

NANOMEDICINA Y CANNABINOIDES:

**POTENCIAL USO EN EL TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES**

~ CARLA GÓMEZ PEÑA ~



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA



TRABAJO DE FIN DE GRADO
TRABAJO DE CARÁCTER EXPERIMENTAL
GRADO EN FARMACIA

**NANOMEDICINA Y CANNABINOIDES:
potencial uso en el tratamiento de
enfermedades cardiovasculares**

Alumna: Carla Gómez Peña

Tutora: Dra. Lucía Martín Banderas

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Facultad de Farmacia
Universidad de Sevilla

Sevilla, julio 2023

RESUMEN

Desde la antigüedad, la planta de *Cannabis sativa* L. o cáñamo indiano ha destacado por múltiples características, entre las que adquieren principal importancia las propiedades psicoactivas. A pesar de ser este el motivo principal por el cual hoy en día es ampliamente conocida a nivel mundial, el verdadero interés por parte de la comunidad científica despierta gracias al descubrimiento de sus propiedades medicinales. A lo largo de los años numerosos estudios han concluido que estas propiedades farmacológicas no se deben únicamente a la presencia de cannabinoides (CBD, THC, etc.) como principios activos, sino que, además, existen otras sustancias secundarias (terpenos o flavonoides) capaces de modificar el efecto farmacológico de los primeros. Entre estos componentes secundarios, destaca notablemente el β -cariofileno. Este, al interactuar con el Sistema Cannabinoide ha evidenciado poseer propiedades antiinflamatorias y analgésicas. Además, a esto se suma su capacidad para interactuar únicamente con los receptores cannabinoides tipo II, eximiendo por tanto las propiedades psicoactivas características de los receptores cannabinoides tipo I.

La evidencia de sus beneficios farmacológicos unido a la demostrada actividad agonista CB2, ha llevado a poner el foco en la búsqueda de un sistema óptimo y seguro para la administración del compuesto en cuestión, que permita la llegada del mismo a los tejidos diana. Para ello, se ha hecho uso de la nanomedicina, una disciplina de la nanotecnología que permite vehicular los fármacos en estructuras nanométricas, capaces de acceder fácilmente al lugar de acción, lo que permite mejorar considerablemente la calidad de vida de los seres humanos.

Concretamente en este trabajo de carácter experimental, se ha centrado en el uso de la nanomedicina para desarrollar un sistema eficaz de administración del β -cariofileno como posible tratamiento de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis.

PALABRAS CLAVE:

β -cariofileno (β -CFN), nanopartículas (NPs), receptor CB2 (CB2R), efecto séquito, actividad antiinflamatoria.

ABSTRACT

Since ancient times, *Cannabis sativa* L. plant or indian hemp has been focus of attention because of many reasons, among them, the psychoactive properties. This is probably the main reason to be known worldwide. Nevertheless, the interest of the scientific community lies on its great therapeutic potential. Over years, many studies have demonstrated that the pharmacological properties are not only due to the presence of main cannabinoids (CBD, THC, etc.) but also because of the presence of secondary molecules (flavonoids or terpenes) able to modulate the pharmacological effect of the main cannabinoids. Among these secondary molecules, the terpene β -caryophyllene recently received special attention because of its anti-inflammatory and analgesic effects. These effects are derived because of a selective interaction of this drug with the cannabinoid receptor type II. Moreover, this molecule does not exert psychoactive effects, which makes it more attractive. These evidences about its potential pharmacological benefits offer new potential pharmacological treatments for a wide variety of illness. Nevertheless, this molecule is a challenge, from a technological point of view, because it is a volatile and a really lipophilic molecule. For these reasons, the actual effort is to develop a suitable drug delivery system able to offer a suitable pharmacokinetic profile. In this sense, nanomedicine could be an alternative. It has been demonstrated that nano-drug delivery systems allow to transport and deliver drugs directly to the target. So, the objective of this work was to develop a suitable nanometric system for the effective administration of β -caryophyllene, as a possible treatment for cardiovascular diseases such as atherosclerosis.

KEYWORDS:

β -caryophyllene (β -CFN), nanoparticles (NPs), CB2 receptor (CB2R), entourage effect, anti-inflammatory activity.

ÍNDICE

1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	5
1.1. CANNABIS MEDICINAL	5
1.2. ACTIVIDAD Y USO TERAPÉUTICO DEL CANNABIS	7
1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA	8
1.4. EFECTO SÉQUITO	10
1.5. PROPIEDADES Y MECANISMOS DE ACCIÓN. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE	11
1.6. β-CARIOFILENO	13
1.7. NANOTECNOLOGÍA Y NANOMEDICINA	14
2. <u>OBJETIVOS</u>	16
3. <u>METODOLOGÍA</u>	16
3.1. MATERIALES	16
3.2. MÉTODOS	17
3.2.1. Síntesis de nanopartículas de β-CFN	17
3.2.1.1. <u>Proceso de elaboración de Nanopartículas</u>	17
3.2.1.2. <u>Cuantificación del β-CFN por cromatografía</u>	20
3.2.1.3. <u>Eficacia de la encapsulación</u>	20
3.2.2. Pruebas de congelación	21
3.2.2.1. <u>Pruebas de congelación con trehalosa</u>	21
3.2.2.2. <u>Pruebas de congelación con trehalosa y tensioactivos</u>	22
3.2.3. Pruebas de liofilización	24
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	25
4.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS ELABORADAS	25
4.1.1. Tamaño, polidispersión de tamaños y carga eléctrica superficial.....	25
4.1.2. Cuantificación del β -CFN y Eficacia de la encapsulación.....	29
4.2. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE CONGELACIÓN	30
4.3. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE LIOFILIZACIÓN	33
5. <u>CONCLUSIONES</u>	35
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	36

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CANNABIS MEDICINAL

Cannabis sativa L. (*Cannabaceae*), también conocida como cáñamo indio es una planta herbácea, cultivada principalmente en Asia Central (India y China) desde la antigüedad (Bonini et al., 2018). Se trata de una especie que ha sido utilizada por el hombre durante muchos años, con una amplia variedad de objetivos: desde la elaboración de vestidos, cuerdas o papel a partir de las fibras de su tronco; hasta la utilización de sus semillas, bien como alimento o bien como fuente de aceite para crear jabones, pinturas y barnices (Ramos, 2003). Puede verse una imagen de la planta en la *Figura 1*.



Figura 1. Planta de *Cannabis sativa* (Base de datos Fitoterapia, 2023)

A pesar de los múltiples usos, fueron sus **propiedades medicinales** y **psicoactivas** las que despertaron gran interés, permitiendo su utilización en la actividad terapéutica. Estas se deben a unas sustancias denominadas **cannabinoides** que actúan sobre el Sistema Nervioso Central de aquellas personas que los inhalan o ingieren (Ramos, 2023). Así, desde su descubrimiento, el cannabis ha sido empleado en tratamientos tan diversos como el *dolor*, *las convulsiones*, *los espasmos* y *el vómito* (Casadiego Mesa et Lastra Bello, 2015). No obstante, fue el **uso recreativo** de la planta lo que le permitió alcanzar el verdadero auge, despertando el interés de la comunidad científica, quien se encargó del aislamiento y el análisis de sus componentes (Inzunza et Peña, 2019). Los **preparados psicotrópicos** obtenidos a partir del cannabis se conocen hoy en día con el nombre de **marihuana** o **hachís**, en función de las partes de la misma y los procesos utilizados para su obtención. La **marihuana** hace referencia a las flores desecadas y tallos que habitualmente

se fuman, mientras que el *hachís* describe a la resina concentrada que se obtiene a partir de las flores, la cual se puede ingerir (Fraguas-Sánchez et al., 2014).

Es por estas *propiedades psicoactivas*, principalmente, por lo que hasta el año 2019 tanto el *cannabis* como su *resina* pertenecieron a la lista **IV de Estupefacientes de la Convención Única de Viena de 1961**, ocupando un espacio reservado únicamente para las sustancias más perjudiciales y con escaso valor médico reconocido. Sin embargo, las recomendaciones posteriores llevadas a cabo por la **Organización Mundial de la Salud (OMS)** sobre los beneficios médicos y terapéuticos y la revisión crítica sobre la planta elaborada por el comité de expertos en farmacodependencia (WHO, 2019), llevaron a la **Comisión de Estupefacientes de la ONU** a reconocer las propiedades terapéuticas del *cannabis* y por consiguiente, eliminarlo de la lista **IV** reclasificándolo nuevamente en la lista **I de Estupefacientes de la Convención Única de Viena de 1961** (ONU, 2020).

Así, la **Agencia Europea del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS)** recoge ahora que: *“El Cannabis, la resina del cannabis y los extractos y tinturas de cannabis, se encuentran incluidos en la lista I de la citada Convención y están regulados por la citada Ley 17/1967, del 8 de abril”*. Por lo tanto, son considerados **estupefacientes** estando exclusivamente limitada a fines médicos y científicos, su producción, fabricación, exportación, distribución, comercio, uso y posesión (AEMPS, 2023).

No obstante, a pesar de las limitaciones y restricciones a ciertos ámbitos, el cannabis sigue siendo, con diferencia, la droga más consumida del mundo, habiendo aumentado su uso un 23% durante la última década. Al menos así lo recoge el **Informe Mundial sobre las Drogas (2022)** elaborado por **La Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC)** (UNODC, 2022). Ciertamente es que, aunque el cannabis posea verdaderos beneficios, un uso irracional y continuado de la planta da lugar a dependencia, síndrome de abstinencia, déficit cognitivo y además, aumenta el riesgo de padecer enfermedades psiquiátricas (Rodríguez Carranza, 2012). Por esto, a pesar de ser la base de una industria global multimillonaria, el conocimiento científico y la investigación sobre esta hierba aún están rezagados en comparación con otros cultivos de alto valor (Booth et Bohlmann, 2019).

Aunque en España, cada vez son más las empresas investigadoras que disponen de la autorización otorgada por la AEMPS, la cual, concede licencias para el cultivo de plantas de cáñamo con fines médicos y/o de investigación (AEMPS, 2023), todavía existen ciertas limitaciones sustanciales que requieren ser modificadas para que se pueda cultivar, producir, comercializar e investigar en condiciones de total legalidad (Kochen, 2022). De hecho, pese a la persistente lucha constante, el Parlamento español denegó nuevamente el pasado martes 21 de febrero la legalización integral del cannabis para uso terapéutico y recreativo (Proposición de Ley 122/00028, 2023).

1.2 ACTIVIDAD Y USO TERAPÉUTICO DEL CANNABIS

Aunque actualmente, la *marihuana* sigue siendo motivo de debate, el uso médico de los cannabinoides está aprobado por la **Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA)**. Los cannabinoides han demostrado tener, principalmente, cierta actividad terapéutica sobre *desórdenes neurológicos y problemas cardiovasculares* como son: trastornos de espasticidad asociada a esclerosis múltiple o lesiones de la médula espinal, epilepsia, trastornos convulsivos, síndrome de Tourette, alteraciones del movimiento, náuseas y vómitos en pacientes quimioterápicos antineoplásicos, anorexia-caquexia en pacientes con sida o cáncer... Además, ciertos estudios también han aportado datos relevantes sobre el uso de estos compuestos en el glaucoma o para el tratamiento del dolor (Silva et Carvalho, 2022). Si bien, es importante destacar que, aunque el *cannabis* puede aliviar los síntomas o ralentizar el avance de una enfermedad, investigaciones científicas no han demostrado un uso curativo (Bedrocan, 2022).

El *dronabinol* y la *nabilona* fueron los primeros medicamentos cannabinoides aprobados por la **FDA** en la década de 1980. Ambos son formas sintéticas del tetrahidrocannabinol (THC) (Fundación CANNA, 2023). El *dronabinol* forma parte de algunos medicamentos comercializados a nivel europeo como son el **Marinol®** y el **Syndros®**. Su uso está aprobado para el tratamiento de náuseas y vómitos asociados a quimioterapia y para la anorexia asociada a la pérdida de peso en pacientes con SIDA. Por su parte, la *nabilona*, comercializada como **Cesamet®**, únicamente está aprobada para las náuseas y vómitos causados por la quimioterapia. Pese a su autorización y comercialización en varios países de Europa, ninguno de ellos está aún autorizado en España (Panorama Actual del Medicamento, 2023).

En España está autorizado, por la **AEMPS**, el **Sativex®**, siendo legal su uso desde el año 2010. Se trata de un spray de aplicación en la mucosa oral que contiene dos extractos suaves de hoja y flor de *C. sativa.*, estandarizados en **Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC)** y **cannabidiol (CBD)**. Su utilización, está únicamente restringida a la mejoría de los síntomas en pacientes con espasticidad moderada o grave debida a la esclerosis múltiple que no han respondido adecuadamente a otros tratamientos (Arana, 2019).

