

NANOEMULSIONES DE CANNABINOIDES EN TERAPIA OCULAR

Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



ANA MEJÍAS CARRASCOSA

DOBLE GRADO EN FARMACIA Y EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

Curso 2020-2021



Trabajo de Fin de Grado (TFG)
Trabajo de Carácter Experimental
Doble grado en Farmacia y en Óptica y Optometría

NANOEMULSIONES DE CANNABINOIDES EN TERAPIA OCULAR

Alumna: Ana Mejías Carrascosa
Tutora: Dra. Lucía Martín Banderas
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Facultad de Farmacia
Universidad de Sevilla

Sevilla, junio de 2021

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer al Ministerio de Educación y Formación Profesional la concesión de la Beca de Colaboración para el curso académico 2020-2021, gracias a la cual he podido desarrollar esta investigación experimental a pesar de las difíciles circunstancias en que nos encontramos debido a la crisis sanitaria por el Covid-19. Esta beca me ha brindado la oportunidad de conocer de primera mano la labor investigadora que se lleva a cabo en el departamento en el que he trabajado y me ha permitido desarrollar este trabajo de manera satisfactoria y completa.

En segundo lugar, querría agradecer a mi tutora y sus compañeras/os de investigación por toda la ayuda ofrecida y por el gran aprendizaje que ha supuesto para mí el desarrollo de este trabajo de investigación.

Finalmente, muestro mi más sincero agradecimiento a mi familia por el apoyo incondicional que me ofrece y gracias al cual me siento capaz de llevar a cabo cualquier desafío que me proponga.

Resumen

El globo ocular es una estructura que constituye una compleja diana terapéutica. Ello se debe a la presencia de barreras estructurales como son las diferentes capas de la córnea, el humor acuoso, el humor vítreo y la esclera, así como a las barreras dinámicas propias del ojo que incluyen el intercambio lagrimal, la propia dilución de las sustancias en la película lagrimal y el flujo sanguíneo que drena la conjuntiva y coroides. Todo ello dificulta la penetración de fármacos en la concentración suficiente para poder tratar patologías oculares, especialmente del segmento posterior del ojo.

Una de las aplicaciones de la nanotecnología es la formulación de fármacos en estructuras que permiten vehicular y optimizar la acción terapéutica de los mismos en los tejidos diana. Dentro de dichas estructuras encontramos las nanoemulsiones, dispersiones coloidales con tamaño de gotícula de entre 20 y 200 nm, que en términos de terapia ocular han demostrado resultar especialmente efectivas al prolongar la permanencia del fármaco en el saco conjuntival y facilitar su penetración a través de la córnea. Por otro lado, la presencia de receptores CB2 a nivel ocular y el efecto antiinflamatorio que produce su activación los ha convertido en una diana terapéutica prometedora para el tratamiento de patologías oculares inflamatorias tales como la uveítis y la vitreoretinopatía proliferativa.

En este estudio experimental, se ha trabajado en la optimización de una formulación de nanoemulsiones como posible alternativa en patología ocular. Para ello, se han seleccionado dos activos de naturaleza cannabinoide, uno sintético y otro de origen natural, con demostrada actividad agonista CB2.

Palabras Clave

Nanoemulsiones (NE), cannabinoides, receptor CB2, balance hidrófilo-lipófilo (HLB)

Abstract

The ocular globe has been a complex and tedious structure to treat in terms of ocular pharmacology. This is mainly due to the structural barriers that are found in it which include the different corneal layers, the aqueous and vitreous humor and the sclera, as well as the dynamic barriers including tear exchange, tear dilution of substances that reach the tear film and the choroidal and conjunctival blood flow. All these factors interfere with the penetration of drugs and the delivery of the adequate concentration of them in order to treat ocular diseases, especially those affecting the posterior segment of the eye.

Nanotechnology proposes alternative ways of pharmaceutical formulation that aim to improve drug bioavailability and delivery to their target tissues. One of these alternatives are nanoemulsions, colloidal dispersions with a droplet size in the range of 20-200 nm, who in terms of ocular therapy have shown promising characteristics that enable de perpetuation of drugs in the tear film and facilitate their permeation through the corneal surface. On the other hand, the presence of CB2 receptors in the eye and the anti-inflammatory effect that results of their activation, have made them particularly interesting as therapeutical targets in the treatment of inflammatory ocular diseases such as uveitis and proliferative vitreoretinopathy.

The present experimental study has worked on the optimization of a formulation of nanoemulsions as a possible alternative in the treatment of ocular pathologies. In order to do so, two cannabinoid actives with a demonstrated CB2 agonist activity were selected, one of them of natural origin and the other synthetic.

Keywords

Nanoemulsions (NE), cannabinoids, CB2 receptor, hydrophilic-lipophilic balance (HLB)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	7
3. METODOLOGÍA	8
3.1. Materiales	8
3.2. Métodos	9
3.2.1. Elaboración de Nanoemulsiones	9
3.2.2. Encapsulación de un activo cannabinoide sintético en las nanoemulsiones	13
3.2.3. Cuantificación del activo cannabinoide sintético por cromatografía	13
3.2.4. Eficacia de la Encapsulación y Carga de Fármaco.....	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
4.1. Influencia del HLB en las propiedades fisicoquímicas de la NE	15
4.2. Influencia de tensioactivo/s para el HLB requerido en las propiedades de la NE.....	18
4.3. Encapsulación del activo cannabinoide sintético en las nanoemulsiones.....	22
4.4. Cuantificación del activo cannabinoide sintético por Cromatografía.....	23
4.5. Estudio de la capacidad de vehiculización de las nanoemulsiones	25
5. CONCLUSIONES	28
5.1. Futuro y Perspectivas	28
6. BIBLIOGRAFÍA	29

1. INTRODUCCIÓN

Cannabis sativa se trata de una planta herbácea perteneciente a la familia *Cannabaceae* y originaria de Asia Central y del subcontinente indio. Un aspecto común a todas las especies dentro de esta familia es la presencia de sustancias llamadas cannabinoides, o más concretamente, **fitocannabinoides** de las que se han caracterizado hasta 100 moléculas distintas (Schilling et al., 2020). Principalmente, se encuentran tetrahidrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN), cannabigerol (CBG), tetrahidrocannabivarina (THCV), cannabicromeno (CBC) y sus respectivos ácidos. Observamos sus estructuras químicas en la *Figura 1*. Este estudio se centrará en los dos primeros (THC y CBD) al ser los más activos biológicamente y, por ello, los más estudiados (Papaseit et al., 2019). Además, estas plantas también producen una serie de sustancias tales como terpenos, azúcares, hidrocarburos, flavonoides, compuestos nitrogenados, fenoles no cannabinoides y aminoácidos (Elsohly, Slade, 2005). Dentro de los terpenos, se destaca el β -cariofileno.

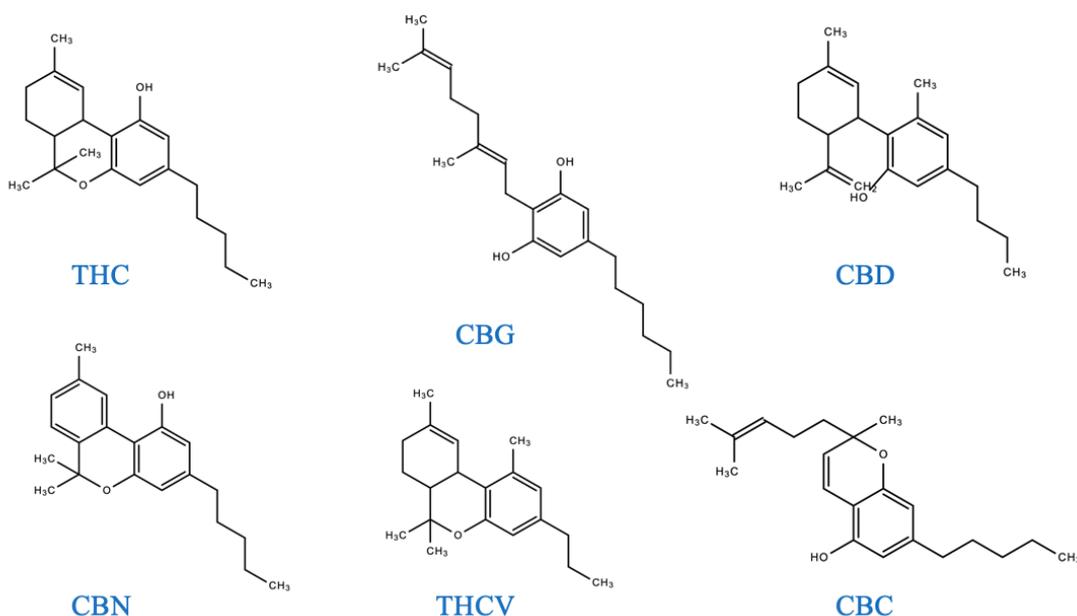


Figura 1. Estructura química de los principales fitocannabinoides. Figura de elaboración propia basada en las figuras encontradas en el estudio realizado por (Fraguas-Sánchez et al., 2014)

Los efectos de los cannabinoides son el resultado de su interacción con el **sistema endocannabinoide**, un sistema de comunicación intercelular formado por una serie de receptores cuyos ligandos son dichas sustancias. Estos receptores existen en el organismo

puesto que diferentes especies animales, incluyendo humanos y roedores, sintetizan de manera natural sustancias cannabinoideas provenientes de la degradación de los lípidos de las membranas biológicas. Los principales receptores de este tipo son los llamados CB1 y CB2, ambos pertenecientes a la superfamilia de receptores de membrana con 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G (Martín, 2000). También se encuentran los receptores metabotrópicos GPR55 y GPR18 y los receptores viniloides de potencial transitorio (TPRV), aunque han sido menos estudiados que los anteriores (Morales, Reggio, 2017).

