

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN**

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



Trabajo Fin de Grado

**NANOPARTÍCULAS SÓLIDO-LIPÍDICAS
PARA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS
(Solid lipid nanoparticles for drug delivery)**

Para acceder al Título de

Graduado/a en Ingeniería Química

Autor: Ángela Martínez Ruiz



TÍTULO	Nanopartículas sólido-lipídicas para liberación de fármacos		
AUTOR	Ángela Martínez Ruiz		
DIRECTOR/CODIRECTOR	Rosa Martín Rodríguez / Ana Carmen Perdigón Aller		
TITULACIÓN	Grado en Ingeniería Química	FECHA	09/09/2024

PLABRAS CLAVE

Nanopartículas sólido-lipídicas (SLNP), Fármaco, Síntesis, Microscopio electrónico de transmisión (TEM), Dispersión de luz dinámica (DLS), Absorbancia UV-visible, Fluorescencia, *Delamanid*, *Doxorrubicina*, *Paclitaxel*

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La nanotecnología es un campo multidisciplinar que combina conocimientos de ciencia e ingeniería para la creación de materiales y sistemas a escala nanométrica. A esta escala, las propiedades físicas y químicas de los materiales difieren significativamente de la macroscópica, lo que permite aplicaciones novedosas. En particular, en el ámbito de la biomedicina, sus principales aplicaciones son en diagnóstico y terapia. La administración de fármacos enfrenta numerosos desafíos, ya que las moléculas de los medicamentos se ven sometidas a condiciones adversas en el organismo tras su administración. En este Trabajo de Fin de Grado se lleva a cabo el diseño, síntesis y caracterización de nanopartículas sólido-lipídicas cargadas con diferentes fármacos de interés, como son el *Delamanid*, *Doxorrubicina* y *Paclitaxel*, con el fin de mejorar sus propiedades farmacéuticas y su potencial aplicación en biomedicina.

RESULTADOS

En este TFG se aborda la síntesis y caracterización de nanopartículas sólido-lipídicas (SLNP) así como su aplicación para la liberación de fármacos. Tras la optimización del procedimiento de síntesis de las SLNP, se presentan a continuación los resultados más relevantes para cada fármaco estudiado.

En primer lugar, como prueba de concepto, se realizaron cinco síntesis de SLNP incorporando el fármaco *Delamanid*. Las nanopartículas obtenidas presentaron un tamaño promedio de 100-200 nm, con un índice de polidispersidad favorable, indicando una distribución de tamaño homogénea. Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) confirmaron que las nanopartículas eran esféricas y contenían nanopartículas de hierro en su interior. La estabilidad de las nanopartículas disminuyó con el tiempo, observándose un aumento en el tamaño y la polidispersidad después de 15 días.

Por su parte, en segundo lugar, con el fármaco *Doxorrubicina* se llevaron a cabo tres síntesis utilizando diferentes concentraciones de *Doxorrubicina* en etanol. La mejor síntesis fue la que utilizó una dilución de 1:100. Las medidas de dispersión de luz

dinámica (DLS) mostraron un tamaño promedio de partículas de aproximadamente 147 nm y un índice de polidispersidad favorable, sugiriendo una buena estabilidad y uniformidad. Las imágenes TEM confirmaron la forma esférica de las nanopartículas. Sin embargo, la eficiencia de encapsulación de *Doxorrubicina* fue baja (menos del 10%), lo que indica que la mayoría del fármaco no fue encapsulado eficientemente.

Por último, se realizó una única síntesis con el fármaco *Paclitaxel*, obteniéndose una sola población de nanopartículas con un tamaño promedio de 140 nm y un índice de polidispersidad bajo, lo que indica una distribución de tamaño homogénea. La eficiencia de encapsulación medida por absorbancia UV-visible fue moderada (en torno al 40%), lo que sugiere que el proceso de encapsulación podría mejorarse.

CONCLUSIONES

En este apartado se resumirán los hallazgos principales de la investigación sobre la síntesis de nanopartículas sólido-lipídicas (SLNP) para la liberación de tres fármacos: ***Delamanid***, ***Doxorrubicina*** y ***Paclitaxel***.

En el caso de la síntesis de SLNP con ***Delamanid***, se muestra una morfología esférica estable y un tamaño adecuado para la administración de fármacos; sin embargo, se observa una pérdida de estabilidad con el tiempo, probablemente por agregación de las partículas.

En el caso de la ***Doxorrubicina***, aunque se logró una distribución de tamaño homogénea, la eficiencia de encapsulación fue baja, lo que limita su eficacia terapéutica.

Por último, las nanopartículas sólido-lipídicas con ***Paclitaxel*** presentaron una síntesis controlada, pero la eficiencia de encapsulación moderada sugiere que es necesario ajustar el método para mejorar la cantidad de fármaco encapsulado.

De manera general, se puede concluir que, aunque se lograron sintetizar SLNP con propiedades físicas adecuadas (tamaño y morfología), la eficiencia de encapsulación de los fármacos ***Doxorrubicina*** y ***Paclitaxel*** fue insuficiente.

TITLE	Solid lipid nanoparticles for drug delivery		
AUTHOR	Ángela Martínez Ruiz		
DIRECTOR/CODIRECTOR	Rosa Martín Rodríguez / Ana Carmen Perdigón Aller		
DEGREE	<i>Degree in Chemical Engineering</i>	FECHA	09/09/2024

KEYWORDS

Solid lipid nanoparticles, Drug, Synthesis, Transmission electron microscope, Dynamic light scattering, UV-vis absorbance, Fluorescence, *Delamanid*, *Doxorubicin*, *Paclitaxel*

SCOPE

Nanotechnology is a multidisciplinary field that combines science and engineering expertise to create materials and systems at the nanoscale. At this scale, the physical and chemical properties of materials differ significantly from the macroscopic scale, allowing novel applications. In particular, in the field of biomedicine, the main applications are in diagnostics and therapy. Drug delivery faces numerous challenges, as drug molecules are subjected to adverse conditions in the body after administration. In this Final Degree Project, the design, synthesis and characterisation of solid-lipid nanoparticles loaded with different drugs of interest, such as *Delamanid*, *Doxorubicin* and *Paclitaxel*, are carried out in order to improve their pharmaceutical properties and their potential application in biomedicine.

RESULTS

This dissertation deals with the synthesis and characterisation of solid-lipid nanoparticles (SLNPs) and their application for drug delivery. After the optimisation of the SLNP synthesis procedure, the most relevant results for each drug studied are presented below.

First, as a proof of concept, five SLNP syntheses incorporating the drug *Delamanid* were performed. The nanoparticles obtained presented an average size of 100-200 nm, with a favourable polydispersity index, indicating a homogeneous size distribution. Transmission electron microscopy (TEM) images confirmed that the nanoparticles were spherical and contained iron nanoparticles inside. The stability of the nanoparticles decreased with time, with an increase in size and polydispersity observed after 15 days.

Secondly, with the drug *Doxorubicin*, three syntheses were carried out using different concentrations of *Doxorubicin* in ethanol. The best synthesis was the one using a dilution of 1:100. Dynamic light scattering (DLS) measurements showed an average particle size of approximately 147 nm and a favourable polydispersity index, suggesting good stability and uniformity. TEM images confirmed the spherical shape of the nanoparticles. However, the encapsulation efficiency of *Doxorubicin* was low (less than 10%), indicating that most of the drug was not efficiently encapsulated.

Finally, a single synthesis was performed with the drug ***Paclitaxel***, yielding a single population of nanoparticles with an average size of 140 nm and a low polydispersity index, indicating a homogeneous size distribution. The encapsulation efficiency measured by UV-visible absorbance was moderate (around 40%), suggesting that the encapsulation process could be improved.

CONCLUSIONS

This section will summarise the main research findings on the synthesis of solid-lipid nanoparticles (SLNPs) for the delivery of three drugs: ***Delamanid***, ***Doxorubicin*** and ***Paclitaxel***.

In the case of SLNP synthesis with ***Delamanid***, a stable spherical morphology and a size suitable for drug delivery is shown; however, a loss of stability over time is observed, probably due to particle aggregation.

In the case of ***Doxorubicin***, although a homogeneous size distribution was achieved, the encapsulation efficiency was low, limiting its therapeutic efficacy.

Finally, solid-lipid nanoparticles with ***Paclitaxel*** showed controlled synthesis, but moderate encapsulation efficiency suggests that the method needs to be adjusted to improve the amount of encapsulated drug.

Overall, it can be concluded that, although SLNPs with adequate physical properties (size and morphology) were synthesised, the encapsulation efficiency of the drugs ***Doxorubicin*** and ***Paclitaxel*** was insufficient.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Nanotecnología y nanomedicina	1
1.2 Nanotecnología en la aplicación química	2
1.3 Sistemas lipídicos	5
1.4 Nanopartículas sólido-lipídicas	6
1.5 Objetivos	8
2. Método experimental	9
2.1 Síntesis de nanopartículas sólido-lipídicas con diferentes fármacos	9
2.1.1 Síntesis de SLNP con el fármaco <i>Delamanid</i>	9
2.1.2 Síntesis de SLNP con el fármaco <i>Doxorrubicina</i>	13
2.1.3 Síntesis de SLNP con el fármaco <i>Paclitaxel</i>	15
2.2 Técnicas de caracterización	18
2.2.1 Preparación de las muestras para el TEM	18
2.2.2 Tamaño de partícula y potencial zeta	19
2.3 Estudio de viabilidad de la síntesis de SLNP	21
2.3.1 Estudio de encapsulación y control	21
2.3.2 Estudio mediante el método de absorbancia UV-visible para <i>Paclitaxel</i>	22
2.3.3 Estudio mediante fluorescencia para <i>Doxorrubicina</i>	25
3. Resultados	27
3.1 Nanopartículas sólido-lipídicas con el fármaco <i>Delamanid</i>	27
3.2 Nanopartículas sólido-lipídicas con el fármaco <i>Doxorrubicina</i>	32
3.3 Nanopartículas sólido-lipídicas con el fármaco <i>Paclitaxel</i>	34
4. Conclusiones	38
5. Referencias	40

Listado de figuras

Figura 1. Representación esquemática del modo de captación celular de nano-formulaciones en las células. (i) la orientación pasiva aprovecha las anomalías morfológicas de las células enfermas/tumorales para la acumulación de nanopartículas cargadas con fármacos mediante endocitosis. (ii) la focalización activa utiliza el reconocimiento de la nano-formulación cargada de fármaco conjugado con ligando por el receptor sobre expresado presente en la superficie de las células para la localización específica de la nanopartícula.	4
Figura 2. Representación esquemática del modo de captación celular de nano-formulaciones en las células. (i) extravasación de nanopartículas cargadas de fármacos a través de vasos sanguíneos fenestrados, lo que conduce a una orientación pasiva hacia los tejidos enfermos o tumorales. (ii) con la ayuda de ligandos funcionalizados, las nanopartículas cargadas de fármacos se extravasan a través de los vasos sanguíneos fenestrados y alcanzan los tejidos tumorales/enfermos en grandes cantidades. (iii) los nano-transportadores cargados de fármacos diseñados para responder a estímulos pueden atravesar los vasos sanguíneos fenestrados y liberarlos por estímulos internos o externos.	4
Figura 3. Esquema general de la estructura de los liposomas	5
Figura 4. Modelos de incorporación de principios activos en las SLNP	7
Figura 5. Esquema del dispositivo experimental empleado en la síntesis de SLNP	12
Figura 6. Esquema del equipo de un microscopio eléctrico de transmisión.....	18
Figura 7. Equipo de medición mediante dispersión dinámica de luz.....	20
Figura 8. Esquema del estudio de encapsulación de <i>Doxorrubicina</i> y <i>Paclitaxel</i>	21
Figura 9. Equipo utilizado para determinar la espectrofotometría	22
Figura 10. Diagrama de niveles correspondiente a la energía de una molécula	23
Figura 11. Ejemplo de curva de calibrado (absorbancia frente a concentración).....	24
Figura 12. Distribución de las muestras en las placas utilizadas para la fluorescencia.....	26
Figura 13. Gráfico tamaño de partícula frente a intensidad obtenido por DLS de la muestra DELA-5	27
Figura 14. Gráfico tamaño de partícula frente a intensidad obtenido por DLS de la muestra DELA-1	28
Figura 15. Gráfico tamaño de partícula frente a intensidad obtenido por DLS de la muestra DELA-3	28
Figura 16. Gráfico tamaño de partícula frente a intensidad obtenido por DLS de la muestra DELA-5 a los 8 días.....	30

Figura 17. Gráfico tamaño de partícula frente a intensidad obtenido por DLS de la muestra DELA-5 a los 15 días	30
Figura 18. Gráfico tamaño de partícula frente a intensidad obtenido por DLS de la muestra DELA-5 a los 21 días	31
Figura 19. Imágenes TEM de la muestra DELA-5 con nanopartículas de hierro encapsuladas en su interior.....	31
Figura 20. Gráfico tamaño de partícula frente a intensidad obtenido por DLS de la muestra DOXO-1	33
Figura 21. Imágenes TEM de la muestra DOXO-1 con nanopartículas de hierro encapsuladas en su interior.....	33
Figura 22. Gráfico tamaño de partícula frente a intensidad obtenido por DLS de la muestra TAXOL-1.....	34
Figura 23. Espectro de absorción de la síntesis de la muestra TAXOL-1 y de su control obtenido mediante la técnica absorbancia UV-visible.....	35
Figura 24. Espectro de absorción de las nanopartículas con <i>Taxol</i> en la síntesis y en su control obtenido mediante la técnica de absorbancia UV-visible	36

Listado de tablas

Tabla 1. Ventajas y desventajas del empleo de nanopartículas sólido-lipídicas.....	6
Tabla 2. Reactivos utilizados para la preparación de la fase orgánica	9
Tabla 3. Soluciones stock orgánicas preparadas a partir de los reactivos de la Tabla 2	10
Tabla 4. Reactivos utilizados para la preparación de la fase acuosa.....	10
Tabla 5. Soluciones stock acuosas preparadas a partir de los reactivos de la Tabla 4.....	11
Tabla 6. esquema de las muestras realizadas con el fármaco de referencia <i>Delamanid</i>	13
Tabla 7. Reactivos utilizados para la preparación de la fase orgánica	14
Tabla 8. Soluciones stock orgánicas preparadas a partir de los reactivos de la Tabla 7	14
Tabla 9. Esquema de las muestras realizadas con el fármaco de referencia <i>Doxorrubicina</i>	15
Tabla 10. Reactivos utilizados para la preparación de la fase orgánica	16
Tabla 11. Soluciones stock orgánicas preparadas a partir de los reactivos de la Tabla 10	16
Tabla 12. Esquema de la muestra realizada con el fármaco <i>Paclitaxel (Taxol)</i>	17
Tabla 13. Cálculo de la eficacia de encapsulación de la muestra TAXOL-1	37
Tabla 14. Resumen de los resultados obtenidos en las diversas técnicas a las que se han sometido los tres fármacos de interés	37

