



FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

EMPLEO DE NANOPARTÍCULAS EN TERAPIA ANTIDEPRESIVA

BELÉN CHAVES BALBONTÍN

Sevilla, 2016



FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

TRABAJO DE FIN DE GRADO
GRADO EN FARMACIA

EMPLEO DE NANOPARTÍCULAS EN TERAPIA ANTIDEPRESIVA

BELÉN CHAVES BALBONTÍN

Sevilla, julio del 2016

Tutora: Dra. Mercedes Fernández Arévalo
Profesora Titular de la Universidad de Sevilla
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

RESUMEN

RESUMEN

Actualmente existe una enorme focalización, desde los puntos de vista tecnológico e industrial, hacia el desarrollo de sistemas de administración de activos capaces de ejercer un control sobre su comportamiento fisicoquímico, en general, y biofarmacéutico, en particular. La posibilidad de desarrollar productos novedosos con relación a activos conocidos se ha convertido en una realidad de sumo interés para industrias de diferente índole, como la farmacéutica, cosmética, agroalimentaria... El hecho es que con esta opción, se aporta un elemento diferencial con ventajas innegables que redundan en la puesta en el mercado de productos novedosos, de mayor calidad y mejor precio.

En este contexto, la aportación de la nanotecnología, específicamente en lo relativo al desarrollo de sistemas nanoparticulares para activos tales como fármacos, ingredientes cosméticos o productos de interés alimentario, está resultando ser una herramienta tecnológica especialmente útil.

Teniendo en cuenta los conceptos mencionados, el objetivo principal del presente TFG ha sido desarrollar sistemas multiparticulares nanométricos de naturaleza polimérica que actúen como transportadores intranasales del fármaco antidepresivo venlafaxina.

En primer lugar, se trata de la venlafaxina (VLF) como agente terapéutico, concretamente sobre su uso antidepresivo. Por otro lado se describen las nanopartículas como sistemas de liberación controlada, teniendo en cuenta las limitaciones que presentan a la hora de una administración intranasal y las posibles modificaciones superficiales para solventar dichas limitaciones.

En segundo lugar, se lleva a cabo el desarrollo y la caracterización de diferentes sistemas nanoparticulares de PLGA y quitosano (CS) para la administración intranasal de la VLF en la terapia antidepresiva.

Por último, se trata de la preparación, caracterización y evaluación de las nanopartículas modificando su carga superficial mediante una conjugación con transferrina con fin de demostrar la actividad y selectividad de la VLF.

PALABRAS CLAVE: Nanopartículas, Venlafaxina, PLGA, CS.

INDICE

1. Introducción
 - 1.1. Barrera hematoencefálica
 - 1.2. Venlafaxina
 - 1.2.1. Estructura y propiedades de la VLF
 - 1.2.2. Limitaciones de la VLF
 - 1.3. Nanopartículas poliméricas
 - 1.3.1. Nanopartículas de PLGA
 - 1.3.1.1. Métodos de elaboración de las NPs de PLGA
 - 1.3.2. Nanopartículas de CS
 - 1.3.2.1. Métodos de elaboración de las NPs de CS
 - 1.4. Métodos de cuantificación de proteínas
 - 1.5. Conjugación con transferrina
 - 1.6. Nose-to-brain (Vía intranasal)
2. Objetivos
3. Materiales y métodos
 - 3.1. Materiales
 - 3.2. Nanoencapsulación mediante E-SEV
 - 3.3. Nanoencapsulación mediante gelificación iónica
 - 3.4. Estudio de caracterización de las nanopartículas
 - 3.5. Modificación superficial de las nanopartículas (conjugación)
4. Resultados y discusión
 - 4.1. Caracterización de las nanopartículas
 - 4.1.1. Nanopartículas de PLGA (por E-SEV)
 - 4.1.2. Nanopartículas de CS (por gelificación iónica)
 - 4.2. Eficacia de encapsulación
 - 4.3. Eficacia del proceso de conjugación con Tf
5. Conclusiones
6. Bibliografía

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura molecular de la Venlafaxina (VLF).

Figura 2: Estructura molecular del PLGA.

Figura 3: Estructura molecular del Quitosano (CS).

Figura 4: Rutas de un fármaco administrado vía intranasal.

Figura 5: Esquema de modificación superficial de nanopartículas 1.

Figura 6: Esquema de modificación superficial de nanopartículas 2.

Figura 7: Distribución de tamaños de las nanopartículas elaboradas por E-SEV.

Figura 8: Distribución de tamaños de las nanopartículas de CS.

Figura 9: Recta de calibrado para el cálculo de la eficacia de encapsulación de las nanopartículas.

Figura 10: Entrada de nanopartículas al cerebro mediante conjugación con Transferrina (Tf).

Figura 11: Recta de calibrado para el cálculo de la eficacia de conjugación con Tf.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

La barrera hematoencefálica (BHE) es una interfase dinámica entre la sangre y el cerebro formada por células endoteliales capilares cerebrales selladas con uniones estrechas continuas que protegen al cerebro de la invasión de las numerosas toxinas circulantes, así como de otras moléculas perjudiciales. Es responsable de importantes funciones como el mantenimiento del movimiento neuronal, la homeostasis de los tejidos, la regulación vasotónica, fibrinólisis y coagulación, activación y migración de células cerebrales durante procesos fisiológicos y patológicos (Alam, 2010). El problema que se presenta con esta barrera es que también limita el transporte de productos terapéuticos tales como fármacos anticancerígenos, antibióticos, etc. (Inge van Roy, 2011), pues con muy pocas excepciones, sólo moléculas lipofílicas y con peso molecular bajo podrán atravesar pasivamente la BHE (Yan y cols. 2013).

Por todo ello es necesario intensificar la investigación de las posibles formas que puedan emplearse para que los fármacos puedan alcanzar esta diana de acción y se pueda así poner en marcha tratamientos para multitud de enfermedades del SNC como depresión, esquizofrenia, epilepsia, etc.

Se pueden considerar diversas vías de administración para intentar que las moléculas activas puedan acceder al SNC atravesando la BHE. La administración intravenosa es la más utilizada en los estudios clínicos. Sin embargo, están adquiriendo una atención considerable otras vías como, por ejemplo, la vía oral, la vía inhalatoria, la vía intranasal y la vía intraventricular.