Los receptores CB1 se encuentran principalmente en el sistema nervioso central siendo especialmente numerosos en la sustancia nigra, en el globus pallidus del hipocampo, en la corteza cerebral, el putamen, el núcleo caudado y la amígdala. También los encontramos en tejidos periféricos como pulmones, corazón, y tractos urogenital y gastrointestinal. Por su parte, los receptores CB2 se expresan predominantemente en el sistema nervioso periférico y en tejidos del sistema inmune situados en las amígdalas y el bazo. Sin embargo, ambos receptores han sido localizados también a nivel del globo ocular y es por ello que, desde hace unos años, se han convertido en una nueva diana para el tratamiento de patologías oculares. En este sentido, encontramos receptores CB1 a nivel del epitelio y endotelio corneal, en el iris, cuerpo ciliar, malla trabecular, canal de Schlemm, coroides, así como en la capa ganglionar, plexiforme interna y externa, capa nuclear interna y en los segmentos externos de las células fotorreceptoras retinianas. Así mismo, los receptores CB2 se han encontrado en el epitelio corneal y el epitelio pigmentario retiniano. Por último, algunos modelos murinos han demostrado la presencia de receptores GPR18 en el epitelio corneal y ciliar, además de en la malla trabecular (Wang et al., 2021).

La activación de los receptores CB1 y CB2 conlleva la inhibición de la enzima Adenilato Ciclasa y la consiguiente disminución de los niveles de AMPc. La activación del receptor CB1 genera una modificación de diversas proteínas celulares como factores de transcripción génica y canales iónicos. Se produce un bloqueo de los canales de calcio y una apertura de los canales de potasio. Esto origina una hiperpolarización de la membrana, quedando bloqueada la liberación de neurotransmisores como la acetilcolina, la noradrenalina y el glutamato a nivel de las neuronas presinápticas. Además, también se produce la activación de la vía de las MAP quinasas, viéndose así alterados diversos

procesos de proliferación y diferenciación celular. La activación del receptor CB2 conlleva las mismas consecuencias que la activación del CB1, pero sin verse afectados los canales iónicos por lo que no se ve alterada la liberación de neurotransmisores (Fraguas-Sánchez et al., 2014).

A nivel fisiológico, la activación de los receptores CB1, que se encuentran altamente expresados en nociceptores aferentes primarios (Duran et al., 2004), al bloquear la neurotransmisión, bloquearía también la transmisión del impulso nervioso que genera la sensación de dolor. Sin embargo, su alta presencia en el sistema nervioso central hace que su activación exógena también sea responsable de los efectos psicotrópicos del cannabis: relajación, reducción de la coordinación, somnolencia, alteración de la percepción y la concentración y alteración del sentido del espacio y el tiempo (Pertwee, 1988). Cuando se consume cannabis a altas dosis y de manera prolongada, la activación de estos receptores puede llegar a producir alucinaciones, delirios, deterioro de la memoria, desorientación y pensamientos esquizofrénicos (Crean et al., 2011).

Por su parte, los receptores CB2 presentan un importante papel inmunomodulador relacionado con 4 sucesos: (I) inducción de apoptosis, (II) supresión de proliferación celular, (III) inhibición de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como las interleuquinas 1 y 6 (IL-1 y IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y aumento de la liberación de citoquinas antiinflamatorias, (IV) inducción de las células T reguladoras (Rieder et al., 2010). Esto los hace especialmente interesantes para el tratamiento de patologías puesto que regulan la magnitud de la respuesta inmune y ejercen un efecto antiinflamatorio (Rossi et al., 2020).

Como se decía inicialmente, los cannabinoides más estudiados son el THC y el CBD. El THC es el principal componente con actividad psicotrópica que encontramos en el *Cannabis*, mientras que el CBD es su componente no psicotrópico más predominante. El THC ejerce la mayoría de sus efectos gracias a su actividad agonista sobre los receptores CB1, CB2 y GPR18 (Amin, Ali, 2019). De hecho, se ha demostrado que produce una disminución de la presión intraocular (PIO) gracias a su interacción con los receptores CB1, GPR18 y GPR19 que disminuyen la producción de humor acuoso a nivel de los cuerpos ciliares (Miller et al., 2018). En esta línea, su actividad hipotensora a nivel intraocular ha sido demostrada a través de diversos estudios en conejos normotensos

(Green K, et al. 1977), en humanos con alta PIO (Merritt et al., 1980), en conejos con glaucoma (Muchtart et al., 1992), en perros normotensos (Fischer et al., 2013) y en ratas (Crandall et al., 2007). Sin embargo, la amplia distribución de los receptores CB1 en el organismo hace que el paso de THC a la circulación sistémica conlleve numerosos efectos no deseados. Este hecho ha dificultado significativamente la elaboración de fórmulas que contengan THC y que sean viables para ejercer un efecto terapéutico sin producir resaltables efectos secundarios. En términos de **terapia ocular**, la comercialización de fármacos a base de cannabinoides con fines terapéuticos está aún por alcanzarse, aunque puede no tratarse de un horizonte tan lejano, como muestra la *Figura 2*.



Figura 2. Líneas en vías de comercialización de la empresa iCANsee (<https://www.cannatech.co/wp-content/uploads/2020/05/202001-iCANsee-V-Deck.pdf>)

En cuanto al CBD, como se ha dicho anteriormente, se trata de un componente no psicoactivo del cannabis, pero a nivel fisiológico ejerce un efecto antioxidante y antiinflamatorio (Iffland, Grotenhermen, 2017). Es por ello que se trata de una molécula que ha sido objeto de muchos estudios en términos de prevención y tratamiento de enfermedades relacionadas con un desequilibrio redox e inflamación (Atalay et al., 2020). Se trata de una sustancia con escasa afinidad por el receptor CB1 y presenta un leve agonismo por el receptor CB2 (Muller et al., 2018), aún así, diversos estudios clínicos han confirmado que el CBD reduce los niveles de citoquinas proinflamatorias, inhibe la proliferación de linfocitos T, induce su apoptosis y reduce la adhesión de células inmunes

(Jean-Gilles et al., 2015). Por otro lado, presenta una marcada afinidad por el receptor 5-HT_{1A} que al activarse actúa como antioxidante puesto que media la captura de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Azouzi et al., 2017).

En términos de terapia ocular, el CBD demostró presentar efectos beneficiosos al reducir las ROS que inducen la muerte de las células neuronales de la retina interna y la descomposición de la barrera hematoencefálica en ratas con retinopatía diabética (El-Remessy et al., 2006). Sin embargo, su escasa afinidad por los receptores CB1 y CB2 hace que no sea una molécula tan prometedora en este campo.

Sí lo es el β -cariofileno (BCP), un sesquiterpeno presente en el aceite esencial de la pimienta (*Piper nigrum*), la canela (*Cinnamomum spp.*), la menta melisa (*Melissa officinalis*), el orégano (*Origanum vulgare*), el lúpulo (*Humulus lupulus*) y el cannabis (*Cannabis sativa*) (Russo, 2016). Se trata de un compuesto que actúa como agonista selectivo del receptor CB2 produciendo efectos antiinflamatorios (Dahham et al., 2017), antinociceptivos y antioxidantes (Poddighe et al., 2018) en ausencia de efectos secundarios psicotrópicos al no activar al receptor CB1 (Klauke et al., 2014). Esta selectividad por el receptor CB2, hace que se trate de una molécula prometedora en el campo de la terapia de patologías oculares inflamatorias.

Un estudio realizado por Porter et al. demostró que en modelos de ratones con uveítis inducida por endotoxinas y vitreoretinopatía proliferativa, se produjo una sobreexpresión del receptor CB2 en el ojo durante la inflamación ocular producida por dichas patologías. La activación de dicho receptor mediante cannabinoides sintéticos exógenos redujo la adhesión de leucocitos en la microvasculatura del iris y disminuyó los niveles oculares de mediadores pro-inflamatorios, reduciendo así la patología de dichas enfermedades (Porter et al., 2019).

El ojo es una de las estructuras de nuestro organismo más complejas a la hora de tratar farmacológicamente. La naturaleza de su estructura dificulta considerablemente la penetración de cualquier tipo de sustancia exógena y la renovación de la película lagrimal, así como la dilución de dichas sustancias en la propia lágrima, suponen las principales barreras frente al aumento del tiempo de permanencia sobre la superficie ocular. Es por ello que hacer llegar la concentración adecuada al tejido ocular diana que se desee tratar

ha resultado un desafío a la hora de diseñar formas farmacéuticas de administración ocular (Shah et al., 2019).

Sin embargo, el desarrollo de la nanotecnología ha permitido el diseño de diferentes formas farmacéuticas que han contribuido al aumento del tiempo de residencia, mejorar la biodisponibilidad y la biodistribución, aumentar la solubilidad de sustancias lipófilas en medio acuoso y con ello la biocompatibilidad, consiguiéndose un aumento de la penetración de fármacos a través de las barreras naturales presentes en el ojo y una mejor tolerancia a los mismos (Qamar et al., 2019). En concreto, las **nanoemulsiones** han demostrado proporcionar una alta penetración del fármaco a través de la córnea llegando a alcanzar tejidos oculares más profundos gracias a la liberación de fármaco a un ritmo sostenido (Ammar et al., 2010). Además, la interacción de la nanoemulsión con la capa lipídica de la lágrima contribuye a la prolongación de la presencia del fármaco en el saco conjuntival actuando como una formulación depot (Alany et al., 2006).

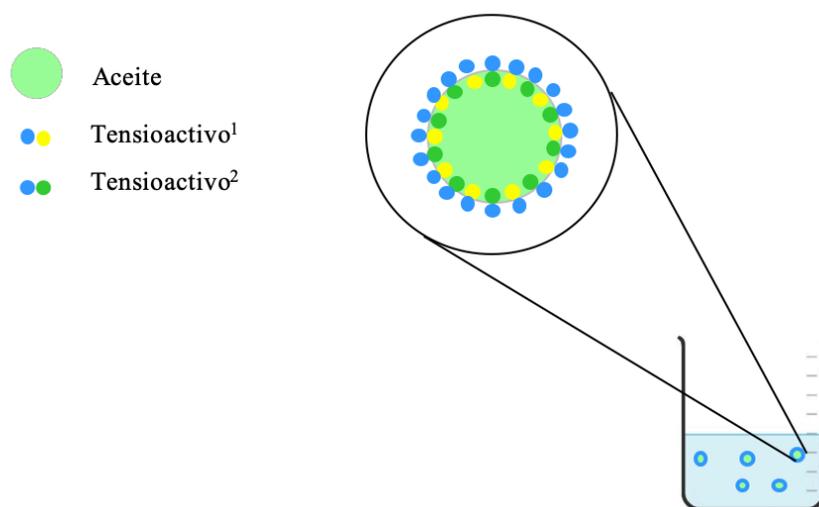


Figura 3. Esquema de una nanoemulsión O/W. Figura de elaboración propia

Una nanoemulsión es una dispersión coloidal formada por dos o más sustancias líquidas inmiscibles entre sí, donde una de ellas se encuentra dispersa en la otra en forma de gotículas de tamaño de entre 20 y 200 nm y cuya interfase se encuentra estabilizada por uno o varios tensioactivos (Solís-Silva et al., 2018). El pequeño tamaño de las gotículas facilita la resistencia a la desestabilización física por separación gravitacional, floculación o coalescencia (Bernardi et al., 2011). En la *Figura 3*, se observa la estructura de la nanoemulsión con la que se trabajó en este estudio. Se trata de una nanoemulsión de tipo

oleoso/acuoso (O/W) donde la fase oleosa está formada por el β -cariofileno, aceite esencial proveniente del cannabis, y la fase acuosa está formada por el tampón fosfato-salino (PBS), ambas puestas en contacto a través de una serie de parejas de tensioactivos que se detallarán más adelante.