Listado de acrónimos

Abreviatura	Significado
CTAB	Bromuro de Cetiltrimetilamonio (Cetyltrimethylammonium Bromide)
DLS	Dispersión de luz dinámica
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration)
NPs	Nanopartículas
PBS	Solución Salina Tamponada con Fosfato (Phosphate-Buffered Saline)
PHC	Ácido Polihidroxicarboxílico
PI	Índice de polidispersidad
SLNP	Nanopartículas sólido-lipídicas
TEM	Microscopio electrónico de transmisión (Transmission Electron Microscope)

1. Introducción

1.1 Nanotecnología y nanomedicina

La nanotecnología es un campo multidisciplinar que combina los conocimientos propios de la ciencia e ingeniería para la creación de un material o sistema en la escala nanométrica (nm) al nivel de los átomos, moléculas y su estructura macromolecular. La física y la química de los materiales a escala macroscópica se comporta de manera distinta en cuanto a tiempos de resistencia, conductividad y reactividad cuando se reducen a escala nanométrica [1]. La aplicación de la nanotecnología se ha extendido ampliamente, sobre todo en el campo de la salud humana, de tal manera que diferentes nanomateriales que han sido desarrollados tienen un papel importante en nuestras vidas por sus aplicaciones en el campo farmacéutico y de la medicina. Por ejemplo, enfermedades tales como el VIH para la cual, actualmente no hay cura ni medidas preventivas, con el avance de la nanotecnología, han surgido diversas opciones de tratamiento [1]. Del mismo modo, el cáncer o la tuberculosis encabezan la lista de enfermedades temidas en los países desarrollados, y con la utilización de la nanotecnología, se ha conseguido un importante progreso en cuanto a la eficacia del tratamiento [1].

Con los años, el prometedor campo de la nanotecnología ha evolucionado exponencialmente, potenciándose más en diversas áreas incluyendo el sector de la salud. Se define nanomedicina como la aplicación de la nanociencia y la nanotecnología en medicina y ciencias de la salud. Las aplicaciones más importantes se pueden englobar en tres grandes grupos: diagnóstico, terapia y medicina regenerativa [1]. El interés principal en nanodiagnóstico es la identificación de una enfermedad de forma rápida y poco invasiva. Para ello, se han desarrollado nanodispositivos y sistemas de contraste basados en nanomateriales [1]. En particular, se utilizan nanopartículas luminiscentes como *quantum dots*, nanopartículas magnéticas o nanopartículas metálicas para bioimagen. También existe un gran desarrollo de bio-sensores, que identifican y cuantifican sustancias químicas o biológicas, basados en nanomateriales. Asimismo, y con mayor interés para el trabajo desarrollado en este Trabajo Fin de Grado, la introducción de la nanotecnología ha revolucionado los aspectos relacionados con la administración de

fármacos en cuanto a la terapia en el área de la nanomedicina. En particular, los nanosistemas de liberación de fármacos intentan solucionar problemas tales como la baja solubilidad de algunos medicamentos, su cinética desfavorable o la falta de selectividad para tejidos diana [1]. En este sentido, tiene mucho interés el desarrollo de nuevos biomateriales y nanomateriales.

Los enfoques basados en la nanotecnología proporcionan una oportunidad para diseñar formulaciones novedosas para obtener un mayor beneficio en el entorno de la atención médica. Los científicos encargados del estudio de la nanotecnología están continuamente desarrollando nuevos productos farmacéuticos para diferentes enfermedades, que suponen un impacto significativo en la práctica actual de la medicina mejorando la calidad de vida del propio paciente. Las plataformas nanotecnológicas que se encargan de la mejora de la administración del fármaco se basan en el manejo de varios factores tales como la solubilidad acuosa, el control del tamaño de la partícula, la biocompatibilidad, la liberación controlada, etc [1]. Estas características propias de las nanopartículas proporcionan una eficacia terapéutica más alta y, además, permite la administración de dos o más fármacos simultáneamente como terapia de combinación que induce el efecto sinérgico. Tal modalidad puede superar las deficiencias de la monoterapia al actuar sobre diversas vías de señalización, así como suprimir la resistencia a múltiples medicamentos.

En las últimas dos décadas, numerosos nanomedicamentos han sido aprobados como agentes terapéuticos y de diagnóstico para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer y otras enfermedades como asma, alergias, infecciones, hepatitis, etc [1].

1.2 Nanotecnología en la aplicación química

La administración de fármacos es un proceso complejo y desafiante, ya que las moléculas de los medicamentos deben enfrentarse a diversas barreras fisiológicas y biológicas que limitan su eficacia después de su administración, ya sea por vía oral o parental. Una vez dentro del organismo, los fármacos nativos se ven sometidos a condiciones adversas, como variaciones en el pH, la presencia de enzimas y las barreras epiteliales, lo que puede reducir su concentración en el sitio de acción y, en consecuencia, su efectividad terapéutica.

Para superar estos desafíos, se han desarrollado estrategias avanzadas de administración de fármacos, especialmente en el campo de la nanomedicina. Las nanoformulaciones han emergido como una solución prometedora, ofreciendo un sistema seguro y eficaz que permite mejorar la precisión en la entrega del fármaco al lugar deseado, aumentar su biocompatibilidad y reducir la toxicidad en tejidos sanos manteniendo al mismo tiempo su eficacia en el sitio de la enfermedad. Estas nanoformulaciones también protegen al fármaco encapsulado de la degradación prematura debido a las condiciones fisiológicas, lo que prolonga su vida media en el plasma y regula su actividad terapéutica.

En cuanto a los métodos de administración de nanopartículas, se ha explorado dos enfoques principales: la orientación pasiva y la activa. La orientación pasiva se basa en el tamaño de las nanopartículas y en la explotación de las características únicas de la vasculatura tumoral para dirigir el fármaco al sitio del tumor, aprovechando el efecto de permeación y retención mejorada (EPR). Sin embargo, este enfoque requiere que las nanopartículas tengan una circulación prolongada en el torrente sanguíneo para ser eficaces.

Por otro lado, la orientación activa implica el uso de estímulos específicos para liberar el fármaco en el lugar de la enfermedad, lo que minimiza la exposición del tejido sano. Esta liberación puede ser desencadenada por estímulos internos, como condiciones fisiopatológicas del tumor, o externos, como la temperatura, la luz, ultrasonidos, campos magnéticos y eléctricos. Este enfoque ofrece un control espacial y temporal más preciso sobre la terapia, lo que permite ajustar características como la estructura y la configuración de las nanopartículas en respuesta a estímulos específicos.

A pesar de estos avances, el campo de la liberación desencadenada de fármacos mediante nanoformulaciones aún enfrenta desafíos significativos. Uno de los principales es la dependencia de un único tipo de estímulo para la liberación del fármaco, lo que puede limitar la eficacia en entornos clínicos.

Por ello, el desarrollo de materiales que puedan responder a múltiples estímulos simultáneamente se considera una dirección prometedora para mejorar tanto la administración de fármacos como el diagnóstico y la obtención de imágenes en la práctica clínica.

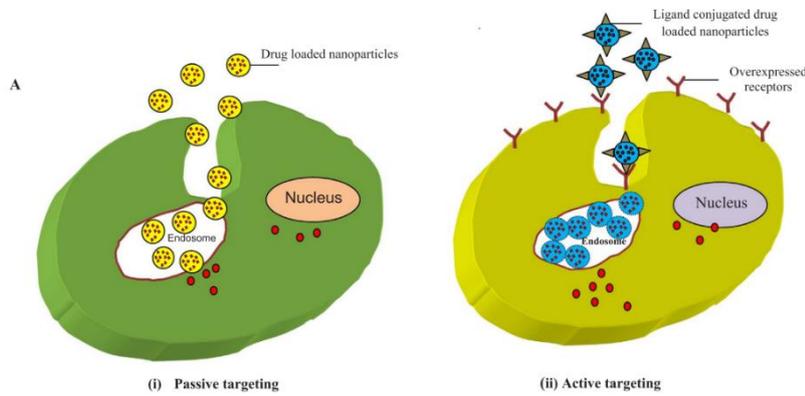


FIGURA 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL MODO DE CAPTACIÓN CELULAR DE NANO-FORMULACIONES EN LAS CÉLULAS. (I) LA ORIENTACIÓN PASIVA APROVECHA LAS ANOMALÍAS MORFOLÓGICAS DE LAS CÉLULAS ENFERMAS/TUMORALES PARA LA ACUMULACIÓN DE NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON FÁRMACOS MEDIANTE ENDOCITOSIS. (II) LA FOCALIZACIÓN ACTIVA UTILIZA EL RECONOCIMIENTO DE LA NANO-FORMULACIÓN CARGADA DE FÁRMACO CONJUGADO CON LIGANDO POR EL RECEPTOR SOBRE EXPRESADO PRESENTE EN LA SUPERFICIE DE LAS CÉLULAS PARA LA LOCALIZACIÓN ESPECÍFICA DE LA NANOPARTÍCULA.

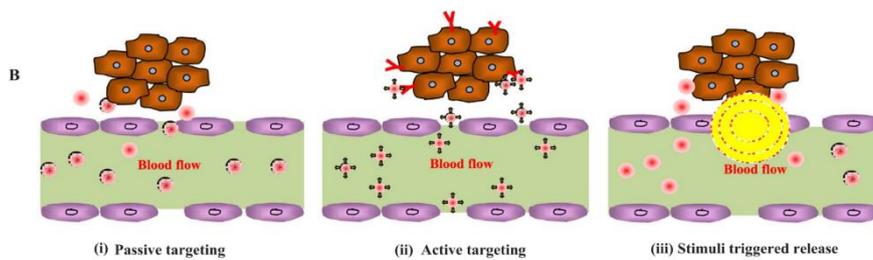


FIGURA 2. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL MODO DE CAPTACIÓN CELULAR DE NANO-FORMULACIONES EN LAS CÉLULAS. (I) EXTRAVASACIÓN DE NANOPARTÍCULAS CARGADAS DE FÁRMACOS A TRAVÉS DE VASOS SANGUÍNEOS FENESTRADOS, LO QUE CONDUCE A UNA ORIENTACIÓN PASIVA HACIA LOS TEJIDOS ENFERMOS O TUMORALES. (II) CON LA AYUDA DE LIGANDOS FUNCIONALIZADOS, LAS NANOPARTÍCULAS CARGADAS DE FÁRMACOS SE EXTRAVASAN A TRAVÉS DE LOS VASOS SANGUÍNEOS FENESTRADOS Y ALCANZAN LOS TEJIDOS TUMORALES/ENFERMOS EN GRANDES CANTIDADES. (III) LOS NANO-TRANSPORTADORES CARGADOS DE FÁRMACOS DISEÑADOS PARA RESPONDER A ESTÍMULOS PUEDEN ATRAVESAR LOS VASOS SANGUÍNEOS FENESTRADOS Y LIBERARLOS POR ESTÍMULOS INTERNOS O EXTERNOS.

1.3 Sistemas lipídicos

Los liposomas son vesículas esféricas compuestas por capas de lípidos concéntricas, que se pueden crear a partir de colesterol y de fosfolípidos, siendo simples o múltiples, y que contienen un comportamiento acuoso en su centro. Estas estructuras permiten absorber y transportar sustancias hidrosolubles en su interior y liposolubles en la interfase entre las capas de lípidos. Su tamaño puede variar dependiendo de cómo estén diseñados, oscilando entre los 10 y 200 nm de diámetro. Desde su descubrimiento, los liposomas han sido ampliamente utilizados como modelos de membrana. Además, en los últimos años, se ha aumentado el interés en su utilización como sistemas de transporte, tanto en la industria farmacéutica como cosmética debido a su capacidad para encapsular activos de naturaleza muy diversa, su biodegradabilidad y su ausencia de toxicidad [2].

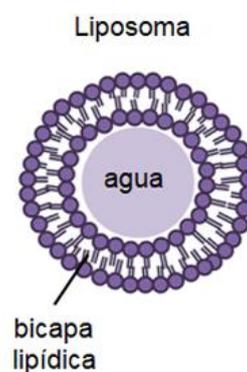


FIGURA 3. ESQUEMA GENERAL DE LA ESTRUCTURA DE LOS LIPOSOMAS

El trabajo pionero de numerosos investigadores sobre los liposomas en la nanomedicina, llevó a la aparición de numerosos avances técnicos en el desarrollo de diferentes tipos de liposomas como liposomas PEGilados o de liberación activa, liposomas que contienen polímeros de ácido nucleico o dirigidos a ligandos y liposomas cargados de fármacos. Estos liposomas han resultado ser muy eficaces en muchos ensayos clínicos utilizándose como vehículos de medicamentos anticancerígenos y antibióticos además de medicamentos genéticos y antiinflamatorios. La liberación del fármaco tiene una implicación importante en las actividades terapéuticas, el fármaco contenido en los liposomas se vuelve biodisponible cuando se libera del sistema para poder tener una actividad terapéutica óptima [3]. El desarrollo de fármacos liposomales

altera preferiblemente la farmacocinética del medicamento nativo. Son muchos los liposomas que, cargados de medicamentos contra el cáncer, están en el dominio clínico entre los cuales destacan las primeras formulaciones liposomales de PEGilados de *Doxorrubicina (Doxil)*, aprobadas por la FDA, para el tratamiento del sarcoma de Kaposi, cáncer de ovario, mieloma múltiple y cáncer de mama metastático.

1.4 Nanopartículas sólido-lipídicas

Las nanopartículas sólido-lipídicas (en adelante, SLNP), surgieron a principios de los años 90 como una alternativa a las emulsiones, liposomas y nanopartículas poliméricas. Estos sistemas presentan una cinética de liberación controlada de los principios activos, buena biocompatibilidad, estabilidad y tolerabilidad, mostrándose así superiores a otros tipos de nanotransportadores [4]. Las SLNP se definen como matrices lipídicas a escala nanométrica. Estos sistemas coloidales presentan un diámetro de partícula entre 50 y 100 nm [5].