Lo mismo ocurre con el **Epidyolex®**, tramitándose una autorización de comercialización válida en toda la UE casi una década más tarde, en 2019 (EMA, 2019). El CBD, comercializado en España bajo el nombre de **Epidyolex®** y presentado en forma de jarabe, ha sido autorizado como tratamiento complementario de convulsiones asociadas con el *Síndrome de Lennox-Gastaut (SLG)* o el *Síndrome de Dravet (SD)* en conjunto con clobazam, para pacientes a partir de los 2 años de edad (AEMPS, 2021). Dado que estas son enfermedades consideradas como raras, **Epidyolex®** ha sido reconocido por la **Agencia Europea del Medicamento (EMA)** como *medicamento huérfano* para estas patologías (Panorama Actual del Medicamento, 2023).

Es importante destacar que el acceso a todos estos medicamentos, presentes en la *Figura 2*, es extremadamente limitado, por motivos *clínicos* (falta de estudios que analicen eficacia en multitud de patologías), *económicos* (los precios son en algunos casos desorbitados) y *legales* (en la inmensa mayoría de los países del mundo el uso de estos productos no está permitido). Además, a esto también se le suman ciertas *limitaciones farmacológicas* (Fundación CANNA, 2023).



Figura 2. Medicamentos con cannabinoides o derivados de ellos en su composición (FDA.report, 2023)

1.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA

A pesar de las limitaciones, la investigación del *cannabis* ha ido creciendo a lo largo de los años, lo que ha permitido que hasta la actualidad se hayan aislado e identificado cerca de 400 compuestos naturales provenientes del metabolismo de *C. sativa*, de los cuales, al menos 60 presentan una estructura química de tipo *cannabinoides* (Callado, 2012). Estos también son conocidos con el nombre de *fitocannabinoides* y según el uso y contenido de los mismos, se puede clasificar el *cannabis* como tipo **fibra** (cáñamo o cáñamo industrial) o tipo **droga** (*cannabis* medicinal o marihuana) (Hurgobin et al., 2021).

Los principales *fitocannabinoides* presentes en la planta son el **TCH**, el **CBD**, el **cannabinol (CBN)**, el **cannabigerol (CBG)**, la **tetrahidrocannabivarina (THCV)**, el **cannabicromeno (CBC)** y sus respectivos ácidos (Papaseit et al., 2018). En la *Figura 3* se describen todos los cannabinoides presentes en la planta, así como sus usos asociados. No obstante, el *cannabis* como medicamento a base de hierbas, es una mezcla compleja que además, presenta otros componentes como: fenoles no cannabinoides, flavonoides, terpenoides, alcoholes, aldehídos, n-alcanos, ésteres de cera, esteroides y alcaloides entre otros (Odieka et al., 2022). Dentro de los compuestos no cannabinoides los *terpenos* y *flavonoides* adquieren gran importancia.

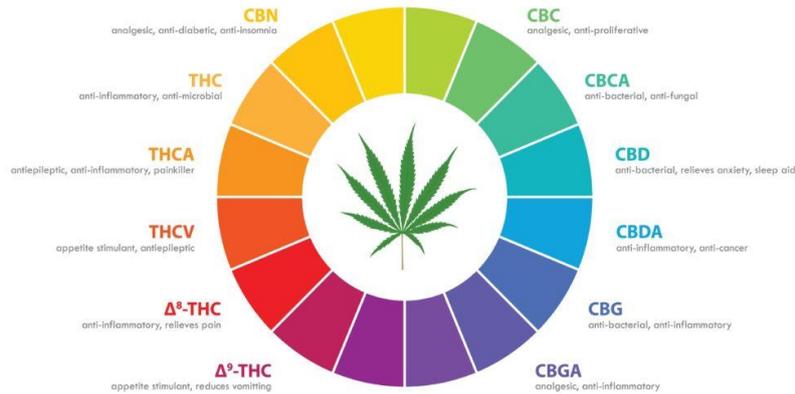


Figura 3. Compuestos cannabinoides presentes en la planta de *Cannabis sativa* y sus propiedades características (Fundación Efecto Séquito, 2023)

Los **flavonoides** son metabolitos secundarios polifenólicos que presentan comúnmente un grupo cetona y pigmentos de coloración amarilla, de ahí su nombre. Aunque dentro de esta familia se distinguen varios grupos, todos ellos ejercen un amplio espectro de funciones sobre las plantas. Además, presentan grandes actividades farmacológicas como son: *propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antialérgicas, antibióticas, antidiarreicas y efectividad contra el cáncer.*

Por su parte, los **terpenos** son compuestos aromáticos y volátiles constituidos por la unión de varias unidades de isopreno, hidrocarburo formado por cinco átomos de carbono. Estos metabolitos secundarios, aparte de otorgar las principales *características organolépticas*, también cumplen diversas funciones destacando principalmente, la defensa frente a insectos y animales y la protección ante elevadas temperaturas. Además, al igual que los flavonoides, están presentes en concentraciones suficientes para tener actividad farmacológica. Los **terpenos** más abundantes en la planta del cannabis y que forman la parte mayoritaria de su aceite esencial son los **monoterpenos**; *mirceno, pineno, limoneno, linalool, eucaliptol* y el **sesquiterpeno** *cariofileo*, aunque no son los únicos (Fundación CANNA, 2023). En la *Figura 4* se aprecian en su totalidad cada uno de los **terpenos** presentes en la planta con su función característica.



Figura 4. Terpenos presentes en la planta *Cannabis sativa* y sus principales propiedades (Fundación Efecto Séquito, 2023)

1.4 EFECTO SÉQUITO

Aunque los *terpenos* por ellos mismos tienen multitud de propiedades, más recientemente, el interés se ha centrado en la sinergia farmacológica entre estos y los *cannabinoides* y la capacidad para producir el llamado “*efecto séquito*” o “*entourage*” (El-Hammadi et al., 2021) (Figura 5). Hoy día existe una gran controversia con relación a si los cannabinoides puros son tan eficaces y bien tolerados como es la forma herbal. Pues, de acuerdo con algunos investigadores, los diferentes cannabinoides, con sus *terpenos* y *flavonoides*, actuarían “cooperando” entre ellos para conseguir un resultado final, tanto en eficacia como en tolerabilidad, superior al de las formas puras (Fundación CANNA, 2023).

Si bien, es importante tener clara la diferencia entre **sinergismo** y “**efecto séquito**”. La **sinergia** indica que dos o más compuestos activos pueden producir un efecto aditivo o combinado mayor que sus efectos individuales por separado. Mientras que, la potenciación del efecto biológico de un compuesto por compuestos inactivos, en combinación, se denomina “**efecto séquito**” (Anand et al., 2021). Así, se puede describir este último como la contribución positiva sugerida, derivada de la adición de los *terpenos* a los *cannabinoides* (Ferber et al., 2020). No obstante, hasta la fecha, no hay constancia clara de que ambos compuestos muestren interacción.

Un grupo de investigadores del departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Otago, Nueva Zelanda, realizó un estudio cuyo objetivo fue determinar si los terpenos de la planta del cannabis tenían actividad detectable medida por receptores; o bien, podían modificar la actividad del $\Delta 9$ -TCH, el CBD, o el endocannabinoide 2-araquidonilglicerol (2-AG) en los receptores cannabinoides. Los resultados obtenidos en el estudio no respaldan la idea de que ninguno de los cinco *terpenos* probados, contribuían a un supuesto “*efecto séquito*” directo a través de los receptores cannabinoides. Sí que se descubrió que el β -cariofileno (β -CFN) se une débilmente y de forma independiente al receptor cannabinoide tipo II (CB2R), no obstante, no se detectaron otros efectos funcionales o de unión para los *terpenos* solos o en combinación con CBD o los agonistas cannabinoides 2-AG y $\Delta 9$ -THC (Finlay et al., 2020).

Y es que, aunque todavía falte evidencia sólida para demostrar este hecho, se espera que este efecto potenciador pueda allanar el camino para terapias más eficaces contra el *dolor*, *la inflamación*, *la depresión*, *la ansiedad* y *el cáncer* entre otras patologías (El-Hammadi et al., 2021).

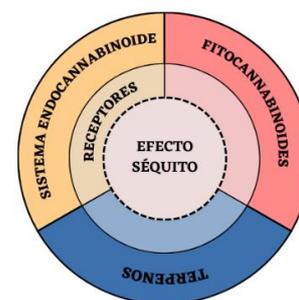


Figura 5. Efecto séquito

1.5 PROPIEDADES Y MECANISMOS DE ACCIÓN. SISTEMA ENDOCANNABINOIDES

Para ejercer su efecto, los **cannabinoides** necesitan interactuar con el Sistema Endocannabinoide, un sistema neuromodulador formado por tres elementos principales: los **receptores**, pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR); los **endocannabinoides**, ligandos endógenos que se unen a estos receptores y las **enzimas**, responsables de la síntesis o degradación de los mismos (Rodríguez, 2017).

Los principales **receptores** del Sistema Endocannabinoide son los llamados **CB1R** y **CB2R**. Recientemente, también se ha aceptado que el receptor huérfano **GPR55** puede considerarse como el tercer receptor con actividad cannabinoide, siendo todos ellos capaz de transmitir una señal extracelular al interior de la célula (Fundación CANNA, 2023). Los receptores cannabinoides tipo I (**CB1R**) se encuentran principalmente en el Sistema Nervioso Central, siendo especialmente numerosos en la sustancia nigra, 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 tracto urogenital y gastrointestinal. Por su parte, los **CB2R** se expresan predominantemente en el Sistema Nervioso Periférico y en tejidos del Sistema Inmune situados en las amígdalas y el bazo (Wang et Danesh-Meyer, 2021). En la *Figura 6*, se puede observar a modo de esquema los principales sitios del organismo donde se encuentran ambos receptores.

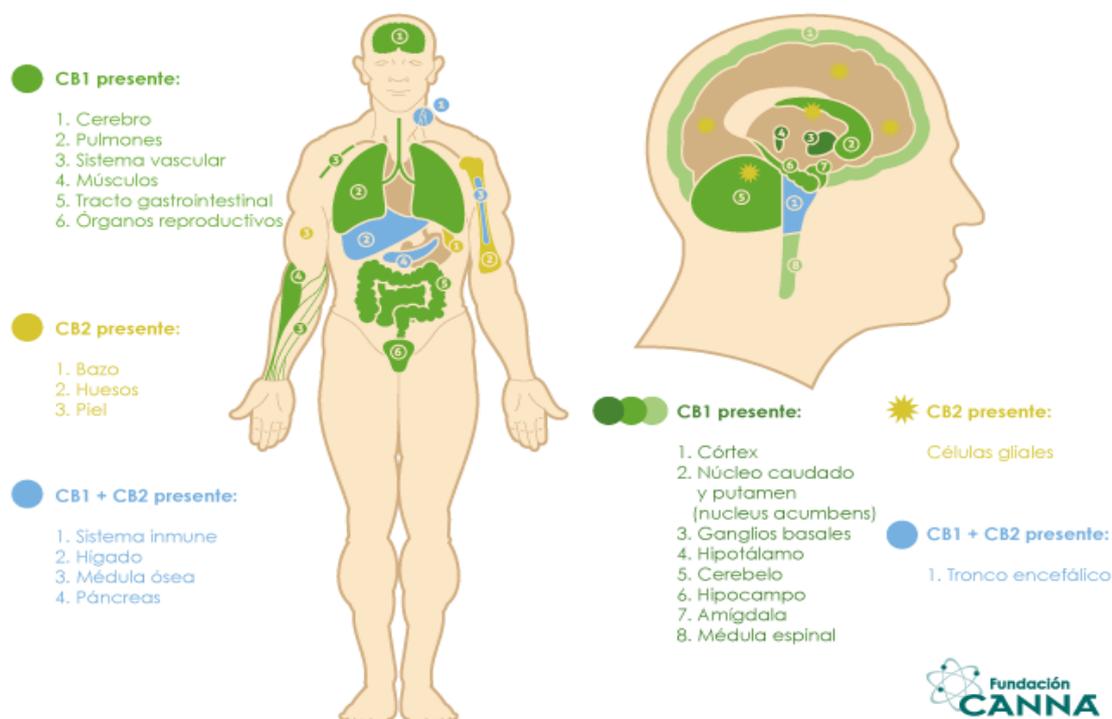


Figura 6. El Sistema Endocannabinoide (Fundación CANNA, 2023)

La activación de estos receptores tan específicos implica la inhibición de la *adenilato ciclasa* (AC), lo que conlleva a una disminución de los niveles de **AMPe**. Como consecuencia de la activación de **CB1R** se produce la modificación de diversas proteínas celulares, como factores de transcripción génica y canales iónicos. La conductancia aumenta sobre los canales de potasio (K^+) y calcio (Ca^{2+}) y se reduce por tanto la entrada de estos iones. Esto conlleva a una disminución en la despolarización de la membrana bloqueando la liberación de neurotransmisores como la *acetilcolina*, *noradrenalina* y *glutamato* a nivel de las terminaciones presinápticas. A su vez se produce la activación de las MAP quinasas (MAPK), alterándose por tanto diversos procesos de proliferación y diferenciación celular. Por su parte, la activación de los **CB2R** sigue las mismas rutas que la de los **CB1R** pero sin verse afectados los canales iónicos y por consiguiente, la liberación de neurotransmisores (Fraguas Sánchez et al., 2014).

