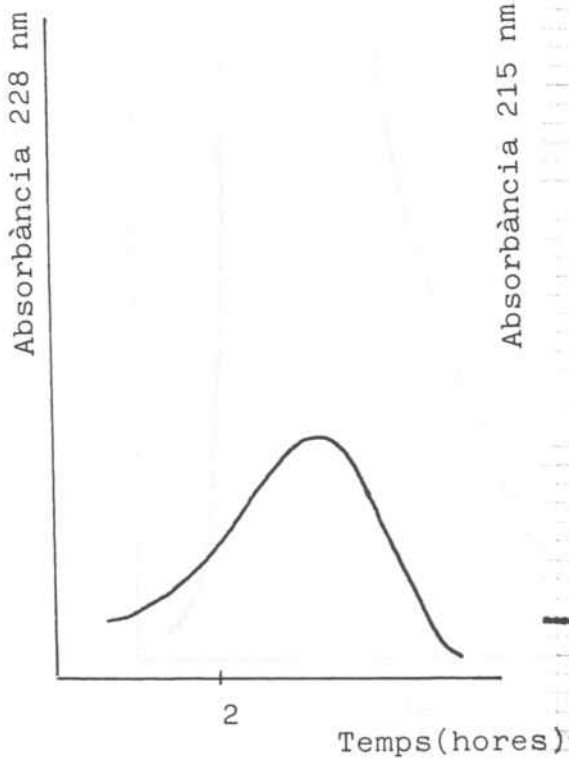
MC103



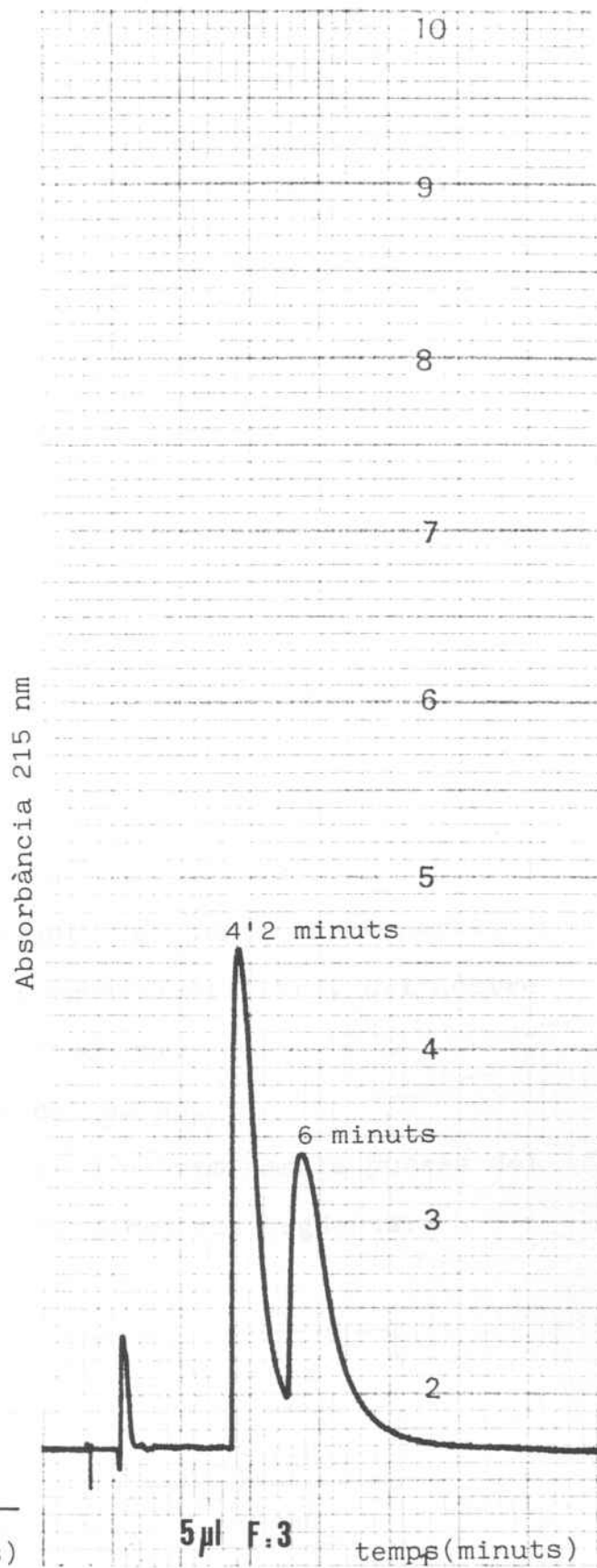
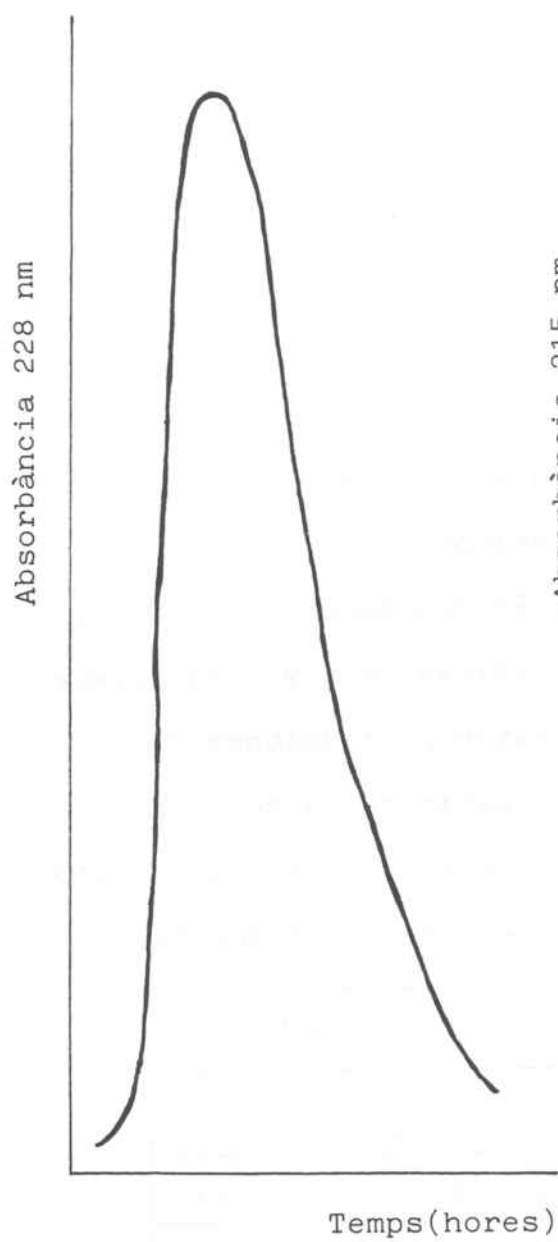
1^a fracció
liposomes Etilmorfi-
na ClH.



2^a Fracció liposomes
Etilmorfina ClH



3^a Fracció liposomes
Etilmorfina ClH



4.- Obtenció del clorhidrat de morfina.

Els resultats de l'anàlisi elemental de la morfina base lliure de partida estan indicats en la taula .

	% teòrics	% reals
C	70'58	68'08
H	6'92	7'44
N	4'84	4'51

Taula 6

A fi de millorar el resultat de la combustió, es va preparar el seu clorhidrat. Es va partir de 1'0977 g de morfina base lliure. S'hi va afegir una quantitat equimolecular de ClH 1 N. La morfina base lliure i el ClH reaccionen equivalent a equivalent, per tant, si es partia de ClH 1N, que suposa que té 1 equivalent/litre, pel nostre assaig s'en van necessitar 3'885 ml.