El paso a través de la BHE puede darse por distintas rutas como la difusión paracelular (para moléculas de carácter acuoso), difusión transcelular (para moléculas lipófilas), transporte activo, receptor mediado por endocitosis, endocitosis por adsorción y transporte de flujo (Bransjevic y cols. 2009).

1.2. VENLAFAXINA

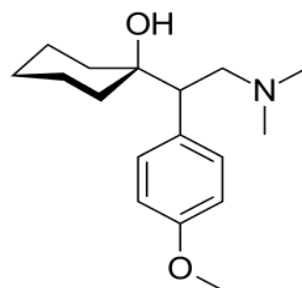
1.2.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LA VLF

La Venlafaxina (VLF) es un fármaco antidepresivo de la familia de las feniletilaminas. Su actividad consiste en inhibir la recaptación de serotonina y noradrenalina, y en menor proporción, dopamina, en la neurona presináptica, potenciando la neurotransmisión a nivel del sistema nervioso central. La Venlafaxina no tiene actividad inhibidora de la monoaminoxidasa (IMAO); es por ello que a diferencia de otros antidepresivos tricíclicos, esta molécula no tiene efectos secundarios tan importantes a nivel cardiovascular (Pacher, 2004), aunque su efecto antiplaquetario puede representar un nivel de riesgo que ha generado la restricción de su uso en algunos países (Taylor, 2010).

La dosis recomendada de Venlafaxina es de 75 mg al día en tres dosis. De ser necesario se puede incrementar hasta 150 mg/día e incluso a 225 mg/día con aumento en intervalos de 75 mg cada cuatro días (Schatzberg 2000).

Tras su consumo oral, aproximadamente el 92% de la Venlafaxina es absorbido alcanzando una biodisponibilidad absoluta del 42%; su grado de unión a proteínas plasmáticas es del 30%, y es metabolizada en el hígado siendo su principal metabolito la O-desmetilvenlafaxina, molécula con igual actividad biológica. Aproximadamente a las 48 horas el 87% de la Venlafaxina y sus metabolitos son eliminados por orina (FDA, 2005).

La VLF es un sólido cristalino blanquecino con una solubilidad de 572 mg/ml en agua. La porción insoluble se elimina con las heces. En los compuestos destinados a preparaciones de liberación prolongada su vida media es de 15 ± 6 horas (Taylor, 2010).



(Figura 1: estructura molecular de la VLF)

1.2.2. LIMITACIONES DE LA VLF

Una de las principales limitaciones para su uso en terapéutica se trata del acceso restringido que tiene la molécula para llegar a su lugar de acción, por sus propias peculiaridades fisicoquímicas y las características anatómicas propias de la BHE.

Con objeto de mejorar la eficacia terapéutica de los sistemas que posibiliten la administración de la VLF, se están estudiando portadores nanotecnológicos como sistemas de administración oral, que se postulan como una alternativa apropiada y novedosa.

Sin embargo, en el presente trabajo se propone el desarrollo de un sistema nanométrico destinado a la vía de administración intranasal, que permite pasar directamente al cerebro sin atravesar la BHE.

1.3. NANOPARTICULAS POLIMERICAS

Son sistemas coloidales de tamaño entre 10 y 1000 nm, generalmente de naturaleza polimérica. Se utilizan como portadores de fármacos en las que el principio activo está disuelto, atrapado, encapsulado, adsorbido o fijado a la partícula (Kreuter, 2007).

En el campo de los sistemas de liberación de fármacos, la nanotecnología permite la vectorización de principios activos a nivel de órganos, tejidos o células sobre los que ejercen su acción mediante la utilización de transportadores. Estos sistemas transportadores deben garantizar el direccionamiento del fármaco al lugar que lo necesite y en la cantidad adecuada (Singh y Lillard, 2009). Además, deben cumplir con ciertas características, como lo son una baja toxicidad, propiedades óptimas para el transporte y liberación del fármaco y una larga vida media en el organismo (Barratt, 2000).

Una ventaja que ofrece este tipo de dispositivos es el evidente aumento de la efectividad del medicamento por medio del control preciso de la dosis requerida, del tamaño, la morfología y las propiedades superficiales. Al liberarse el activo desde las nanopartículas de forma específica sólo en órganos, tejidos o células que lo necesiten, se disminuye la toxicidad asociada al fármaco (Kawasaki y Player, 2005).

Las nanopartículas representan sistemas de administración de fármacos adecuados para la mayoría de las vías de administración, incluyendo los inyectables (Igarashi, 2008). Además, se consigue una mejoría notable en la administración de fármacos lipófilos, proteínas, péptidos y genes por vía oral (Hillareau y cols., 2006; Bhavsar y Amiji, 2007; Yoncheva y cols., 2007), así como también en el suministro de fármacos que se dirigen a determinados órganos y tejidos como portadores de ADN en terapia génica.

Además, desde un punto de vista tecnológico ofrecen ventajas interesantes, como las indicadas a continuación:

- Alta estabilidad
- Capacidad de transportar una alta carga del fármaco
- Capacidad de incorporación de sustancias tanto hidrófilas como hidrófobas
- Propiedades de liberación controlada.

Estas ventajas permiten mejoras en la biodisponibilidad del fármaco, modificación de los perfiles farmacocinéticos y especificidad de acción y penetración intracelular de fármacos macromoleculares.

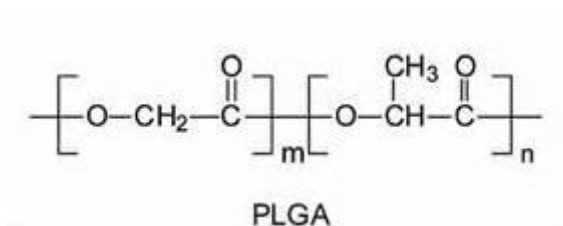
1.3.1. NANOPARTÍCULAS DE PLGA

El PLGA o ácido poli-(láctico-co-glicólico) es uno de los polímeros sintéticos desarrollados utilizado con más éxito en una gran cantidad de dispositivos terapéuticos (Pavot, 2014). Esto es debido a sus atractivas propiedades, algunas de las cuales se indican a continuación:

- Biodegradabilidad y biocompatibilidad
- Polímero aprobado por parte de la FDA y la EMA para sistemas de administración de fármacos por vía parenteral
- Capacidad de dar lugar a formulaciones bien definidas y métodos de elaboración adaptados a diversos tipos de fármacos
- Capacidad de protección del fármaco frente a la degradación

- Liberación sostenida del principio activo
- Posibilidad de modificar las propiedades superficiales para proporcionar una mejor interacción con los materiales biológicos
- Posibilidad de direccionar las nanopartículas a los órganos o células específicas (Danhier y cols., 2012).