De manera resumida, el estímulo de receptores cannabinoides puede dar lugar a *sensaciones de euforia, sedación y relajación; actividad analgésica y antiinflamatoria; broncodilatación, hipotensión y taquicardia; ataxia y debilidad muscular; actividad orexígenica y antiemética y alteraciones de la percepción temporal y de la memoria*, entre otras. Sin embargo, es importante destacar que la mayoría de las acciones evocadas por los agonistas cannabinoides sobre el Sistema Nervioso Central parecen depender principalmente de la activación de **CB1R**, *efectos cognitivos, psicológicos, antieméticos y analgésicos* parecen ser los característicos, aunque cierto es que, en alguno de ellos no puede descartarse la participación de los **CB2R**. Además, el papel de estos últimos también es fundamental en otras acciones cannabimiméticas, como es el caso de los *efectos inmunomoduladores y antiproliferativos* (Pascual Simón et Fernández Rodríguez, 2017).

Por otro lado, como ya se mencionó, el Sistema Endocannabinoide, además de poseer **receptores** específicos, también está constituido por **ligandos** y **enzimas** encargadas de su síntesis o degradación. En cuanto a los **ligandos** de estos receptores, pueden ser *sintéticos, fitocannabinoides* o *cannabinoides de naturaleza endógena*, también conocidos como *endocannabinoides*. Dentro de estos últimos se encuadran la N-araquidoniletanolamina (**AEA**) y el **2-AG** ambos derivados del ácido araquidónico. Los *fitocannabinoides* por su parte, serán aquellos que proceden de la propia planta encontrándose fundamentalmente en el cáñamo; mientras que los *cannabinoides sintéticos*, son compuestos de síntesis basadas en moléculas originarias de fitocannabinoides sobre las cuales se ha realizado alguna modificación estructural con el objetivo de incrementar el efecto psicotrópico (Bagaría, 2021).

Cierto es que, aunque las modificaciones químicas originarias de los cannabinoides sintéticos han aportado beneficios en el mundo de la medicina, el creciente interés por lo natural, los efectos terapéuticos y las ventajas con respecto a su obtención, así como la preferencia de estos por parte de la multitud, ha llevado a la comunidad científica a centrar su búsqueda en compuestos naturales

que mantengan las propiedades y funcionen de manera similar a como lo hacen los ligandos endógenos en el organismo. De este modo, se evita tener que recurrir a procesos químicos, lo que supone también, un gran ahorro de tiempo y dinero.

Uno de los compuestos presentes en la planta del cannabis que precisamente cumple estas características es el β -CFN. Pues, aunque la manipulación del mismo aún conlleva ciertos retos tecnológicos, se trata de un componente natural y por lo tanto económico, que ha demostrado ser agonista únicamente de los CB2R, lo que le exime, por tanto, de presentar efectos a nivel central. Además, también ha manifestado poseer multitud de beneficios a nivel medicinal. Las particularidades ya mencionadas unidas al descubrimiento de su elevado potencial terapéutico en enfermedades cardiovasculares como la *aterosclerosis*, donde actualmente está trabajando el grupo de investigación CTS-480, son los principales motivos que han permitido desarrollar este trabajo, centrado especialmente en el compuesto en cuestión.

1.6 BETA-CARIOFILENO

El β -CFN es uno de los *terpenos* más abundantes en el extracto de *C. sativa*. Se trata de un alqueno sesquiterpénico bicíclico cuya estructura química puede apreciarse en la *Figura 7*.

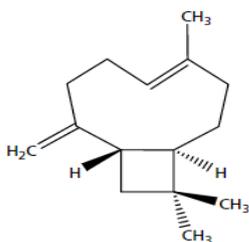


Figura 7. Estructura química de β -cariofileno (Legault et Pichette, 2010)

Este *fitocannabinoides* se encuentra actualmente muy extendido en los aceites esenciales del reino vegetal, encontrándose en especies como: el bálsamo de *Copaiba spp.*, la pimienta negra (*Piper nigrum*); el toronjil (*Melissa officinalis*); el clavo (*Syzygium aromaticum*) y el lúpulo (*Humulus lupulus*) (Russo, 2016). Dicho compuesto en cuestión actúa como agonista selectivo del CB2R humano, careciendo de afinidad sustancial por el CB1R, lo que le exime de producir efectos secundarios psicótropos consecuentes de su activación. Esta característica atribuible al mismo hace que ejerza una toxicidad insignificante en los tejidos normales y contrariamente, demuestra que posee efectos protectores en los mismos (Hashiesh et al., 2021). De hecho, estudios experimentales han informado sobre diversas actividades farmacológicas como son la actividad *cardioprotectora*, *hepatoprotectora*, *gastroprotectora*, *neuroprotectora*, *nefroprotectora*, *antioxidante*, *antiinflamatoria*, *antimicrobiana* e *inmunomoduladora*, entre otras (Sharma et al., 2016). Además, debido a su carácter aromático, también ha sido aprobado por la FDA para su uso

como agente saborizante, aditivo alimentario y potenciador del sabor en los alimentos (Hashiesh et al., 2021).

La selectividad por el receptor **CB2R**, la ausencia de efectos psicótrópos, y los numerosos beneficios terapéuticos, hacen del **β -CFN** un candidato prometedor para el uso terapéutico, incluido en el tratamiento de múltiples enfermedades (Hashiesh et al., 2021).

No obstante, a pesar de tener múltiples características significativamente favorables, sus **propiedades fisicoquímicas** impiden su administración, lo que supone una limitación importante para el ámbito de la medicina. Los **cannabinoides** en general, tienen una solubilidad en agua muy baja, lo que dificulta la absorción de los mismos al administrarse por vía oral. Esto implica que sean pocas las moléculas que pueden ejercer su acción medicinal cuando ingresan al organismo, siendo en muchos casos no efectivas en el tratamiento de la enfermedad, pues gran parte del compuesto administrado se desperdicia (Roman Vargas et al., 2021).

Tanto los cannabinoides naturales como los sintéticos, pertenecen a la **Clase II** de compuestos (baja solubilidad y alta permeabilidad) según el **Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS)**, lo que determina un perfil de absorción variable y por consiguiente, concentraciones plasmáticas y efectos adversos también variables (Durán-Lobato et al., 2015). Su naturaleza volátil e hidrofobicidad, asociadas a una baja solubilidad y baja biodisponibilidad, limitan su idoneidad como agentes farmacéuticos en la práctica.

Por esta razón, cada vez se proponen más sistemas de administración de fármacos basados en **nanopartículas** (NPs) que permitan encapsular estos **terpenos**. Esto abordaría sus limitaciones fisicoquímicas para la administración, y al mismo tiempo, mantendría la actividad terapéutica deseada (El-Hammadi et al., 2021; El-Hammadi et al., 2022). No obstante, para que esto sea posible es necesario recurrir al mundo de la nanomedicina y nanotecnología.

1.7 NANOTECNOLOGÍA Y NANOMEDICINA

Desde su nacimiento, a mediados del siglo XX, la **nanotecnología** ha evolucionado progresivamente en todos los niveles. En un periodo de tiempo de aproximadamente medio siglo, esta ciencia se ha convertido en la base de notables aplicaciones industriales con un amplio crecimiento exponencial (Hulla et al., 2015). Si bien, es importante destacar que, aunque existen múltiples descripciones, la definición oficial de nanotecnología no ha surgido hasta el año 2021. Por eso, es posible confundir y no tener una definición clara del concepto, así como mezclar la terminología y las limitaciones de tamaño en función del campo de especialización.

Como aplicación a la **nanotecnología** en las ciencias de la salud, surge la **nanomedicina**, rama de la nanotecnología que se perfila como la de mayor proyección, debido a sus importantes

aplicaciones, especialmente diagnósticas y terapéuticas (Lechuga, 2011). Desde el punto de vista farmacéutico, la **nanotecnología** ofrece múltiples posibilidades (i) permite vehicular tanto fármacos de bajo peso molecular, macromoléculas, péptidos, proteínas o material genético; (ii) permite la administración de fármacos de forma localizada o dirigida hacia un órgano diana; (iii) permite mejorar la biodisponibilidad oral, sostener su efecto en el tiempo; (iv) permite solubilizar fármacos para una administración intravascular; (v) permite mejorar la estabilidad de los agentes terapéuticos... (Martín-Banderas et al., 2013).

Respecto al tamaño, aunque la FDA, EMA e ISO han publicado documentos relacionados con la nanotecnología, donde la limitación de tamaño se encuentra entre los 1-100 nm para el uso en “nanomedicina”, el **Centro Común de Investigación y el Comité científico sobre Emergentes y Recién Identificados Riesgos Sanitarios de la Comisión Europea** considera que esta definición debe ampliarse, pues en este campo se utilizan materiales a nanoescala de más de 100 nm. De este modo, las nanopartículas para aplicaciones médicas quedan definidas como partículas con un tamaño comprendido entre 1 y 1000 nm (documento FDA-2017-D-0759, 2022).

Dado que la mayoría de los *cannabinoides* suelen presentar varias limitaciones a la hora de evaluar su uso clínico, el desarrollo de un sistema nanométrico para la administración oral de cannabinoides se presenta como alternativa novedosa y ventajosa frente a otros sistemas de administración convencionales (Martín-Banderas et al., 2013), lo que permitirá superar con éxito estos conflictos. En la práctica, esto significa que los cannabinoides pueden cargarse o conjugarse en **NPs**, ofreciendo la oportunidad de hacer llegar de manera efectiva las formulaciones del *cannabis* y *cannabinoides* a los sitios de acción. Así, la aplicación de la nanotecnología en medicina implica el empleo de **NPs**, no solo para potenciar la acción de medicamentos, sino también para mejorar el diagnóstico y la terapia de enfermedades y poder reducir los costes sanitarios (Onaivi et al., 2020).

2. OBJETIVOS

El **objetivo general** del trabajo es desarrollar un sistema de liberación biocompatible y biodegradable que permita la vehiculización de un fitocannabinoide, más concretamente de un **sesquiterpeno**, β -cariofileno, con potencial terapéutico en enfermedades cardiovasculares.

Para ello se plantean los siguientes **objetivos parciales**:

- Sintetizar de NPs de PLGA que permite la vehiculización de una molécula volátil, como el β -CFN.
- Caracterizar in vitro de las NPs elaboradas: tamaño, dispersión del tamaño y potencial Z.
- Desarrollar de un método RP-HPLC que permita estimar la cantidad encapsulada de fármaco presente en las nanopartículas y cuantificación de la misma.
- Poner a punto un proceso que permita el almacenamiento y conservación de las partículas obtenidas mediante procesos de congelación y/o liofilización.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

- **Reactivos**
 - β -Cariofileno (β -CFN) (Ref. W225207sigma-Aldrich)
 - Copolímero de ácido láctico y glicólico pegilado (PLGA-PEG) (Sigma ref. 76460-1G)
 - Copolímero poliláctico-co-glicólico (PLGA) (Sigma ref. 754760-1G)
 - Acetona grado HPLC (PanReac)
 - Agua purificada (Millipore Milli-Q®)
 - Trehalosa (Sigma-Merk)
 - Pluronic® F-68 (BioChemica)
 - Alcohol Povidínico (PVA) (PanReac 7200)
 - Acetonitrilo (PanReac HPLC)
 - Metanol (PanReac HPLC)
 - Ácido acético (PanReac)
 - Nitrógeno líquido

- **Utensilios de laboratorio**
 - Viales de vidrio de 15 mL.
 - Pipetas de 20, 200, 1000 μ l y 5 mL y sus correspondientes puntas.
 - Vaso de precipitado de 50 mL.
 - Espátula
 - Varillas agitadoras magnéticas
 - Pesamuestras
 - Tubos Amicon Ultracel de 100 kDa y capacidad 15 mL.
 - Tubos Eppendorf de 1,5 mL.
 - Viales opacos de topacio
 - Nitrógeno líquido

- **Equipos**
 - Agitador tipo vórtex (RS-Lab 11C)
 - Balanza de precisión. (LE225D-OCE)
 - Placa agitadora multiposición (IKA[®] RT 15)
 - Campana extractora
 - Varillas agitadoras magnéticas de pequeño tamaño
 - Centrifuga refrigeradora (Eppendorf 5804R)
 - Zetasizer Nano series: Nano ZS90 (Malvern Instruments)
 - RP-HPLC (LaChron Merck Hitachi)
 - Liofilizador (Telstar Cryodos -80)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Síntesis de nanopartículas de β -CFN

3.2.1.1 Proceso de elaboración de nanopartículas

La elaboración de nanopartículas de **PLGA** o **PLGA-PEG** cargadas con **β -CFN** se llevó a cabo utilizando el método de *nanoprecipitación* previamente descrito (Iannitelli et al., 2011), incorporando algunas modificaciones.