El rendiment va ésser del 83'9%.

En quan a les proves per a determinar la puresa del ClH de morfina, els resultats foren els següents:

a) Anàlisi elemental.

	%teòrics	% reals
C	63'39	63'40
Cl	10'87	10'86
H	6'21	6'26
N	4'35	4'39

Taula 7.

Segons el resultat de l'anàlisi elemental es dedueix que el clorhidrat obtingut és anhidre.

b) Rotació òptica.

$$\left[\alpha \right]_D^{20} = -113'2 \quad (c=2'2 \text{ H}_2\text{O}) \quad \text{literatura} = -113'5$$

c) Cromatografia en capa fina.

(SBN) Rf=0'083

Revelat amb ninhidrina i Cl₂/toluidina

d) Absorció al U.V. del ClH de morfina.

Aquesta prova es realitza per tal de veure si la lecitina i el ClH de morfina es solapen o bé, presenten absorbància a diferents longituds d'ona. Això serà útil a posteriori per a esbrinar si les diferents fraccions de liposomes (quan es pretengui encapsular-hi drogues), contenen lecitina, morfina (o altre opiaci) o ambdues.

Es prepara una solució del ClH de morfina 10⁻³ M i es fa un escombrat en un espectrefotòmetre entre 450 nm i 190 nm. El màxim d'absorció el presenta a 285 nm. El s'indica en la pàgina següent.

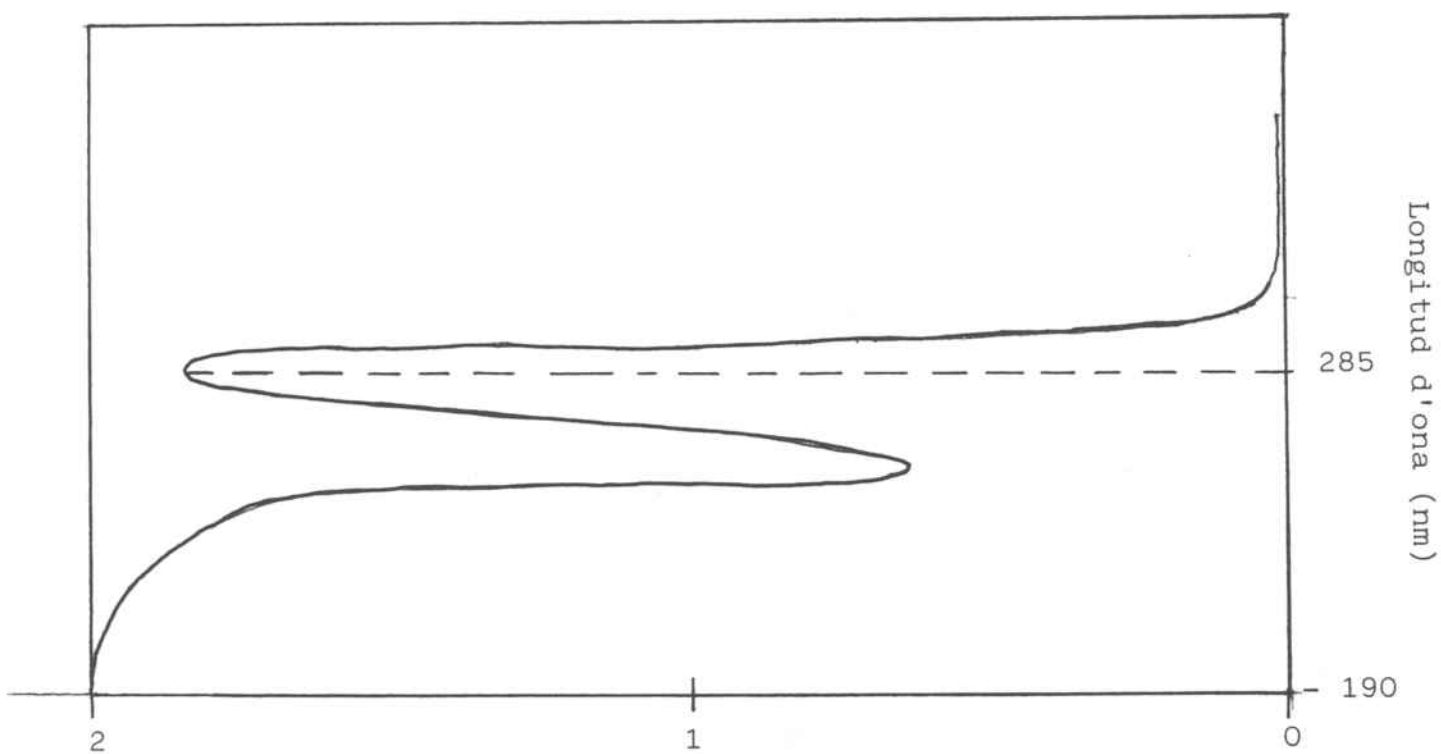


Figura 26

5.- Estudi de les interaccions lípid/molècula opiàcia.

Els resultats obtinguts en l'estudi de l'interacció d'una sèrie de molècules opiàcies amb lecitina, els hem subdividit en dos parts, una es refereix a interaccions associades a la temperatura i una altra relacionada amb interaccions de tipus hidròfob. No obstant, en primer lloc, descriurem breument les característiques físiques dels liposomes obtinguts:

a) Observació al microscopi electrònic dels diferents tipus de liposomes.

Mitjançant la microscòpia electrònica s'ha pogut observar la forma i mesura de liposomes obtinguts per diferents mètodes. Així doncs, quan la dispersió de liposomes es sotmet a una sonicació en sonda d'ultrasons (foto 1), s'obté una gran varietat de liposomes multilaminars de tamany heterogeni. Quan la sonicació es seguida per una centrifugació segons les condicions descrites en l'apartat 3.2.2.b, el tamany de liposomes que s'obté és més homogeni (foto 2). Finalment, si es fa el procés complet, sonicació amb sonda d'ultrasons, centrifugació i gel filtració, els liposomes resultants són unilaminars (foto 3).

Aquests resultats posen de manifest l'importància del mètode alhora d'obtenir SUV i la seva efectivitat. Amb aquesta observació, ens hem assegurat que treballàvem amb SUV.

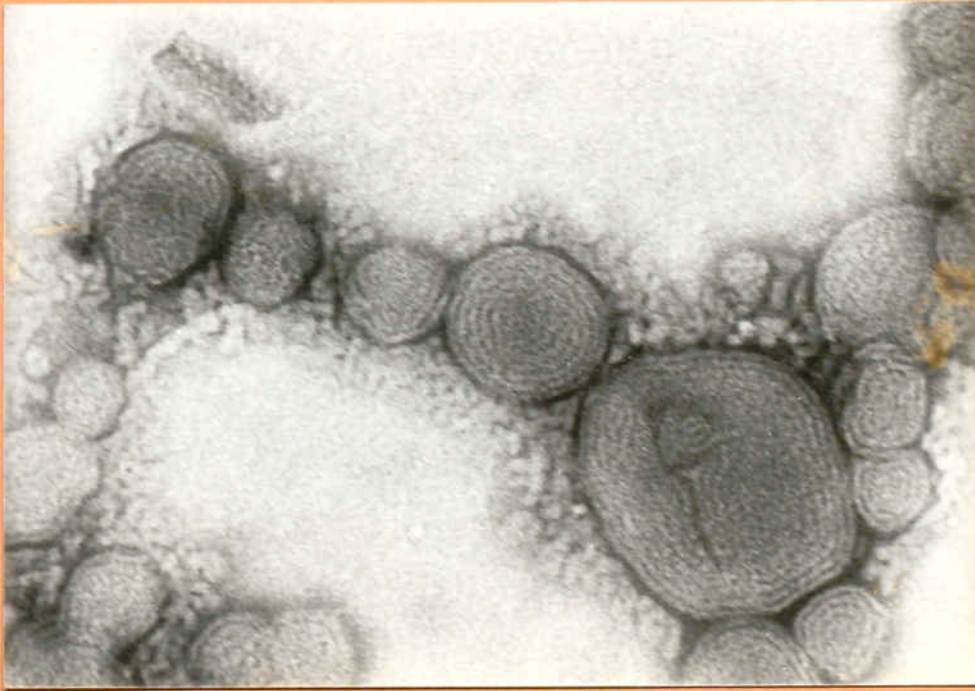


Foto 1.