Su estructura se muestra en la siguiente imagen:



(Figura 2: estructura molecular del PLGA)

Definitivamente, las nanopartículas de PLGA constituyen una gran oportunidad para la administración tanto oral como intranasal de fármacos que presentan condiciones desfavorables derivadas de sus propiedades fisicoquímicas inadecuadas para la absorción, problemas de estabilidad o solubilidad, etc. (Kagan y Hoffman, 2008). Su tamaño nanométrico y la enorme área superficial derivada de ello favorecen su absorción, y su propio diseño determina su farmacocinética.

1.3.1.1. MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLGA

Están producidas principalmente por técnicas de emulsión simple (E-SEV) o doble emulsión (DE-SEV) seguido por evaporación del disolvente.

La encapsulación del fármaco, el tamaño de partícula, los posibles aditivos añadidos durante la formulación, el peso molecular, o la tensión superficial son parámetros que pueden influir en las características de liberación (Raghavendra y cols., 2007).

Para el presente trabajo, se empleará la técnica E-SEV, que se detallará más adelante.

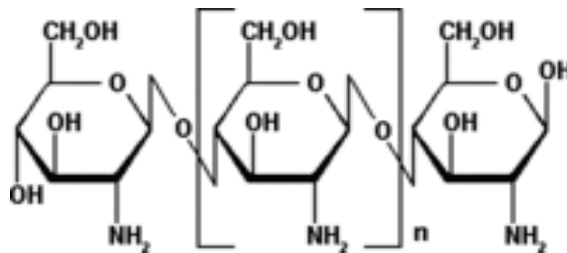
1.3.2. NANOPARTÍCULAS DE CS

El quitosano es un polímero natural que se obtiene a partir de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza. La quitina y el quitosano son biopolímeros que en los últimos años han encontrado gran cantidad de aplicaciones, especialmente en la industria alimentaria y en la biotecnológica.

Se trata de un compuesto muy estudiado en la industria farmacéutica por su potencial en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos, pues constituye un vehículo para la encapsulación del fármaco, protegiéndolo y liberándolo de forma controlada, además de promover su absorción a través del epitelio.

Así mismo, el quitosano presenta propiedades necesarias para su uso en dicha industria, como son su biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad.

Su estructura se muestra en la siguiente imagen:



(Figura 3: estructura molecular del CS)

1.3.2.1. MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE CS

Las nanopartículas de CS están elaboradas por la técnica de gelificación iónica, que consiste básicamente en la mezcla de dos fases acuosas a temperatura ambiente (Abeer y cols., 2010).

Será detallado más adelante.

1.4. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS

Para cuantificar la cantidad de proteína encapsulada en los sistemas multiparticulados, existen muchos métodos: electroforesis, HPLC, western-blot, etc. (Walker, 2002).

En el presente trabajo se ha optado por métodos basados en la absorbancia que presentan las biomoléculas empleadas cuando se les añade el reactivo específico. Los principales son: Bradford, Lowry y microBCA.

1.5. CONJUGACIÓN CON TRANSFERRINA

Una de las estrategias que existen para el direccionamiento de activos (*targeting*), es la modificación superficial de las partículas mediante un ligando determinado que llega de manera eficiente y muy selectiva a las células diana, gracias a la presencia de receptores específicos, y penetra posteriormente en ellas por un proceso mediado generalmente por endocitosis (Pei-Hiu Yang y cols., 2005).

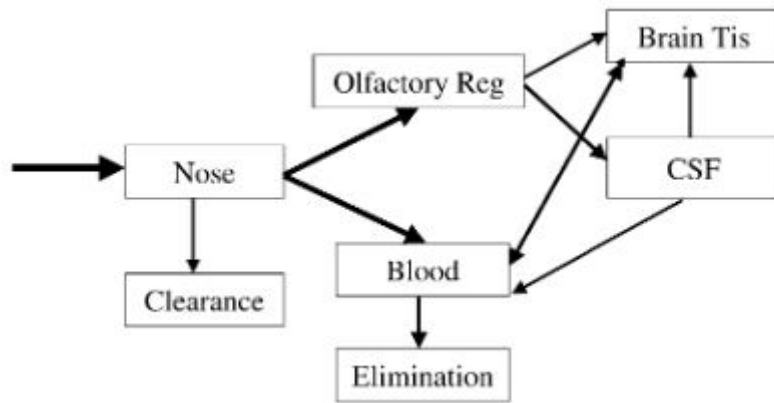
La transferrina (Tf) es una molécula hidrofílica que controla los niveles de hierro extracelular en los fluidos corporales. Se trata de una beta-glicoproteína que contiene una cadena de 698 aminoácidos (Kuo y cols., 2011).

El receptor de transferrina (TfR) es una proteína trans- membranar que se encuentra en los glóbulos rojos, células tiroideas, hepatocitos, células intestinales, monocitos y, sobre todo, en el cerebro (Li y cols., 2002).

1.6. NOSE-TO-BRAIN (VÍA INTRANASAL)

La vía de administración intranasal no es un nuevo enfoque para la administración de fármacos en circulación sistémica. La novedad radica en el uso de este método no invasivo para la rápida entrada de fármacos al cerebro, todo ello con el objetivo de tratar trastornos del SNC y reducir al mínimo la exposición sistémica (Dhuria y cols., 2010).