Para ello se propuso la encapsulación del terpeno, **β -CFN**, en el polímero elegido, bien el poli(láctido-co-glicólido) o **PLGA**, o bien el polipoli(etilenglicol)-poli(láctido-co-glicólido), también conocido como **PEG-PLGA**. Este último no es más que el copolímero de **PLGA** acompañado de una cadena hidrófila de polietilenglicol (**PEG**). Véase la estructura química de

ambos polímeros en la *Figura 8* y *Figura 9* respectivamente. El copolímero aporta ventajas exitosas en cuanto a solubilidad y estabilidad, mientras que la incorporación final de la cadena de PEG ayuda a proporcionar cierta singularidad al compuesto en cuestión.

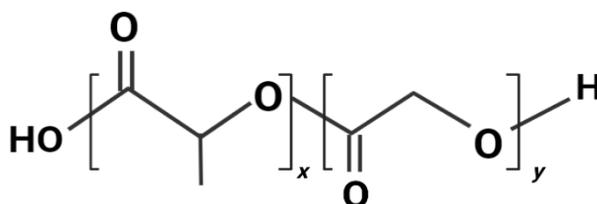


Figura 8. Estructura química del PLGA. (Rosas et Pedraz, 2007)

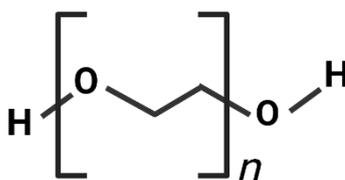


Figura 9. Estructura química del PEG (Quintanilla et al., 2017)

A continuación, se detalla el proceso de elaboración de las NPs, para lo cual se necesitan dos fases (orgánica y acuosa):

- **Fase orgánica:** consiste en una solución de **PLGA-PEG** o **PLGA** en acetona a concentración de 50 mg/mL. La cantidad de polímero pesado se añade a la acetona y se disuelve con el vórtex. Posteriormente se añaden 15 μ L de solución β -CFN que supone un 97% p/p de carga β -CFN respecto al polímero.
- **Fase acuosa:** consiste únicamente en agua Milli-Q[®] dispuesta en vasos de precipitado (4 mL por lote) que estará en agitación continua a temperatura ambiente.

Método de producción de nanopartículas

Para la elaboración de las NPs, es necesario mantener cada uno de los vasos de precipitados con los 4 mL de **fase acuosa** en agitación, para ello se utiliza la placa agitadora y una mosca magnética (aproximadamente 300 rpm). En el proceso de *nanoprecipitación*, el volumen correspondiente de **fase orgánica** se incorpora directamente sobre los 4 mL de agua Milli-Q[®] que forman la **fase acuosa**. Este proceso se realiza en un solo paso con ayuda de la pipeta correspondiente. A continuación, cada uno de los lotes, donde ya se incluyen ambas **fases**, se mantienen en agitación dentro de la campana extractora, a t.a y durante 20 min. Se pretende lograr la completa evaporación de la acetona.

En ese tiempo, se mide el tamaño de partícula y el potencial Z (PZ) con el **Zetasizer**[®]. Para ello, se emplea una cubeta Malvern a la que se añaden 100 μL de la suspensión de nanopartículas y 900 μL de agua Milli-Q[®] para que la muestra no esté tan concentrada.

Pasados los 20 minutos y evaporada en su totalidad la acetona, se traspasada la formulación a un vial cerrado para evitar ahora, la evaporación del β -CFN. Seguidamente se concentra y separan las NPs de la suspensión llevando a cabo una ultrafiltración en la centrífuga durante 20 minutos a 15° y 4.000 rcf, hasta conseguir un volumen final de NPs de 1500 μL . Para ello se utilizan tubos Amicon.

Finalmente, terminado el proceso de centrifugado, el bajonadante se transfiere a un vial cerrado y se congela a -20° para su posterior análisis. Por su parte, el concentrado de cada uno de los Amicon se recupera en un tubo Eppendorf, llevándose a un volumen final de 1.500 μL . Así se obtiene la suspensión de NPs deseada. En la *Figura 10* se muestra un esquema del procedimiento seguido en la producción de las NPs para cada uno de los lotes trabajados.

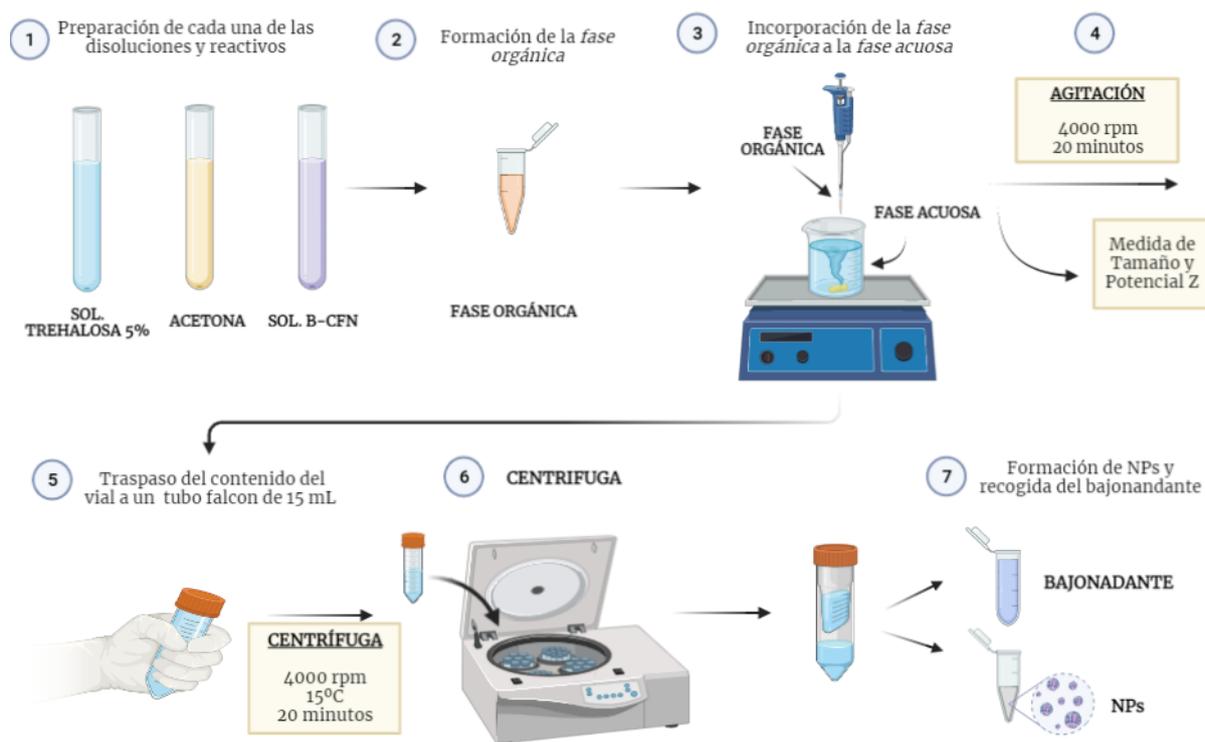


Figura 10. Modelo esquemático del procedimiento de elaboración de NPs cargadas

Aunque el objetivo final es obtener nanopartículas de **PLGA-PEG cargadas** para evaluar la formulación, también se elaboraron NPs de PLGA-PEG sin fármaco y NPs con PLGA sin pegilar tanto blancas como cargadas, para poder estudiar la comparación entre ambas.

3.2.1.2 Cuantificación del fármaco por cromatografía

Tras la elaboración de NPs de β -CFN, interesa conocer cuál es la cantidad fármaco vehiculizado en las mismas. Para ello se utilizó la **Cromatografía Líquida de Alta Eficacia en fase reversa (RP-HPLC)**. Este método se llevó a cabo en el equipo *LaChron Merck Hitachi* utilizando para el procedimiento una **fase estacionaria**, constituida por una columna *C18 Atlantis® T3* ($3 \mu\text{m}$, $4.6 \times 150 \text{ mm}$) y una **fase móvil** formada por el componente **A**: Metanol (MeOH); el componente **B**: Agua Milli-Q® acidificada con ácido acético hasta conseguir un pH de 4,5 y el componente **C**: Acetonitrilo (ACN).

El método se puso a punto a partir de la experiencia del grupo de investigación **CTS-480**. Tras realizar varias pruebas para establecer los porcentajes exactos de cada uno de los componentes que forman la **fase móvil**, y obtener un pico simétrico bien definido a un tiempo de retención aceptable, se fijaron las siguientes proporciones para los componentes de la fase móvil: **MeOH:ACN:H₂O (50:40:10)**.

Además, la cuantificación se llevó a cabo siguiendo unas condiciones determinadas, siendo la longitud de onda de 210 nm y la temperatura del horno 25°C. Por su parte, la velocidad de flujo se estableció en 1 mL/min y el volumen de inyección en 5 μL , siendo el tiempo de corrida (run time) de 18 minutos.

Finalmente, con el propósito de poder determinar la concentración de β -CFN en las NPs producidas se elaboró una recta de calibrado. Para ello, primero se preparó una disolución madre de 1mg/mL en ACN. A partir de esta primera disolución se elaboraron diferentes disoluciones estándar de concentraciones conocidas (patrones): 12,5; 25; 50; 75; 150 y 300 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

3.2.1.3 Eficacia de la Encapsulación (EE) y Carga de fármaco (CF)

Tras la preparación de cada uno de los estándares en sus correspondientes viales topacio, estos son introducidos en el **RP-HPLC** para su posterior medición.

El equipo mencionado, tras realizar un análisis cromatográfico, obtendrá un cromatograma, donde aparecerán representados los picos de absorbancia frente al tiempo, cada uno perteneciente a una muestra en concreto. Los resultados obtenidos tras la medición del área bajo la curva de cada uno de los picos formados permiten elaborar una **recta de calibrado** que relaciona el área bajo la curva con la concentración de fármaco presente en la muestra. Así se puede obtener una ecuación que permite comparar ambos parámetros.

Tras la obtención de la mencionada recta y su correspondiente ecuación, el siguiente objetivo es llevar a cabo la medición de cada uno de los bajonandantes ya obtenidos previamente en el proceso de centrifugación. De este modo y gracias a la recta de calibrado, sería posible relacionar los valores de área bajo el pico resultantes tras la medición de estas muestras con valores de concentración. Así, se podría obtener la cantidad de fármaco no encapsulada, y por diferencia podría extraerse el valor atrapado dentro de la nanopartícula (NP).

Para evaluar la capacidad de vehiculización de las NPs se emplearon dos parámetros, la **eficacia de encapsulación (EE)** y la **carga de fármaco (CF)**. El primero de ellos define la cantidad de fármaco presente en la NPs con respecto a la cantidad inicial del mismo que se utilizó en la elaboración de estas. Así, conociendo los miligramos (mg) de fármaco encapsulado (obtenidos a partir de la concentración de este y volumen añadido del mismo) y los mg teóricos introducidos inicialmente en la NPS se puede calcular la **EE**.

Por su parte, la **CF** define la cantidad de compuesto cargado por los mg de polímero utilizado y nos permite conocer realmente la cantidad de β -CFN encapsulada. Las ecuaciones que expresan las siguientes definiciones son las siguientes:

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

$$CF = \frac{\text{mg de fármaco encapsulado}}{\text{mg de polímero}} \times 100$$

3.2.2 Pruebas de congelación

El PLGA-PEG, polímero de la matriz que compone las NPs, es biodegradable y biocompatible, lo que significa que es capaz de hidrolizarse en agua. Por este motivo, se requiere de un proceso de almacenamiento que permita evitar esta degradación y por consiguiente, asegure la estabilidad de la NP en cuestión. Para ello, se llevaron a cabo varias pruebas de congelación a -20°C utilizando distintos crioprotectores y a diferentes concentraciones.

3.2.2.1 Prueba de congelación con trehalosa

En este procedimiento, se evalúan las proporciones **polímero:trehalosa**, 1:1; 1:3 y 1:5 respectivamente.

Para ello, primero es necesario preparar una solución de trehalosa al 5% (p/v). Se pesan 2,5 mg del compuesto y se disuelven en 50 mL de agua. Esta solución se prepara en un falcon y tras su elaboración se conserva en la nevera hasta ser utilizada.

Teniendo en cuenta que, para cada muestra, la concentración final de NPs será de **4 mg/mL**, siendo **1 mL** el volumen final y por consiguiente **4** los mg de nanopartículas presentes en cada uno de los Eppendorf; se calcula el volumen de nanopartículas por muestra, siendo este de 160 μL por lote, los cuales se harán por duplicado. En base a esto y sabiendo, también, los μL de solución de trehalosa necesarios para cada condición, se calcula el volumen necesario de agua Milli-Q[®] para cada uno de los lotes preparados. Con el fin de evitar errores se elabora una tabla que recoja todos y cada uno de los cálculos (*Tabla 1*).