Liposomes obtinguts per sonicació amb sonda d'ultrasons.

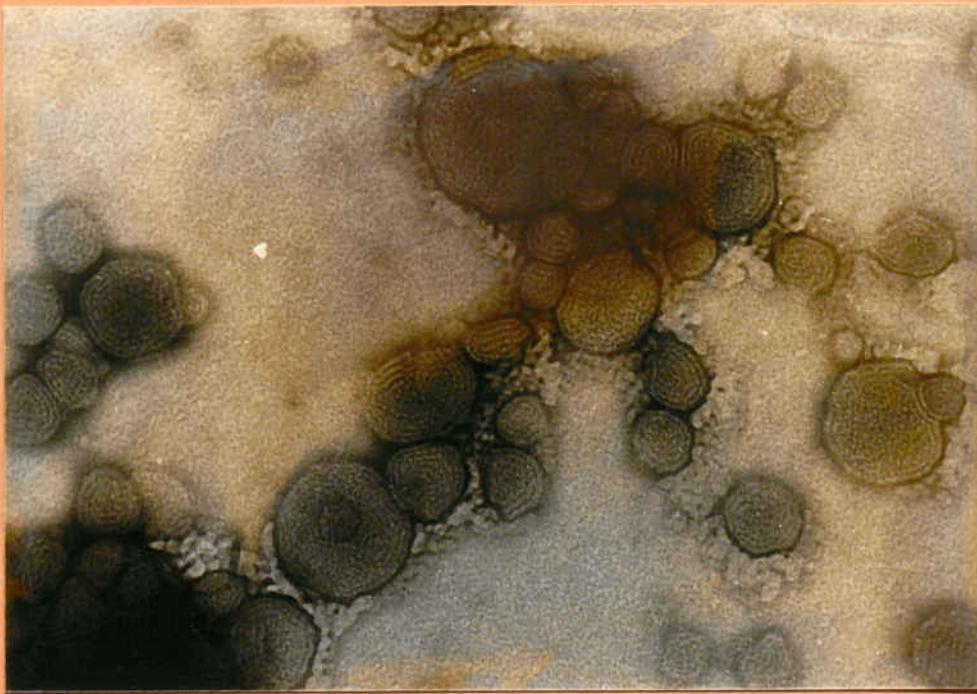


Foto 2.

Liposomes obtinguts per sonicació amb sonda d'ultrasons i centrifugació.

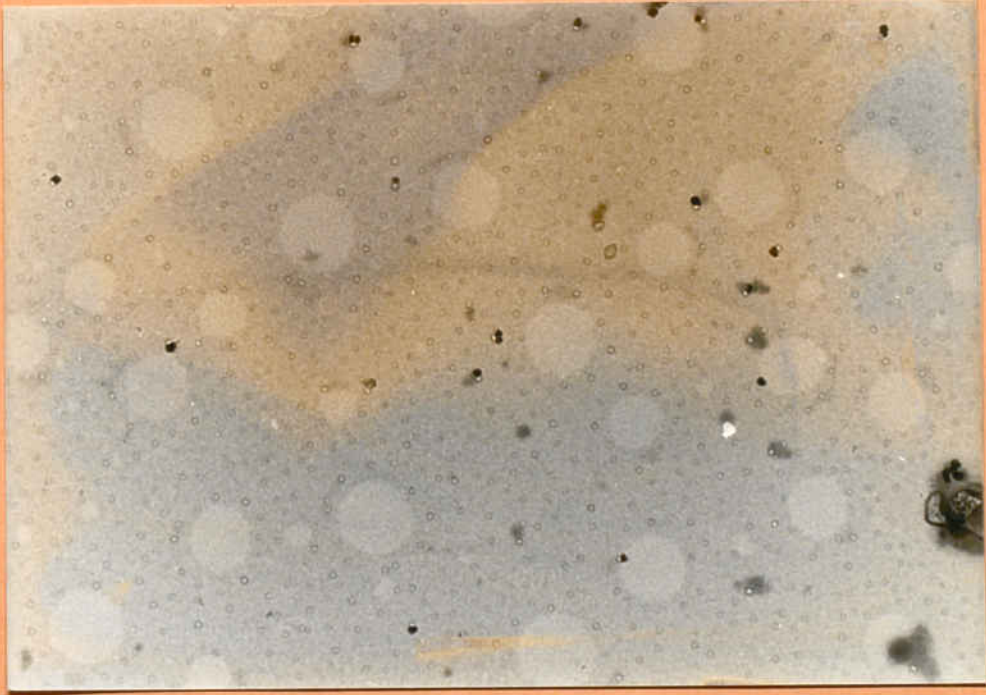


Foto 3.

liposomes obtinguts per sonicació amb sonda d'ultrasons, centrifugació i gel filtració.

b) Transicions de fase de la PC i DPPC produïdes per variacions de la temperatura.

b.1.- Cristalls líquids.

Es varen preparar barreges de fosfolípids i molècules opiàcies en la proporció molar lípid /opiàci = 25/1 tal com s' indica en l'apartat 3.5.2.

Les mostres a estudiar tenien consistència pastosa. Es van estendre sobre un porta i es va examinar l'aspecte de la mostra amb un microscopi òptic de llum polaritzada de augments.

En el cas de que existeixi algun tipus d'ordenació molecular que confereixi anisotròpia a certes zones de la preparació, es posaria en evidència per la presència de diferents tonalitats de color.

Tal com s'ha indicat en l'introducció, els diversos tipus de cristalls líquids es poden distingir per l'aspecte de la preparació a l'observar-los en un microscopi dotat de llum polaritzada.

En el nostre cas, les figures observades per la les preparacions que contenien lecitina pura (PC), naloxona/PC, morfina/PC, eren molt semblants entre si, fotos 4, 5 i 6 no poguent-se atribuir les diferents figures observades a canvis d'ordenació molecular a temperatura ambient.



Foto 4.
Cristall líquid de lecitina liofilitzada (< 99% d'aigua)



Foto 5.
Cristall líquid de lecitina (25 mM) - ClH de morfina
(1 mM). (< 99% d'aigua).