Las diferentes rutas por las que un fármaco administrado por vía intranasal puede alcanzar el LCR y el cerebro se muestran en la siguiente imagen:



(Figura 4: rutas de un fármaco administrado vía intranasal. Illum y cols., 2000)

Cuando los fármacos se administran por esta vía, lo normal es que se elimine rápidamente por el sistema de depuración muco-ciliar (Illum y cols, 2000). También podría pasar a sangre, lo que lo llevaría directamente a la circulación sistémica y sería eliminado por los sistemas de depuración normal (Hussain y cols, 1999). El fármaco puede llegar al cerebro por el torrente sanguíneo, pero puede ser también eliminado del LCR por la sangre. Por otro lado, puede ser absorbido en la nariz en la zona olfatoria (por el nervio trigémino olfatorio) y posiblemente entrar en el cerebro sin ser eliminado por la sangre u otras barreras (Sakane y cols, 2001).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

En el presente trabajo se establece el siguiente objetivo general:

Elaboración de sistemas poliméricos nanoparticulares destinados a una administración intranasal, para la terapia antidepresiva de venlafaxina.

Para llevar a cabo este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos parciales:

1. Poner a punto y validar el método analítico empleado en la elaboración de las nanopartículas de PLGA.
2. Poner a punto y validar el método analítico empleado en la elaboración de las nanopartículas de CS.
3. Asegurar la homogeneidad de los sistemas nanoparticulares con un control del tamaño y de la carga superficial adecuados.
4. Conseguir una elevada eficacia de encapsulación de la VLF.
5. Modificar las características de superficie de las nanopartículas optimizadas con el fin de mejorar la biodisponibilidad intranasal de la VLF encapsulada.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

Venlafaxina HCl Medichem. Copolímero de ácido láctico y glicólico (PLGA) (Resomer RG 504 H; Boehringer Ingelheim, Alemania).

El alcohol polivinílico (PVA), el quitosano (CS), el TPP (Sodium triphosphate) y la transferrina (Tf) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Alemania).

Todos los solventes empleados fueron de calidad HPLC (La Chrom): acetonitrilo, diclorometano y acetato de etilo (VWR).

La producción de nanopartículas por el método E-SEV se llevó a cabo con el Polytron PT 2500 E.

La producción de las nanopartículas por el método de gelificación iónica se llevó a cabo con la bomba de jeringa Harvard apparatus 11Plus.

Para la medida de tamaño y carga superficial de las nanopartículas se empleó el Malvern Zetasizer3000 Nano Series (Nano-ZS90).

Otros aparatos empleados fueron la Eppendorf Centrifuge 5804 R y el Liofilizador TelstarCryodos.

Para la conjugación con Tf se empleó EDC (hidrochloride Biochemica) AppliChem Panreac, NHS (N-Hydroxysuccinimide) Sigma-Aldrich y el kit de reactivos Pierce BCA Protein Assay Kit Thermo Scientific.

3.2. NANOENCAPSULACIÓN MEDIANTE E-SEV

La producción de nanopartículas por el método de simple emulsión (E-SEV) con evaporación del disolvente consta de dos fases:

1. Una fase oleosa (O) que contiene una solución de polímero PLGA en acetato de etilo (AE) al 4% p/v.
2. Una fase acuosa (W) que contiene una solución acuosa de 10 mL de PVA en agua miliQ con concentración 0.5% p/v filtrada por filtro de 0.45µm + el fármaco (VLF).

El procedimiento a seguir es el siguiente:

- 1) 10 mL de la disolución W previamente preparada y filtrada se coloca en tubo de centrífuga de 50 mL.
- 2) Disolver el fármaco mediante sonicación.
- 3) Colocar la fase W en el Polytron para emulsionarla con la O haciendo gotear la O sobre la W.
- 4) Homogenizar durante aproximadamente 45 segundos/1 minuto a una velocidad de 24000 rpp.
- 5) Bajar la velocidad y apagar el Polytron.
- 6) Traspasar de inmediato la emulsión a un vaso de precipitados de 50 mL con mosca pequeña y colocarlo en el agitador magnético.
- 7) Mantener en agitación durante unas 4 horas a temperatura ambiente, hasta completa evaporación del acetato de etilo.
- 8) Tras esto se mide el tamaño de las nanopartículas y el potencial zeta y se recuperan las partículas mediante ultracentrifugación a 4 °C.
- 9) Finalmente, las nanopartículas se liofilizan.

Se realizan lotes por triplicado con diferentes concentraciones de VLF, al 20, 25 y 30% p/p.

3.3. NANOENCAPSULACIÓN MEDIANTE GELIFICACIÓN IÓNICA

El proceso de gelificación iónica es extremadamente suave y consiste en la mezcla de dos fases acuosas a temperatura ambiente:

- Fase 1: contiene 10mL de disolución de CS en ácido acético al 2% v/v (pH 3.5) al que se añadirá el fármaco en proporción 1:1.
- Fase 2: se trata de una disolución de TPP a una concentración de 2 mg/mL

El procedimiento es el siguiente:

- 1) Filtrar ambas disoluciones con filtro de 0.45 μm .
- 2) Dejar gotear 4mL de la disolución de TPP sobre 10 mL de la disolución de CS (en la que va incorporada la VLF) en bomba de jeringa con aguja amarilla.
- 3) Dejar agitando unos 30-35 minutos.
- 4) Medir el tamaño y el potencial zeta de las nanopartículas.
- 5) Recuperar las partículas mediante ultracentrifugación a 10 °C durante 40-45 minutos.
- 6) Liofilizar.

3.4. ESTUDIO DE CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

El diámetro medio de las nanopartículas elaboradas por los dos métodos desarrollados se determinó mediante *light scattering* (Malvern ZetaSizer 3000). Para ello, como se ha indicado con anterioridad, debe finalizar la evaporación del disolvente, y a continuación se procede a determinar por un lado el tamaño de las partículas y por otro lado el índice de polidispersión (IP).

El control de ambos parámetros resulta esencial a la hora de controlar la liberación de los activos.