Tabla 1. Condiciones para congelar NPs de β -CFN 4 mg/mL con diferentes proporciones de polímero:trehalosa

Vol. Concentrado NPs (μL)	Proporción NP:trehalosa	Trehalosa (mg)	Vol. Sol. Trehalosa 5% (μL)	Vol. Agua Milli-Q [®] (μL)
160	1:1	4	80	760
160	1:3	12	240	600
160	1:5	20	400	440
160	1:8	32	640	200

A la hora de elaborar cada uno de los lotes, primero se añaden los μL de agua Milli-Q[®] seguido del volumen correspondiente de la solución de trehalosa 5% (p/v). Posteriormente, se añaden el volumen de NPs, consiguiendo en cada Eppendorf un volumen final de 1 mL. Finalmente, todas las muestras son congeladas con nitrógeno líquido y conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el congelador.

Para evaluar el efecto de la congelación con las diferentes proporciones de trehalosa, las muestras una vez descongeladas, se medirán en el **Zetasizer Nano**. El contenido de cada Eppendorf se traspasa directamente a una cubeta Malvern y se realizan las medias correspondientes para determinar el tamaño, el índice de polidispersión (PDI) y el PZ. Para concluir, se comparan las medidas obtenidas con las mediciones realizadas de las NPs recién producidas.

3.2.2.2. Prueba de congelación con trehalosa y tensioactivos

En este caso, se pretende evaluar la resistencia de las NPs a la congelación utilizando el crioprotector trehalosa en combinación con dos tensioactivos, **Pluronic[®] F-68** y **PVA** a diferentes concentraciones.

Para llevar a cabo estas condiciones es necesario preparar a priori tres soluciones: una solución de trehalosa al 5% (p/v); una de Pluronic[®] F-68 al 1% (p/v) y otra de PVA al 0,5% (p/v).

La elaboración de la **solución de trehalosa** se realiza en un falcon de 15 mL, donde se disolverán en agua Milli-Q® los 0,75 mg de trehalosa previamente pesados. Para preparar la **solución de Pluronic® F-68** al 15(p/v) se pesan 0,05 mg de Pluronic® y se disuelven en agua Milli-Q® en un tubo de 5 mL. Por último, para la solución de **PVA** al 0,5 % (p/v) se utiliza un falcon de 15 mL, donde serán disueltos en agua Milli-Q® 0,075mg de PVA. Todas las soluciones elaboradas se reservan en la nevera a una temperatura de 4°C hasta su posterior utilización.

El objetivo ahora es realizar una prueba de congelación con diferentes **proporciones polímero:trehalosa:tensioactivo (p/p/p)**. Para ello, manteniendo la relación **NPs:trehalosa 1:5**, se añade el tensioactivo correspondiente en diferentes proporciones:

1. **Congelación NPs:trehalosa:pluronic en proporción: 1:5:1.25.**
2. **Congelación NPs:trehalosa:PVA en las proporciones: 1:5:0.5**
1:5:0.1
1:5:0.01

En este caso, se siguen los mismos pasos que en el método anterior y se elabora una tabla que recoge las condiciones experimentales (*Tabla 2 y Tabla 3*).

Al igual que antes, sabiendo que para cada muestra, la concentración final de NPs es de **4 mg/ml**, siendo 1 mL el volumen final y por consiguiente 4 los mg de NPs presentes en cada uno de los Eppendorf, el volumen de NPs será de **160 µL** por lote, los cuales se harán nuevamente por duplicado. Además, teniendo en cuenta los µL de solución de trehalosa necesarios para cada condición, que según la condición NPs:trehalosa 1:5, serán **80 µL**, se calcula el volumen necesario de agua Milli-Q® para cada uno de los lotes preparados. Finalmente, también se calculan los µL de tensioactivo necesario (Pluronic® F-68 o PVA) para cada condición.

Tabla 2. Condiciones para congelar NPs:trehalosa:Pluronic en proporción 1:5:1.25

Vol. NPs (µL)	Proporción NP:trehalosa:Pluronic	Trehalosa (mg)	Vol. Sol. Trehalosa 5% (µL)	Pluronic (mg)	Vol. Sol. Pluronic 1% (µL)	Vol. Agua Milli-Q® (µL)	Concentración final Pluronic
160	1:5:1.25	4	80	5	500	260	0.5%

Tabla 3. Condiciones para congelar NPs:trehalosa:PVA en diferentes proporciones

Vol. NPs (µL)	Proporción NP:trehalosa:Pluronic	Trehalosa (mg)	Vol. Sol. Trehalosa 5% (µL)	PVA (mg)	Vol. Sol. Pluronic 1% (µL)	Vol. Agua Milli-Q® (µL)	Concentración final Pluronic
160	1:5:0.5	4	80	2	400	360	0.2%
160	1:5:0.1	4	80	0.4	80	680	0.04%
160	1:5:0.01	4	80	0.04	8	752	0.004%

A la hora de elaborar los lotes, se incorpora a cada Eppendorf de 1 mL, en el orden establecido, los μL de agua Milli-Q[®], el volumen de solución de trehalosa 5% (pv), los microlitros de la solución de Pluronic[®] F-68 o PVA correspondiente y por último el concentrado de NPs para que en cada muestra queden 4 mg. Finalmente, todas las muestras son congeladas con nitrógeno líquido y conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Nuevamente, para evaluar el efecto de la congelación con las diferentes condiciones, las muestras descongeladas se medirán en el **Zetasizer Nano**, para determinar tamaño, PDI y PZ. Las medidas obtenidas serán comparadas con las mediciones realizadas de las NPs recién producidas para sacar conclusiones.

3.2.3 Pruebas de liofilización

La liofilización es una técnica que permite la conservación de las muestras. Mediante una previa congelación de las mismas y la posterior aplicación de vacío, el agua es eliminada por sublimación, en presencia de calor circundante y bajas presiones, obteniendo de este modo una estructura seca que favorece la preservación de las mismas en el tiempo (Rodríguez Barona et al., 2016; Surco Laos et al., 2017). Véase una representación visual de los estados transitorios surgidos durante un proceso de liofilización en la *Figura 11*.

Para llevar este método a cabo se utilizó el liofilizador disponible en el servicio de biología del **CITIUS**. Este proceso permitió hacer de la suspensión de NPs elaboradas con trehalosa y PVA un polvo compacto y sólido en forma de matriz seca, lo que supone entre otras cosas una ventaja característica, puesto que el producto resultante es más fácil de manejar y almacenar.

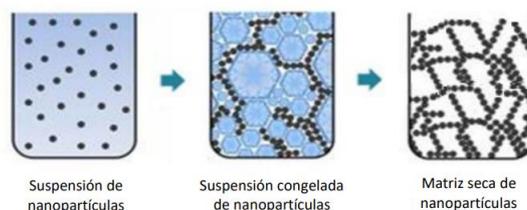


Figura 11. Representación de los diferentes estados de las NPs tras ser sometidas a un proceso de liofilización (Yacasi Ramos, 2017)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARÁCTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS ENCAPSULADAS

4.1.1 Tamaño, polidispersión de tamaños (PDI) y carga eléctrica superficial (PZ)

Tanto el *tamaño de partícula* como la *carga eléctrica superficial* fueron los primeros parámetros tenidos en cuenta a la hora de evaluar las propiedades fisicoquímicas de las NPs poliméricas.

La determinación del **diámetro** de las mismas es una de las consideraciones más importantes, puesto que influye en la determinación del destino biológico, la toxicidad, la distribución in vivo y la capacidad de orientación de estos sistemas de suministro de fármacos. Además, en la mayoría de los casos, la liberación de fármacos puede verse afectada por el tamaño de las partículas. Así, aquellas que tienen un diámetro **menor**, poseerán una mayor relación superficie-volumen, favoreciendo por tanto, la asociación del fármaco con las moléculas del órgano diana (está más expuesto) consiguiendo de este modo una liberación más rápida del mismo. Por otra parte, aquellas partículas que tengan un diámetro **mayor** serán poseedoras de grandes núcleos, lo que permite la encapsulación de una mayor cantidad de fármaco y por lo tanto, una liberación más lenta de este (Oropesa et Jáuregui, 2012).

El **PZ**, por su parte, permite medir la carga superficial de las NPs. Se trata de una medida que refleja el potencial eléctrico de las partículas en función de la composición de la misma y del medio en el que esta se dispersa. Además influye de manera muy importante en las propiedades de los materiales coloidales tales como: su estabilidad, la interacción con electrolitos y la reología de las suspensiones (Villafuente et al., 2008).

Por ello, posterior a la elaboración de las NPs tal y como se describió en el apartado 3.2.1.1 de *Materiales y Métodos* se utilizó el equipo **Zetasizer Nano** para llevar a cabo las mediciones mencionadas. La finalidad del equipo es realizar medidas por triplicado basándose en la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) la cual mide las oscilaciones del movimiento browniano y permitiendo relacionarlo con el tamaño y el PDI. A su vez, gracias a la dispersión de luz electroforética (ELS) se consiguió obtener también medidas de PZ, lo que permitió conocer la estabilidad de las NPs en cuestión. En la *Tabla 4* se resumen los datos que se obtuvieron tras elaborar NPs de PLGA y PLGA-PEG, tanto blancas (sin fármaco) como cargadas con β -CFN.

Tabla 4. Medidas y distribución de tamaño de los lotes elaborados

POLÍMERO	TIPO NP	LOTES	D _{medio} ± DE (nm)	PDI ± DE	PZ ± DE (mV)
PLGA	Blancas	Lote 1	214 ± 7	0,178 ± 0,02	-33 ± 2
		Lote 2	205 ± 9	0,206 ± 0,03	-35 ± 2
	Cargadas	Lote 1	296 ± 29	0,259 ± 0,08	-48 ± 5
		Lote 2	298 ± 26	0,259 ± 0,09	-51 ± 4
PLGA-PEG	Blancas	Lote 1	91 ± 1	0,097 ± 0,05	-20 ± 1
		Lote 2	90 ± 1	0,083 ± 0,02	-22 ± 1
	Cargadas	Lote 1	290 ± 21	0,217 ± 0,09	-38 ± 1
		Lote 2	276 ± 17	0,196 ± 0,09	-34 ± 1
		Lote 3	295 ± 18	0,269 ± 0,21	-37 ± 2

Tras la observación de los resultado obtenidos en la tabla, si se tiene en cuenta que las NPs para aplicaciones médicas se definen, como partículas con un tamaño comprendido entre 1 y 1000 nm, se puede concluir que en este caso las NPs elaboradas se encuentran dentro de los límites de tamaño aceptables para llevar a cabo su administración. Por su parte, respecto al PDI se observa que todas las formulaciones ensayadas presentan una adecuada homogeneidad y uniformidad de tamaños, con valores por debajo de 0,3; lo que refleja nuevamente una distribución de tamaño homogéneo. Si bien, poniendo en foco en cada una de las diferentes NPs elaboradas, para cualquiera de las dos condiciones, las **NPs cargadas** presentan un diámetro notablemente mayor al de las **NPs blancas**. El fundamento de esto es bastante lógico puesto que al añadir más cantidad de sustancia a la NP, esta adquiere un tamaño mayor. En la *Figura 12* se aprecian las diferencias de tamaño una NPs blanca y otra cargada.

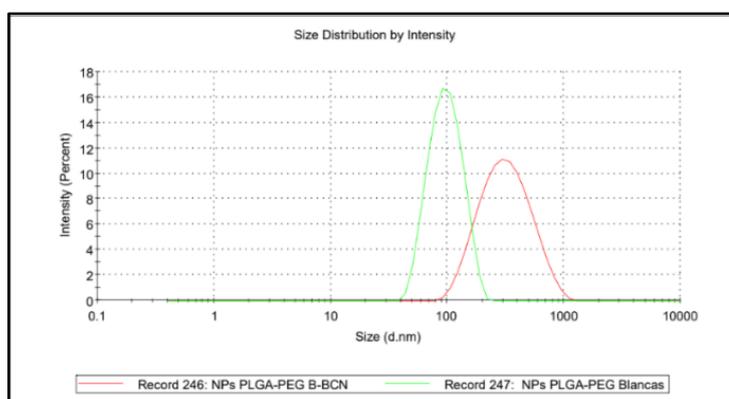


Figura 12. Comparación de tamaño entre NPs de PLGA-PEG cargadas con fármaco y blancas

Por su parte, entre las NPs cargadas de **PLGA** y las de **PLGA-PEG**, se aprecia una pequeña disminución del diámetro en estas últimas. Esto se debe al grupo carboxilo presente en el polímero de **PLGA**, el cual aporta carga negativa. El PEG aporta hidrofilia y al estar en contacto con el PLGA permite la estabilización de la NP cuando esta entra en contacto con la fase acuosa, lo que justifica la disminución del tamaño de las NPs de PLGA-PEG respecto a las de PLGA. En la *Figura 13* se puede apreciar las diferencias de tamaño entre las NPs elaboradas con los diferentes polímeros mencionados.