Sus componentes generales incluyen lípidos sólidos y agentes tensoactivos. Para su utilización con fines farmacéuticos todos los reactivos utilizados en su preparación deben ser generalmente reconocidos como materiales seguros. Entre los lípidos más comúnmente utilizados se encuentran los triglicéridos, glicéridos parciales, ácidos grasos, esteroides y grasas, siendo estos lípidos fisiológicos o moléculas utilizadas comúnmente en formulaciones farmacéuticas [5].

TABLA 1. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL EMPLEO DE NANOPARTÍCULAS SÓLIDO-LIPÍDICAS

Ventajas	Desventajas
Numerosas vías de administración	Baja eficiencia de encapsulamiento de fármacos
Aumento de la estabilidad del fármaco en la formulación	Posible expulsión de fármacos debido a cambios en la forma de cristalización
Posibilidad de una terapia más eficaz (terapia combinada)	Posible crecimiento de partículas durante su almacenamiento
Versatilidad de aplicación como portador de fármacos de diferentes grupos farmacológicos	Tendencia a la formación de geles
Uso mínimo o inexistente de solventes orgánicos	Incapacidad de algunas formas cristalinas para incorporar fármacos

En cuanto a su estructura, existen tres tipos básicos de SLNP, la obtención de uno u otro depende de la composición de las propias nanopartículas sólido-lipídicas (líquido, componente activo, surfactante) y de las condiciones de producción (método utilizado). La estructura denominada tipo I se obtiene por homogeneización en frío y se caracteriza por una distribución uniforme del ingrediente activo en el volumen total de la matriz lipídica. La estructura tipo II se caracteriza por una concentración de sustancia activa en la parte exterior de las nanopartículas. Por último, la estructura tipo III tiene la concentración de compuesto activo más alta en la parte central de las nanopartículas [6].

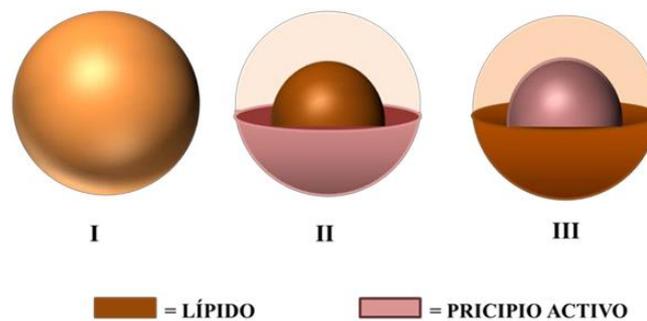


FIGURA 4. MODELOS DE INCORPORACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN LAS SLNP

1.5 Objetivos

El objetivo principal de este TFG es el diseño de nuevas SLNP para la liberación de fármacos. Las SLNP se utilizan como sistemas de liberación ya que permiten mejorar la biodisponibilidad, estabilidad y farmacocinética de los fármacos, protegiéndolos y controlando su liberación.

Para conseguir este objetivo general, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- Puesta a punto del dispositivo experimental empleado para la síntesis. Para ello, se ha reproducido la síntesis de SLNP incorporando el fármaco *Delamanid* como prueba inicial.
- Caracterización de las muestras SLNP-*Delamanid* en particular tamaño promedio, grado de dispersión y estabilidad, mediante las técnicas de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y Dispersión de Luz Dinámica (DLS).
- Adaptación del método de síntesis de SLNP para la incorporación de los dos fármacos de interés, *Doxorrubicina* y *Paclitaxel*.
- Caracterización de las propiedades de tamaño y grado de dispersión de las SLNP sintetizadas para su posterior uso en biomedicina, mediante las técnicas de TEM y DLS.
- Análisis del porcentaje de fármaco incorporado en las SLNP mediante espectrofotometría.

2. Método experimental

2.1 Síntesis de nanopartículas sólido-lipídicas con diferentes fármacos

2.1.1 Síntesis de SLNP con el fármaco *Delamanid*

La síntesis de SLNP depende fundamentalmente del diseño de formulaciones y procesos empleados, en particular, las denominadas fase orgánica y fase acuosa.

En este TFG, para llevar a cabo la síntesis de SLNP, de manera general, se siguió el procedimiento descrito a continuación. En primer lugar, se presentan los reactivos empleados (Tabla 2).

TABLA 2. REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA PREPARACIÓN DE LA FASE ORGÁNICA

Fármaco <i>Delamanid</i>	Polvo
PHC (ácido polihidroxicarboxílicos)	Polvo
Ácido esteárico	Polvo
Etanol	Líquido

En la síntesis de SLNP se utilizan dichos reactivos para cumplir funciones específicas en la formación y estabilización de las nanopartículas. Para la **fase orgánica**, se emplea el fármaco *Delamanid* en el contexto de síntesis de SLNP puesto que es el fármaco encapsulado dentro de las nanopartículas. Para medir esta encapsulación se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia de encapsulación (\%)} = \left(\frac{\text{Cantidad de fármaco encapsulado}}{\text{Cantidad de fármaco inicial}} \right) \times 100$$

Su inclusión tiene como objetivo mejorar su biodisponibilidad, protegerlo de la degradación prematura y controlar su liberación. El PHC es un surfactante que se utiliza para estabilizar las nanopartículas durante su formación, ayuda a reducir la tensión superficial entre los componentes acuosos y lipídicos, previniendo la agregación de las nanopartículas y asegurando que se mantengan en una distribución uniforme y estable en la suspensión. Por otro lado, el ácido esteárico es un lípido sólido que actúa como material base en la formación de la matriz de las nanopartículas sólido-lipídicas. Este ácido graso es fundamental para formar el núcleo sólido de las SLNP, que encapsula el

fármaco (en este caso, *Delamanid*). Por último, el etanol se utiliza generalmente como un solvente en la síntesis de SLNP. Al ser miscible con agua, el etanol facilita la emulsificación del lípido en la fase acuosa durante el proceso de formación de las nanopartículas. Después de la formación, el etanol se evapora, permitiendo la solidificación de las nanopartículas.

A partir de estos reactivos, se elaboran las siguientes soluciones stock orgánicas (Tabla 3) para preparar así, la **fase orgánica** a utilizar en la síntesis de SLNP.

TABLA 3. SOLUCIONES STOCK ORGÁNICAS PREPARADAS A PARTIR DE LOS REACTIVOS DE LA TABLA 2

Solución <i>Delamanid</i> en etanol (0,5 mg/ml)	Disolver 2 mg de <i>Delamanid</i> en 4 ml de etanol filtrado. Mantener la solución a -20 °C.
Solución PHC en etanol (2,4 mg/ml)	Disolver 4,8 mg de PHC en 2 ml de etanol filtrado. Mantener la solución a -20 °C.
Ácido esteárico	A temperatura ambiente

Por su parte, en la preparación de la **fase acuosa**, se utilizan los reactivos a continuación:

TABLA 4. REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA PREPARACIÓN DE LA FASE ACUOSA

PBS	Polvo
CTAB	Polvo
Tween 80	Líquido

El reactivo PBS (Solución salina tamponada con fosfato) es una solución salina que se utiliza como medio acuoso durante la síntesis y procesamiento de las nanopartículas, su función principal es mantener un pH constante y proporcionar un ambiente compatible con las condiciones biológicas, ayudando a que las nanopartículas sean estables durante la síntesis y posteriormente. El CTAB (Cetiltrimetilamonio Bromuro) es un tensoactivo catiónico que se utiliza en la síntesis de SLNP para estabilizar las interfaces entre los componentes hidrofóbicos (lípidos) y la fase acuosa. Ayuda a formar y mantener la dispersión de las nanopartículas en solución, previniendo su agregación. Finalmente, el Tween 80 (Polisorbato 80) es un tensoactivo no iónico que se emplea para estabilizar emulsiones y suspensiones de nanopartículas, ayuda a dispersar los lípidos en la fase

acuosa y estabiliza las nanopartículas al reducir la tensión superficial entre los componentes.

De igual manera que en la fase orgánica, a partir de estos reactivos se elaboran las soluciones stock acuosas (Tabla 5) que se emplearán para la preparación de la **fase acuosa**.

TABLA 5. SOLUCIONES STOCK ACUOSAS PREPARADAS A PARTIR DE LOS REACTIVOS DE LA TABLA 4

Solución de PBS 0,25x en agua desionizada	Diluir 5 ml de PBS 1x en 15 ml de agua desionizada, ambos filtrados en filtros de 0,22 µm. Mantener la solución a 4 °C.
Solución de CTAB al 1% en PBS 0,25x	Disolver 10 mg de CTAB en 1 ml de PBS 0,25x. Mantener la solución a 4 °C.
Solución de Tween 80 al 10% en PBS 0,25x	Diluir 20 µl de Tween 80 en 180 µl de PBS 0,25x. Mantener la solución a 4 °C.
Nanopartículas magnéticas	Las nanopartículas magnéticas se preparan previamente con 20 µl de la solución stock de NPs de hierro + 2 ml de agua desionizada en un tubo Eppendorf de 5 ml. Distribuir la solución en dos tubos Eppendorf de 2 ml. Centrifugar a 13000 rpm, durante 5 minutos a 4 °C. Eliminar el agua y volver a suspender en 200 µl de agua desionizada en cada tubo. Mantener las soluciones resultantes a 4 °C.

Cabe destacar que el uso de las nanopartículas magnéticas en la síntesis de SLNP permite introducir funcionalidades adicionales que mejoran el control y la orientación de las SLNP en aplicaciones biomédicas. La inclusión de nanopartículas magnéticas en las SLNP facilita la liberación controlada de fármacos. Bajo la influencia de un campo magnético, es posible inducir cambios estructurales, liberando el fármaco encapsulado de manera controlada.

A partir de las soluciones stock orgánicas y acuosas (Tablas 3 y 5, respectivamente) se procede a la preparación de las fases orgánicas y acuosas.

Para la preparación de la fase **orgánica**, se disponen en un tubo Eppendorf de 5 ml, las soluciones stock orgánicas en las siguientes cantidades: 857 µl de la solución del fármaco de referencia (*Delamanid* en este caso), 301 µl de la solución de PHC y 4,4 mg de ácido

esteárico. La fase orgánica se deja sonicar en baño hasta que se disuelva el ácido esteárico.

Por su parte, la fase **acuosa** se prepara colocando en un tubo Falcon de 15 ml, las siguientes cantidades de soluciones stock acuosas: 4500 μ l de solución de PBS 0,25x, 160 μ l de solución de CTAB, 40 μ l de solución de Tween 80 y 100 μ l de nanopartículas magnéticas.

Por último, se lleva a cabo la síntesis de SLNP. Para ello, se ha utilizado la siguiente figura (Figura 5), en la cual se explica de manera esquemática los pasos seguidos en la propia síntesis.

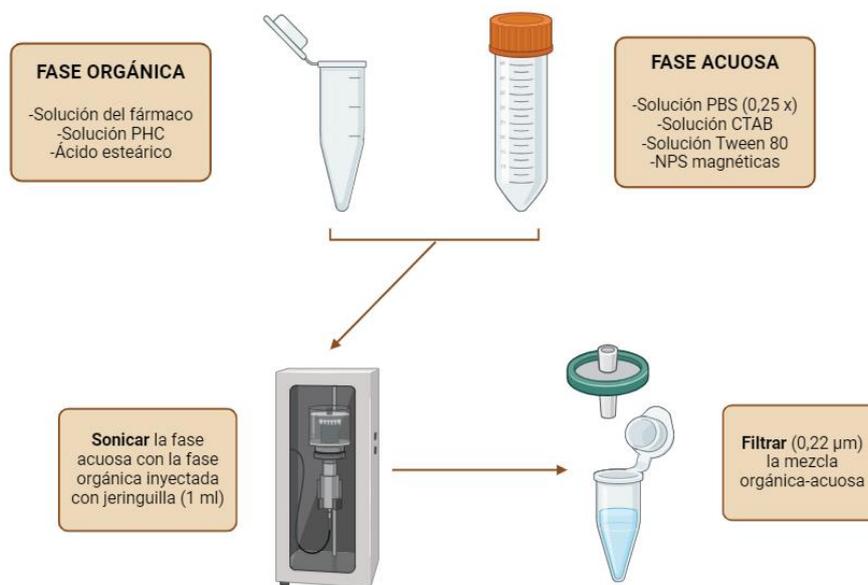


FIGURA 5. ESQUEMA DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL EMPLEADO EN LA SÍNTESIS DE SLNP

Como se representa en la figura, con la fase orgánica y acuosa preparada como se explicó anteriormente, se extraen 200 μ l de la fase orgánica con aguja y jeringuilla mientras que se dispone la fase acuosa en el tubo de 15 ml en el sonicador.

Una vez se haya programado el sonicador a 40% de amplitud, durante 5 pulsos cada 30 segundos, iniciar el programa e inmediatamente inyectar la fase orgánica con la jeringuilla de 1 ml.

Por último, se deja finalizar el programa y extraer la mezcla orgánica-acuosa resultante con una jeringuilla de 1 ml y filtrarla empleando un filtro de 0,22 µm. Disponer el filtrado en un tubo Eppendorf de 5 ml. Almacenar a 4°C.

Empleando esta metodología de síntesis de SLNP, se han llevado a cabo cinco síntesis, que han sido recogidas en la tabla a continuación (Tabla 6). El nombre de la muestra se señala como DELA, debido al fármaco utilizado (*Delamanid*) y el número que le acompaña hace referencia al número de síntesis realizadas.