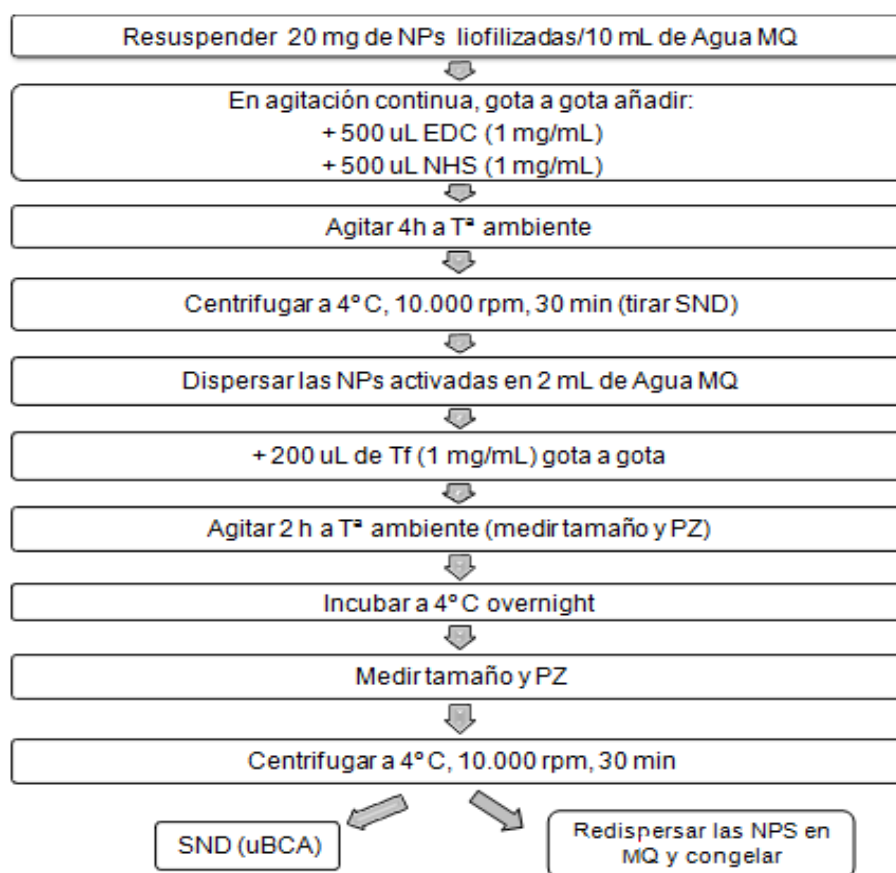
La carga eléctrica superficial de las nanopartículas se determinó midiendo el potencial zeta (PZ) con el mismo ZetaSizer. Esta medida proporciona un valor del potencial electrostático de la superficie de la partícula, y es de gran interés cuando se pretenden estudiar comportamientos como la sedimentación, filtración, interacción con membranas, etc.

3.5. MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE LAS NANOPARTÍCULAS (CONJUGACIÓN)

Una vez liofilizadas las nanopartículas se lleva a cabo el proceso de conjugación con un ligando específico, que en nuestro caso es la transferrina (Tf), con el fin de vehicular la VLF al órgano diana, es decir, al cerebro.

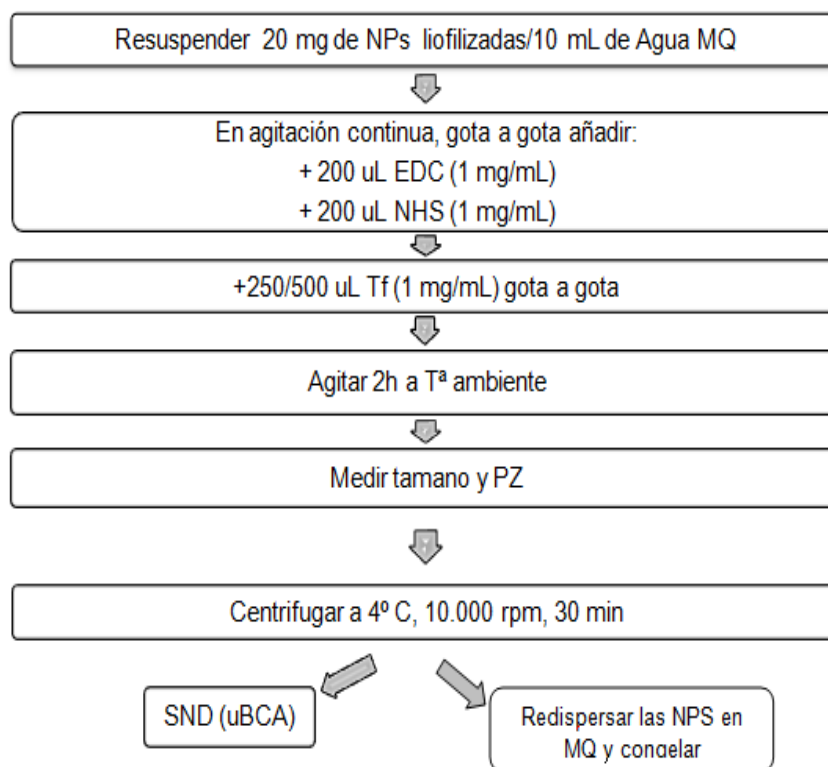
Para ello las nanopartículas deben activarse previamente, por uno de los dos métodos cuyos protocolos se muestran a continuación:

Método 1:



(Figura 5: esquema modificación superficial de NPs 1)

Método 2:



(Figura 6: esquema modificación superficial de NPs 2)

En ambos casos, tras la centrifugación se recogen las nanopartículas, recuperando el sobrenadante del primer lavado para poder cuantificar la cantidad de ligando que no se ha unido, y poder calcular así de forma indirecta la eficacia del proceso de conjugación. Para ello se ha usado el método micro-BCA (Thermoscientific) (Kuo y cols., 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

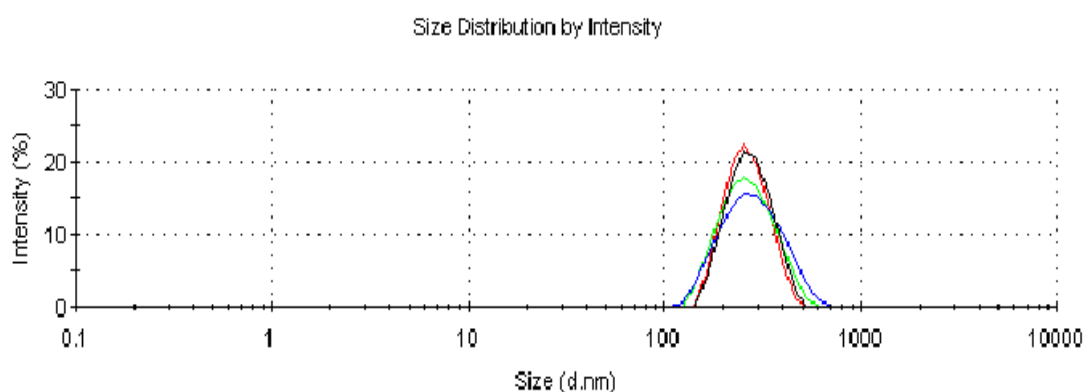
Como se han elaborado dos tipos diferentes de nanopartículas (cada una por un método), se procede a su análisis por separado.