(*) En el presente estudio se trabajó con dos principios activos cannabinoides, uno de origen natural y otro de origen sintético. El nombre del activo sintético no se dará por razones de confidencialidad por lo que se hará referencia al mismo como “activo cannabinoide sintético” o “fármaco”.

2. OBJETIVOS

Entre los objetivos de este estudio experimental se encuentra la optimización de la elaboración de nanoemulsiones de tipo O/W donde la fase oleosa se compone de los activos cannabinoides y la acuosa de PBS, ambas puestas en contacto a través de parejas de tensioactivos. Para ello, se propusieron los siguientes objetivos:

- Determinar qué balance hidrófilo-lipófilo (HLB) otorga las mejores propiedades fisicoquímicas a la nanoemulsión descrita en términos de tamaño y potencial Z.
- Determinar qué combinación de tensioactivos es la más adecuada para la estabilización de la interfase entre las gotículas oleosas y la fase continua acuosa.
- Analizar e interpretar los datos obtenidos en la medida de tamaño y potencial Z a fin de seleccionar los aspectos anteriores de manera adecuada.
- Estudiar la capacidad de este sistema para la vehiculización de activos cannabinoides.

3. METODOLOGÍA

3.1. Materiales

- **Reactivos**
 - β -cariofileno
 - Tween 80, 60 y 20
 - Span 80, 60 y 20
 - Acetona grado HPLC
 - Tampón fosfato salino (PBS)
 - Agua mili Q[®]
 - Acetonitrilo (ACN)
 - Ácido Trifluoroacético (TFA)

- **Utensilios de laboratorio**
 - Balanza de precisión
 - Viales de vidrio de 15ml
 - Pipetas de 20, 200 y 1000 μ l y sus respectivas boquillas
 - Pipetas Pasteur
 - Espátula
 - Bandeja de plástico 8x41x41 mm
 - Vaso de precipitado de 50 ml
 - Agitador tipo vórtex
 - Placa agitadora multiposición
 - Varillas agitadoras magnéticas pequeñas
 - Campana extractora
 - Cubetas de plástico Malvern
 - Tubos Amicon Ultracel de 100 kDa y capacidad de 15ml
 - Tubos Eppendorf

- **Equipamiento**
 - Zetasizer Nano series: Nano ZS90. Malvern Instruments
 - Centrífuga 5804 R. Eppendorf
 - HPLC LaChron Merck Hitachi

3.2. Métodos

Para la síntesis de nanoemulsiones se tuvo en cuenta la metodología sugerida por ICI Americans. Así pues, se comenzó por encontrar el HLB que permite obtener una nanoemulsión con el tamaño de gotícula menor. Para ello se probaron una serie de HLBs alcanzados mediante la combinación de los tensioactivos Tween 80 y Span 80.

3.2.1. Elaboración de Nanoemulsiones

Para elaborar un lote:

- **Fase orgánica**

Por una parte, se prepara una solución de β -cariofileno en acetona a una concentración de 12 mg/ml. Para ello se pesan 11 mg de β -cariofileno partiendo de 100 μ l del aceite esencial y se añaden 900 μ l de acetona, asegurando la disolución del aceite en acetona mediante agitación.

Por otra parte, se prepara la solución de Tween 80 en acetona a una concentración de 100 mg/ml. Para ello, siguiendo la *Tabla 1*, se pesan los mg de Tween 80 y se añaden al vial los μ l de acetona correspondientes para el HLB deseado. De nuevo, aseguramos la disolución del tensioactivo en acetona mediante agitación.

La tercera disolución, se prepara disolviendo Span 80 en acetona hasta alcanzar una concentración de 100 mg/ml. Para ello, siguiendo nuevamente la *Tabla 1*, se pesan los mg de Span 80 y se añaden al vial los μ l de acetona correspondientes para el HLB deseado. Se agita la mezcla para asegurar la disolución del tensioactivo en acetona.

Finalmente, en un nuevo vial se añaden 900 μ l de la disolución de β -cariofileno en acetona junto con los μ l de las disoluciones de Tween 80 y Span 80 en acetona correspondientes para el HLB deseado según la columna “Acetona” de la *Tabla 1*. Se asegura su completa disolución por agitación obteniéndose, en total, 1 ml de fase orgánica.

Tabla 1. Cantidades Tween 80, Span 80 y acetona en función de HLB deseado

HLB	Solución Tween 80 en acetona		Solución Span 80 en acetona	
	Tween 80 (mg)	Acetona (µl)	Span 80 (mg)	Acetona (µl)
8	3,5	34,6	6,5	65,4
9	4,4	43,9	5,6	56,1
10	5,3	53,3	4,7	46,7
11	6,3	62,6	3,7	37,4
12	7,2	72,0	2,8	28,0
13	8,1	81,3	1,9	18,7
14	9,1	90,7	0,9	9,3
15	10,0	100,0	0,0	0,0

Para calcular las cantidades necesarias de cada tensioactivo, se hizo uso de las siguientes expresiones que nos permiten averiguar el porcentaje de cada componente necesario para un HLB X deseado.

$$\%(A) = \frac{100 \cdot (X - HLB_{(B)})}{HLB_{(A)} - HLB_{(B)}}$$

$$\%(B) = 100 - \%(A)$$

Siendo A y B cada componente de la pareja de tensioactivos y HLB_A y HLB_B sus valores de HLB individuales (ICI Americans, 1984). Para pasar el porcentaje obtenido a valores de masa, se mantuvo siempre el que la solución de tensioactivos en acetona tuviese una concentración de 100mg/ml y que, en total, las soluciones de tensioactivos en acetona debían suponer un volumen de 100 µl.

- **Fase acuosa**

Esta fase consiste, simplemente, en 2 ml de PBS.

- **Producción de la nanoemulsión**

Se añade al PBS en agitación a una velocidad media-alta en una placa agitadora multiposición 1 ml de la fase orgánica de una vez, con la pipeta vertical y por la zona lateral del vaso, apartada del centro de agitación. Tras 10 minutos de agitación, se mide el tamaño de gotícula y el potencial Z (PZ) utilizando el Zetasizer. En este proceso, se

emplea una cubeta Malvern a la que se añaden 100 μl de la nanoemulsión y 900 μl de agua miliQ[®].

Se evapora la acetona dejando la nanoemulsión en agitación en la placa multiposición a velocidad media-alta, durante 30 minutos aproximadamente. A continuación, se concentra y separa la nanoemulsión del medio de dispersión mediante ultrafiltración en la centrífuga durante 20 minutos a 15°C y 4.000 rcf hasta alcanzar un volumen por debajo de los 200 μl . Se recupera el concentrado en un tubo Eppendorf y se completa con agua miliQ[®] hasta 300 μl .

Finalmente, se vuelve a medir el tamaño de gotícula y el PZ de la nanoemulsión empleando, esta vez, una dilución 2:100 al haber aumentado la concentración de la nanoemulsión.

De nuevo, tal y como se recomienda en el texto de ICI Americans, una vez comprobado qué HLB ofrece el mejor perfil de nanoemulsión en cuanto a tamaño y PZ, se fijó dicho HLB y se probó con las parejas de tensioactivos Tween 60/Span 60 y Tween 20/Span 20. El procedimiento seguido fue el mismo, pero en este caso las cantidades de dichos reactivos fueron las que se detallan en las *Tablas 2 y 3*, respectivamente.

Tabla 2. Cantidades Tween 60, Span 60 y acetona para obtener una mezcla de HLB 12

HLB	Solución Tween 60 en acetona		Solución Span 60 en acetona	
	Tween 60 (mg)	Acetona (μl)	Span 60 (mg)	Acetona (μl)
12	7,16	71,57	2,84	28,43

Tabla 3. Cantidades Tween 20, Span 20 y acetona para obtener una mezcla de HLB 12

HLB	Solución Tween 20 en acetona		Solución Span 20 en acetona	
	Tween 20 (mg)	Acetona (μl)	Span 20 (mg)	Acetona (μl)
12	4,2	41,98	5,8	58,02

Midiendo los parámetros fisicoquímicos de las nanoemulsiones elaboradas, se descubrió qué pareja de tensioactivos a las cantidades suficientes para obtener el HLB deseado, es la que permite obtener una nanoemulsión con las mejores características.