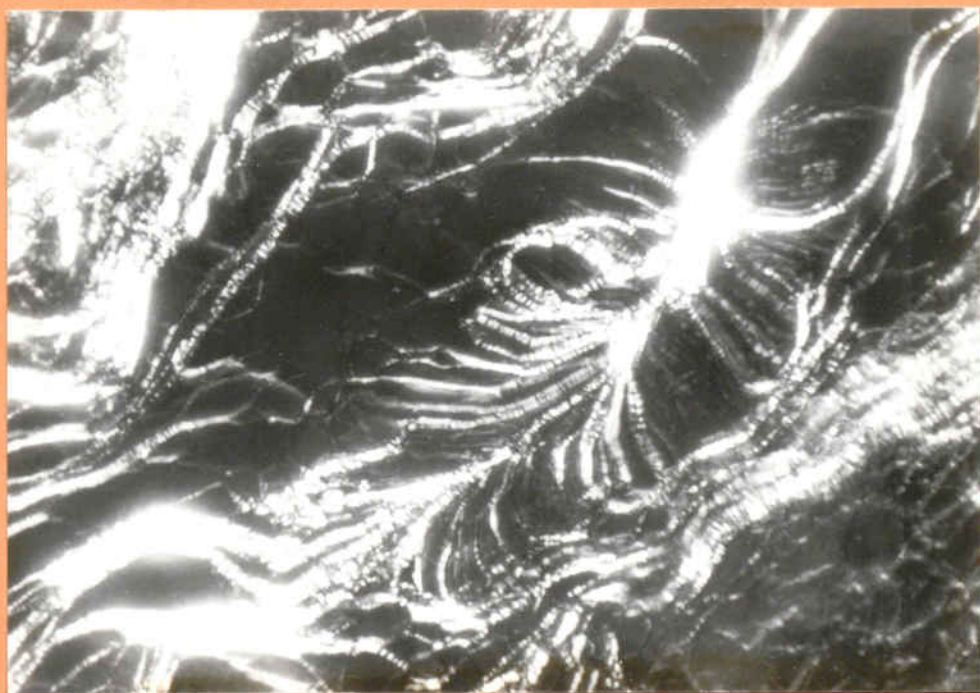


Foto 6.

Cristall líquid de Lecitina (25 mM) - ClH Naloxona
(1mM). (< 99% d'aigua).

A fi de determinar si la temperatura podia influir en l'ordenació molecular, abans esmentada, es varen observar aquestes mateixes mostres amb un microscopi òptic dotat de placa calefactora. La temperatura es va anar augmentant de manera gradual fins a 150°C.

Per a les tres preparacions , l'aspecte que anava adquirint el material era semblant, en totes es seguia un procés paral·lel. Es a dir, que la presència de morfina o naloxona en preparacions de lecitina absents d'aigua, no afecta de manera detectable el comportament de la lecitina en front a les variacions de temperatura.

Donat aquest resultat negatiu i la poca sensibilitat del mètode, varem optar per emprar el mètode turbidimètric per a aquest tipus de determinacions.

b.2.- Mètode turbidimètric per a determinació de les transicions de fase.

Seguint el procediment descrit en l'apartat 3.5.1., es va treballar amb solucions aquoses de PC i DPPC contenint morfina, naloxona, meperidina, etilmorfina i codeïna. La relació fosfolípid/droga era en el cas de la PC va ésser de 25 (PC)/ 4 i en el de la DPPC de 2'5 (DPPC)/ 2. En totes el % de H₂O era de més d'un 99%.

Els resultats obtinguts treballant amb PC venen representats en la figura 27'_a

Degut a limitacions instrumentals, no va ésser possible treballar a temperatura inferior a 10 °C, per lo qual , la transició de fase de la PC que es produeix a -10 °C no és observable.

A la figura 27'_b venen representats els canvis de turbidesa (mesurada mitjançant absorció a 430nm) produïts en liposomes de lecitina obtinguts per diversos procediments així com en presència de diferents molècules opiàcies.

Com es pot observar, la corba n° 1 i la n°2 en que la població de liposomes és homogènia, l'efecte de la temperatura és pràcticament nul. La diferència d'absorció observada entre les corbes 1 i 2 és deguda a la proporció de MLV que conté la corba 2 i que han estat eliminades de la preparació n° 1 mitjançant columnació.

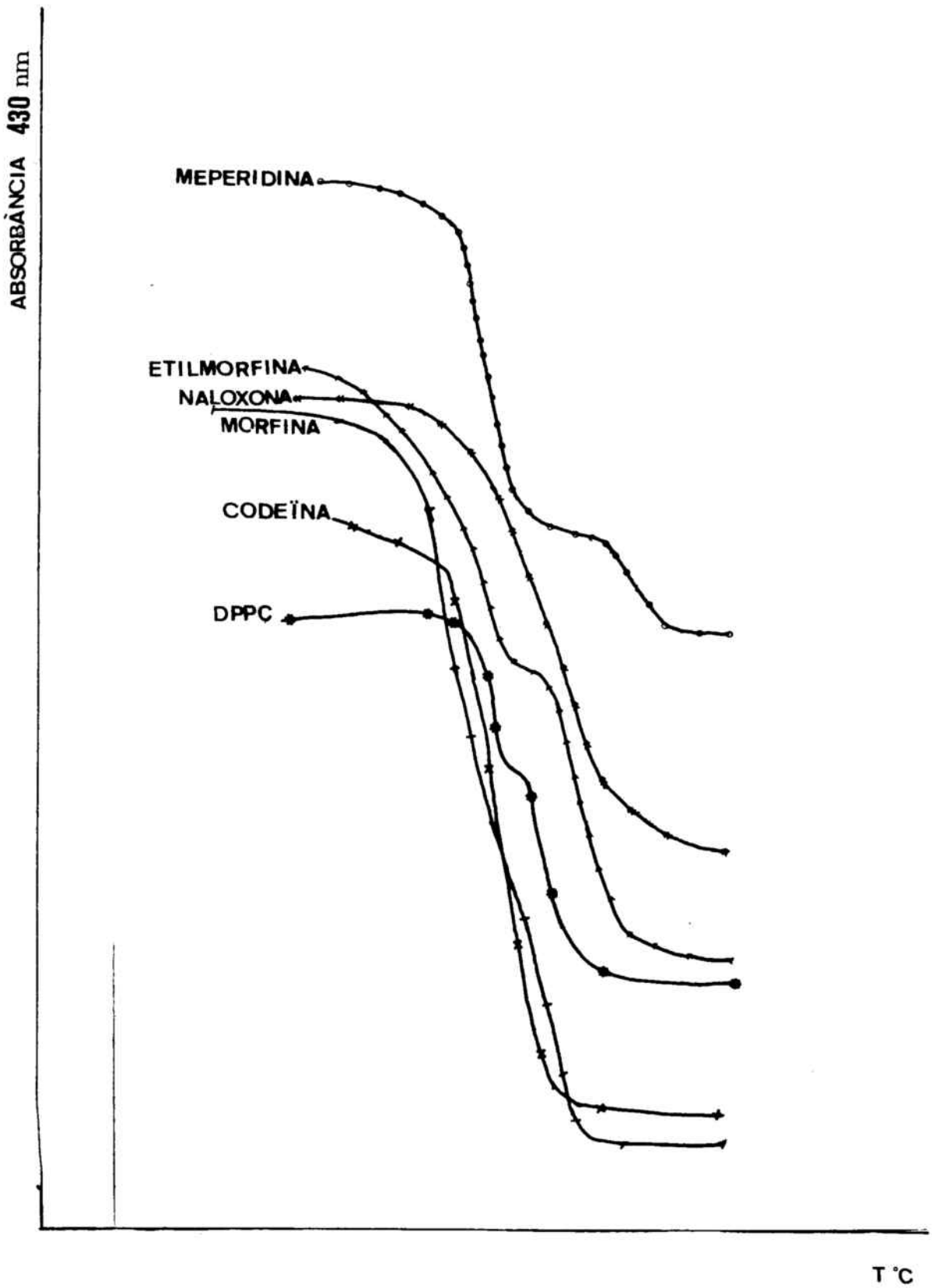


Figura 27'
a

Influència sobre la temperatura de transició de la DPPC de diverses moèlucies opiàcies.