4.1.1. NANOPARTÍCULAS DE PLGA (elaboradas por el método E-SEV)

Una vez producidas las nanopartículas de PLGA por el método E-SEV se llevó a cabo su caracterización. Se analizaron utilizando el Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments) para medir tamaño y potencial Z.

El tamaño experimental obtenido fue de $253,024 \pm 13.114$ nm con un PDI (índice de polidispersión) medio de 0.043 ± 0.021 nm.

Valores de PDI mayores a 0,4 nm indican heterogeneidad, por tanto podemos concluir que nuestros valores suponen homogeneidad en el sistema nanoparticulado, y que los valores de tamaño son ideales para que lleguen a su lugar de acción.



(Figura 7: distribución de tamaños de las NPs elaboradas por E-SEV)

El potencial zeta es una medida de la carga superficial, por lo tanto es un parámetro indicativo de las posibles interacciones entre partículas y de su estabilidad en suspensión. Es a esta escala nanométrica donde las interacciones

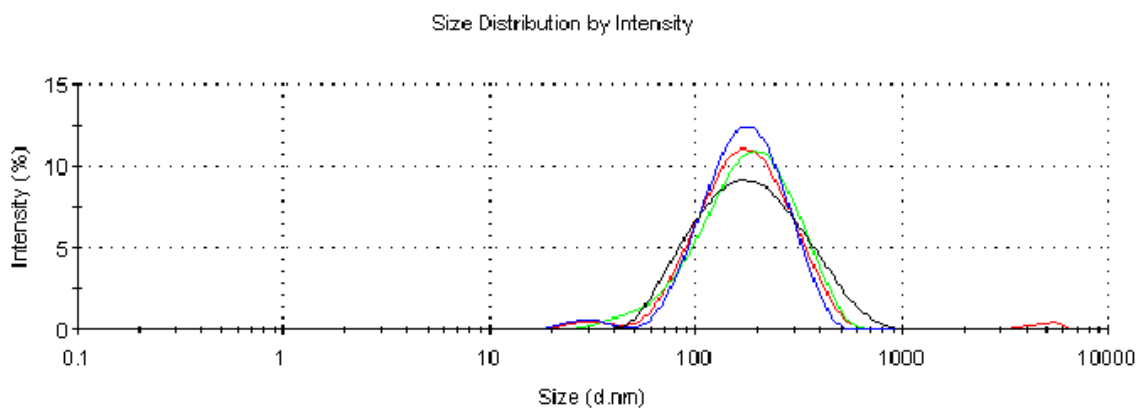
entre partículas pueden alcanzar máxima intensidad, y por ello el interés en controlar estos valores de PZ.

El potencial Z en este tipo de NPs debe salir negativo, ya que los grupos terminales del PLGA tienen carga superficial negativa. El resultado medio obtenido fue de $-3,267 \pm 0,309$ mV.

4.1.2. NANOPARTÍCULAS DE CS (elaboradas por gelificación iónica)

Tras elaborar las nanopartículas de CS por el método de gelificación iónica se llevó a cabo igualmente su caracterización por el Zetasizer midiendo de nuevo tamaño y PZ.

El tamaño medio obtenido fue de $166,333 \pm 7,661$ nm con un PDI medio de $0,081 \pm 0,031$ nm, por lo que podemos volver a concluir que el sistema nanoparticulado es homogéneo y que no habrá problema para llegar al lugar de acción, pues el tamaño es correcto.



(Figura 8: distribución de tamaños de las NPs de CS)

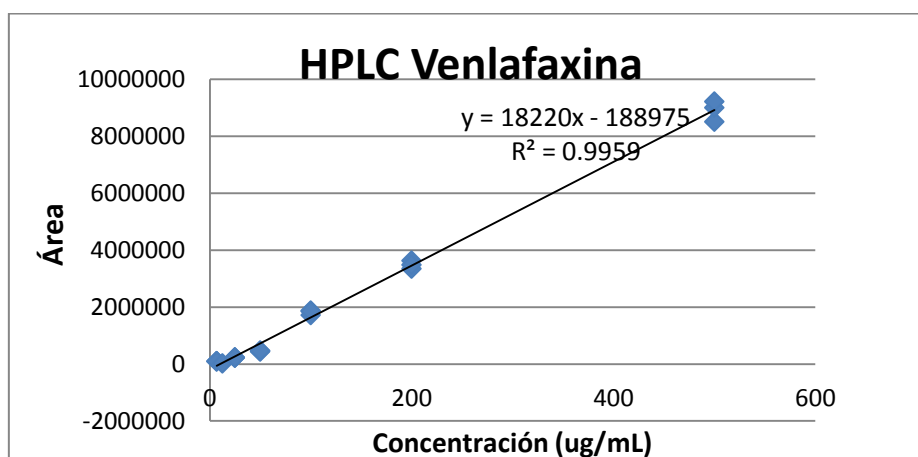
En cuanto al potencial Z ideal, debe rondar en torno a los +30 mV. En este caso es positivo debido a que los grupos terminales de CS tienen carga superficial +.

El potencial Z medio que se obtuvo fue de $+23,116 \pm 3,68$ mV, por lo que podemos concluir que es un valor muy próximo al potencial Z ideal.

4.2. EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN

Para el cálculo de la eficacia de encapsulación, tras liofilizar las nanopartículas se cuantifica de manera indirecta la cantidad de fármaco encapsulado, es decir, midiendo la cantidad de fármaco presente en el sobrenadante. Para ello utilizamos el HPLC La Chrom (VWR).