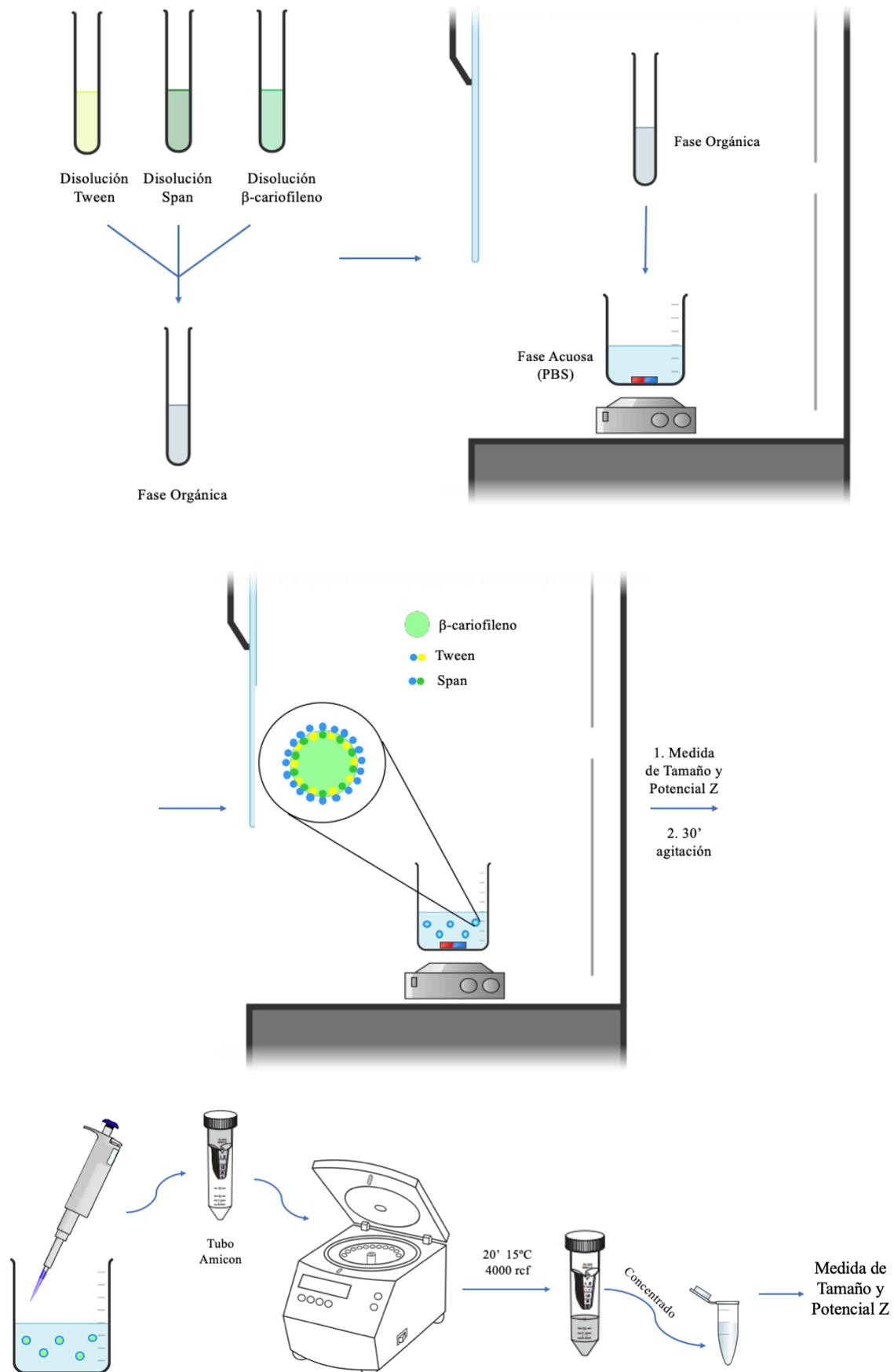


Figura 4. Dibujo esquemático de la producción de nanoemulsiones. Figura de elaboración propia

En la *Figura 4* se muestra un esquema del procedimiento seguido para la producción de las nanoemulsiones para todas las parejas de tensioactivos y todos los HLBs trabajados.

3.2.2. Encapsulación de un activo cannabinoide sintético en las nanoemulsiones

A continuación, se procedió a incluir en el interior de las nanogotículas, además del β -cariofileno, un activo cannabinoide de origen sintético que ejerce una acción agonista selectiva frente al receptor CB2. Para la elaboración de las nanoemulsiones con este fármaco, se empleó una solución stock del mismo a una concentración de 52,23 mg/ml en acetona. A partir de ella se tomaron diferentes volúmenes resultando en las concentraciones finales reflejadas en la *Tabla 4*. Dichas concentraciones están expresadas en % p/p respecto al β -cariofileno.

Tabla 4. Volumen de solución stock de fármaco a añadir para cada concentración deseada

Concentración de fármaco en NE (% p/p)	Volumen solución stock (μ l)
2,5	5,26
5	10,53
10	21,06

En la elaboración de las nanoemulsiones cargadas del activo cannabinoide sintético se siguió el mismo procedimiento anteriormente detallado. Una vez elaboradas y recogido el concentrado, se rompieron las nanoemulsiones mediante la adición progresiva de acetona de 100 μ l en 100 μ l para poder cuantificar qué cantidad de fármaco se llegó a encapsular.

3.2.3. Cuantificación del activo cannabinoide sintético por cromatografía

Para cuantificar la cantidad de fármaco vehiculizado en las nanoemulsiones, se empleó la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-PR). Esta se realizó en un equipo LaChron Merck Hitachi, empleando una columna C18 Waters Atlantis T3 3 μ m de 100 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro.

Dicha cuantificación se llevó a cabo a una longitud de onda de 211 nm. Se desarrolló un método analítico isocrático cuya fase móvil está compuesta por el componente A:

acetonitrilo (ACN) y B: agua miliQ® con ácido trifluoroacético al 0.01% v/v, alcanzándose un pH de 3,45. La velocidad de flujo se fijó en 1ml/min, siendo el volumen de inyección de 20 µl, el tiempo de corrida de 10 minutos y la temperatura del horno de 25°C.

A fin de poder determinar la concentración de fármaco en las nanoemulsiones producidas, se elaboró una recta de calibrado a partir de disoluciones estándar de concentración conocida del fármaco en ACN. Las concentraciones de las disoluciones empleadas fueron de 15, 25, 50, 75, 125, 250 y 750 µg/ml.

3.2.4. Eficacia de la Encapsulación (EE%) y Carga de Fármaco (CF%)

Tras el análisis cromatográfico se obtiene un cromatograma que representa la absorbancia de la muestra frente al tiempo. Esta representación permite distinguir picos de absorbancia correspondientes a las sustancias contenidas en la muestra.

La medida de una serie de disoluciones estándares de concentración conocida permite elaborar una recta de calibrado que relacione el área bajo el pico correspondiente, en este caso, al fármaco, con la concentración de fármaco en la muestra, obteniéndose una ecuación que relaciona ambos parámetros. Una vez obtenida la recta, se midieron por HPLC las muestras de nanoemulsiones cargadas con fármaco a concentraciones teóricas de 2,5, 5 y 10% p/p. Estas medidas proporcionan unos valores de área bajo el pico que, gracias a la recta de calibrado, se pueden relacionar con valores de concentración.

Para evaluar la capacidad de vehiculización de las nanoemulsiones se emplearon dos parámetros, la eficacia de encapsulación (EE%) y la carga de fármaco (CF%):

$$EE\% = \frac{mg \text{ de fármaco encapsulado}}{mg \text{ iniciales de fármaco}} \times 100$$

$$CF\% = \frac{mg \text{ de fármaco encapsulado}}{mg \text{ de } \beta - \text{ cariofileno}} \times 100$$

De esta manera, conociendo la concentración de fármaco encapsulado y en qué volumen se encontraba, se pudieron obtener los mg de fármaco que realmente llegaron a vehiculizarse en las nanogotículas y como se conocían los mg de fármaco que teóricamente se introdujeron en la nanoemulsión, se calculó la eficacia de encapsulación.

Así mismo, la carga de fármaco nos permite expresar la cantidad de fármaco que realmente se encapsuló con respecto a los mg de β -cariofileno también encapsulados en las nanoemulsiones.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudio de la influencia del HLB en las propiedades fisicoquímicas de la nanoemulsión

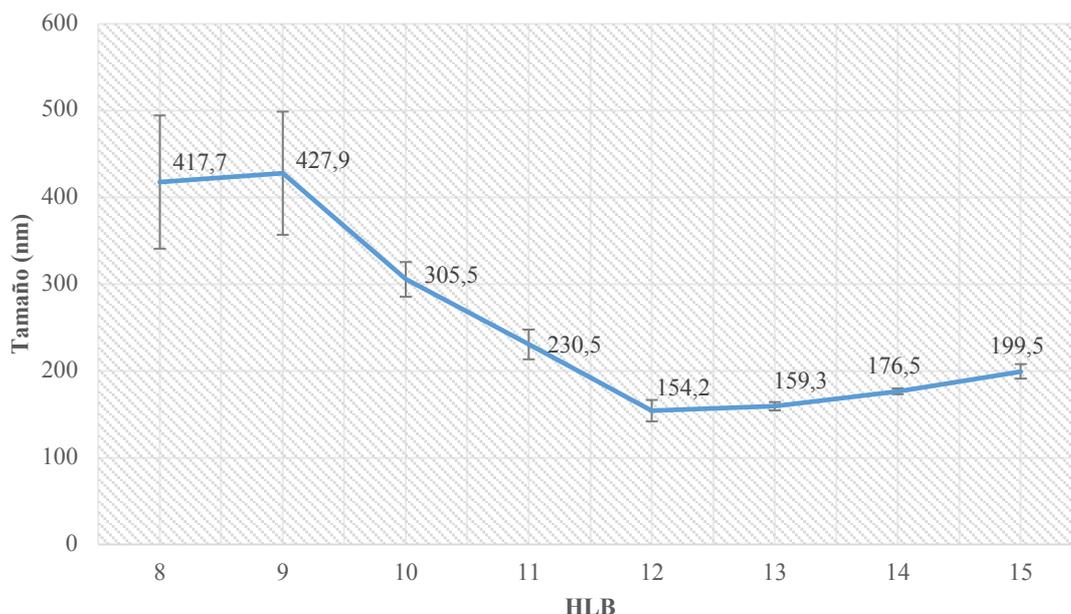
Las principales propiedades fisicoquímicas que se estudiaron a la hora de evaluar las nanoemulsiones elaboradas fueron el tamaño de gotícula (diámetro) y el potencial Z. En términos de tamaño, un menor tamaño reduce las fuerzas de atracción entre las gotículas impidiendo la separación espontánea de las fases oleosa y acuosa (Aswathanarayan, Vittal, 2019). Por lo tanto, un menor tamaño otorga una mayor estabilidad a la nanoemulsión. Además, el tamaño de gotícula supone un aspecto importante en cuanto a la permeabilidad a través del epitelio corneal que se puede esperar de la formulación. De una nanoemulsión formada por gotículas de menor tamaño se esperará una mejor transmisibilidad a través de las barreras biológicas (Ospina et al., 2014).

En cuanto al PZ, se trata de una medida de la velocidad de desplazamiento de partículas inmersas en un campo eléctrico. En una nanoemulsión, como en todo sistema coloidal, contamos con una fase continua, que normalmente es líquida, y una fase dispersa que en este caso son las gotículas nanométricas. El valor del PZ está relacionado con la estabilidad de la dispersión coloidal puesto que indica el grado de repulsión entre las partículas adyacentes, cargadas en una dispersión (Hunter, 1988). Un alto PZ confiere estabilidad de manera que la dispersión resistirá a la agregación (Batalla et al., 2014) manteniéndose, en nuestro caso, las gotículas lipófilas dispersas en el medio acuoso.