El empleo de los polímeros **PLGA** y **PEG** en la elaboración de estos compuestos también permite aportar ciertas características significativas. En lo que respecta al **PLGA**, se trata de uno de los polímeros sintéticos desarrollados con más éxito, debido a sus atractivas propiedades, entre las que destacan: la biodegradabilidad y biocompatibilidad, capacidad para dar lugar a formulaciones bien definidas, la idoneidad para proteger al fármaco, la liberación sostenida del principio activo y la posibilidad de direccionar las nanopartículas a los órganos o células específicas, entre otras (Danhier et al., 2012). Además, el **PLGA** se puede funcionalizar con **PEG** u otros polímeros hidrofílicos, lo que da como resultados partículas que se vuelven prácticamente indetectables para el sistema reticuloendotelial, responsable de la eliminación de las mismas del torrente sanguíneo. Esto les permite una circulación más prolongada, pues alarga su vida media. Por otro lado, la adición de una capa de **PEG** también puede aumentar la hidrofilia y por lo tanto reduce las posibles interacciones con lípidos o proteínas séricas (Swider et al., 2018). En conclusión, en base a su excelente biodegradabilidad y biocompatibilidad, tanto el **PEG** como el **PLGA** han sido aprobados por la FDA de Estados Unidos. Estos en combinación forman el ya mencionado **PEG-PLGA**, un polímero anfifílico, que se autoensambla en la fase acuosa y permitirá la generación espontánea de nanopartículas (Watcharadulyarat et al., 2023).

En cuanto al **PZ**, un valor **pequeño** del mismo, indica que la dispersión puede romperse y flocular. Por otro lado, si las partículas en la suspensión tienen un alto PZ, ya sea negativo o positivo, entonces muestran una tendencia a repelerse de modo que no se produce floculación. Generalmente se consideran estables las suspensiones de partículas con PZ superior a 30 mV, en valor absoluto (Nnamani et al., 2014). Según esto, todas las NPs elaboradas, a excepción de las NPs de **PLGA-PEG blancas**, cumplirían esta condición.

Si analizamos uno a uno los resultados, las NPs tanto de **PLGA** como de **PLGA-PEG blancas** presentan un **PZ** más negativo que el de las **NPs cargadas**. Esto se debe a que en estas últimas el exceso de fármaco, a pesar de haber hecho los lavados, sigue encontrándose en la superficie de la NP, haciendo que sean menos negativas o por consiguiente, más positivas. Por su parte, entre ambos polímeros, en las NPs de **PLGA-PEG**, el **PEG** contrarresta la carga negativa que presenta el **PLGA**, haciendo que las NPs elaboradas por combinación de ambos sean aún menos negativas

que las que presentan únicamente **PLGA**. En la *Figura 14* se pueden observar las comparaciones mencionadas

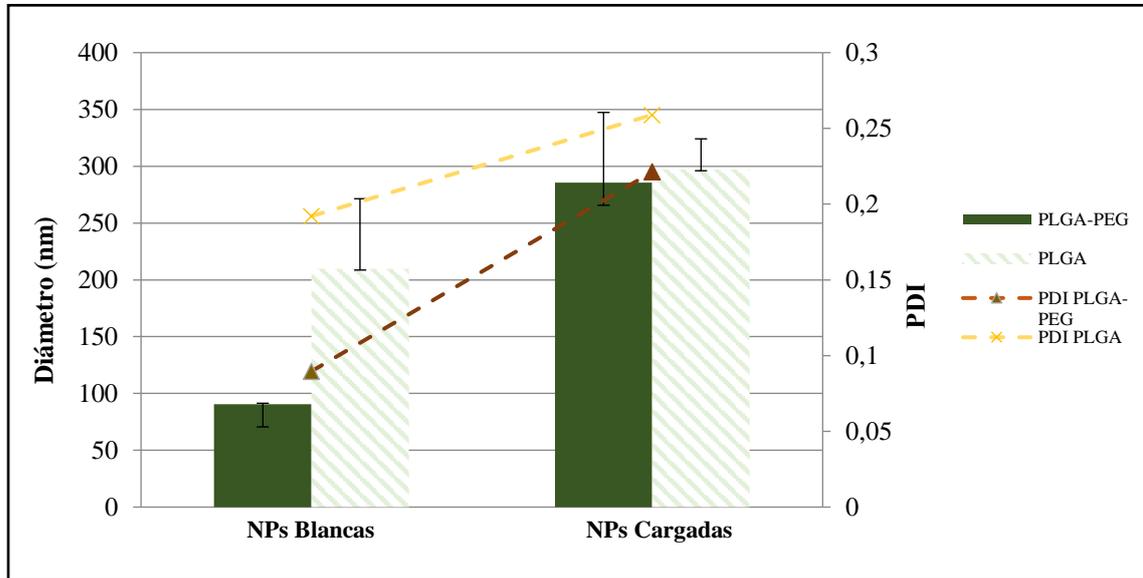


Figura 13. Diferencias de tamaño y PDI entre las NPs de PLGA y PLGA-PEG cargadas y sin fármaco

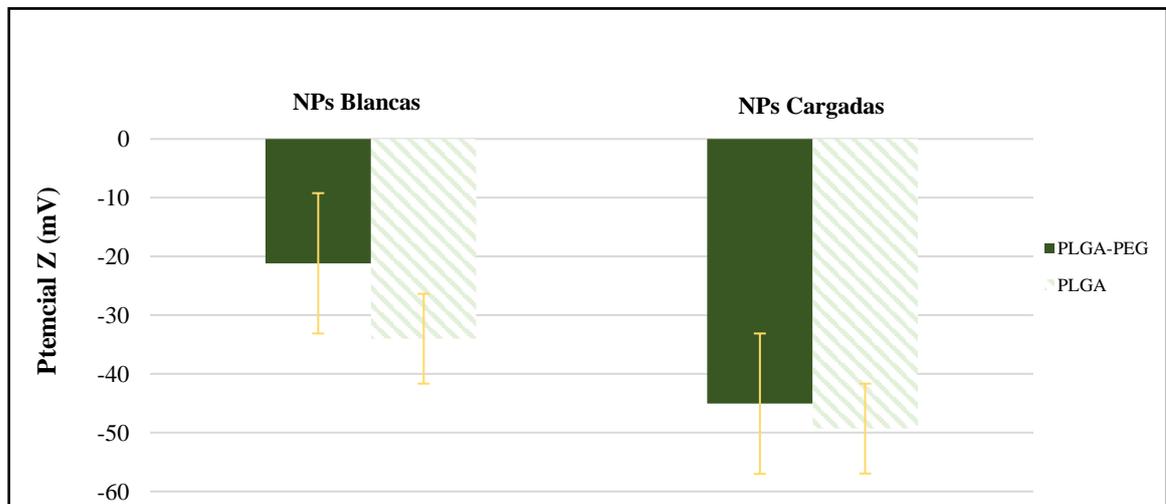


Figura 14. Diferencias de PZ entre las NPs de PLGA y PLGA-PEG cargadas y sin fármaco

4.1.2 Cuantificación del β -CFN y Eficacia de la encapsulación

Tras la obtención de las NPs PLGA-PEG cargadas con β -CFN y habiendo obtenido los datos tanto de tamaño como de PZ, se calculó la **eficacia de encapsulación** según el procedimiento descrito en el apartado 3.2.1.3 de *Materiales y Métodos*. Para llevar a cabo el proceso se utilizó el equipo RP-HPLC, gracias al cual, de manera indirecta, se cuantificó la cantidad de fármaco no encapsulado presente en el sobrenadante. En la *Figura 15* se muestra a modo de ejemplo el cromatograma para un patrón a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$.

En el cromatograma se aprecian dos picos bien definidos y simétricos. El **pico primero**, de menor área, se puede atribuir a impurezas del producto, ya que tal como se recoge en la ficha del mismo, la pureza de este es entorno al 90%. El **segundo pico**, con un tiempo de retención de 11 minutos y de mayor área, se atribuye al β -CFN. Tal como se recoge en la gráfica de la recta de calibrado (*Figura 16*), las áreas de este segundo pico son proporcionales a la concentración de β -CFN. Aunque en el cromatograma aparezcan ambos picos representados, el método desarrollado, permite la separación de los dos de forma clara, lo que permite realizar la cuantificación de forma fiable.

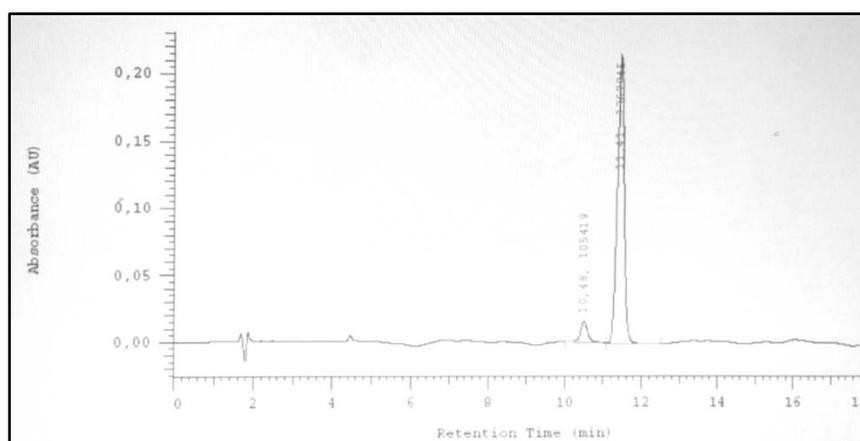


Figura 15. Cromatograma de un patrón de 200 $\mu\text{g/mL}$ de β -CFN en ACN

El objetivo era elaborar una recta de calibrado a partir del análisis cromatográfico de estándares de concentración conocida del fármaco en ACN de diferentes soluciones. En la **Figura 16** se observa la mencionada recta de calibrado obtenida para la cuantificación por el método β -CFN.

Como se puede observar se obtuvo una recta ($y=7062 - 18339$; $R^2 = 0,9871$) en el intervalo de concentraciones de 25 a 300 $\mu\text{g/mL}$. De este modo, teniendo en cuenta el **Coefficiente de Correlación de Pearson (R^2)**, el cual permite conocer la linealidad entre las variables representadas y la fuerza con que estas se vinculan, se verifica la linealidad buscada entre el área obtenido bajo el pico de absorbancia perteneciente al fármaco y la concentración del mismo

presente en la muestra. Si bien, es importante destacar que aunque los resultados obtenidos son válidos, todavía es posible optimizar el método para obtener tiempos de retenciones menores, haciéndolo todavía más práctico.

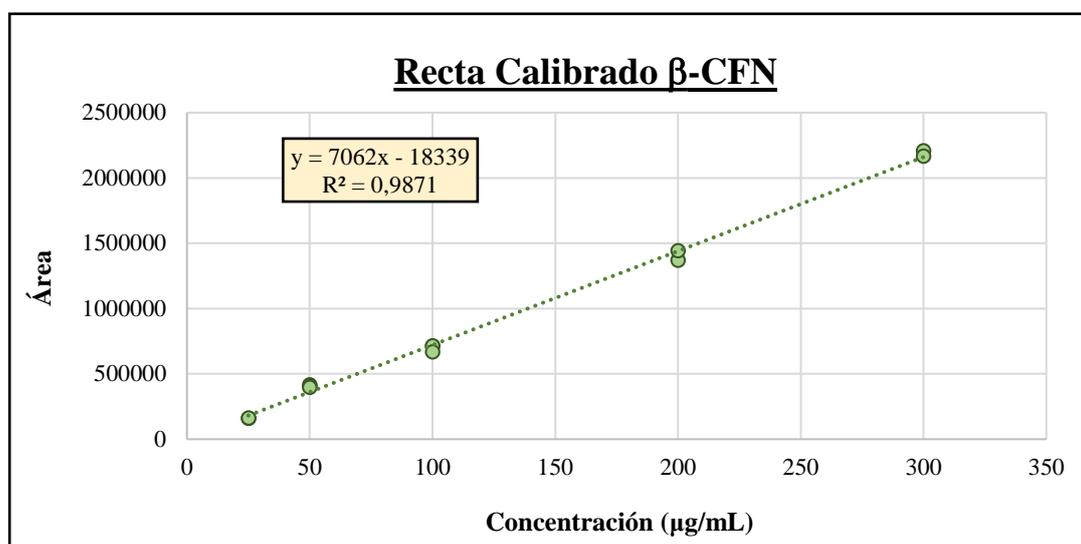


Figura 16. Recta de Calibrado de β -CFN en el intervalo de concentraciones 25-300 $\mu\text{g/mL}$

Por su parte, como es de esperar el principal reto que supone la utilización del β -CFN es la encapsulación del mismo. El hecho de ser un aceite esencial y por tanto un compuesto volátil supone un reto tecnológico en lo que a manipulación se refiere. Por este motivo es muy importante evaluar la **EE** y la **CF** presente en las NPs elaboradas. Los resultados preliminares obtenidos, en cuanto a la EE, muestran que pesar de las dificultades se trata de un proceso bastante óptimo, pues la eficiencia con la que se ha realizado el método es del **10-13% lo que correspondería con una CF% en torno al 10%**. Lo que supone un gran logro en el ámbito de la nanotecnología y la nanomedicina ya que demuestra la posibilidad de llevar a cabo la elaboración NPs altamente cargadas de un activo volátil como el β -CFN.