Construyendo una recta de calibrado cuyos valores son conocidos se extrapola la concentración para así hallar la cantidad:



(Figura 9: recta de calibrado para el cálculo de la eficacia de encapsulación de las NPs)

La eficacia en encapsulación se define como el principio de activo encapsulado en relación en la cantidad inicial:

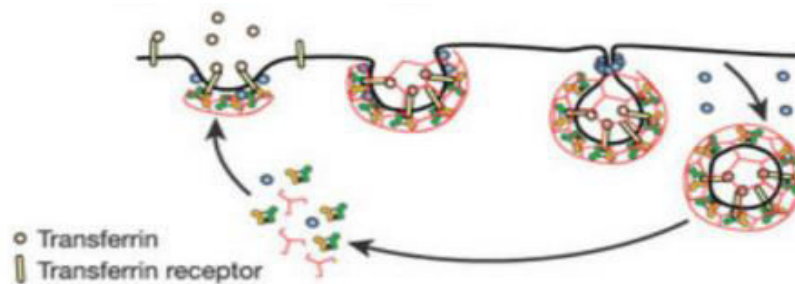
$$EE (\%) = \frac{Q_{exp}}{Q_i} \times 100$$

Con las nanopartículas de CS elaboradas por el método de gelificación iónica, la encapsulación fue prácticamente nula. Esto puede ser debido a que el polímero (CS) no ha interactuado de forma adecuada con el fármaco, y por tanto no se ha creado la unión necesaria para que se encapsule el activo. De este modo, concluimos que el CS no se adapta a las necesidades que buscamos.

En cuanto a las nanopartículas de PLGA elaboradas por la técnica E-SEV, se obtuvo una encapsulación media del $65,501 \pm 2,65$ %, constituyendo pues, una eficacia de encapsulación ideal.

4.3. EFICACIA DEL PROCESO DE CONJUGACIÓN CON TRANSFERRINA

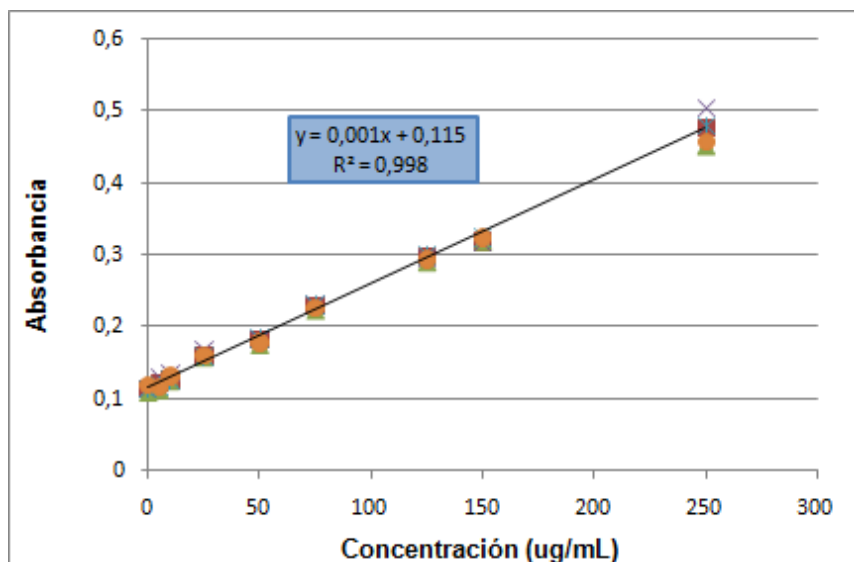
Las nanopartículas conjugadas con ligando específico, atraviesan la barrera hematoencefálica por un proceso mediado por endocitosis, según se muestra en la siguiente imagen:



(Figura 10: entrada de NPs al cerebro mediante conjugación con Tf. Illum 2000)

En el presente trabajo, como ya se ha comentado, se ha escogido como ligando específico a la transferrina (Tf) para atravesar la BHE, ya que esta está sobreexpresada en el cerebro, lo que supone una gran ventaja. Para calcular la cantidad de Tf unida a la nanopartícula se opta por el método micro-BCA, calculando de forma indirecta la eficacia de conjugación, ya que se cuantifica la cantidad de Tf no unida, es decir, la cantidad presente en el sobrenadante.

Para ello se construyó una recta de calibrado cuyos resultados se muestran a continuación:



(Figura 11: recta de calibrado para el cálculo de la eficacia de conjugación con Tf)

Como se cita anteriormente, la cuantificación de la conjugación con Tf se realiza por el método microBCA, obteniéndose una conjugación media del $57,49 \pm 3,77$ % de Tf, lo que supone un resultado aceptable.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Como se indicó previamente, el objetivo general del presente trabajo ha sido obtener **sistemas nanoparticulares de naturaleza polimérica, conteniendo el fármaco (VLF), destinados a una potencial administración intranasal para su aplicación terapéutica.**

Las conclusiones se exponen a continuación:

1. Tras elaborar las nanopartículas por dos técnicas diferentes, se optó por continuar con las nanopartículas de PLGA elaboradas por el método E-SEV, pues las condiciones de producción propuestas para las nanopartículas de CS (método de gelificación iónica) no resultaron ser adecuadas al no proporcionar resultados de encapsulación correctos.
2. El método E-SEV ha resultado ser preciso, lineal y fiable para la nanoencapsulación de VLF en las condiciones ensayadas en este trabajo.
3. En cuanto a la caracterización de los sistemas desarrollados, se han obtenido poblaciones homogéneas, monodispersas y del tamaño nanométrico pretendido, lo que es esencial para que lleguen a su lugar de acción.
4. Se han conseguido eficacias de encapsulaciones elevadas, superiores al 65%.
5. Se han modificado las propiedades de superficie de las nanopartículas de PLGA mediante conjugación con transferrina, reduciendo tanto la hidrofobicidad como la carga superficial negativa de los sistemas originales, dando lugar a sistemas nanoparticulares con mejores condiciones fisicoquímicas.
6. Con los datos anteriores, podemos concluir que existe compatibilidad fisicoquímica entre la VLF y el resto de componentes de las formulaciones, y que el método E-SEV empleado para la síntesis de las nanopartículas permite generar sistemas nanométricos que podrían ser adecuados para alcanzar el objetivo general propuesto.

A modo resumen, se puede concluir que las nanopartículas de PLGA diseñadas y elaboradas por el método E-SEV para el direccionamiento selectivo de la venlafaxina pueden constituir una estrategia novedosa en la terapia antidepresiva al presentar propiedades adecuadas para una eficaz administración intranasal.