A fin de encontrar el HLB que permite obtener una nanoemulsión con las mejores características, que aseguren una mayor estabilidad y permeabilidad a través del epitelio corneal, se hizo un cribado inicial empleando la pareja de tensioactivos Tween 80/Span 80. Estos, al igual que todos los tensioactivos, son sustancias anfifílicas con un grupo polar o hidrófilo que es soluble en agua y un grupo apolar o lipófilo que es soluble en solventes orgánicos o sustancias oleosas (Vasseur et al., 2018). Las nanoemulsiones fabricadas fueron de tipo oleoso-acuoso (O/W) de modo que las gotículas de aceite (o aceite y fármaco) conformaron la fase interna y el medio acuoso (PBS) conformó la fase externa. El HLB de un tensioactivo o mezcla de tensioactivos nos indica el tipo de emulsión que resultará de su uso, es decir, si se obtendrá una emulsión de tipo acuoso-oleoso (W/O), oleoso-acuoso (O/W) o si actuarán como solubilizantes de aceites. El rango de HLB 8-18 da lugar a emulsiones de naturaleza oleosa-acuosa, por ello se emplearon HLBs dentro de dicho rango (ICI Americans, 1984). El procedimiento se realizó hasta la producción de la nanoemulsión, y se midieron los parámetros antes de la evaporación de la acetona. Se obtuvieron los resultados que se muestran en la *Tabla 5*.

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos de caracterización de NE a diferentes HLBs empleando la mezcla Tween 80/Span 80

HLB	Diámetro (nm)			Potencial Z (mV)		n
	Media	DE	PdI	Media	DE	
8	417,7	76,8	0,264	-23,1	0,9	3
9	427,9	71,0	0,237	-22,5	1,3	3
10	305,5	20,0	0,295	-21,7	0,6	3
11	230,5	17,1	0,089	-18,4	1,8	3
12	154,2	12,4	0,132	-15,2	1,1	3
13	159,3	4,8	0,181	-12,5	1,0	3
14	176,5	3,4	0,140	-10,4	1,1	3
15	199,5	8,4	0,205	-16,8	1,3	4



Gráfica 1. Variación del diámetro de gotícula en función del HLB resultante

Tal y como nos indica el parámetro “n” en la *Tabla 5* se realizaron 3 lotes de nanoemulsiones por cada HLB a excepción del HLB 15, del cual se realizaron 4 lotes. Se midió el tamaño de gotícula y se tomó la desviación estándar (DE) para evaluar la variabilidad de las medidas entre los lotes por lo que cuanto menor sea dicho valor, mayor regularidad existe entre las propiedades fisicoquímicas medidas en los lotes. El índice de polidispersión (PDI) proporciona información acerca de la estabilidad física de las nanoemulsiones, donde valores $<0,2$ indican una alta estabilidad debida a la alta homogeneidad en la distribución de los tamaños de partícula (Riquelme, Arancibia, 2019).

El tamaño de gotícula, tal y como se observa en la *Tabla 5* y en la *Gráfica 1*, experimentó una disminución conforme incrementaba el valor del HLB hasta alcanzar un mínimo en HLB 12, momento en el cual comenzó de nuevo a aumentar. Como los tamaños obtenidos con HLB 12 y 13 fueron los más bajos y mantenían un PDI inferior a 0,2, se prepararon otros tres lotes con las cantidades correspondientes de tensioactivos para obtener esos valores de HLB, pero esta vez sí se realizó el procedimiento completo. Como muestra la *Tabla 6*, se reafirma que a HLB 12 se obtiene una nanoemulsión con el menor tamaño de gotícula y con un índice de polidispersión por debajo de 0,2, confirmándose la homogeneidad del tamaño y la estabilidad física de la nanoemulsión. Además, se observa

cómo al completar el procedimiento aumenta el valor del PZ siendo este aún mayor a HLB 12. Esto es un dato positivo puesto que a mayor PZ más estabilidad presenta la nanoemulsión.

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos de caracterización de NE tras procedimiento completo

HLB	CON ACETONA			SIN ACETONA + ULTRAFILTRACIÓN							
	Diámetro (nm)		Potencial Z (mV)	Diámetro (nm)			Potencial Z (mV)		n		
	Media	DE	PdI	Media	DE	Media	DE	PdI		Media	DE
12	148,8	6,1	0,141	-14,7	1,7	135,7	8,6	0,154	-25,1	2,1	3
13	166,1	6,1	0,176	-12,4	0,6	148,6	7,2	0,206	-22,8	0,9	3

Tras la prolongada experiencia que se tiene en el trabajo con el sistema HLB, se ha llegado a la conclusión de que cada componente oleoso que quiera ser incorporado a una sustancia acuosa tiene un HLB requerido, es decir, un HLB al que la emulsión será más estable. Ello no implica que cualquier pareja de tensioactivos que otorgue dicho HLB requerido vaya a generar una emulsión de las mismas características, pero sí se puede afirmar que una vez encontrado el valor de HLB requerido, para todo tensioactivo o mezcla de ellos se obtendrá una emulsión más estable que con cualquier otro valor de HLB (ICI Americans, 1984). De este modo, una vez se observó que el valor de HLB 12 ofrecía una nanoemulsión con las características más favorables, se estimó que se trataba del HLB requerido para la formulación de una nanoemulsión de β -cariofileno en PBS.

4.2. Estudio de la influencia de tensioactivo/s para el HLB requerido en las propiedades fisicoquímicas de la nanoemulsión

A continuación, se procedió a probar otras parejas de tensioactivos en búsqueda de aquella que, fijando el HLB en 12, proporcionase la nanoemulsión con mejores parámetros fisicoquímicos (tamaño y PZ). Se probaron las parejas Tween 60/ Span 60 y Tween 20/ Span 20 llevando, de nuevo, el procedimiento solo hasta la fabricación de la nanoemulsión, sin evaporar la acetona, para así medir los parámetros y sólo continuar con el proceso si estos resultaban prometedores. Se obtuvo lo reflejado en la *Tabla 7*.

Tabla 7. Parámetros fisicoquímicos para la caracterización de NE con las mezclas Tween 60/ Span 60 y Tween 20/ Span 20

HLB 12						
Mezcla de tensioactivos	Diámetro (nm)			Potencial Z (mV)		n
	Media	DE	PdI	Media	DE	
Tween 60/ Span 60	115,3	10,2	0,170	-16,6	2,9	3
Tween 20/ Span 20	583,2	81,7	0,364	-12,7	0,5	3

Con ello quedó comprobado que la mezcla Tween 20/ Span 20 no permite la elaboración de una nanoemulsión de β -cariofileno en PBS con un tamaño aceptable a HLB 12, al formarse gotas de tamaño superior a 200 nm en todos los lotes. Además, el PdI superior a 0,2 también es indicativo de una nanoemulsión poco homogénea e inestable físicamente. Así pues, se descartó su uso. Por el contrario, las nanoemulsiones formuladas haciendo uso de la mezcla Tween 60/ Span 60 sí mostraron valores prometedores de tamaño y PdI, por ello, se continuó con el procedimiento y se elaboraron otros 4 lotes para asegurar los resultados.

Como se refleja en la *Tabla 8*, en la que se recopilan también los resultados incluidos en la *Tabla 7*, se confirma que la mezcla de tensioactivos Tween 60/ Span 60 permite la formulación de una nanoemulsión con propiedades fisicoquímicas (tamaño y PZ) muy aceptables, al obtenerse tamaños de en torno a los 120 nm con un PdI siempre inferior a 0,2 y valores de potencial Z indicativos de alta estabilidad física.

Tabla 8. Parámetros fisicoquímicos para la caracterización de NE con la mezcla Tween 60/ Span 60, repetición

HLB	CON ACETONA			SIN ACETONA + ULTRAFILTRACIÓN							
	Diámetro (nm)			Potencial Z (mV)		Diámetro (nm)			Potencial Z (mV)		n
	Media	DE	PdI	Media	DE	Media	DE	PdI	Media	DE	
12	115,3	10,2	0,170	-16,6	2,9	115,9	7,6	0,190	-29,1	3,3	3
12	123,0	3,0	0,165	-16,5	0,8	122,0	5,5	0,174	-26,4	1,7	3
12	141,0	2,1	0,146	-16,6	1,5	124,0	3,8	0,190	-26,1	0,5	1

A continuación, en la *Tabla 9*, se muestra una recopilación de las medidas de tamaño y PZ obtenidas para las tres parejas de tensioactivos con las que se ha trabajado.

Tabla 9. Parámetros fisicoquímicos par la caracterización de NE con todas las mezclas de tensioactivos empleadas

HLB 12						
Mezcla de tensioactivos	Diámetro (nm)			Potencial Z (mV)		n
	Media	DE	PdI	Media	DE	
Tween 60/ Span 60	115,3	10,2	0,170	-16,6	2,9	3
Tween 20/ Span 20	583,2	81,7	0,364	-12,7	0,5	3
Tween 80/ Span 80	148,8	6,1	0,141	-14,7	1,7	3

En la *Tabla 9* se puede observar que la mezcla de Tween 20/ Span 20 otorga a la nanoemulsión las peores características fisicoquímicas. Atendiendo a sus estructuras químicas, representadas en la *Figura 5*, se observa que el componente Tween de todas las mezclas presenta una cola lipófila que le otorga mayor lipofilia que al componente Span. Además, en el caso del Tween 20, esta cola es notablemente más corta que en los otros dos casos. Este hecho explicaría que exista una menor interacción entre dicho tensioactivo y los activos cannabinoides empleados puesto que ambos son de naturaleza lipófila, se observa la estructura del β -cariofileno en la *Figura 6*. Esta menor interacción justifica la obtención de un tamaño de gotícula tan superior a los obtenidos en los otros casos, así como la menor estabilidad en la nanoemulsión obtenida, como nos indica el valor de PdI $> 0,2$.