Figura 27_b

VARIACIO DE LA TURBIDES DE LIPOSOMES DE PC
EN FUNCIO DE LA TEMPERATURA I DE LA MOLE-
OPIACEA INCORPORADA.

ABS.
430 nm

0,6

0,55

0,5

0,325

0,3

0,05

0,025

N° 3000 N. A. 4 "EXAKO" MARCA REGISTRADA

25

30

35

40

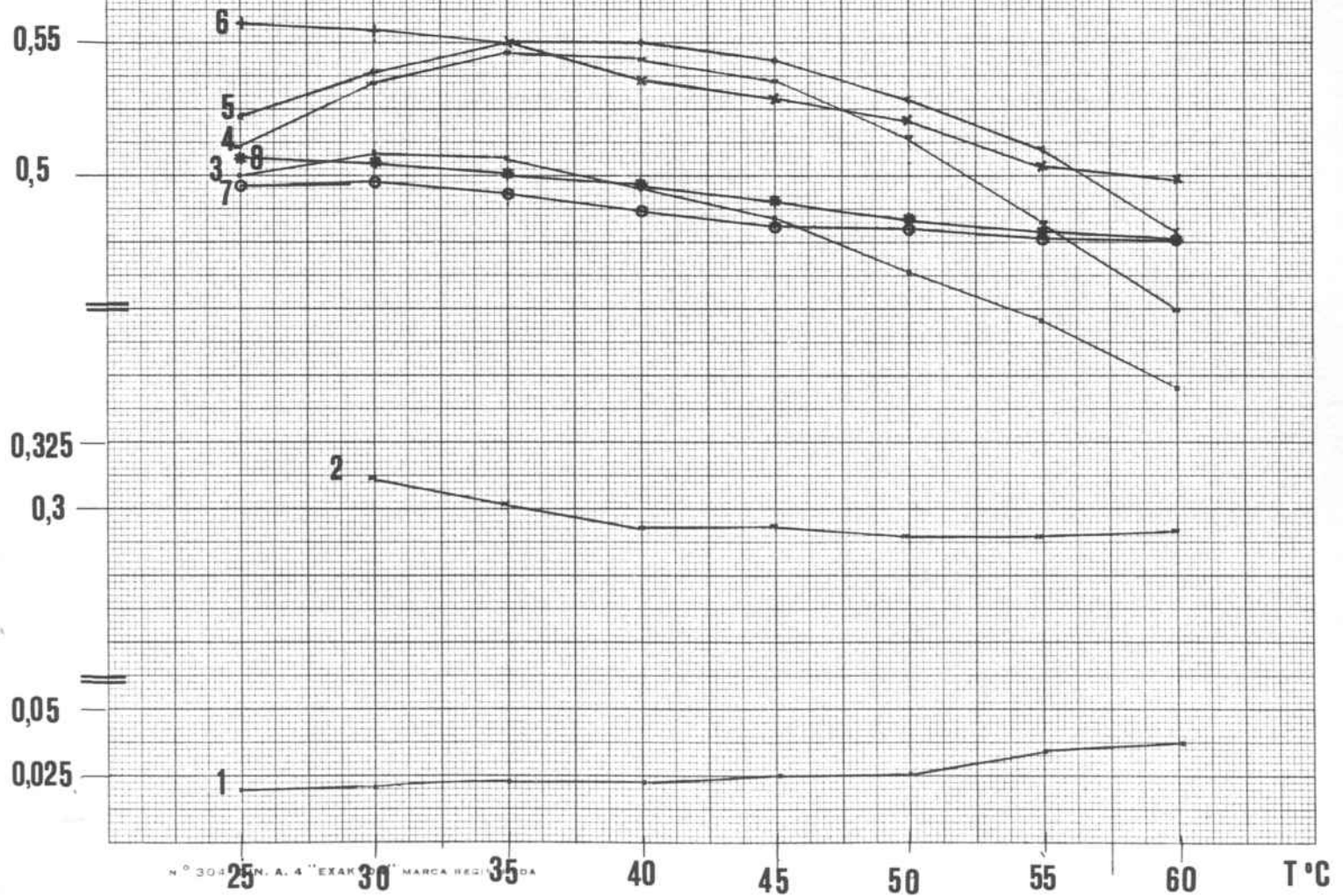
45

50

55

60

T °C



En el cas de la DPPC, la temperatura de transició es veu afectada en diferent grau pel opiacis emprats. Segons es representa en la figura , la codeïna base lliure i la morfina sembla ésser, avancen la temperatura crítica mentre que l'etilmorfina, la naloxona i la meperidina, la retarden. Tos aquests valors estan referits a la corba determinada per la DPPC lliure.

En la taula 8 s'indiquen els valors obtinguts de T_c.

Producte	T°C
DPPC	41'25
Morfina	39'5
Codeïna	40'5
Etilmorfina	42
Meperidina	45
Naloxona	42

Taula 8

b.3.- Anàlisi tèrmica diferencial.

- Resultats de la calibració:

En el nostre cas el crisol escollit era d'alumini, amb un diàmetre de 6 mm i una alçada de 2'5 mm. La calibració es va fer entre -20°C i 75 °C. La massa del crisol era de ≈ 35 mg. La corba ve representada en la figura 27. El seu ajust correspon a :

$$k \frac{mV}{w} = -62'54 \cdot 10^{-4} T^2 (\text{°K}) + 4'444 T (\text{°K}) - 421'410$$

$$r = 0'9972$$

nº de punts 40.

- Resultats experimentals:

S'han efectuat uns primes assajos amb la DPPC (dipalmitoil-fosfatidilcolina) dopat i sense dopar. Les molècules emprades alhora de fer el dopatge han estat la Morfina ClH i la Naloxona ClH. En la figura 28 ve representat un registre , que compren un interval de temperatures del bloc entre 50 °C i 80 °C. La velocitat d'escalfament ha estat de 0'5 °K/minut, aproximadament.

S'han obtingut dos pics clarament identificables, amb els maxims situats a uns 64 °C i 73 °C amb energies de 48 J/g i 39 J/g. La quantitat de substància assajada ha sigut de 11'5 mg i el període de mostreig de 1'05 s.