TABLA 6. ESQUEMA DE LAS MUESTRAS REALIZADAS CON EL FÁRMACO DE REFERENCIA *DELAMANID*

Muestra	Fármaco	Concentración fármaco (mg/ml Etanol)	Fase orgánica	SLNPs
DELA-1	<i>Delamanid</i>	0,5	Sol. <i>Delamanid</i> (857 µl) + Sol. PHC (301 µl) + 4,4 mg	Fase orgánica (200 µl) + Fase acuosa (4800 µl)
DELA-2	<i>Delamanid</i>	0,5	Sol. <i>Delamanid</i> (857 µl) + Sol. PHC (301 µl) + 4,4 mg	Fase orgánica (200 µl) + Fase acuosa (4800 µl)
DELA-3	<i>Delamanid</i>	0,5	Sol. <i>Delamanid</i> (857 µl) + Sol. PHC (301 µl) + 4,4 mg	Fase orgánica (200 µl) + Fase acuosa (4800 µl)
DELA-4	<i>Delamanid</i>	0,5	Sol. <i>Delamanid</i> (857 µl) + Sol. PHC (301 µl) + 4,4 mg	Fase orgánica (200 µl) + Fase acuosa (4800 µl)
DELA-5	<i>Delamanid</i>	0,5	Sol. <i>Delamanid</i> (857 µl) + Sol. PHC (301 µl) + 4,4 mg	Fase orgánica (200 µl) + Fase acuosa (4800 µl)

2.1.2 Síntesis de SLNP con el fármaco *Doxorrubicina*

Como se mencionó anteriormente, la segunda parte de este TFG consiste en la síntesis de SLNP utilizando el fármaco ***Doxorrubicina*** en lugar de *Delamanid* (como se hacía en las primeras síntesis). La *Doxorrubicina*, es un fármaco líquido, de color rojo cuya forma encapsulada en liposomas, llamada *Doxil*, se utiliza ampliamente en la quimioterapia del cáncer desde su descubrimiento en la década de los 70, debido a su función como agente intercalante de ADN. En la actualidad se utiliza mucho en su forma liposomal [7].

El empleo de este fármaco se debe a su eficacia como agente antitumoral, dado que es un fármaco frecuentemente empleado en la quimioterapia debido a su capacidad para inhibir la proliferación celular en diversos tipos de cáncer. Su uso en la formulación de nanopartículas sólido-lipídicas permite administrar el fármaco directamente en el tumor, mejorando la eficacia del tratamiento. La relevancia de la *Doxorrubicina* con relación al *Delamanid* radica en su utilización en el ámbito de la oncología, dado que es un agente quimioterapéutico. Es importante señalar su relevancia en la nanotecnología, ya que el uso de SLNP con dicho fármaco se enfoca en dirigir el fármaco a los tumores y mejorar su perfil terapéutico.

En lo relacionado con la preparación de nanopartículas sólido-lipídicas, lo único que se debe de tener en cuenta es su presencia como reactivo para la preparación de la fase orgánica, como se muestra en la tabla a continuación (Tabla 7). Por su parte, los reactivos y las soluciones stock acuosas necesarias son las que aparecen en las tablas 4 y 5, respectivamente.

TABLA 7. REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA PREPARACIÓN DE LA FASE ORGÁNICA

Fármaco <i>Doxorrubicina</i>	Líquido
PHC (ácido polihidroxicarboxílicos)	Polvo
Ácido esteárico	Polvo
Etanol	Líquido

La preparación de las soluciones stock orgánicas a partir de los reactivos de la Tabla 7 se realiza de la siguiente manera:

TABLA 8. SOLUCIONES STOCK ORGÁNICAS PREPARADAS A PARTIR DE LOS REACTIVOS DE LA TABLA 7

Solución <i>Doxorrubicina</i> en etanol al 1%	Diluir 20 μ l de solución de <i>Doxorrubicina</i> (100 mg/ml DMSO) en 1980 μ l de etanol filtrado. Mantener la solución a 4 °C.
Solución PHC en etanol (2,4 mg/ml)	Disolver 4,8 mg de PHC en 2 ml de etanol filtrado. Mantener la solución a 4 °C.
Ácido esteárico	A temperatura ambiente

Con las soluciones stock orgánicas de la Tabla 8 y las soluciones stock acuosas de la Tabla 5, se procede a preparar ambas fases (orgánica y acuosa) para la síntesis de SLNP. Para ello, hay que tener en cuenta que el procedimiento es el mismo que el que se explicaba anteriormente para el fármaco *Delamanid*, mismas cantidades para ambas fases, únicamente cambiando el fármaco que ahora es la *Doxorrubicina*.

Finalmente, en relación con la síntesis de SLNP empleando el fármaco *Doxorrubicina*, dada la identidad de procedimiento, me remito a la explicación dada sobre la misma operación con el fármaco *Delamanid*, en la página 15 (Figura 5) y sucesivas.

Con este segundo fármaco se realizaron tres síntesis las cuales vienen recogidas en la siguiente tabla (Tabla 9). El nombre de las muestras, como se hizo anteriormente con el otro fármaco, se identifica como DOXO (por el fármaco *Doxorrubicina*) y el número hace referencia a las síntesis realizadas.

TABLA 9. ESQUEMA DE LAS MUESTRAS REALIZADAS CON EL FÁRMACO DE REFERENCIA DOXORRUBICINA

Muestra	Fármaco	Solución stock fármaco (mg/ml DMSO)	Concentración fármaco	Fase orgánica	SLNPs
DOXO-1	<i>Doxorrubicina</i>	100	1:100 Etanol	Sol. <i>Doxorrubicina</i> (857 μ l) + Sol. PHC (301 μ l) + 4,4 mg	Fase orgánica (200 μ l) + Fase acuosa (4800 μ l)
DOXO-2	<i>Doxorrubicina</i>	100	1:50 Etanol	Sol. <i>Doxorrubicina</i> (857 μ l) + Sol. PHC (301 μ l) + 4,4 mg	Fase orgánica (200 μ l) + Fase acuosa (4800 μ l)
DOXO-3	<i>Doxorrubicina</i>	100	1:200 Etanol	Sol. <i>Doxorrubicina</i> (857 μ l) + Sol. PHC (301 μ l) + 4,4 mg	Fase orgánica (200 μ l) + Fase acuosa (4800 μ l)

2.1.3 Síntesis de SLNP con el fármaco *Paclitaxel*

Por último, la etapa final de la síntesis de SLNP se llevó a cabo utilizando el fármaco *Paclitaxel*. El *Paclitaxel* o *Taxol* es un agente antitumoral, extraído inicialmente de la corteza del tejo, que se emplea para el tratamiento de algunos tipos de cáncer debido a

su capacidad de inhibir la multiplicación de las células tumorales [8]. Su uso está recomendado en el tratamiento del cáncer de mama y en combinación con otros compuestos, se utiliza en la quimioterapia para el tratamiento del cáncer de ovario.

En este caso, las SLNP permiten una liberación controlada del *Paclitaxel*, lo que puede llegar a mantener niveles terapéuticos más prolongados en el cuerpo. Esto es crucial para maximizar la efectividad del tratamiento. Aunque ambos fármacos (*Doxorrubicina* y *Paclitaxel*) se utilizan para el tratamiento de varios tipos de cáncer, presentan variados aspectos divergentes. La *Doxorrubicina* requiere una estrategia de encapsulación más compleja debido, fundamentalmente, a su mayor solubilidad en agua mientras que el *Paclitaxel*, debido a su hidrofobicidad y afinidad por los lípidos, es más fácil de encapsular directamente en la matriz lipídica de las SLNP.

Como ya se ha mencionado, y de igual manera que con la *Doxorrubicina*, los reactivos y las soluciones stock acuosas son las de las tablas 2 y 3 respectivamente. En cuanto a los reactivos utilizados en la elaboración de la fase orgánica tenemos:

TABLA 10. REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA PREPARACIÓN DE LA FASE ORGÁNICA

Fármaco <i>Paclitaxel</i>	Líquido
PHC (ácido polihidroxicarboxílicos)	Polvo
Ácido esteárico	Polvo
Etanol	Líquido

A partir de ellos, se preparan las soluciones stock orgánicas:

TABLA 11. SOLUCIONES STOCK ORGÁNICAS PREPARADAS A PARTIR DE LOS REACTIVOS DE LA TABLA 10

Solución <i>Paclitaxel</i> en etanol	Diluir 50 µl de solución de <i>Paclitaxel</i> en 850 µl de etanol filtrado. Mantener la solución a 4 °C.
Solución PHC en etanol (2,4 mg/ml)	Disolver 4,8 mg de PHC en 2 ml de etanol filtrado. Mantener la solución a 4 °C.
Ácido esteárico	A temperatura ambiente

Con ambas soluciones stock preparadas, se procede a la preparación de las fases orgánica y acuosa y posteriormente, a la síntesis de SLNP. Para ello, me remito de nuevo a lo explicado en las páginas 15 y 16 debido a que el procedimiento es idéntico.

Con el *Taxol* solamente se hizo una síntesis, cuyas características y nombre de muestra vienen recogidos en la tabla a continuación.

TABLA 12. ESQUEMA DE LA MUESTRA REALIZADA CON EL FÁRMACO PACLITAXEL (TAXOL)

Muestra	Fármaco	Solución stock fármaco	Concentración fármaco	Fase orgánica	SLNPs
TAXOL-1	<i>Paclitaxel</i>	6 mg/ml en DMSO/aceite ricino	50 μ l en 850 μ l Etanol	Sol. <i>Paclitaxel</i> (857 μ l) + Sol. PHC (301 μ l) + 4,4 mg	Fase orgánica (200 μ l) + Fase acuosa (4800 μ l)

2.2 Técnicas de caracterización

2.2.1 Preparación de las muestras para el TEM

El microscopio electrónico de transmisión (en adelante, TEM) es un instrumento que aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones suficientemente acelerados, colisionan con una muestra convenientemente preparada. Al colisionar con la muestra, los electrones se dispersan según el grosor y el tipo de átomos presentes. Posteriormente, las lentes modulan estos electrones para formar una imagen con una definición extremadamente alta [9]. La imagen resultante muestra diferentes grados de gris que corresponden a la dispersión de los electrones incidentes.

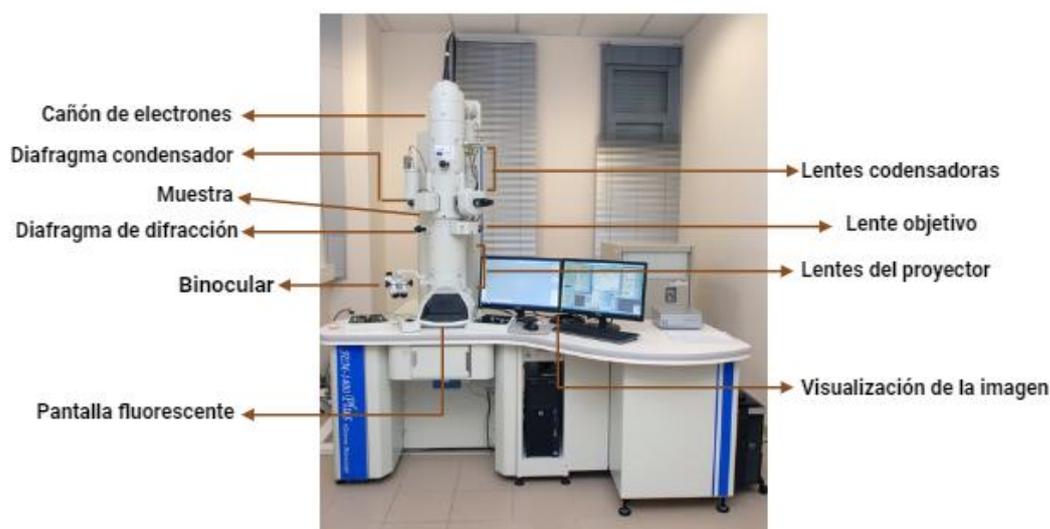


FIGURA 6. ESQUEMA DEL EQUIPO DE UN MICROSCOPIO ELÉCTRICO DE TRANSMISIÓN

En primer lugar, en el caso de las síntesis de SLNP con **Delamanid** para la preparación de las muestras para el TEM, primero se cogen 10 μl de muestras filtradas de nanopartículas y se dispone en un tupo Eppendorf de 2 ml. Diluir la muestra en PBS 1x, previamente filtrado con un filtro de 0,22 μm , la concentración se hace 1:100, es decir, 10 μl de muestra y 990 μl de PBS 1x filtrado, deja sonicar durante aproximadamente 10 minutos. Por último, coger 10 μl de solución, disponer en un *grid* y dejar la muestra evaporar a temperatura ambiente. También se repitió este procedimiento para dos concentraciones distintas, siendo estas 1:10 y 1:1000.

Para las síntesis con **Doxorrubicina** se hicieron cuatro preparaciones. Una primera en la cual, se diluye 1:100 en etanol, previamente filtrado con un filtro de 0,22 μm , se cogen posteriormente 20 μl de solución stock de **Doxorrubicina** y se diluye en 980 μl de etanol

filtrado para finalmente, homogeneizar la muestra tanto manualmente como con pipeta. La segunda preparación se hizo cambiando la concentración a 1:50 en etanol, la tercera a una concentración de 1:200 en etanol y la cuarta a 1:10.

Por último, para la síntesis con **Paclitaxel** se hizo una sola preparación en la cual se diluían 50 μl de solución stock de *Paclitaxel* en 850 μl de etanol, previamente filtrado utilizando un filtro de 0,22 μm .

Cabe destacar que finalmente, la concentración que se decidió coger para realizar mediciones a través del TEM fue 1:10 en PBS 1x, puesto que, tras varias evaluaciones, se observó que, con las otras concentraciones empleadas, no se lograba ver de manera definida las nanopartículas sólido-lipídicas.

2.2.2 Tamaño de partícula y potencial zeta

La dispersión de luz dinámica (en adelante, DLS) es una técnica de análisis de partículas ampliamente utilizada para medir el tamaño y la distribución de tamaño de moléculas y partículas en suspensión o en solución. El principio de esta técnica se basa en el movimiento browniano de las partículas en suspensión [10]. El DLS mide el diámetro hidrodinámico de la partícula, es decir, el correspondiente a la partícula rodeada de moléculas de agua, iones y moléculas absorbidas, por lo que no se obtiene el diámetro de la partícula sola, sino el de toda la nube de elementos que la rodean.

El comportamiento coloidal de las nanopartículas está determinado por el potencial de superficie. La propiedad medible que refleja el potencial que las partículas sienten en una nanodispersión se denomina potencial de superficie o potencial Zeta.

La cantidad de atracción o repulsión electrostática entre las partículas de nanodispersión de SLNP está determinada por el potencial eléctrico existente en la interfaz de las nanopartículas y el medio de dispersión. Cuantos mayores sean los valores del potencial zeta, mayor será la estabilización de las nanopartículas debido a la repulsión electrostática y previene la agregación causada por la repulsión [11].