Lógicamente, debería continuarse con la investigación para determinar la potencialidad de este nanosistema.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

Abeer, M., Al-Ghananeem, Saeed, H., Florence, R., Robert, A., Yokel, H. y cols. *Intranasal drug delivery of didanosine-loaded chitosan nanoparticles for brain targeting; an attractive route against infections caused by aids viruses.* J Drug Target. **2010**; 18(5): 381-388.

Alam, M.I., Sarwar, B., Abdus, S., Sanjula, B., Kanchan, K., Javed, A., Alka, A., Aknar, M. *Strategy for effective brain drug delivery.* Eur J Pharm Sci. **2010**; 40(5): 385-403.

Barrat, G.M. *Therapeutic applications of colloidal drug carriers.* Pharm Sci Technolo Today. **2000**; 3(5): 163-171.

Bhavsar, M.D., Amiji, M.M. *Polymeric nano- and microparticle technologies for oral gene delivery.* Expert Opin Drug Deliv. **2007**; 4(3): 197-213.

Brasnjevic, I., Harry W., Steinbusch, M., Schmitz, C., Martinez, P. *Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier.* Prog Neurobiol. **2009**; 87(4): 212-251.

Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J.M., Coco, R., Breton, A.L., Pr eat, V. *PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications.* J Control Release. **2012**; 161(2): 505-522.

Dhuria, S.V., Hanson, L.R., Frey, W.H. *Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations.* J Pharm Sci. **2010**; 99(4): 1654-1673.

Hillareau, H., Nedjma, T., Bertrand, J.R., Tamaddon, A., Elhamesh, H., Malvy, C., y cols. *Efficacy of siRNA nanocapsules targeted against the EWS-Fli1 oncogene in Ewing sarcoma.* Pharm Res. **2006**; 23(5): 892-900.

Hussain, I., Powell, D., Howlett, D.R., Tew, D.G., Meek, T.D., Chapmen, C., y cols. *Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase.* Mol Cell Neurosci. **1999**; 14(6): 419-427.

Igarashi, E. Factors *affecting toxicity and efficacy of polymeric nanomedicines*. *Toxicol Appl Pharmacol.* **2008**; 229(1): 121-134.

Illum, L. *Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system*. *Eur J Pharm Sci.* **2000**; 11(1): 1-18.

Inge van Rooy. *Targeted liposomes for drug delivery across the blood-brain barrier*. 1^a ed. The Netherlands: Utrecht University; **2011**.

Kagan, L., Hoffman, A. *Systems for region selective drug delivery in the gastrointestinal tract: biopharmaceutical considerations*. *Expert Opin Drug Deliv.* **2008**; 5(6): 681-692.

Kawasaki, E.S., Player, A. *Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer*. *Nanomedicine.* **2005**; 1(2): 101-109.

Kreuter, J. *Nanoparticles, a historical perspective*. *Int J Pharm.* **2007**; 331(1): 1-10.

Kuo, A.J., Cheung, P., Chen, K., Zee, B.M., Kioi, M., Xi, Y., y cols. *NSD2 links dimethylation of histone H3 at lysine 36 to oncogenic programming*. *Mol Cell.* **2011**; 44(4): 609-620.

Li, H., Ming, Z., Hongzhe, S., Kwokping, H. *Targeted Drug Delivery via the Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis Pathway*. *Pharmacol Rev.* **2002**; 54(4): 561-587.

Musumeci, T., Pellitteri, R., Spatuzza, M., Puglisi, G. *Nose-to-brain Delivery: Evaluation of Polymeric Nanoparticles on Olfactory Ensheathing Cells Uptake*. *J Pharm Sci.* **2014**; 103(2): 628-635.

Naimat, K.B., Fazil, M., Quamrul, H., Haider, R., Bharti G., Jasjeet K., y cols. *Brain delivery of buspirone hydrochloride chitosan nanoparticles for the treatment of general anxiety disorder*. *Int J Biol Macromol.* **2015**; 81: 49-59.

Pacher, P., Kecskemeti, V. *Cardiovascular side effects of new antidepressants and antipsychotics: new drugs, old concerns?*. **2014**; 10(20): 2463-2475.

Pavot, V., Berthet, M., Rességuier, J., Legaz, S., Handké, N., Gilbert, SC., Paul, S., Verrier, B. *Poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery*. *Nanomedicine (Lond)*. **2014**; 9(17): 2703–18.

Pei-Hui, Y., Xuesong, S., Jen-Fu, C., Hongzhe, S., Qing-Yu, H. *Transferrin-Mediated Gold Nanoparticle Cellular Uptake*. *Bioconjug Chem*. **2005**; 16(3): 494-496.

Raghavedra, C., Mundargi, V., Ramesh, B., Vidhya, R., Pradip, P., Tejraj, M. *Nano/micro technologies for delivering macromoleculer therapeutics using poly (D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives*. *J Control Release*. **2008**; 125(3): 193-209.

Samadi, N., Abbadessa, A., Di Stefano, A., van Nostrum, C. F., Vermonden, T., Rahimian, S., y cols. *The effect of lauryl capping group on protein release and degradation of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) particles*. *J Control Release*. **2013**; 172(2): 436–443.

Schatzberg, A.F., Kraemer, H.C. *Use of placebo control groups in evaluating of treatment of unipolar major depression*. *Biol Psychiatry*. **2000**; 47(8): 736-744.

Seju, U., Kumar, A., Sawant, K.K. *Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: In vitro and in vivo studies*. *Acta Biomater*. **2011**; 7(12): 4169-4176.

Singh, R., Lillard, J.W. *Nanoparticle-based targeted drug delivery*. *Exp Mol Pathol*. **2009**; 86(3): 215-223.

Taylor, D. *Venlafaxine and cardiovascular toxicity*. *BMJ*. **2010**; 340-411.

Yan, J., Enge, M., Dave, K., Liu, J., Sur, I., Jolma, A., y cols. *Transcription factor binding in human cells occurs in dense clusters formed around cohesin anchor sites*. *Cell*. **2013**; 154(4): 801-813.

Yoncheva, K., Guembe, L., Campanero, M.A., Irache, J.M. *Evaluation of bioadhesive potential and intestinal transport of pegylated poly(anhydride) nanoparticles*. *Int Jour Pharm*. **2007**; 334(2): 156-165.