Figura 5. Estructuras químicas de los tensioactivos utilizados. Figura de elaboración propia a partir de lo encontrado en (Gómez-Vega, 2014)

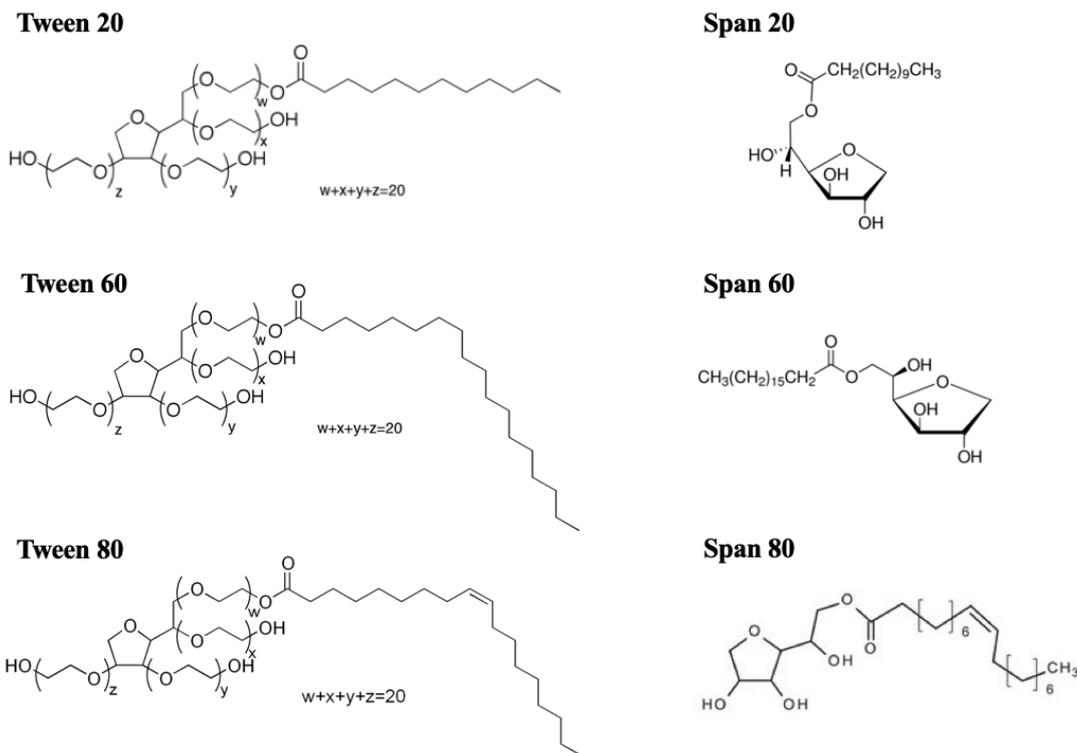
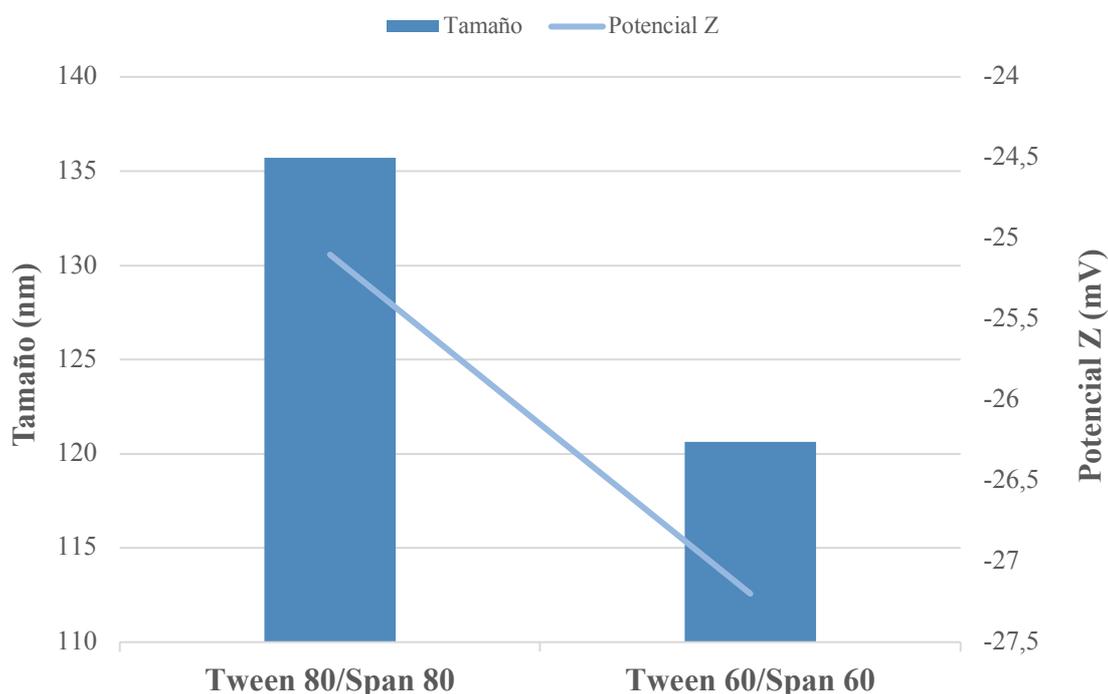


Figura 6. Estructura del β -cariofileno. Figura de elaboración propia a partir de lo encontrado en (García-Camargo, 2018)



Por otro lado, los componentes Tween 60 y Tween 80 no difieren mucho en su estructura química por lo que se puede esperar una interacción similar entre dichos componentes y las sustancias lipófilas a encapsular. De hecho, según se observa en la Gráfica 2, aunque se alcanzaron valores menores de tamaño utilizando la mezcla Tween 60/Span 60, la diferencia tan solo fue de 15 nm aproximadamente. Igualmente, los PZ alcanzados solo difieren en 2 mV. Por lo tanto, se puede considerar que ambas mezclas son candidatas para la elaboración de nanoemulsiones de β -cariofileno y fármaco en PBS.

Gráfica 2. Comparativa del tamaño y PZ de las NE elaboradas con las mezclas Tween 80/Span 80 y Tween 60/ Span 60



4.3. Encapsulación del activo cannabinoide sintético en las nanoemulsiones

Siguiendo la metodología, se continuó con la introducción de un activo cannabinoide sintético junto con el β -cariofileno en la nanoemulsión. Al ser la mezcla Tween 80/Span 80 y la mezcla Tween 60/Span 60 igualmente válidas para la formulación de las nanoemulsiones, se comenzó utilizando la mezcla Tween 60/Span 60 por haber permitido la elaboración de nanoemulsiones con un menor tamaño de gotícula. Se elaboraron 2 lotes con cada concentración y se midieron los parámetros fisicoquímicos a fin de comprobar si estos se mantenían adecuados.

Tabla 10. Parámetros fisicoquímicos para la caracterización de NE con fármaco

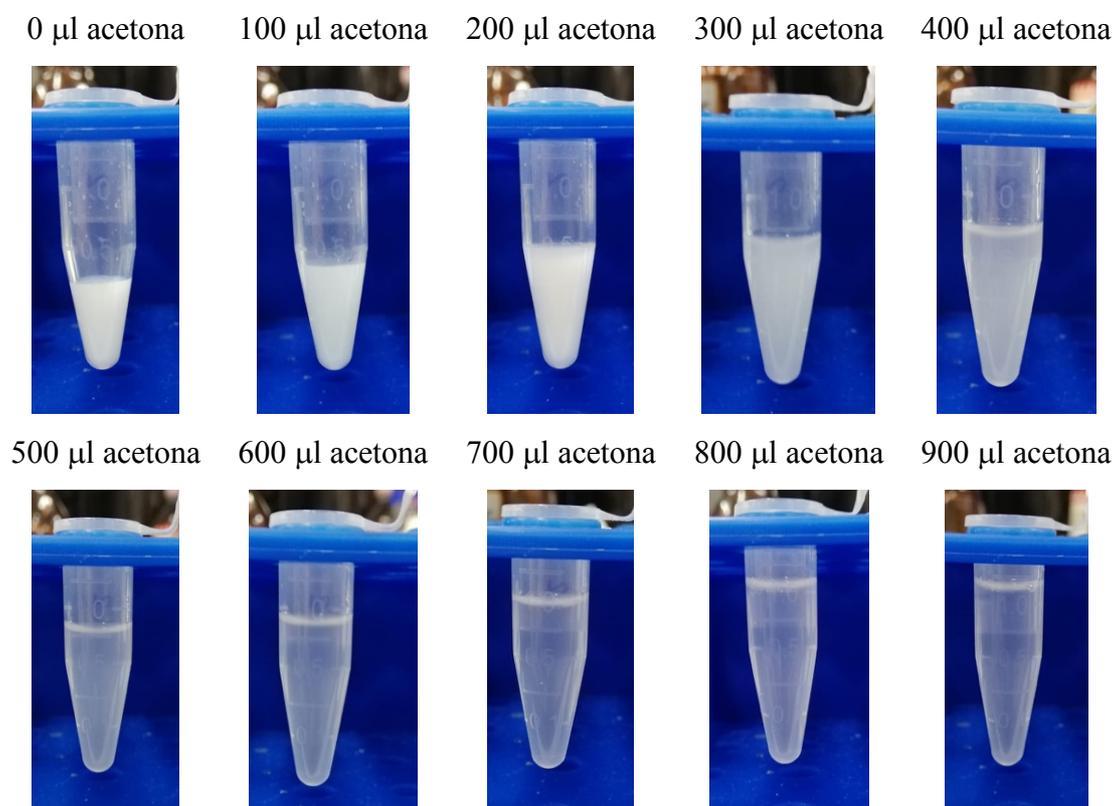
[Fármaco] %p/p	CON ACETONA						SIN ACETONA + ULTRAFILTRACIÓN				
	Diámetro (nm)			Potencial Z (mV)			Diámetro (nm)			Potencial Z (mV)	
	Media	DE	PdI	Media	DE		Media	DE	PdI	Media	DE
2.5	122,5	3,5	0,126	-15,2	1,1		121,7	3,3	0,179	-23,7	1,4
5	111,6	4,2	0,163	-15,5	1,8		108,3	9,6	0,224	-24,0	3,3
10	115,3	3,5	0,205	-16,2	1,4		97,4	6,7	0,326	-24,3	2,6

Tal y como se muestra en la *Tabla 10*, los tamaños de gotícula obtenidos en las nanoemulsiones fueron incluso menores que todos los obtenidos anteriormente, el PZ creció tras la evaporación de la acetona y la ultrafiltración hasta valores por encima de 20, aunque ligeramente inferiores a los obtenidos en las nanoemulsiones que no contenían fármaco. Se puede considerar que se tratan de valores igualmente indicativos de nanoemulsiones estables. En cuanto al PDI, tras la evaporación de la acetona y la ultrafiltración de las nanoemulsiones con un 5 y 10% p/v de fármaco se obtuvieron valores ligeramente por encima de 0,2, pero se consideran aceptables en términos de homogeneidad.