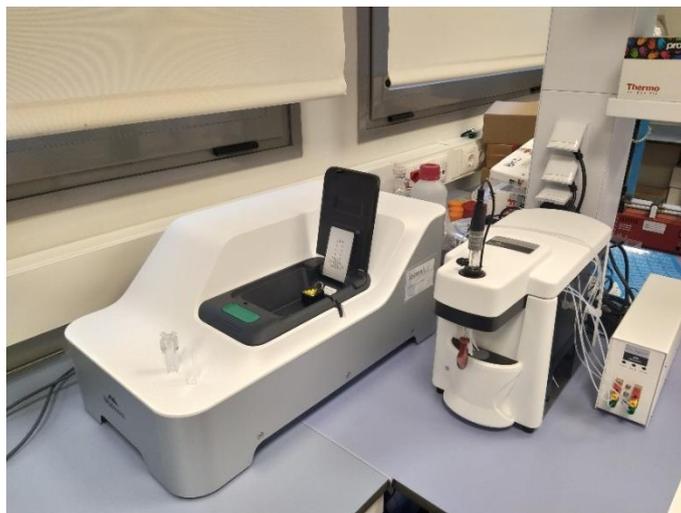


FIGURA 7. EQUIPO DE MEDICIÓN MEDIANTE DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ

Tanto para las síntesis con los fármacos ***Delamanid***, ***Doxorrubicina*** y ***Paclitaxel*** la caracterización de las nanopartículas se hizo siguiendo el mismo procedimiento. Se diluyeron 100 μl de la dispersión de SLNP en un tubo Eppendorf con 900 μl de PBS 1x. Sonicar unos segundos y transferir a la cubeta de plástico de 1 cm y proceder a la medición en DLS.

La concentración utilizada para medir las muestras, de la misma manera que para el TEM, fue 1:10 en PBS 1x.

2.3 Estudio de viabilidad de la síntesis de SLNP

2.3.1 Estudio de encapsulación y control

El estudio de encapsulación es un estudio de gran importancia puesto que permite controlar la liberación, mejorar la eficacia y, además, reducir los efectos secundarios de los medicamentos haciendo que los tratamientos sean más efectivos y seguros para los pacientes. El estudio de encapsulación, en este caso, se llevó a cabo con los fármacos *Doxorrubicina* y *Paclitaxel*. Como se ve en la Figura 8, se extraen 650 μ l de la muestra filtrada de SLNP y se dispone en un tubo Eppendorf de 2 ml. Centrifugar la muestra a 13000 rpm, a 4°C y durante un tiempo de 15 minutos. Por último, se recoge el sobrenadante y se almacena a 4°C.

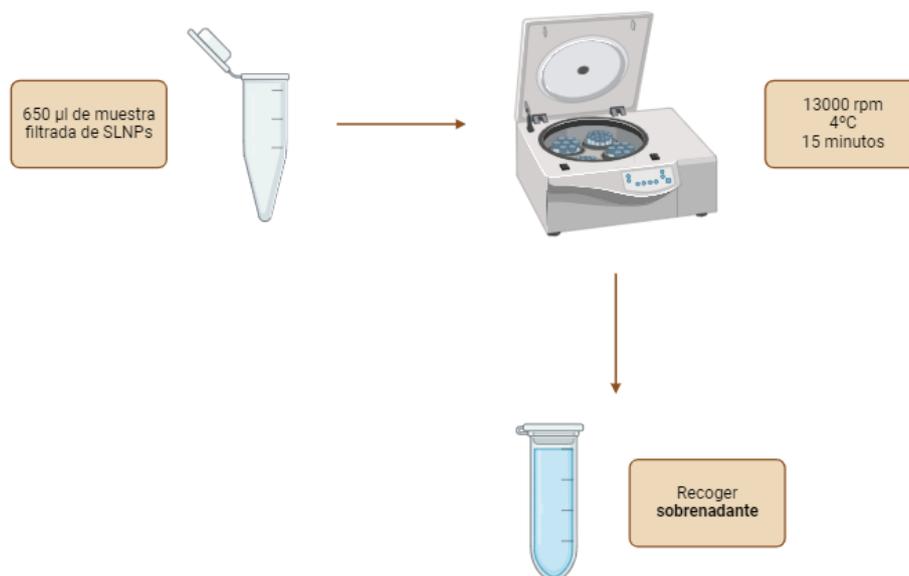


FIGURA 8. ESQUEMA DEL ESTUDIO DE ENCAPSULACIÓN DE DOXORRUBICINA Y PACLITAXEL

El estudio de encapsulación se realiza con anterioridad a medir las muestras mediante las técnicas de absorbancia UV-visible y fluorescencia (dependiendo de si trabajamos con el fármaco *Paclitaxel* o *Doxorrubicina*, respectivamente), ya que nos permite a través del principio de centrifugación, medir la cantidad de fármaco que se encuentra en el sobrenadante, es decir, se trata de un método indirecto.

Sin embargo, aunque se conozca esta cantidad, es necesario compararla con la cantidad total, es decir, la que había inicialmente para saber qué cantidad de fármaco ha sido encapsulado. Esto se realiza por medio de la diferencia entre lo que se obtiene de las

técnicas de absorbancia UV-visible y fluorescencia y la cantidad inicial, esto último se denomina control. El proceso de control consta de tres partes diferenciadas.

En primer lugar, se hace la síntesis de SLNP con el fármaco (*Doxorrubicina* y *Paclitaxel* ya que son los que queremos estudiar) como se explicaba en detalle en el apartado 2.1. Después se centrifuga la muestra, esto nos permite conocer cuáles son las partículas que han quedado en suspensión y cuales han encapsulado. Para conocer de manera más precisa cuales han encapsulado, debemos saber cuál es el total, es decir, cuales había inicialmente (control). Para ello, llevamos a cabo una síntesis de SLNP como en el apartado 2.1 pero sin llegar a colocarla en el sonicador (último paso). Esto nos permite comparar las dos muestras y por diferencia entre ambas, conocer cuál es el porcentaje de encapsulación.

2.3.2 Estudio mediante el método de absorbancia UV-visible para *Paclitaxel*

Se utiliza la espectrofotometría UV-visible para la cuantificación y control del *Paclitaxel* debido a las características de absorción en el rango UV-visible que presenta y a su relación lineal con la concentración. La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro (Figura 9), en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración [12].



FIGURA 9. EQUIPO UTILIZADO PARA DETERMINAR LA ESPECTROFOTOMETRÍA

Como se mencionaba anteriormente, el fundamento de la espectroscopía se basa en la capacidad de las moléculas en absorber radiaciones. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica...), por lo que esta técnica es un valioso instrumento para poder determinar y caracterizar biomoléculas.

Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. Cuando la luz es absorbida por una molécula se origina un salto desde un estado energético fundamental, E1, a un estado de mayor energía (estado excitado), E2. Cada molécula tiene una serie de estados excitados que la distingue del resto de moléculas. Como consecuencia, la absorción que a distintas longitudes de onda presenta una molécula, constituye una señal de identidad de esta, esto se conoce como espectro de absorción. Finalmente, la molécula en forma excitada libera energía absorbida hasta el estado energético fundamental [12].

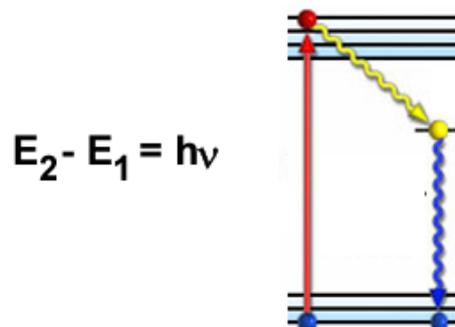


FIGURA 10. DIAGRAMA DE NIVELES CORRESPONDIENTE A LA ENERGÍA DE UNA MOLÉCULA

En la figura anterior se refleja como la absorción de energía en forma de luz hace que la molécula pase del estado fundamental (E1) al estado excitado (E2) para después, reducir su energía.

La medición de la absorbancia de la luz por las moléculas se realiza en unos aparatos llamados espectrofotómetros (Figura 9). Desde el punto de vista operativo, el primer paso es seleccionar la fuente de luz y longitud de onda a la que se va a realizar la medida. Se mide primero la absorbancia del disolvente (conocido como blanco) y al que se le

asigna el valor cero, para que la absorbancia sea cero. Posteriormente, se pone en la celdilla la cubeta con la muestra y se lee la absorbancia.

El espectro de absorción es una representación gráfica que indica la cantidad de luz absorbida a diferentes valores de longitud de onda (λ). A partir de una solución diluida de un compuesto, se verá el valor de absorbancia a diferentes longitudes de onda frente a un blanco del disolvente de la solución de la muestra que se quiera caracterizar. A partir del espectro de absorción se obtendrá el valor de λ al que el compuesto presenta una mayor absorbancia, este valor de λ se utilizará para hacer determinaciones cualitativas y cuantitativas [12].

Finalmente se necesita las curvas de calibrado. Para obtener estas curvas se preparan soluciones a diferentes concentraciones determinándose para cada una de ellas el valor de absorbancia para una longitud de onda máxima. Estos valores de absorbancia se representan en el eje de abscisas y los de las concentraciones en el eje de ordenadas. Se puede concluir, que las concentraciones altas la linealidad se pierde por lo que las medidas son poco fiables, a diferencia de las concentraciones bajas.

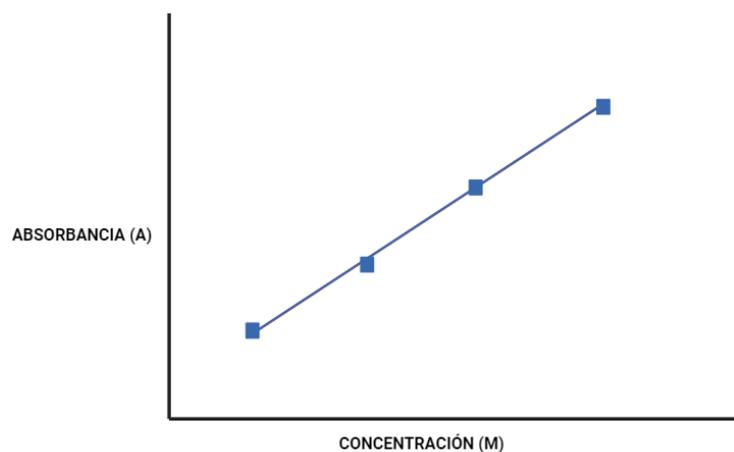


FIGURA 11. EJEMPLO DE CURVA DE CALIBRADO (ABSORBANCIA FRENTE A CONCENTRACIÓN)

Para el caso de medición del fármaco *Paclitaxel*, lo que se necesita para poder medir es la muestra con el *Taxol* y una muestra control. El control se debe preparar con las mismas cantidades o proporciones que la muestra de *Taxol*, ya que se debe conocer cuál es el total, por lo que el procedimiento debe de ser idéntico. Una vez se tengan estas

dos muestras, se debe colocar en la celda en una cantidad de 100 μl . Con esto, ya se podría medir la absorbancia UV-visible.

2.3.3 Estudio mediante fluorescencia para *Doxorrubicina*

Para poder medir la *Doxorrubicina* de manera correcta, se utiliza la técnica de luminiscencia que es complementaria a la técnica vista en el apartado anterior (absorbancia UV-visible). Esto es debido al color rojo característico de este fármaco por lo que, utilizando dicha técnica nos resultaría más práctico.

La fluorescencia o espectrometría de fluorescencia es un tipo de espectroscopia electromagnética que analiza la fluorescencia de una muestra. Se trata de utilizar un haz de luz, por lo general luz ultravioleta, que excita los electrones de las moléculas de ciertos compuestos y provoca que emitan luz de una menor energía, generalmente luz visible.

Las moléculas tienen diferentes estados llamados niveles de energía. La espectrometría de fluorescencia se refiere principalmente a estados vibracionales y electrónicos. Primero se excita la muestra mediante la absorción de un fotón de luz, desde su estado electrónico basal a uno de los distintos estados vibracionales del estado electrónico excitado. Las colisiones con otras moléculas causan que la molécula excitada pierda energía vibracional hasta que alcanza el estado vibracional más bajo del estado electrónico excitado. La molécula desciende luego a uno de los distintos niveles de vibración del estado electrónico basal, emitiendo un fotón en el proceso. Como las moléculas pueden caer a cualquiera de los diferentes niveles de vibración en el estado basal, los fotones emitidos tendrán diferentes energías y, por lo tanto, frecuencias. Así pues, mediante el análisis de las diferentes frecuencias de luz emitida por espectrofotometría de fluorescencia, junto con sus intensidades relativas, se puede determinar la estructura de los diferentes niveles de vibración.

Esta técnica se trata de un experimento típico en el cual, se miden diferentes frecuencias de luz fluorescente emitida por una muestra, manteniendo la luz de excitación a una longitud de onda constante. A esto se le llama espectro de emisión. Un espectro de excitación se mide mediante el registro de una serie de espectros de emisión utilizando luz de diferentes longitudes de onda [13].

Para medir las muestras con el fármaco *Doxorrubicina*, en primer lugar, se utilizó el software de análisis y recopilación de datos *GEN5*. Después, es necesario consultar la bibliografía para poder conocer la longitud de onda de la excitación y emisión de la *Doxorrubicina*, datos que son necesarios indicar en el programa. Se debe introducir también el número de muestras que se quiera realizar y las distintas longitudes de onda para que trabaje el programa, el rango de valores debe de estar entre los de excitación y emisión. Además, es necesario indicar las celdas en las que se ha puesto la muestra. En este caso, se utilizaron tres celdas para la *Doxorrubicina* y otras tres para el control.