4.2 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE CONGELACIÓN

Para el secado y la mejora de la estabilidad de diversos agentes farmacéuticos, se lleva a cabo un proceso cada vez más utilizado conocido con el nombre de **liofilización**. No obstante, para evaluar la resistencia de los mismos primero es necesario realizar pruebas de congelación, que aseguren que el compuesto en cuestión mantiene sus propiedades originales.

Con el objetivo de mantener las condiciones de las nanopartículas en cuestión y disminuir esas tensiones, se utilizan los crioprotectores, que permiten la protección de los compuestos durante el proceso. En el presente estudio, para evaluar la resistencia de los nanosistemas a la congelación, se utilizó como **crioprotector** la **trehalosa** acompañada o no de diferentes tensioactivos.

A continuación, se resumen las diferentes condiciones experimentales ensayadas y los resultados obtenidos.

- **Criopreservación con trehalosa**

En la *Tabla 5* se pueden observar los resultados obtenidos tras la congelación de las NPs. En este caso se emplean diferentes proporciones del crioprotector empleado para la congelación, con el fin de verificar cuál de las condiciones probadas es la que mejor mantiene la estabilidad de las NPs producidas anteriormente.

Tabla 5. Resultados de tamaño tras congelación de NPs con trehalosa a diferentes proporciones (Siendo Df el diámetro final y Di el diámetro inicial)

Polímero:trehalosa	Df medio ± DE (nm)	PDI ± DE	Di - Df (%)
(1:1)	178 ± 24	0,054 ± 0,045	38 %
(1:3)	111 ± 5	0,217 ± 0,149	61 %
(1:5)	165 ± 69	0,095 ± 0,077	42 %
(1:8)	72 ± 2	0,335 ± 0,063	75 %

Tras observar los resultados obtenidos podemos concluir que en cualquiera de las condiciones probadas el tamaño de NPs disminuye con respecto al tamaño original. Para saber que las pruebas de congelación se han realizado correctamente y que por tanto, se mantiene la estabilidad de las NPs, el tamaño de estas se acepta una desviación en torno al 10% de la media. Es decir, teniendo en cuenta que el tamaño medio de las NPs previamente elaboradas rozaba los 280 nm, el tamaño tras las pruebas de congelación debe situarse entre los 252-308 nm.

Tal y como se observa en los resultados obtenidos, se puede afirmar que en ninguna de las condiciones estudiadas, donde se usa únicamente el crioprotector **trehalosa** a diferentes proporciones, el tamaño de las nanopartículas se mantiene dentro de este intervalo. De hecho, en ninguna de ellas, el diámetro consigue superar los 250 nm. Además, si ponemos el foco en el PDI, también podemos observar que existen ciertas variaciones significativas entre los lotes preparados para cada condición. El PDI debe oscilar entre 0 y 0,3 para que se considere una distribución de tamaño homogéneo.

Por consiguiente, se concluye que para la mayoría de las situaciones ensayadas el diámetro final de las NPs se desvía casi o más de aproximadamente el 50% del tamaño original. Esta variación

tan significativa de tamaño unido a las oscilaciones del valor de PDI permite afirmar que las pruebas de congelación de NPs utilizando únicamente trehalosa, no aportan resultados favorables.

- **Criopreservación con trehalosa y tensioactivos**

Dado que ninguna de las condiciones anteriores reveló buenos resultados, se decidió repetir las mismas utilizando esta vez el crioprotector trehalosa acompañado de tensioactivos, siendo estos **Pluronic® F-68** y **PVA** en diferentes proporciones basándonos en otros métodos de obtención de NPs que ha puesto a punto el grupo de investigación. En la *Tabla 6* se pueden observar los resultados obtenidos tras la congelación de nanopartículas añadiendo el crioprotector **trehalosa** y el tensioactivo seleccionado.

Tabla 6. Resultados de tamaño y PDI tras congelación de NPs con trehalosa y tensioactivos
(Siendo Df el diámetro final y Di el diámetro inicial)

CONDICIÓN DE CONGELACIÓN	Df medio ± DE (nm)	PDI ± DE	Di – Df (%)
NPs:TH:Pluronic (1:5:1,25)	136 ± 6	0,253 ± 0,045	53 %
NPs:TH:PVA (1:5:0,5)	179 ± 10	0,197 ± 0,143	37%
NPs:TH:PVA (1:5:0,1)	286 ± 38	0,237 ± 0,154	0,2 %
NPs:TH:PVA (1: 5:0,01)	352 ± 41	0,232 ± 0,215	23 %

En el primer caso, donde se utiliza **trehalosa** y **Pluronic® F-68** como tensioactivo, el diámetro de las NPs tras las prueba de congelación sigue siendo menor al esperado. De este modo, se puede concluir que esta condición tampoco cumple lo buscado.

Por su parte, en el caso del **PVA**, se han obtenido diferentes resultados en función de la proporción del mismo. Así pues, en aquellas NPs que presentan una mayor proporción de surfactante su tamaño tras la prueba de congelación ha resultado ser **menor**. Por su parte, al disminuir la concentración de tensioactivo el tamaño de la nanopartícula **aumenta**. De esta manera, a pesar de su amplio uso como surfactante en la síntesis de NPs de PLGA-PEG, las partículas preparadas con **PVA** a diferentes concentraciones presentan mejoras con respecto al tamaño frente a las NPs preparadas con **Pluronic® F-68**. En términos generales, se puede decir que el tamaño de partícula obtenido está directamente relacionado uno de los parámetros más importantes de los tensioactivos, el **HLB**. Hace tiempo se demostró que el tamaño medio de partícula disminuye cuando el valor de HLB del sistema aumenta (Bouchemal et al., 2014). Así, si tenemos en cuenta

que el **Pluronic® F-68** presenta un HLB elevado (HLB=29) en comparación con el HLB del PVA (HLB=18) los datos obtenidos tendrían sentido. Pues, según el estudio, el tamaño medio de las primeras NPs debe ser inferior al tamaño medio de las NPs que están compuestas por PVA, tal y como se cumple en este caso.

Además, como se puede observar en la *Tabla 6* el tamaño promedio de las nanopartículas poliméricas disminuye conforme se aumenta la concentración de **PVA**. Esto significa que las partículas son más estables según aumente la concentración de **PVA**, y por consiguiente que la presencia del polímero en cuestión ayuda a evitar la aglomeración de las mismas.

Por tanto, según los resultados obtenidos, se observa que la condición **NPs:TH:PVA (1:5:0,1)** a parte de cumplir con lo mencionado, también sitúa el tamaño medio de partícula en **286 ± 38 nm**. Además, el coeficiente de variación (CV) es del **0,15%**, lo que define que las diferencias de tamaño de los lotes preparados con esa condición son insignificantes. Por tanto, recordando que el tamaño óptimo tras la congelación debe situarse en torno a los 252-308 nm, se puede concluir que esta condición cumple de forma exitosa el objetivo.

4.1 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE LIOFILIZACIÓN

Tras los resultados de tamaño tan favorables obtenidos tras la congelación de NPs según la condición **NPs:TH:PVA (1:5:0,1)** se llevó a cabo el proceso de liofilización anteriormente descrito, con el objetivo de evaluar si ahora las partículas seguían manteniendo el tamaño deseado.

Para ello, tras la obtención del diámetro y PDI, también se evaluó el porcentaje de desviación respecto al tamaño medio de NPs originales recién elaboradas y el tamaño resultantes de las mismas tras el proceso de congelación según condición más favorable ya descritas. Los Eppendorf con las NPs liofilizadas se resuspendieron en 1 mL de agua Milli-Q® y tras una posterior sonicación se utilizó de nuevo el **Zetasizer Nano** para medir el tamaño y el PDI. Los resultados obtenidos pueden observarse en la *Tabla 7*.

Tabla 7. Comparación de tamaños, desviaciones de tamaño y PDI de NPs previa y posterior liofilización

COMPARATIVA	INICIAL		FINAL		Desviación Di - Df (%)
	D _{medio} ± DE (nm)	PDI ± DE	D _{medio} ± DE (nm)	PDI ± DE	
NPs cargadas recién elaboradas vs. NPs liofilizadas	2856 ± 20	0,221 ± 0,13	387 ± 105	0,5 ± 0,1	35 %
NPs congeladas vs. NPS liofilizadas	275 ± 9	0,201 ± 0,003	387 ± 105	0,5 ± 0,1	40 %

Según los resultados obtenidos, puede concluirse que las NPs liofilizadas no mantienen resultados próximos al diámetro inicial. Concretamente se aprecia una variación del **35 %** del diámetro de las partículas liofilizadas frente diámetro de las mismas recién elaboradas (previa congelación). Por otro lado, también se aprecia una porcentaje de variación bastante significativo, del **40 %** exactamente, de las partículas liofilizadas respecto a las NPs resultantes tras la congelación.

En ambos casos, los porcentajes de desviación obtenidos son elevados. Pues si recordamos que, en general, se acepta una desviación máxima del 20% respecto al diámetro original, se puede considerar que, según los resultados obtenidos, las proporciones de **NPs:trehalosa:PVA (1:5:0,1)** no han sido óptimas para llevar a cabo un proceso de liofilización de NPs de β -CFN. Esto implica por tanto, que aún hay que seguir trabajando para conseguir optimizar la formulación final.

5. CONCLUSIONES

La elaboración de este trabajo experimental se centró en el estudio preliminar de sistemas de vehiculización de fármacos, concretamente NPs cargadas con β -CFN. El objetivo principal fue crear una posible estrategia que permitiera la administración del compuesto de una manera óptima al organismo, permitiendo así que las propiedades fisicoquímicas del mismo se mantuvieran mayoritariamente intactas, pese a presentar ciertas dificultades en su manipulación por el hecho de ser una molécula volátil.

A fin de conseguir el objetivo principal, se plantearon ciertos objetivos parciales sobre los cuales se obtuvieron resultados que ayudaron a la consolidación del veredicto final. Estos se exponen a continuación.

- El método de nanoprecipitación modificada propuesto para la encapsulación de β -CFN resultó viable para la producción de NPs con un tamaño óptimo para su administración por varias vías, con un tamaño medio de 280 nm y una estrecha distribución del tamaño.
- Se ha puesto a punto un método RP-HPLC para cuantificar la cantidad de β -CFN. Según los resultados obtenidos, se obtuvieron EE% superiores al 10% lo que indica una elevada carga de fármaco en el interior de las NPs.
- Las pruebas de congelación realizadas para valorar la estabilidad de las NPs elaboradas en ciertas condiciones resultaron ser insuficientes en el caso de utilizar únicamente trehalosa como crioprotector, puesto que el tamaño inicial de las partículas no se mantenía. Lo mismo ocurre al emplear trehalosa y el tensioactivo Pluronic® F-68.
- Por su parte, la utilización de trehalosa como crioprotector acompañada, en este caso, del tensioactivo PVA a una cierta concentración determinada si dio lugar a resultados bastantes favorables que mantenían el tamaño de partícula dentro de los límites. Lo que se verificó está condición como óptima para realizar la congelación.
- Las pruebas de liofilización realizadas posteriormente a la congelación de las NPs con la condición NPs:TH:PVA (1:5:0,1) mostraron no ser suficientes puesto que el tamaño de las NPs se desviaba del inicial en más de un 20%, límite generalmente aceptado.