4.4. Cuantificación del activo cannabinoide sintético por Cromatografía

Para poder cuantificar la cantidad de fármaco que se llegó a encapsular, al concentrado recogido se le añadieron cantidades sucesivas de acetona de 100 μl en 100 μl con el fin de romper la nanoemulsión obteniéndose lo observado en la *Figura 7*.

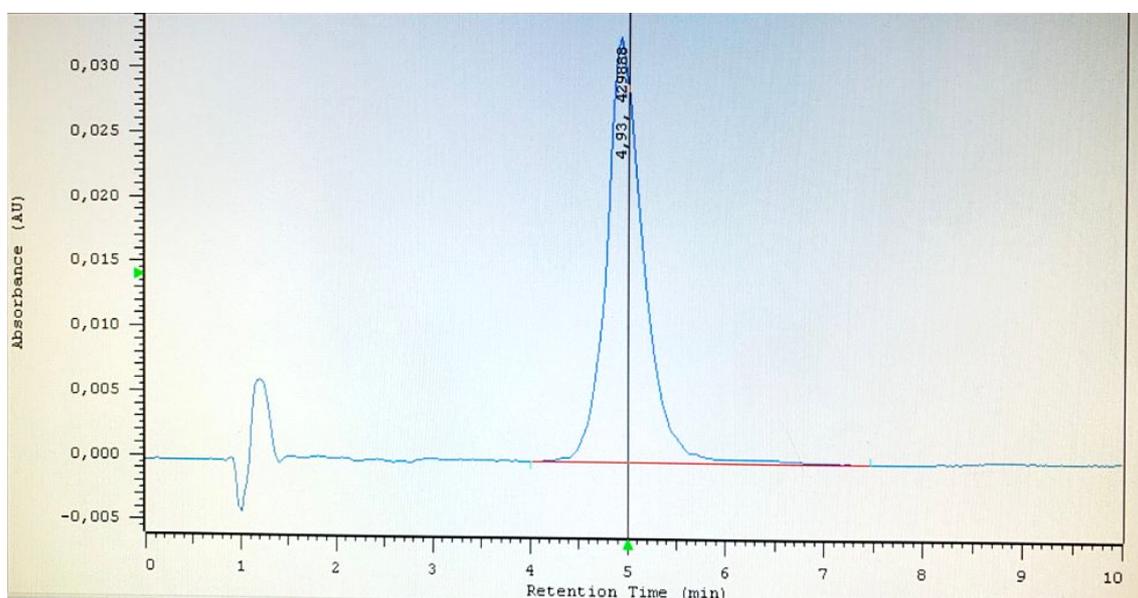
Figura 7. Evolución del aspecto de la NE con la adición progresiva de acetona hasta su ruptura



Como se puede ver, se produce un cambio progresivo en el aspecto de la nanoemulsión. Inicialmente se observa totalmente opaca (0 μl de acetona) y va rompiéndose progresivamente hasta tornarse totalmente transparente (900 μl de acetona). Con ello se comprobó que 900 μl de acetona son suficientes para romper la nanoemulsión.

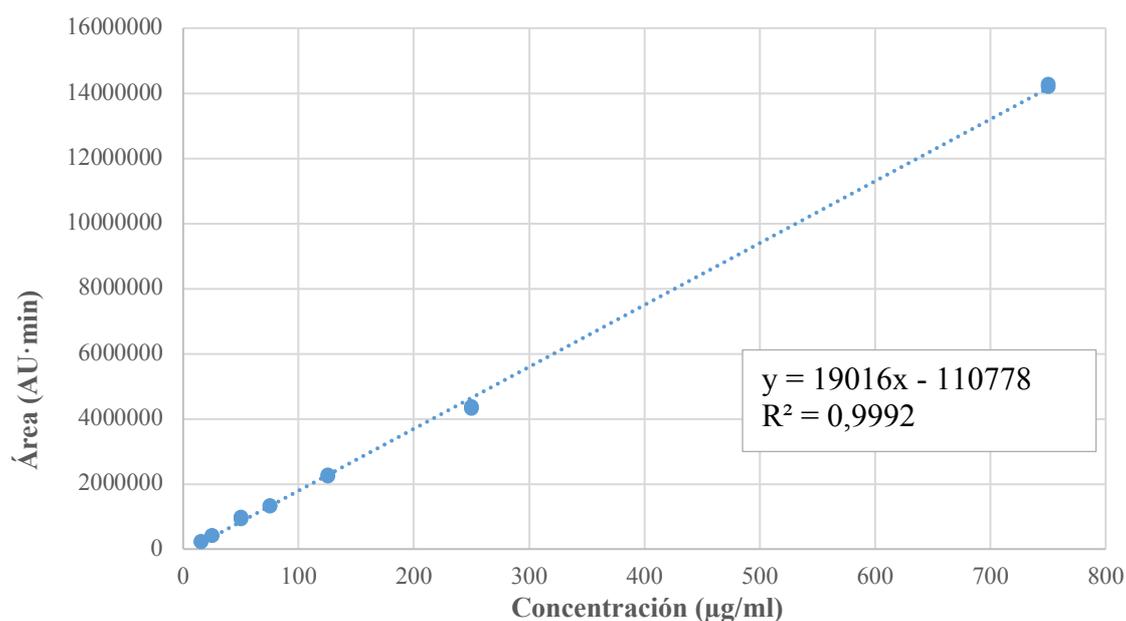
A continuación, se procedió a la elaboración una recta de calibrado mediante el análisis cromatográfico de una serie de disoluciones estándares de concentración conocida del fármaco en acetonitrilo (ACN). Al analizar dichas muestras se obtuvieron cromatogramas como el que muestra la *Figura 8*.

Figura 8. Cromatograma muestra estándar de concentración 25 $\mu\text{g/ml}$



Mediante la integración del área bajo los picos de absorbancia que aparecieron en todos los casos alrededor del minuto 5, se obtuvo una recta de calibrado que permite relacionar el área bajo el pico con la concentración de fármaco en la muestra. Dicha recta es la que se muestra en la *Gráfica 3*.

Gráfica 3. Recta de Calibrado



El coeficiente de correlación de Pearson (R^2) nos indica el grado de asociación lineal entre dos variables, en este caso área y concentración. Cuanto más próximo a 1 sea este valor, mayor es dicha asociación y por lo tanto menor es la dispersión de los puntos respecto a una tendencia lineal (Dagnino, 2014). Al obtenerse un R^2 de 0,9992 podemos afirmar que el área bajo el pico de absorbancia correspondiente al fármaco presenta una relación lineal respecto a la concentración del mismo en la muestra en el intervalo de concentraciones estudiado.

La ecuación de la recta se empleó para, una vez analizadas por cromatografía las muestras de las nanoemulsiones elaboradas conteniendo fármaco a un 2,5, 5, y 10% p/p respecto al β -cariofileno, poder averiguar qué cantidad de fármaco llegó verdaderamente a encapsularse.

4.5. Estudio de la capacidad de vehiculización de las nanoemulsiones

Para evaluar la capacidad de vehiculización de las nanoemulsiones se emplearon dos parámetros, la eficacia de encapsulación (EE) y la carga de fármaco (CF). Los resultados tras realizar los cálculos correspondientes fueron los que refleja la *Tabla 11*.

Tabla 11. Eficacia de Encapsulación y Carga de Fármaco

Muestra	%EE \pm DE	%CF \pm DE
2,5%	80,32 \pm 8,50	1,90 \pm 0,20
5%	77,09 \pm 5,51	3,92 \pm 0,58
10%	71,86 \pm 6,14	6,81 \pm 0,58

La eficacia de encapsulación, como se vio en la expresión, representa la cantidad de fármaco presente en la nanoemulsión respecto a la cantidad de fármaco que se añadió inicialmente en la elaboración de las mismas. Según muestra la tabla, dicha eficacia fue bajando conforme aumentó la proporción de fármaco respecto a β -cariofileno, es decir, conforme más cantidad de fármaco se añadió inicialmente, menor fue el porcentaje que se consiguió encapsular. Esto es razonable puesto que al aumentar la cantidad que se desea encapsular existe una mayor dificultad para que la totalidad llegue a introducirse en las nanogotículas. En cualquier caso, se consiguió una eficacia de encapsulación muy alta en todos los casos, comprobándose la alta lipofilia del fármaco y su afinidad por la fase oleosa compuesta por β -cariofileno.

Por su parte, la carga de fármaco representa el tanto por ciento de fármaco presente en la nanoemulsión respecto al β -cariofileno. Teóricamente, la carga de fármaco debía ser del 2,5, 5 y 10% y en su lugar se obtuvieron los valores que se observan en la *Tabla 11*. De nuevo, se comprueba cómo al aumentar la cantidad de fármaco añadida (mayor carga teórica), menor fue la que se llegó a encapsular, puesto que la diferencia entre 2,5% y 1,9% es menor que la existente entre un 10% y un 6,81%. Sin embargo, cabía esperar este resultado ya que, siguiendo el mismo razonamiento que en la EE, a mayor cantidad de fármaco más complicada resulta su encapsulación. En todo caso, a pesar de aumentar las pérdidas de fármaco conforme incrementa la cantidad inicial añadida, se comprueba que el proceso sí permite aumentar el contenido de fármaco en la nanoemulsión. Es decir, en términos de dosis, la nanoemulsión con una mayor carga de fármaco permitiría, para alcanzar una misma concentración, administrar una menor cantidad de formulación. Aún así, habría que valorar el riesgo de perder más fármaco frente a lo beneficioso que podría resultar para el paciente la administración una menor cantidad de la nanoemulsión.

Por todo ello, se puede afirmar que la eficacia de encapsulación fue considerablemente alta y que el uso de esta formulación resulta viable para el desarrollo de alternativas terapéuticas para el tratamiento de patologías oculares inflamatorias al ser capaz de vehicular con éxito dos principios activos cannabinoides agonistas de los receptores CB2.

Por motivos técnicos, la formulación y estudio de nanoemulsiones que contuviesen fármaco y β -cariofileno haciendo uso de la pareja Tween 80/Span 80 no se pudo realizar y es por ello que queda pendiente para futuras investigaciones el uso de esta pareja de tensioactivos.