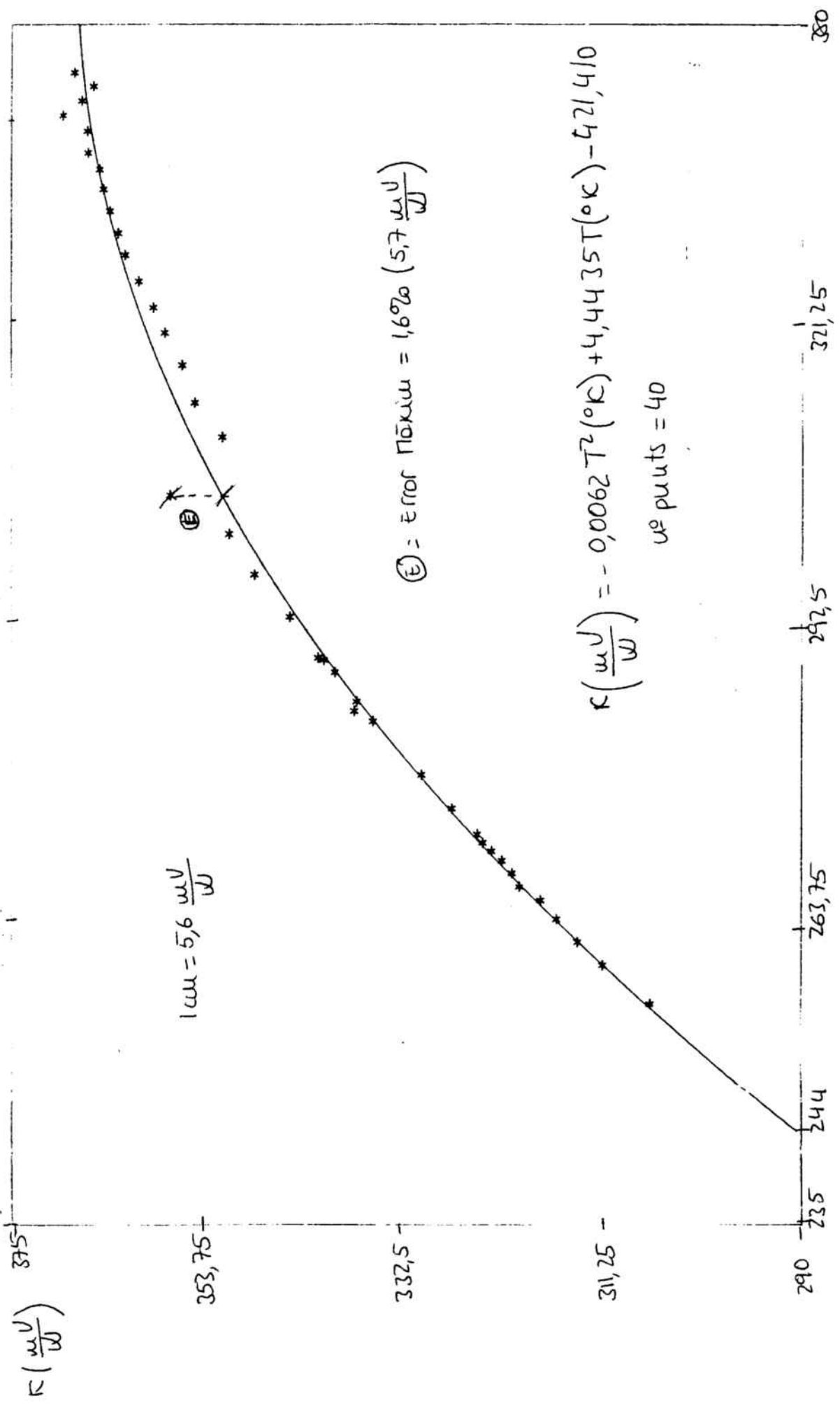
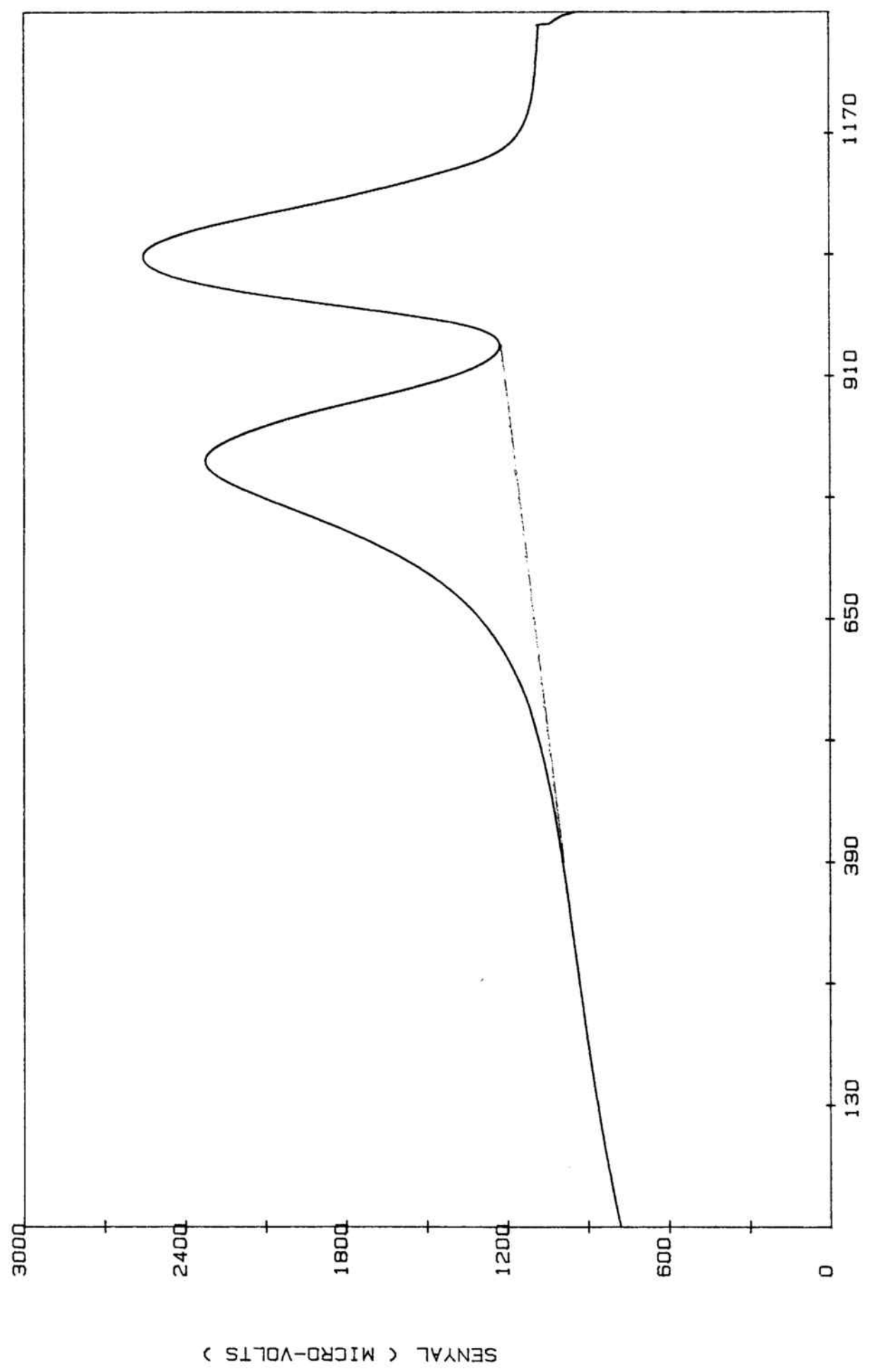


Figura 27



SENYAL (MICRO-VOLTS)

INDEX

Figura 28

L'energia posada en joc del primer pic coincideix plenament amb la de la bibliografia consultada (Lentz, 1978) que és de 47'8 J/g. El segon s'atribueix al pas de la mesofase a la fase isotropa (líquid normal).

En les figures 29 i 30, es mostren els resultats de la DPPC amb dopadges de Morfina ClH i Naloxona ClH respectivament, amb una relació lípid/molècula opiàcia de 2'5/2.

En el cas de la morfina ClH la massa assajada era de 7'2 mg i en el de l'altre molècula de 7'6 mg.

Com es pot observar hi ha notables diferències de comportament entre elles i respecte de la DPPC sense dopar.

Les anàlisis de la influència dels opiàcis en tal fenomen, està previst en un proper futur, si bé, la bondat del mètode emprat està ja controlada. No s'ha d'oblidar que la massa emprada de substància és de 0'01 g aproximadament. A títol de referència, el pic de la figura 2 està situat a una temperatura de 57 °C i l'energia associada és de 41 J/g.