Si bien, es importante destacar que aunque el estudio se realizó en las mejores condiciones posibles y siguiendo todos los protocolos preestablecidos, sería necesario continuar con la investigación y realizar más ensayos que aporten resultados aún más firmes y concluyentes que permitan consolidar las bases de este trabajo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) Informe de Posicionamiento Terapéutico de cannabidiol (Epidyolex®) en el tratamiento coadyuvante del Síndrome de Lennox-Gastaut y Síndrome de Dravet. 2021. [Internet]. [Consultado en Junio 2023]. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/informa/informes-de-posicionamiento-terapeutico/informe-de-posicionamiento-terapeutico-de-cannabidiol-epidyolex-en-el-tratamiento-coadyuvante-del-sindrome-de-lennox-gastaut-y-sindrome-de-dravet/>
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMSP). Estupefacientes y Psicótrpos. Actualizado en Junio 2023 [Internet]. [Consultado en Junio 2023]. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/medicamentos-de-uso-humano/estupefacientes-y-psicotropos/>
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Autorizaciones vigentes emitidas por la AEMPS para el cultivo de plantas de Cannabis. Actualizado en Junio 2023 [Internet]. [Consultado en Junio 2023]. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/medicamentos-de-uso-humano/estupefacientes-y-psicotropos/autorizaciones-vigentes-emitidas-por-la-aemps-para-el-cultivo-de-plantas-de-cannabis/>
- Anand U, Pacchetti B, Anand P, Sodergren MH. Cannabis-based medicines and pain: a review of potential synergistic and entourage effects. *Pain Manag.* 2021; 11(4): 395-403.
- Arana X. La regulación del cannabis en Europa: informe sobre España. Instituto Vasco de Criminología (IVAC-KREI). 2019 [Internet]. [Consultado en Mayo 2023]. Disponible en: https://www.tni.org/files/publication-downloads/spain_spanish.pdf.
- Bagaría G. Cannabis: ¿de dónde venimos?. *El farmacéutico* nº597. 2021 [Internet]. [Consultado en Abril 2023]. Disponible en: <https://www.elfarmacéutico.es/uploads/s1/24/30/ef597-profesion-cannabis.pdf>
- Bedrocan. Aplicaciones del cannabis medicinal para diferentes enfermedades. 2022 [Internet]. [Consultado en Junio 2023]. Disponible en: <https://bedrocan.com/es/cannabis-medicinal/aplicaciones/>
- Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, et al. Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of Ethnopharmacology.* 2018; 227: 300-315.
- Booth JK, Bohlmann J. Terpenes in Cannabis sativa - From plant genome to humans. *Plant Science.* 2019; 284: 67-72.
- Bouchemal K, Briañon S, Perrier E, Fessi H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *Int J Pharm.* 2014 ; 280(1-2): 241–251.
- Callado LF. Cuestiones de interés en torno a los usos terapéuticos del Cannabis. Departamento de Farmacología (UPV/EHU) y Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM). 2012: 75-86.
- Cáñamo indiano-Cannabis. *Fitoterapia.net* [Internet]. [Consultado en Mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.fitoterapia.net/vademecum/plantas/canamo-indiano-cannabis.html>

- Casadiegos Mesa AF, Lastra Bello SM. Cannabis sintético: aspectos toxicológicos, usos clínicos y droga de diseño. *Rev. Fac. Med.* 2015; 63 (3): 501-510.
- Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Pr eat V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release.* 2012 ;161(2):505–22.
- Durán-Lobato M, Martín-Banderas L, Gonçalves LMD, Fernández-Arévalo M, Almeida AJ. Comparative study of chitosan- and PEG-coated lipid and PLGA nanoparticles as oral delivery systems for cannabinoids. *Journal of Nanoparticle Research.* 2015; 17(2): 61.
- El Hammadi MM, Small Howard AL, Jansen C, Fernández Arévalo M, Turner H, Martín Banderas L. Potential use for chronic pain: Poly(Ethylene Glycol)-Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) nanoparticles enhance the effects of Cannabis-Based terpenes on calcium influx in TRPV1-Expressing cells. *International Journal of Pharmaceutics.* 2022; 616: 121524.
- El-Hammadi MM, Small-Howard AL, Fernández-Arévalo M, Martín-Banderas L. Development of enhanced drug delivery vehicles for three cannabis-based terpenes using poly(lactic-co-glycolic acid) based nanoparticles. *Ind Crops Prod.* 2021;164: 113345.
- España. Proposici n de Ley de regulaci n integral del Cannabis. Sesi n plenaria n m. 237 (N m exp. 122/0028). 2023. p. 54. [Internet] [Consultado en Abril 2023]. Disponible en: [https://www.congreso.es/es/busqueda-de-publicaciones?p_p_id=publicaciones&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&publicaciones_mode=mostrarTextoIntegro&publicaciones_legislatura=XIV&publicaciones_id_texto=\(DSCD-14-PL-246.CODI.\)#\(P%C3%A1gina54\)](https://www.congreso.es/es/busqueda-de-publicaciones?p_p_id=publicaciones&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&publicaciones_mode=mostrarTextoIntegro&publicaciones_legislatura=XIV&publicaciones_id_texto=(DSCD-14-PL-246.CODI.)#(P%C3%A1gina54))
- European Medicines Agency (EMA). Epidyolex (cannabidiol). 2019 [Internet]. [Consultado en Abril 2023]. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/epidyolex>
- FDA.report. [Internet]. [Consultado en Abril 2023]. Disponible en: <https://fda.report/DailyMed/>
- Ferber SG, Namdar D, Hen-Shoval D, Eger G, Koltai H, Shoval G, et al. The “Entourage Effect”: Terpenes Coupled with Cannabinoids for the Treatment of Mood Disorders and Anxiety Disorders. *Curr Neuropharmacol.* 2020; 18(2): 87-96.
- Finlay DB, Sircombe KJ, Nimick M, Jones C, Glass M. Terpenoids From Cannabis Do Not Mediate an Entourage Effect by Acting at Cannabinoid Receptors. *Front Pharmacol.* 2020; 25; 11.
- Fraguas Sánchez AI, Fernández Carballido AM, Torres Suárez AI. Cannabinoides: Una prometedora herramienta para el desarrollo de nuevas terapias. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.* 2014; 80 (3): 555-577.
- Fundación CANNA: Investigación y análisis de Cannabis [Internet]. [Consultado en Mayo 2023]. Disponible en: <https://www.fundacion-canna.es/>
- Fundación Efecto Séquito. [Internet] [Consultado en Mayo 2023]. Disponible en: <https://fundacionefectosequito.org/>
- Hashiesh HM, Sharma C, Goyal SN, Sadek B, Jha NK, Kaabi J Al, et al. A focused review on CB2 receptor-selective pharmacological properties and therapeutic potential of β -caryophyllene, a dietary cannabinoid. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2021 ;140: 111639.
- Hulla J, Sahu S, Hayes A. Nanotechnology. *Hum Exp Toxicol.* 2015 ;34(12): 1318–1321.

- Hurgobin B, Tamiru-Oli M, Welling MT, Doblin MS, Bacic A, Whelan J, et al. Recent advances in *Cannabis sativa* genomics research. *New Phytologist*. 2021; 230(1): 73–89.
- Iannitelli A, Grande R, Stefano A Di, Giulio M Di, Sozio P, Bessa LJ, et al. Potential Antibacterial Activity of Carvacrol-Loaded Poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanoparticles against Microbial Biofilm. *Int J Mol Sci*. 2011; 12(8): 5039–5051.
- Inzunza-C G, Peña-V A. Del cannabis a los cannabinoides una perspectiva médico-científica. *Rev. Med. UAS*. 2019; 9 (2): 96-114.
- Kochen S. Cannabis Medicinal. *Salud Colectiva*. 2022; 18: e3991.
- Lechuga LM. Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud. *Biotecnología aplicada a la salud humana*. 2011. [Internet]. [Consultado en Junio 2023]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10261/44635>
- Legault J, Pichette A. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2010; 59(12) : 1643-1647.
- Martín-Banderas L, Durán-Lobato M, Holgado M^aA, Álvarez- Fuentes J, Fernández Arévalo M. *Rev Iberoam Psicol y salud*. 2013; 4 (2): 17-30.
- Nnamani PO, Hansen S, Windbergs M, Lehr CM. Development of artemether-loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation for topical application. *Int J Pharm*. 2014; 477(1–2): 208-217.
- Odieka AE, Obuzor GU, Oyedeji OO, Gondwe M, Hosu YS, Oyedeji AO. The Medicinal Natural Products of *Cannabis sativa* Linn.: A Review. *Molecules*. 2022; 27(5):1689.
- Onaivi ES, Singh Chauhan BP, Sharma V. Challenges of cannabinoid delivery: how can nanomedicine help? *Nanomedicine*. 2020; 15(21): 2023–2028.
- ONU. La comisión de Estupefacientes reclasifica el cannabis, aunque sigue considerándolo perjudicial. *Noticias ONU*. 2020 [Internet]. [Consultado en Mayo 2023]. Disponible en: <https://news.un.org/es/story/2020/12/1485022>.
- Oropesa R, Jáuregui U. Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas Nanoparticles as drug carriers : characteristics and perspectives. *CENIC Ciencias Biológicas*. 2012; 43(3).
- Panorama Actual del Medicamento. Medicamentos autorizados con cannabinoides y derivados. 2023 [Internet]. [Consultado en Junio 2023]. Disponible en: <https://www.farmacuticos.com/pam/temas/formacion-continuada/medicamentos-autorizados-con-cannabinoides-y-derivados/>
- Papaseit E, Pérez-Mañá C, Pérez-Acevedo AP, Hladun O, Torres-Moreno MC, Muga R, et al. Cannabinoids: From pot to lab. *International Journal of Medical Sciences*. 2018; 15(12):1286-1295.
- Pascual Simón J, Fernández Rodríguez B. Breve reseña sobre la farmacología de los cannabinoides. *Medisan*. 2017; 21(3): 351.
- Pazos Rodríguez MR. Moreno P. En: Ramos Atance JA, coordinador. Efectos terapéuticos de los Cannabinoides. Instituto universitario de Investigación en Neuroquímica de la Universidad Complutense de Madrid; 2017. p.7-24.

- Quintanilla D, García W, Peña-Parás L, Vidaltamayo R. Caracterización de Compuestos de Nanotubos de Haloisita y Polietilenglicol. MCNIB. 2017; 4(1): 302-306.
- Ramos A. Cannabis: ¿droga de abuso o medicina mágica? *Ars Medica. Revista de Humanidades.* 2003 ; 2 (2): 210-226.
- Rodríguez Barona S., Giraldo G., Montes L.M. Encapsulación de Alimentos Probióticos mediante Liofilización en Presencia de Prebióticos. *Información tecnológica.* 2016; 27 (6): 135-144.
- Rodríguez Carranza R. Los productos de Cannabis sativa: Situación actual y perspectivas en medicina. *Salud Mental.* 2012; 35 (3): 247-256.
- Román Vargas Y, Benjumea Gutiérrez DM, Chávez Camargo LA, Hernández Orjuela DL, Blandón Naranjo LH, Pérez Pérez LD, et al. Aplicaciones nanotecnológicas para el cannabis. En: Grupo de Toxicología y Alternativas Terapéuticas y Alimentarias. Todo lo que querías saber sobre el cannabis y no te atrevías a preguntar. Universidad de Antioquia; 2021. p. 49-52.
- Rosas JE, Pedraz JL. Microesferas de PLGA: un sistema para la liberación controlada de moléculas con actividad inmunogénica SUMMARY PLGA Microspheres: A controlled release system of molecules with immunogenic activity. *Rev Colomb Cienc Quím Farm.* 2007; 36(2): 134-153.
- Russo EB. Beyond Cannabis: Plants and the Endocannabinoid System. *Trends Pharmacol Sci.* 2016 ; 37(7): 594–605.
- Sharma C, M. Al Kaabi J, M. Nurulain S, N. Goyal S, Amjad Kamal M, Ojha S. Polypharmacological Properties and Therapeutic Potential of β -Caryophyllene: A Dietary Phytocannabinoid of Pharmaceutical Promise. *Curr Pharm Des.* 2016; 30;22(21): 3237–3264.
- Silva J, Carvalho F. El uso terapéutico del cannabis y los cannabinoides. *Revista Española de Drogodependencias.* 2022; 47 (4): 103-122.
- Surco Laos F., Tipiana R., Torres Y., Valle M., Panay J. Efectos de liofilización sobre composición química y capacidad antioxidante en pulpa de cuatro variedades de *Mangifera indica*. 2017; 83 (4): 412-419.
- Swider E, Koshkina O, Tel J, Cruz LJ, de Vries IJM, Srinivas M. Customizing poly(lactic-co-glycolic acid) particles for biomedical applications. *Acta Biomater.* 2018; 73: 38–51.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA). Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials—Guidance for Industry. 2022 [Internet]. [Consultado en Junio 2023]. Disponible en: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/drug-products-including-biological-products-contain-nanomaterials-guidance-industry>
- Villafuente R.L., García F.B., Garzón S.M.L., Hernández L.A., Vázquez R.M.L. Nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 2008; 39 (1): 1-16.
- Wang MTM, Danesh-Meyer HV. Cannabinoids and the eye. *Surv Ophthalmol.* 2021 ; 66(2): 327–45.
- Watcharadulyarat N, Rattanatayarom M, Ruangsawasdi N, Patikarnmonthon N. PEG–PLGA nanoparticles for encapsulating ciprofloxacin. *Sci Rep.* 2023; 6;13(1):266.
- WHO. WHO review of cannabis and cannabis-related substances. 2019 [Internet]. [Consultado en Mayo 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/teams/health-product-and-policy-standards/controlled-substances/who-review-of-cannabis-and-cannabis-related-substances>

World Drug Report 2022. Booklet 3 Drug market trends: Cannabis Opioids. United Nations: Office on Drug and Crime (UNODC). 2022 [Internet]. [Consultado en Mayo 2023]. Disponible en: https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/wdr-2022_booklet-3.html.

Yacasi GRR. Optimización del proceso de liofilización de sistemas nanoestructurados de flurbiprofeno para uso oftálmico y su influencia en el comportamiento biofarmacéutico. [Tesis Doctoral]. Barcelona: Universidad de Barcelona. 2017. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10803/401500>