5. CONCLUSIONES

- Se comprueba la influencia del HLB en las propiedades fisicoquímicas de las nanoemulsiones formuladas.
- Se establece un valor óptimo de HLB de 12 (HLB requerido) utilizando una combinación de tensioactivos Tween 60/ Span 60 y Tween 80/ Span 80 obteniéndose nanoemulsiones con un tamaño de gotícula de 120,6 y 135,7 nm respectivamente y con valores de Potencial Zeta de -27,2 y -25,1 mV respectivamente, en ambos casos óptimas para su administración por vía ocular.
- Se comprueba la eficacia de la formulación de Tween 60/Span 60 para la vehiculización del fármaco obteniéndose una eficacia de encapsulación muy elevadas llegando a valores de alrededor del 80% y una carga de fármaco de aproximadamente 2, 4, y 6,8% respecto al aceite esencial β -cariofileno.

5.1. Futuro y Perspectivas

- Se propone el estudio de la eficacia de la mezcla Tween 80/Span 80 en la encapsulación de fármaco y β -cariofileno en forma de nanoemulsiones O/W a HLB 12.
- Se proponen estudios en los que se evalúe la transmisibilidad de la nanoemulsión elaborada en este estudio a través de la superficie ocular a fin de conseguir tratar patologías oculares inflamatorias por agonismo CB2 de los cannabinoides exógenos β -cariofileno y el fármaco empleado. Así como el estudio de esta capacidad para disminuir la patología de enfermedades inflamatorias oculares a través de la experiencia.

6. BIBLIOGRAFÍA

Alany RG, Rades T, Nicoll J, Tucker IG, Davies NM. W/O microemulsiones for ocular delivery: evaluation of ocular irritation and precorneal retention. *J Control Release*. 2006; 111(1-2): 145-152

Amin MR, Ali DW. Pharmacology of medical cannabis. *Adv Exp Med Biol*. 2019; 1162: 151-165

Ammar HO, Salama HA, Ghorab M, Mahmoud AA. Development of dorzolamide hydrochloride in situ gel nanoemulsion for ocular delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. 2010; 36(11): 1330-1339

Atalay S, Jarocka-Karpowicz I, Skrzydlewska E. Antioxidative and anti-inflammatory properties of cannabidiol. *Antioxidants (Basel)*. 2020; 9(1): 21

Aswathanarayan JB, Vittal RR. Nanoemulsions and their potential applications in food industry. *Front Sustain Food Syst*. 2019; 3(95): 1-21

Azouzi S, Santuz H, Morandat S, Pereira C, Côté F, Hermine O et al. Antioxidant and membrane binding properties of serotonin protect lipids from oxidation. *Biophys. J*. 2017; 112: 1863-1873

Batalla J, Cuadros A, San Martín-Martínez E. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. *Lat. Am. J. Phys. Educ*. 2014; 8(4): 4319-4325

Bernardi DS, Pereira T, Maciel N, Bortoloto J, Viera G, Oliveira G et al. Formation and stability of oil-in-water emulsions containing rice bran oil: in vitro in vivo assessment. *Journal of nanobiotechnology*. 2011; 9(44): 1-9

Crandall J, Matgroom S, Khalifa YM, Borlongan C, Tsai NT, Caldwell RB, Liou G. Neuroprotective and intraocular pressure lowering effects of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in a rat model of glaucoma. *Ophthalmic Res*. 2007; 39(2): 69-75

Crean RD, Crane NA, Mason BJ. An evidence basen review of acute and long-term efectos of cannabis use on executive cognitive functions. *J Addict Med.* 2011; 5: 1-8

Dagnino JS. Correlación. *Rev Chil Anest.* 2014; 43: 150-153

Dahham D, Tabana Y, Ahamed MBK, Abdul Majid AMS. In vivo anti-inflammatory activity of β -caryophyllene, evaluated by molecular imaging. *Mol. Med. Chem.* 2015; 1: 1001

Duran M, Laporte, JR, Capellà, D. Novedades sobre las potencialidades terapéuticas del Cannabis y el sistema cannabinoide. *Med Clin.* 2004; 122(10): 390-398

Elsohly MA, Slade D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci.* 2005; 78(5): 539-548

Fischer KM, Ward DA, Hendrix DV. Efectos of a topically applied 2% Δ^9 -Tetrahydrocannabinol ophthalmic solution on intraocular pressure and aqueous humor flow rate in clinically normal dogs. *Am J Vet Res.* 2013; 74(2): 275-280

Fraguas-Sánchez AI, Fernández-Carbadillo AM, Torres-Suárez AI. Cannabinoides: una prometedora herramienta para el desarrollo de nuevas terapias. *An Real Acad Farm.* 2014; 80(3): 555-577

García-Camargo M. Participación de transmisores gaseosos y receptores a Cannabinoides en el efecto vasodilatador producido por β -cariofileno [Tesis para Grado de Maestría]. Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro. 2018

Gómez-Vega A. Formulación y caracterización de nanoemulsiones de aceite de parafina de tipo agua-en-aceite (W/O) [Tesis para Grado de Maestría]. Monterrey: Cimav; 2014.

Green K, Bigger JF, Kim K, Bowman K. Cannabinoid penetration and chronic effects in the eye. *Exp Eye Res.* 1997; 24(2): 197-205

Hunter RJ. Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications. 3^a ed. San Diego: Academic Press Inc; 1988

ICI Americans. The HLB system: a time-saving guide to emulsifier selection. Willmington: ICI Americans, Inc.; 1984

Iffland K, Grotenhermen F. An update on safety and side effects of cannabidiol: a review of clinical data and relevant animal studies. Cannabis Cannabinoid Res. 2017; 2(1): 139-154

Jean-Gilles L, Braitch M, Latif ML, Aram J, Fahey AJ, Edwards LJ et al. Effects of pro-inflammatory cytokines on cannabinoid CB1 and CB2 receptors in immune cells. Acta Physiol. 2015; 214: 63-74

Klauke AL, Racz I, Pradier B, Markert A, Zimmer AM, Gertsch J, et al. The cannabinoid CB2 receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. Eur Neuropsychopharmacol. 2014; 24(4): 608-620

Martín Sánchez M. Estudio de los mecanismos neuronales implicados en las respuestas motivacionales de las drogas de abuso. Universitat Pompeu Fabra; 2000

Merritt JC, Crawford WJ, Alexander PC, Anduze AL, Gelbart SS. Effect of marijuana on intraocular and blood pressure in glaucoma. Ophthalmology. 1980; 87(3): 222-228

Miller S, Daily L, Leishman E, Bradshaw H, Straiker A. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol differentially regulate intraocular pressure. 2018; 59(15): 5904-5911

Morales P, Reggio PH. An update on non-CB1, non-CB2 cannabinoid related G-protein-coupled receptors. Cannabis and Cannabinoid Res. 2017; 2(1): 265-273

Muchtar S, Almog S, Torracca MT, Saettone MF, Benita S. A submicron emulsion as ocular vehicle for Δ^8 -Tetrahydrocannabinol: effect on intraocular pressure in rabbits. 1992; 24(3): 142-149

Muller C, Morales P, Reggio PH. Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. *Front Mol Neurosci.* 2018; 11: 487

Ospina VE, Mantilla JC, Conde CA, Escobar P. Permeación en piel humana de una nanoemulsión de ftalocianina de aluminio clorada para la optimización de tratamientos tópicos de leishmaniasis cutánea. *Rev Cienc Salud.* 2014; 12(2): 195-211

Papaseit E, Pérez-Mañá C, Pérez-Acevedo AP, Hladun O, Torres-Moreno MC, Muga R et al. Cannabinoids: from pot to lab. *Int J Med Sci.* 2018; 15(2): 1286-1295

Pertwee RG. The central neuropharmacology of psychotropic cannabinoids. *Pharmacol Ther.* 1998; 36: 189-261

Poddighe L, Carta G, Serra MP, Melis T, Boi M, Lisai S, et al. Acute administration of beta-caryphyllene prevents endocannabinoid system activation during transient common carotid artery occlusion and reperfusion. *Lipids Health Dis.* 2018; 17(1): 23

Porter FR, Szczesniak AM, Toguri AT, Gebremeskel S, Johnston B, Lehmann C et al. Selective Cannabinoid 2 Receptor Agonists as potential therapeutic drugs for the treatment of endotoxin-induced uveitis. *Molecules.* 2019; 24(18): 3338

Qamar Z, Qizilbash FF, Iqbal MK, Ali A, Narang JK, Ali J et al. Nano-Based drug delivery system: recent strategies for the treatment of ocular disease and its future perspective. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2019; 13(4): 246-254

Rieder SA, Chauhan A, Singh U, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. *Inmunobiology.* 2010; 215(8): 598-605

Riquelme N, Arancibia C. Obtención de nanoemulsiones utilizando saponinas de quillay como sustituto de un surfactante sintético. *Mundo Nano.* 2019; 12(23)

Rossi F, Tortora C, Argenziano M, Di Paola A, Punzo F. Cannabinoid receptor type 2: a possible target in SARS-CoV-2 (CoV-19) infection? *Int J Mol Sci.* 2020; 21(11): 3809

Russo E. Beyond Cannabis: Plants and Endocannabinoid System. *Trends Pharmacol Sci.* 2016; 37(7): 594-605

Schilling S, Melzer R, McCabe PF. Cannabis sativa. *Curr Biol.* 2020; 30(1): 8-9

Shah J, Nair AB, Jacob S, Patel RK, Shah H, Sheheta TM et al. Nanoemulsion based vehicle for effective ocular delivery of moxifloxacin using experimental design and pharmacokinetic study in rabbits. *Pharmaceutics.* 2019; 11(5): 230

Solís-Silva R, Reyes-Munguía A, Madariaga-Navarrete A, Medina-Pérez G, Campos-Montiel RG, Cenobio-Galindo AJ. Evaluación de la actividad antifúngica y antioxidante de una nanoemulsión W/O de *Opuntia oligacantha* y aceite esencial de *Citrus X sinensis*. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos.* 2018; 3: 182-187

Vasseur M, Simon N, Picher C, Richeval C, Soichot M, Humbert L et al. A decontamination process adding a tensioactive agent and isopropanol to a closed-system drug transfer device for better control of isolator contamination. A prospective, parallel study. *PLoS One.* 2018; 13(8)

Wang MTM, Danesh-Mayer HV. Cannabinoids and the eye. *Survey of Ophthalmology.* 2021; 66: 327-345