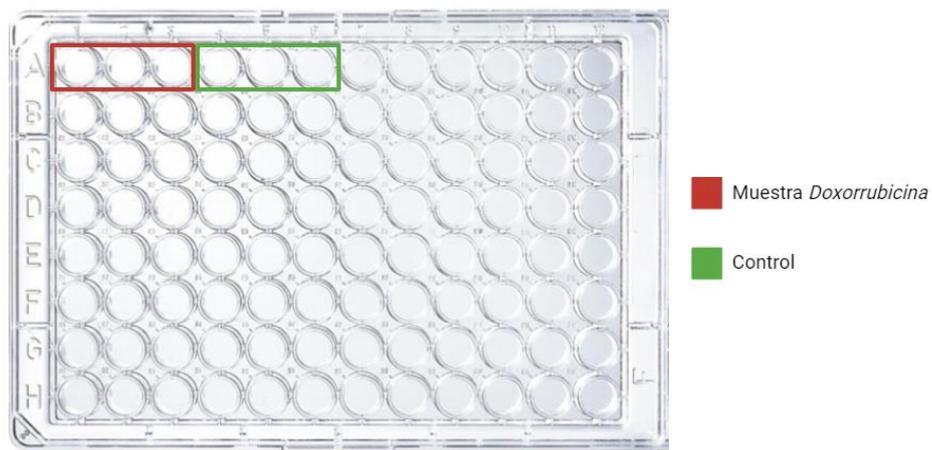


FIGURA 12. DISTRIBUCIÓN DE LAS MUESTRAS EN LAS PLACAS UTILIZADAS PARA LA FLUORESCENCIA

La cantidad que se pone tanto para la *Doxorrubicina* como para el control son 100 μ l en cada muestra, con todo ello, ya se puede medir la fluorescencia.

3. Resultados

3.1 Nanopartículas sólido-lipídicas con el fármaco *Delamanid*

El primer objetivo de este TFG era reproducir de forma eficiente la síntesis de SLNP incorporando el fármaco *Delamanid*. En particular, se pretendía obtener nanopartículas esféricas, de forma bien definida, con un tamaño aproximado de 100-200 nm y cierto grado de estabilidad en el tiempo. Para ello, como se anticipaba de manera esquemática en la Tabla 6, fue necesario realizar cinco síntesis de este primer tipo de SLNP. Esto se debe a que presenta una fase orgánica compleja y se necesitaron varios intentos para obtener la síntesis deseada. Era fundamental para este estudio obtener dicha síntesis ya que supone el punto de partida que permitirá alcanzar las síntesis de los otros fármacos de interés (*Doxorrubicina* y *Paclitaxel*).

A continuación, se muestran los resultados experimentales que indican la obtención o no de las SLNP deseadas, en particular medidas de tamaño por DLS, así como imágenes TEM que permiten obtener información tanto del tamaño como de la morfología de las nanopartículas.

El uso de la técnica de dispersión de luz dinámica radica en que es necesario medir la muestra para poder conocer la información que esta aporta sobre el tamaño y la carga de las nanopartículas, a través de luz dispersada. El gráfico obtenido de esta medición se encuentra a continuación.

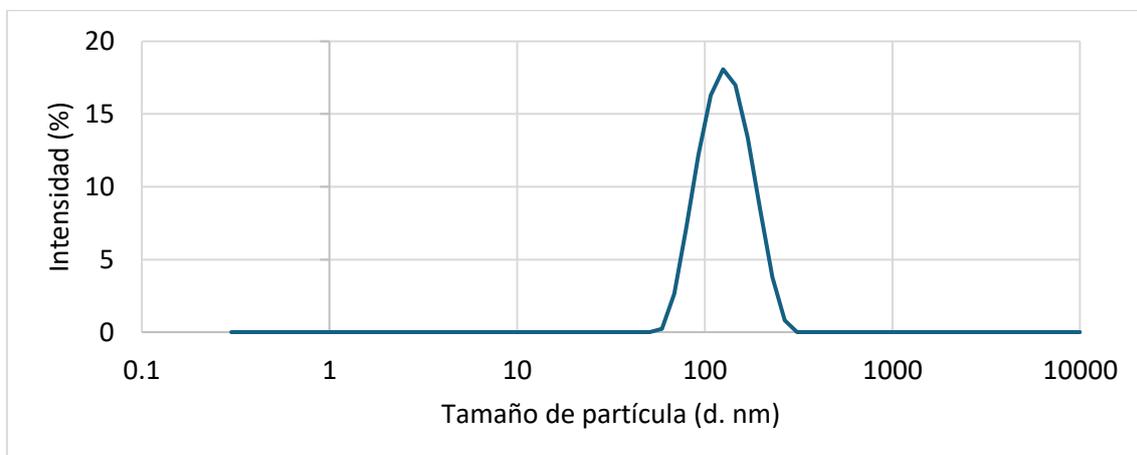


FIGURA 13. GRÁFICO TAMAÑO DE PARTÍCULA FRENTE A INTENSIDAD OBTENIDO POR DLS DE LA MUESTRA DELA-5

En realidad, se realizaron varias mediciones por DLS en las muestras DELA-1 y DELA-3 con el objetivo de verificar si se obtenían resultados óptimos. Sin embargo, dichas mediciones demostraron ser menos eficaces, como se muestra en las figuras a continuación.

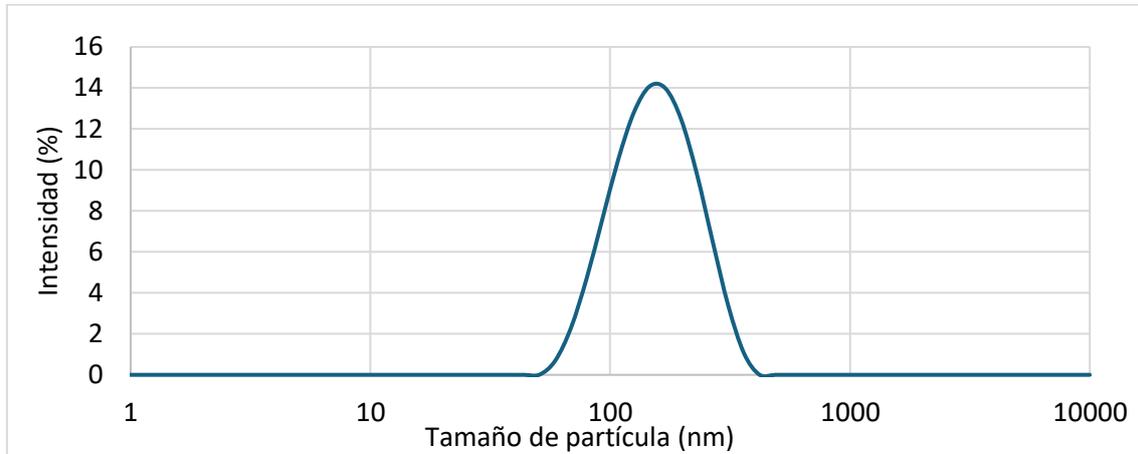


FIGURA 14. GRÁFICO TAMAÑO DE PARTÍCULA FRENTE A INTENSIDAD OBTENIDO POR DLS DE LA MUESTRA DELA-1

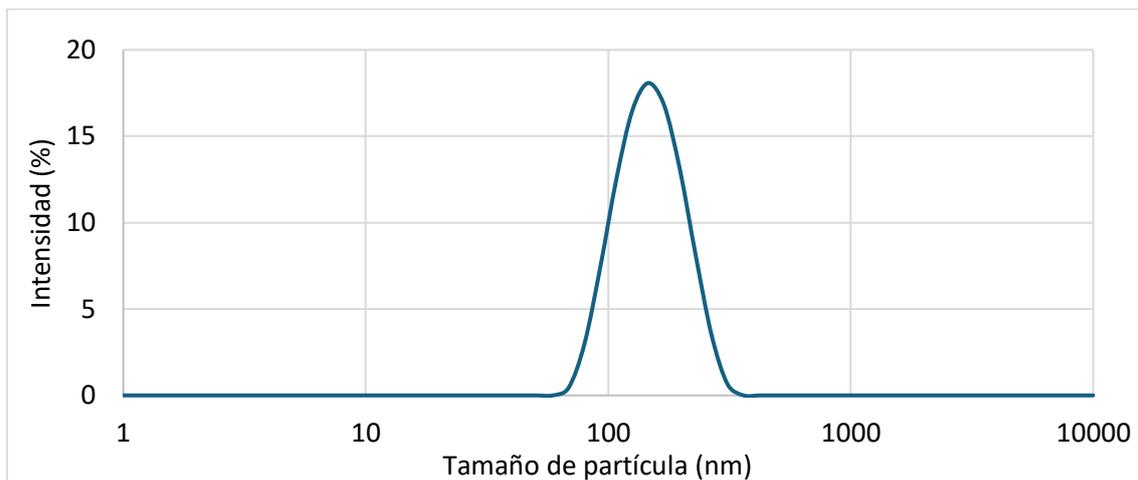


FIGURA 15. GRÁFICO TAMAÑO DE PARTÍCULA FRENTE A INTENSIDAD OBTENIDO POR DLS DE LA MUESTRA DELA-3

Las Figuras 14 y 15 representan una distribución de intensidades para diferentes tamaños de partícula (medidos en nm) para dos muestras, DELA-1 y DELA-3 respectivamente. Como se mencionaba anteriormente, los resultados obtenidos por DLS de estas muestras no fueron tan satisfactorios como los representados en la Figura 13 (muestra DELA-5). En la Figura 14, la muestra exhibe una distribución de tamaños

más heterogénea que la muestra DELA-5, lo cual implica que las nanopartículas de la muestra DELA-1 poseen dimensiones más variadas, lo cual no resulta adecuado para aplicaciones en liberación de fármacos. De igual manera, la Figura 14 también muestra una mayor variación de tamaños de partículas. Esta variabilidad puede ser causada por posibles problemas en la síntesis. Por este motivo, se decidió continuar el estudio utilizando los resultados de la muestra representada en la Figura 13.

La Figura 13 muestra la distribución de intensidad para diferentes tamaños en nm, para las nanopartículas obtenidas en la última síntesis (DELA-5) obtenido mediante DLS. Esta figura muestra claramente información detallada sobre el tamaño y distribución de tamaños de la muestra de liposomas. Estos datos son importantes para caracterizar las propiedades físicas de los liposomas. La muestra DELA-5 presenta una población principal de tamaño. Este máximo corresponde a las partículas de aproximadamente 162 nm de diámetro, esto nos indica que la mayoritaria de liposomas presenta un diámetro aproximado de dicho valor. Además, la presencia de un máximo bien definido sugiere que la muestra presenta liposomas con un tamaño bastante homogéneo. Con el valor de Z-Average (tamaño medio de las partículas), podemos conocer el tamaño promedio de los liposomas de la muestra que, en este caso, es de 141,3 nm. Otro factor importante es el índice de polidispersidad (PI), que en esta muestra es de 0,207. Es importante comentar que un PI por debajo de 0,3 se considera óptimo puesto que indica que las partículas en la muestra tienen tamaños similares entre sí, lo que quiere decir que no hay una gran variedad. Un valor bajo del índice de polidispersidad permite tener un tamaño de partícula más uniforme y predecible.

Otro aspecto importante a la hora de evaluar la calidad de las SLNP para futuras aplicaciones biomédicas es su estabilidad en el tiempo. Idealmente, con el fin de poder realizar experimentos en células e incluso en tejidos, deberían mantener sus propiedades intactas durante varias semanas. Por ello, con el fin de asegurar que la síntesis DELA-5 era adecuada, se llevó a cabo un seguimiento con la técnica DLS de dicha muestra durante varios días. Las figuras 16, 17 y 18 presentan, respectivamente, la distribución de intensidad para diferentes tamaños en nm, todas ellas para las nanopartículas obtenidas en la última síntesis. Con el paso del tiempo, se observa que la muestra experimenta un aumento tanto de tamaño de partícula como de índice de

polidispersidad. El tamaño máximo que llega a alcanzar es de aproximadamente 169 nm y un PI máximo de 0,3. Cabe destacar que la muestra empieza a precipitar a los 15 días.