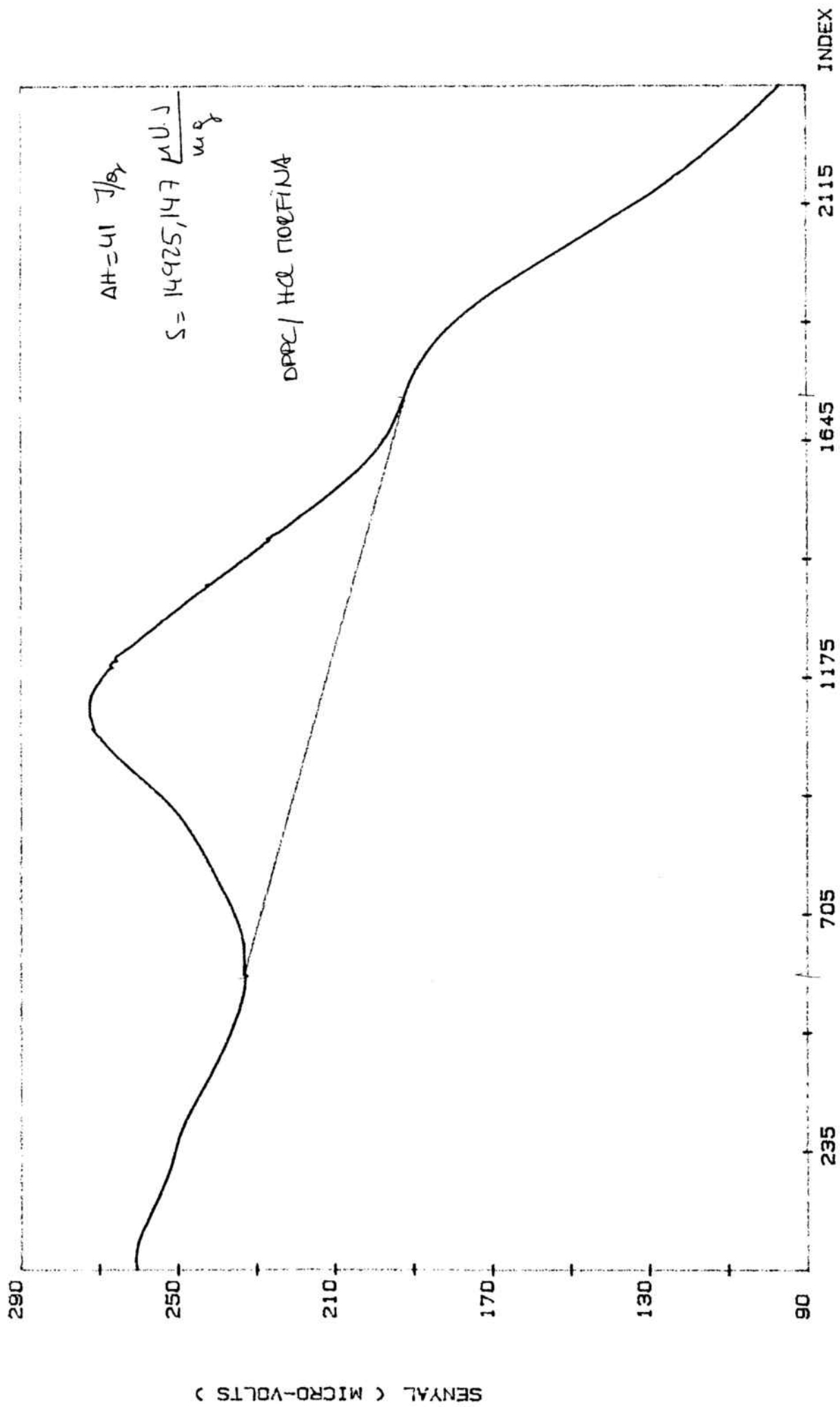


Figura 29

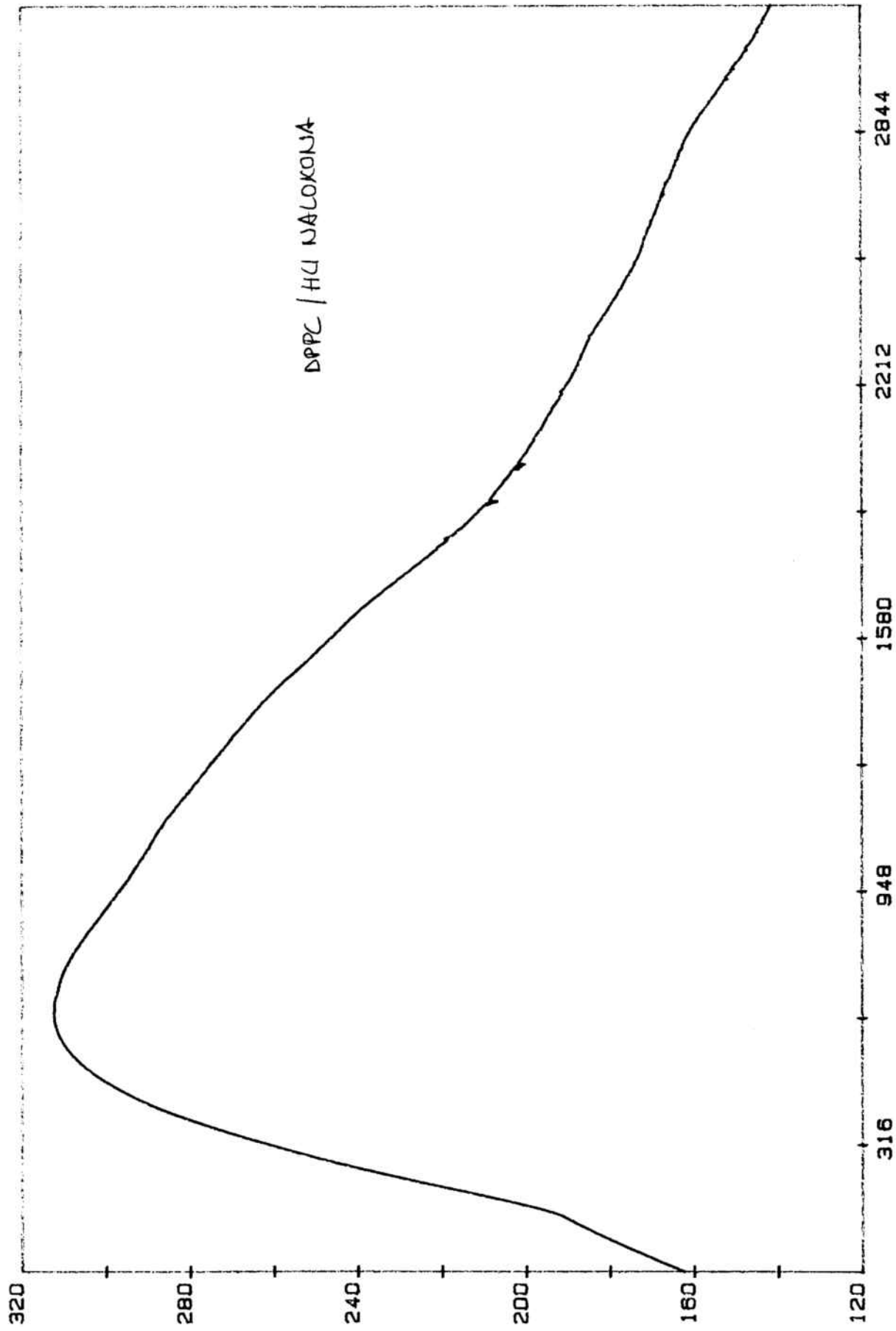


Figura 30

CONCLUSIONS

IV- CONCLUSIONS

1.- Pel mètode dels fosfats s'ha trobat un pes molecular mig de la lecitina de 789 g /mol.