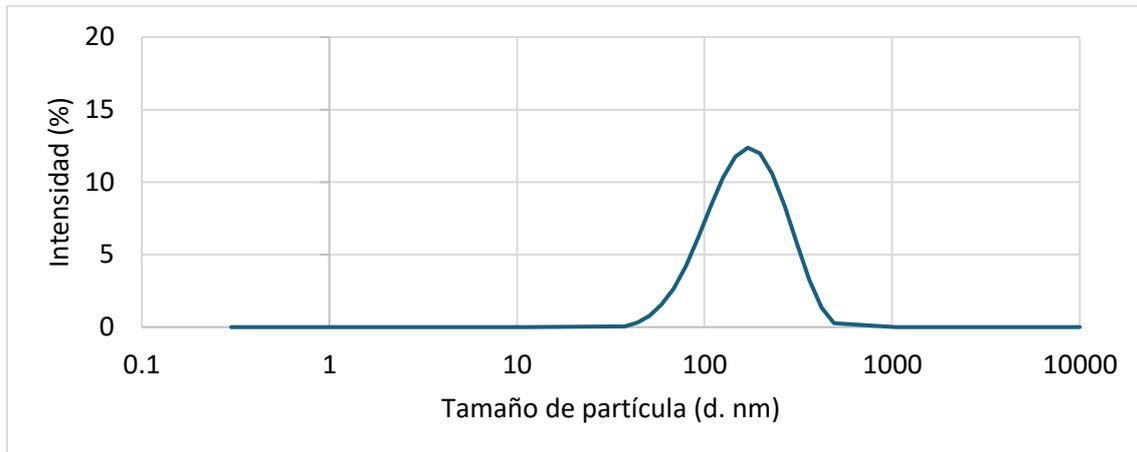


FIGURA 16. GRÁFICO TAMAÑO DE PARTÍCULA FRENTE A INTENSIDAD OBTENIDO POR DLS DE LA MUESTRA DELA-5 A LOS 8 DÍAS

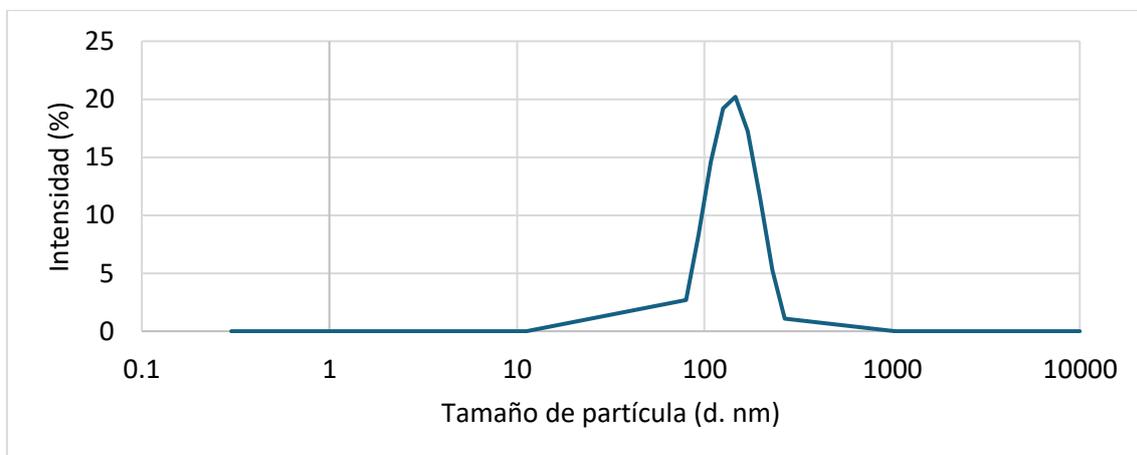


FIGURA 17. GRÁFICO TAMAÑO DE PARTÍCULA FRENTE A INTENSIDAD OBTENIDO POR DLS DE LA MUESTRA DELA-5 A LOS 15 DÍAS

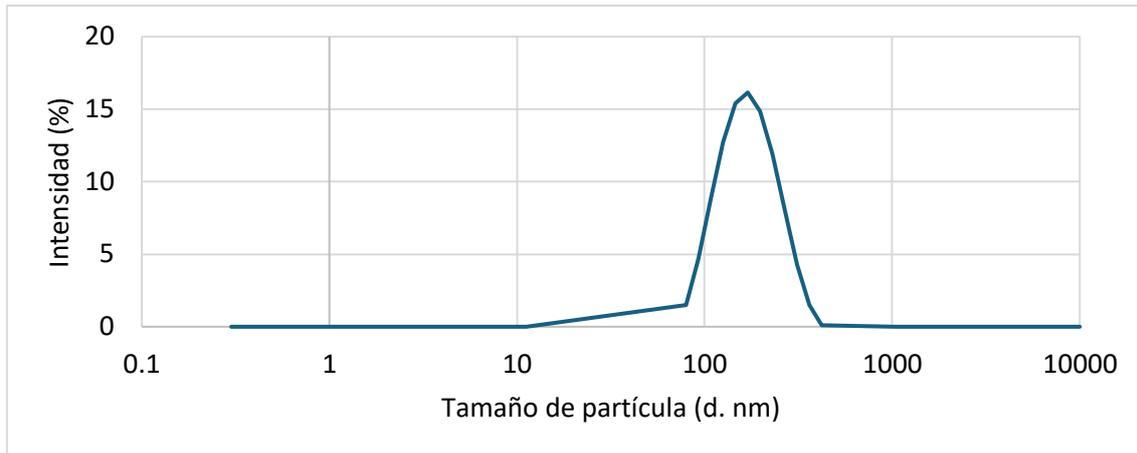


FIGURA 18. GRÁFICO TAMAÑO DE PARTÍCULA FRENTE A INTENSIDAD OBTENIDO POR DLS DE LA MUESTRA DELA-5 A LOS 21 DÍAS

Siguiendo con el análisis de esta muestra, en segundo lugar, se midió utilizando TEM. A pesar de que las mediciones con DLS proporcionan información significativa, es imperativo efectuar una evaluación en el TEM con el fin de determinar la forma y los detalles estructurales de las nanopartículas. La inclusión de nanopartículas de hierro las hace fácilmente visibles, ya que pueden identificarse mediante contraste microscópico. La Figura 19 presenta una imagen TEM de una de las nanopartículas de la muestra DELA-5. La escala, como se muestra en la figura, es 200 nm. De ellas se concluye que todas presentan una forma esférica, presentan en su interior nanopartículas de hierro y tienen un tamaño que ronda los 100 nm aproximadamente.

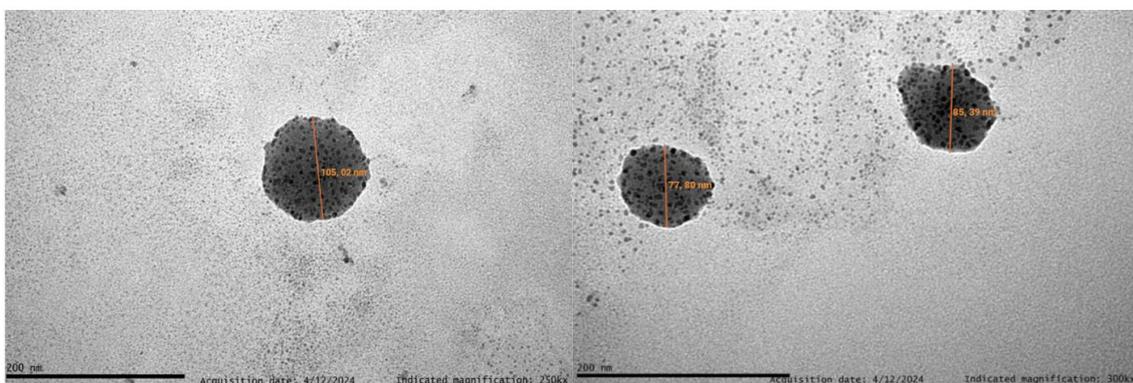


FIGURA 19. IMÁGENES TEM DE LA MUESTRA DELA-5 CON NANOPARTÍCULAS DE HIERRO ENCAPSULADAS EN SU INTERIOR

3.2 Nanopartículas sólido-lipídicas con el fármaco *Doxorrubicina*

Una vez puesto a punto tanto el dispositivo experimental como el método de síntesis de SLNP, el tercero de los objetivos de este TFG consistía en adaptar dicho método para la incorporación de los dos fármacos de interés, *Doxorrubicina* y *Paclitaxel*.

Utilizando el fármaco *Doxorrubicina* se han realizado tres síntesis (DOXO-1, DOXO-2 y DOXO-3). Las tres síntesis se realizaron cambiando la concentración en etanol para comprobar con cuál de ellas se lograba un mejor resultado. En DOXO-1 se diluía 1:100 en etanol, en DOXO-2, 1:50 y en DOXO-3, 1:200. Se observó que los mejores resultados se obtienen con la muestra DOXO-1.

Con la *Doxorrubicina* el proceso varía ya que es el fármaco de interés. Por lo tanto, se requiere medir la muestra con DLS y TEM para analizar tanto la forma como el tamaño de partícula, pero también es necesario someter la muestra (DOXO-1) a la prueba de fluorescencia para determinar el porcentaje de encapsulación (eficacia). Se utiliza la técnica de fluorescencia debido al color rojizo característico de este fármaco. Esta técnica tiene mucha relevancia porque da información de la cantidad de fármaco incorporado en el nanomaterial.

La Figura 20 muestra la distribución de intensidad para los diferentes tamaños de partícula en nm, obtenidos en la primera síntesis con el fármaco *Doxorrubicina* (DOXO-1). Se puede observar que en las SLNP en las que se ha incorporado *Doxorrubicina* se obtiene sólo una población, que se corresponde aproximadamente con un valor de 145 nm, lo que quiere decir que los liposomas presentan un diámetro interno de aproximadamente ese tamaño. Al presentar solo un máximo, se deduce que la muestra presenta una población de liposomas con un tamaño homogéneo. El tamaño medio de las partículas presentes en la muestra DOXO-1 nos lo da el parámetro Z-Average, este valor es de 147,6 nm. Además, el índice de polidispersidad es de 0,1758. Este valor es más pequeño que el de la muestra DELA-5, pero se trata de un valor ya que se acerca al valor de 0,3. Esto indica que la muestra tiene partículas con tamaños similares entre sí, siendo más uniforme.

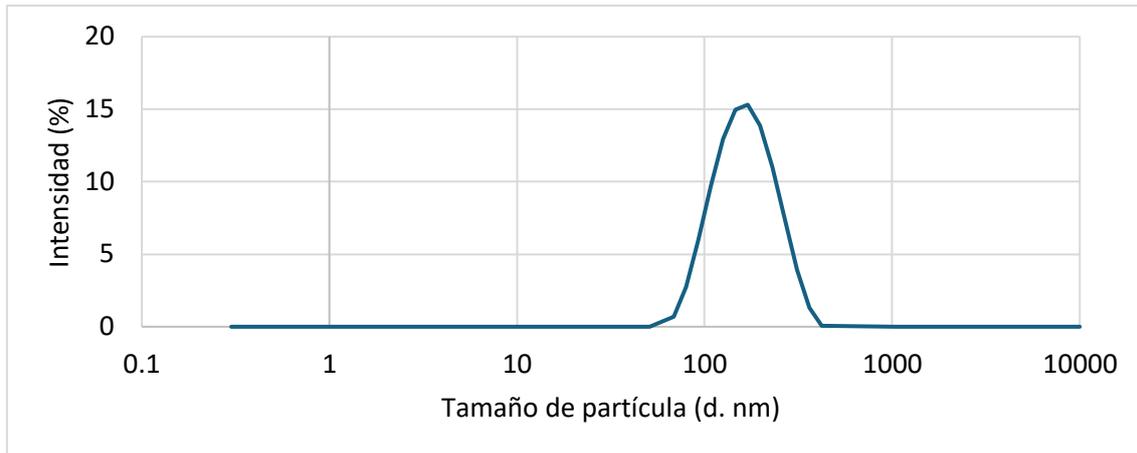


FIGURA 20. GRÁFICO TAMAÑO DE PARTÍCULA FRENTE A INTENSIDAD OBTENIDO POR DLS DE LA MUESTRA DOXO-1

Al obtenerse buenos resultados con el DLS, se mide la muestra en el TEM. La Figura 21 presenta dos imágenes TEM de varias nanopartículas de la muestra (DOXO-1), en la primera se muestra el tamaño de una nanopartícula específica de la muestra y en la segunda, las partículas de hierro encontradas en el interior de las nanopartículas de la muestra. La escala que se muestra en la figura es de 200 nm. El diámetro de las SLNP es más pequeño que el que se obtenía en la muestra DELA-5, pero se consiguen ver las nanopartículas solido-lipídicas. Presentan una forma esférica y se observan las nanopartículas de hierro en su interior.

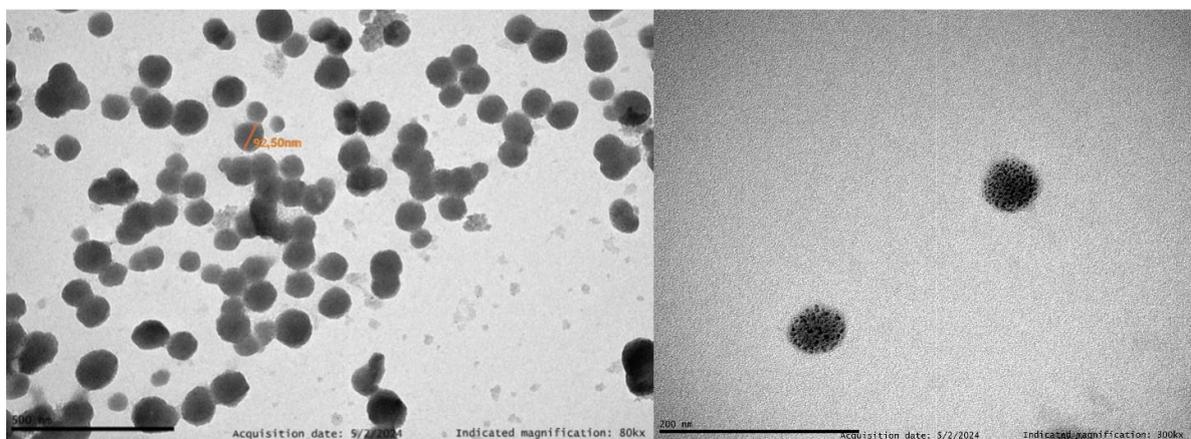


FIGURA 21. IMÁGENES TEM DE LA MUESTRA DOXO-1 CON NANOPARTÍCULAS DE HIERRO ENCAPSULADAS EN SU INTERIOR

Como se explicaba en el apartado 2.2, la concentración elegida para poder medir las SLNP de manera correcta es 1:10 en PBS 1x.

Con la forma y el tamaño de partícula de la muestra conocido, se procede a utilizar la técnica de fluorescencia (explicada en el apartado 2.3.3) para comprobar la encapsulación de la muestra. Para ello, se cogen 100 µl tanto de la muestra con la *Doxorrubicina*, como del control. Como se explicaba en el apartado 2.3.3., se utilizaron tres celdas para DOXO-1 y otras tres para el control. Después, se utiliza el programa GEN5 metiendo los parámetros correspondientes y se busca obtener el porcentaje de encapsulación de DOXO-1. Tras hacer esta medición, se observó que el porcentaje de encapsulación era menos del 10%, lo que supone una encapsulación negativa. De manera general, un buen porcentaje de encapsulación superior al 60-70% se considera una buena eficiencia de encapsulado, aunque lo ideal sería 100%.

3.3 Nanopartículas sólido-lipídicas con el fármaco *Paclitaxel*

Como se mencionaba en el apartado anterior, el tercer objetivo consiste en la adaptación del método para la incorporación de los fármacos de interés, en este apartado en concreto, del *Paclitaxel*.

A partir de este fármaco, sólo se hizo una síntesis, TAXOL-1. A partir de esta síntesis, solamente se llevaron a cabo las mediciones utilizando la técnica DLS (para obtener información acerca del tamaño de partícula) y absorbancia UV-visible (para conocer el porcentaje de encapsulación).