2.- L'encapsulació de molècules opiàcies en les condicions estudiades sols es produeix per la morfina ClH en liposomes de PC unilaminars obtinguts per sonicació a baixa temperatura.

3.- Per microscòpia electrònica s'ha comprovat l'eficàcia del mètode seguit alhora d'obtenir vesícules unilaminars petites de tamany homogeni.

4.- S'han obtingut cristalls líquids de lecitina als que s'hi han afegit morfina ClH i Naloxona ClH i han estat liofilitzats. S'ha comprovat que els opiàcis esmentats s'incorporen perfectament en el cristall líquid sense produir canvis de fase.

5.- Els mateixos cristalls líquids s'han observat en un microscopi òptic termostatitzat i a l'anar augmentant la temperatura no s'ha apreciat cap canvi.

6.- La presència de molècules opiàcies modifica la temperatura de transició de fase de la DPPC. No s'observa una correlació entre les propietats farmacològiques de tals molècules i la modificació que indueixen en la T_c .

7.- Els assajos de turbides amb liposomes de Pc i molècules opiàcies indiquen que no es produeixen canvis associats a transicions de fase, en el marge de temperatures en el que es treballa (T_c de la PC= -10 °C). Les petites variacions de turbidesa observades a l'augmentar la temperatura, són atribuïbles a una major movilitat de les cadenes alquíliques dels àcids grassos constituents de la PC, que indiquen una disminució en l'espessor de la bicapa.

8.- Pel mètode de l'anàlisi tèrmica diferencial es pot assegurar que tant la morfina com la naloxona modifiquen la temperatura de transició de la DPPC, doncs els registres que s'obtenen són diferents i no superposables.

BIBLIOGRAFIA

V.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Abramson, M.B. J.Biol. Chem. 239: 70 (1964).
- 2.- Adrian i Huang. Biochem. 18, 5610-5614 (1979).
- 3.- Aki1. Hebd.Seanc.Acad.Sci.Paris, 274, 3603-3605.(1972).
- 4.- Alving,C.R. Biochem. 13, 4818-4824 (1974).
- 5.-Bangham i col. J.Mol.Biol. 13:238-252. (1965).
- 6.- Bangham i col. Annu.Rev.Biochem. 41: 753 (1972).
- 7.- Barenholz,Y i col. Biochem. 16: 2806-2810 (1977).
- 8.- Barrow,D i Lentz,B. Biochim.Biophys.Acta, 597:92-99 (1980).
- 9.- Bartlett, G.R. J.Biol.Chem. 234: 446-448 (1959).
- 10.- Beckett, A.H i Casy. Prog.Med.Chem. 4: 171 (1965).
- 11.- Boersma, S.L. J.Am.Ceram.Soc. 38 : 8-281 (1955).
- 12.- Bøttcher,C. J.Anal.Chim.Acta. 24 :203-207 (1961).
- 13.- Chandra, R. i Klein.Anal.Biochem. 72: 407-412 (1976).
- 14.- Chapman,D.Quart..Rev.Biophys.8 : 185-235 (1975).
- 15.- Cho i col.Molec.Pharmacol. 16: 393. 222-245 (1979).
- 16.- Craves i col. Science, 207 : 75-76 (1979).
- 17.- Dawson i Kermes J.Biol.Chem.253 : 7999-8001 (1978).
- 18.- Deamer,D i Bangham, A.D. Biochym.Biophys.Acta. 629-634 (1976).
- 19.- Deslauriers,R. Derv.Endocrinal.Neurophysical Pept.Horm.Other Biol.
Act. Pep. 13, 195-200 (1981).
- 20.-Eisleb.Med.Chem. 4 :213. (1942).
- 21.- Fendler, J.C. & En.Special report. Januaru 2, 25-37 (1984).
- 22.- Fryer, J.R. Nature, 313 : 382-384 (1985).
- 23.- Gioannini i col. Biochem.Biophys.Res.Com. Vol.119, n°2, 624-629 (1984)
- 24.- Goñi,F,M i Macarulla J,M. "Laboratorio" Año XXXII.Tomo LXIV,n°384
(Dic.1977) 501-519.
- 25.- Gregoriadis Nature. 244 : 170 (1973)
- 26.- Huang,Ch. Biochem. 344-352 (1969).
- 27.- Hugues i col. Nature 258 : 577--579 (1975).
- 28.- Kerr i Kulp. Analyse Thermique. Gautier - Villars (1972).
- 29.- Klein,R.A. Biochim.Biophys.Acta 210 : 486-489 (1970).
- 30.- Lawaczek i col. Biochi.Biophys.Acta. 443 :313-330 (1976).

- 31.- Lehmann Phys.Chem. 4, 462 (1889).
- 32.-Lentz i col. Biochem.Vol.17,n21 : 4475-4480 (1978).
- 33.- Loh i col.Life.Sci. 14 : 2231-2245 (1974).
- 34.- Lowney i col. Science. 183 : 749-753 (1974).
- 35.- Martin, W,R. i col. J.Pharmacol. exp. Ther. 150 : 437-442 (1965).
- 36.- Marzullo, G. Science 208 : 1171-1173 (1980),
- 37.- Miller, R.J. Biochem.Biophys.Res.Comm. 74 : 1311-1317 (1977),
- 38.- McNaughton, J.L. i Mortimer, C.T.IRS; Physical Chemistry. Series 2
volum 10 (1975).
- 39.-Newman,E.L. Biochem. 23 : 5385-5382 (1984).
- 40.- Nordlund,J.R. Biochem. 21 : 2820-2825 (1982).
- 41.- Olson, Biochim.Biophys.Acta. 557 : 9-23 (1979).
- 42.- Ostro,M i col. Nature 274 : 293 (1978).
- 43.- Ozawa. Analise Thermique. Gauthier-Villars (1972).
- 44.- Papahdjopoulos, D. Biochi.Biophys.Acta.163 : 240-254 (1968).
- 45.- " " " " 311-330 (1973).
- 46.- Pasternak i Snyder.Mol.Pharmacol. 11 : 478 (1975 b).
- 46.- Pattus,F. Biochem.22, 5698-5703 (1983).
- 47.- Pert i Snyder. Science. 1011-1014 (1973).
- 48.- Pert. Opiates and endogenous opioid peptides. Ed.H.W. (1976).
- 49.- Rohman, Neuropeptides 4 :261-268 (1984).
- 50.-Saunders i col. J.Pharm.Pharmacol. 14 : 567 (1962).
- 51.-Saupe. Liquid crystals and plast c crystals. Vol. 1 18-63 (1974)
- 52.- Simon i col. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 70 : 46 8-474 (1973)
- 53.- " " " " " " " 72 : 2404-2407 (1975).
- 54.- Simo i Hiller. Fed.Proc. 37 : 1414-146 (1978).
- 55.- Singleton.W.S. J.Am.OilChemist's Soc. 42-53 (1965).
- 56.- Snyder,S.H. New 'England J.Med. 296 : 266 (1977).
- 57.- Szoka i Papahjopoulos. Annu. Rev.Biophys. Bioeng. 9 : 467 (1980).
- 58.- Szoka i col. Biochim.Biophys.Acta 601 : 559-571 (1980).
- 59.- Tredgold, R.H. Nature 313 : 3481 (1985).
- 60.- Valic,M.I. Biochem. 18 : 854-859 (1979).
- 61.-Vold,A.J. Anal. Chem. 21 : 683 (1949).
- 62.- Wilschut, J. Biochem. 24 : 8-14 (1985).