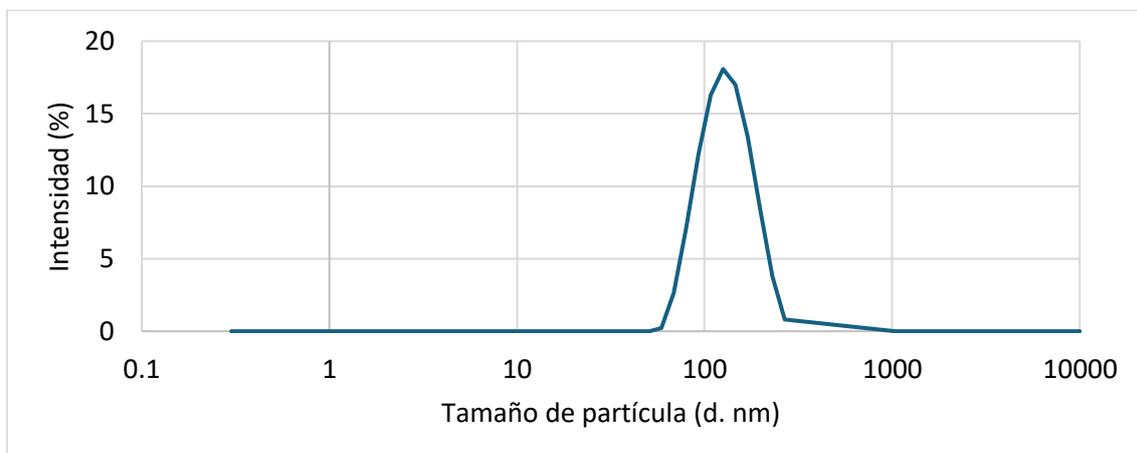


FIGURA 22. GRÁFICO TAMAÑO DE PARTÍCULA FRENTE A INTENSIDAD OBTENIDO POR DLS DE LA MUESTRA TAXOL-1

La Figura 22 muestra la distribución de intensidades para múltiples tamaños en nm para las nanopartículas obtenidas en la única síntesis con *Paclitaxel* (TAXOL-1). A través de esta gráfica sabemos que dicha muestra solo presenta un máximo, lo que quiere decir que en dicha muestra solo hay una población de tamaño de partícula y que, además, la mayoría de las partículas tienen un tamaño alrededor de ese valor, 140 nm aproximadamente. Con la intensidad prácticamente nula antes del máximo y después de él sugiere que hay muy pocas partículas con un tamaño menor o mayor al de este máximo. El índice de polidispersidad es de 0,2 lo que indica una distribución de tamaño de partículas muy estrecha y homogénea. También indica que la mayoría de las partículas tienen un tamaño muy similar, con poca variación de diámetros dando lugar a un proceso de síntesis de partículas bastante controlado y persistente.

Con el tamaño de partícula analizado y comprobando que se trata de una buena síntesis es importante conocer cuál es el porcentaje de encapsulación, es decir, conocer cuanto fármaco ha sido capaz de encapsular las SLNP. Para ello, se utiliza la técnica explicada detalladamente en el apartado 2.3.2. De este procedimiento se obtiene, en primer lugar, el espectro de absorción (gráfica que representa diferentes valores de longitud de onda frente a absorbancia) para finalmente obtener la recta de calibrado (recta que representa concentración frente a absorbancia).

De la muestra TAXOL-1, se obtuvo el siguiente espectro de absorción:

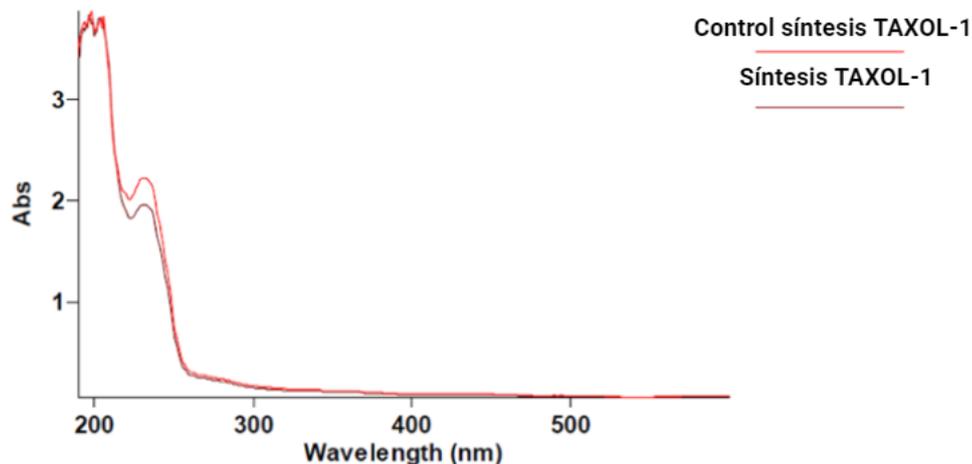


FIGURA 23. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA MUESTRA TAXOL-1 Y DE SU CONTROL OBTENIDO MEDIANTE LA TÉCNICA ABSORBANCIA UV-VISIBLE

En la figura 23 se representa el espectro de absorción de la síntesis de TAXOL-1 y del control de esta síntesis. De esta se obtiene que, para 230 nm, la absorbancia del control es de 2,231 y la de la síntesis es de 1,961. Llevando estos datos a la recta patrón, el control tiene una concentración de 13,79 $\mu\text{g/ml}$ y la síntesis 11,75 $\mu\text{g/ml}$.

Tener gráficas de absorbancia tanto para la síntesis con *Paclitaxel* como para las nanopartículas con *Paclitaxel* es fundamental para poder hacer un buen análisis de la eficiencia de encapsulación, es decir, poder determinar la cantidad de fármaco que ha encapsulado y la que no. En la Figura 23 se representaba la síntesis de TAXOL-1 y con el análisis de la curva de la síntesis (sobrenadante), se obtiene la concentración de lo que no ha encapsulado, al medir la absorbancia del sobrenadante se utiliza la recta patrón para determinar la concentración de *Paclitaxel* libre, pudiendo cuantificar así la concentración inicial de *Paclitaxel*. Una vez se han formado las nanopartículas y separadas del sobrenadante, es preciso conocer cuanto *Paclitaxel* ha sido encapsulado por las nanopartículas, para ello se necesita una gráfica que represente la absorbancia para las nanopartículas con *Paclitaxel*. En la figura 24 se representa el espectro de absorción tanto de las nanopartículas con *Taxol* de la síntesis como del control.

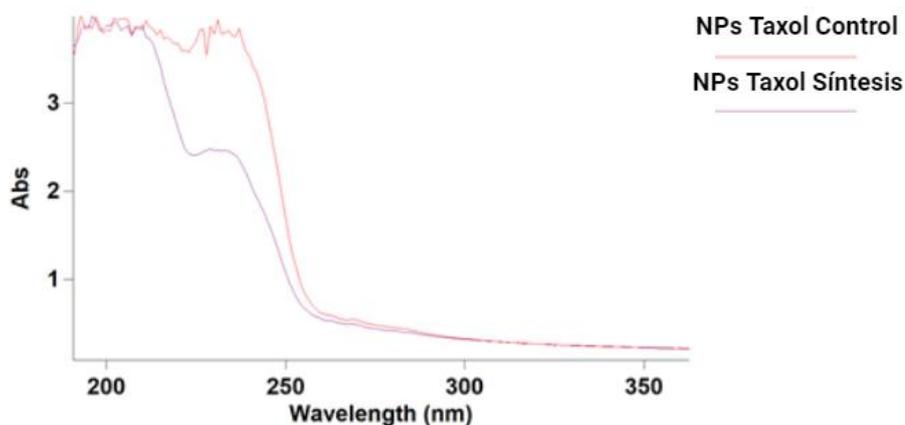


FIGURA 24. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS CON TAXOL EN LA SÍNTESIS Y EN SU CONTROL OBTENIDO MEDIANTE LA TÉCNICA DE ABSORBANCIA UV-VISIBLE

Comparando la cantidad de *Paclitaxel* encapsulado con la cantidad total inicial y la cantidad libre en el sobrenadante, se procede a calcular la eficiencia de encapsulación. Para ello, se utiliza la fórmula que se indicó previamente en el apartado 2.1.1. Así, se obtiene la eficiencia de encapsulación:

TABLA 13. CÁLCULO DE LA EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN DE LA MUESTRA TAXOL-1

	Absorbancia	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Encapsulación (%)
NPs Control	3,84	25,95	
Nps TAXOL-1 (sobrenadante)	2,48	15,66	40

Finalmente, en la siguiente tabla se ha recogido de manera esquemática, las pruebas que se han realizado para los tres fármacos, detallando cuales de ellas se han realizado con éxito y cuales han dado resultados desfavorables.

TABLA 14. RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS DIVERSAS TÉCNICAS A LAS QUE SE HAN SOMETIDO LOS TRES FÁRMACOS DE INTERÉS

Fármaco	Forma y tamaño de partículas		Eficiencia de encapsulación	
	DLS	TEM	Absorbancia UV-visible	Fluorescencia
<i>Delamanid</i>	Favorable	Favorable	-	-
<i>Doxorrubicina</i>	Favorable	Favorable	-	Desfavorable
<i>Paclitaxel</i>	Favorable	-	Favorable pero mejorable	-

4. Conclusiones

Durante el análisis del apartado de resultados, se pueden obtener diversas conclusiones en función de las tres partes de las cuales se encuentran relacionadas, cada una, con los fármacos utilizados para las diversas síntesis de nanopartículas sólido-lipídicas.

En primer lugar, al utilizar el fármaco ***Delamanid***, las mediciones realizadas mediante DLS indicaron un tamaño medio de partícula adecuado y un índice de polidispersidad favorable. No obstante, con el transcurso de los días, se observó un aumento en ambos parámetros, lo cual suele sugerir un problema de estabilidad en el sistema de nanopartículas, posiblemente debido a la agregación de las partículas o a la formación de una distribución de tamaños más heterogénea. Por otro lado, las observaciones mediante TEM revelaron nanopartículas de forma esférica con un tamaño aproximado de 100 nm. Esta morfología esférica suele ser más estable, por lo que su obtención sugiere que el proceso de síntesis está bien controlado. Además, el tamaño alcanzado se considera óptimo para la entrega de fármacos.

En segundo lugar, se llevaron a cabo mediciones con DLS y TEM para determinar el tamaño de partícula y la morfología de las nanopartículas sintetizadas con el fármaco ***Doxorrubicina***. Posteriormente, se empleó la técnica de fluorescencia para evaluar la eficacia de encapsulación. Los resultados obtenidos mediante DLS indicaron un tamaño de partícula y un índice de polidispersidad que sugieren una distribución de tamaños relativamente uniforme, lo cual favorece la estabilidad del sistema. Además, las imágenes TEM mostraron nanopartículas de forma esférica, lo que es indicativo de una síntesis adecuada.

Sin embargo, al evaluar la eficacia de encapsulación mediante fluorescencia, los resultados no fueron los esperados, ya que se obtuvo un valor inferior al 10%. Un porcentaje de encapsulación tan bajo indica que una proporción significativa de la ***Doxorrubicina*** no fue incorporada de manera eficiente en las SLNP, lo que podría tener implicaciones negativas para su desempeño terapéutico. En conclusión, aunque los resultados iniciales parecían óptimos, la baja eficiencia de encapsulación revela que el proceso no fue exitoso, dado que aproximadamente el 90% del fármaco no logró ser encapsulado con éxito.

Por último, se utilizó el fármaco de interés, *Paclitaxel*, para llevar a cabo una primera medición mediante DLS, con el fin de determinar el tamaño medio de las partículas y el índice de polidispersidad, de manera similar a los casos anteriores. Posteriormente, se empleó la técnica de absorción UV-visible para evaluar la eficiencia de encapsulación del fármaco. Los resultados obtenidos por DLS revelaron la existencia de una única población de partículas con un tamaño predominante alrededor de 140 nm, acompañado de un índice de polidispersidad bajo, lo que indica una distribución muy estrecha y homogénea, característica de una síntesis altamente controlada.

Para la evaluación de la encapsulación mediante absorción UV-visible, se utilizaron dos gráficos. El primero, correspondiente al espectro de absorción de la muestra sintetizada y su control, mostró valores de absorbancia muy similares entre ambos. Una absorbancia semejante entre la muestra control y la muestra experimental podría indicar una alta eficiencia de encapsulación; sin embargo, también podría sugerir la presencia de *Paclitaxel* no encapsulado o la existencia de errores experimentales. Por esta razón, se recurrió a un segundo gráfico, que representaba el espectro de absorción de las nanopartículas con *Taxol* y su control, para calcular la eficiencia de encapsulación.

Tras realizar los cálculos pertinentes, se obtuvo una eficiencia de encapsulación del 40%. Este valor indica que, del total de *Paclitaxel* inicialmente presente en la solución, solo el 40% fue encapsulado, mientras que el 60% restante permaneció en el sobrenadante. Esta eficiencia moderada sugiere que el proceso de encapsulación podría mejorarse, ya que se aspira a un porcentaje mayor de fármaco encapsulado. Además, una baja eficiencia de encapsulación podría incrementar los costos de producción, al requerir una mayor cantidad de material inicial para obtener la cantidad deseada de *Paclitaxel* encapsulado. Una posible solución podría consistir en ajustar la concentración de reactivos, el tiempo de reacción o el método de encapsulación.

5. Referencias

- [1] Dilnawaz, F., Amirul Islam, M., Sahoo, S. K. & Naskar, S. (2018). Recent trends of nanomedicinal approaches in clinics. International Journal of Pharmaceutics.
- [2] Khalil NM, Cristina De Mattos A, Moraes TC, Carraro M, Ludwig DB, Mainardes RM. (2013). Nanotechnological Strategies for the Treatment of Neglected Diseases. Curr Pharm
- [3] Dilnawaz F, Acharya S & Sahoo SK. (2018). Recent trends of nanomedicinal approaches in clinics. Int J Pharm.
- [4] Espinola, L.G. (1984). Liposomas en sistemas biológicos (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- [5] Geszke-Moritz, M. & Moritz, M. (2016). Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: composition, properties and therapeutic strategies. National Library of Medicine.
- [6] Müller, R.H., Radtke, M. & S.A. Wissing. (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. National Library of Medicine.
- [7] Sangeeta, R. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. PubMed.
- [8] Centelles, J.J & Imperial, S. (2010). Paclitaxel. Descubrimiento, propiedades y uso clínico. Offarm. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-X0212047X10540737>
- [9] Microscopía electrónica de transmisión: Servicio de Microscopía Electrónica [Internet]. Universidad Politécnica de Valencia. Disponible en: <https://www.upv.es/entidades/SME/info/753329normalc.html>
- [10] Laboratorio de Técnicas Instrumentales [Internet]. Dispersión de Luz Dinámica (DLS). Disponible en: <https://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/dispersin-de-luz-dinamica-dls>

[11] Shafiq S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ahmad FJ, Khar RK & Ali M. (2007). Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. Eur J Pharm Biopharm.

[12] Abril Díaz, N., Bárcena Ruiz, J.A., Fernández Reyes, E., Galván Cejudo, A., Jorrín Novo, J., Peinado Peinado, J., Toribio, F. & Túñez Fiñana, I. Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Facultad de Medicina de Córdoba.

[13] Pérez, G. Espectrometría de fluorescencia. Espectrometría. Disponible en: https://www.espectrometria.com/espectrometra_de_fluorescencia