

*Optimización de un procedimiento para la
liofilización de transportadores lipídicos
nanoestructurados*

*Optimization of a procedure for freeze-
drying of nanostructured lipid carriers*



Alba Guillín Lema



Contenido

Resumen	1
Palabras clave	2
Introducción	3
- Liofilización y crioprotectores	6
- Herramientas de Inteligencia Artificial	7
Objetivos	8
Materiales y métodos	8
- Materiales	9
- Preparación de NLC	9
- Liofilización	10
-Caracterización de las NLC dializadas y del liofilizado resuspendido	10
- Modelización mediante Herramientas de Inteligencia Artificial	11
La calidad de los modelos	12
Resultados y discusión	13
- Caracterización de los NLCs en suspensión acuosa	14
-Caracterización de los NLC tras la resuspensión de los liofilizados	17
-Análisis macroscópico de los productos liofilizados	17
-Modelos obtenidos mediante FormRules®	18
-Tamaño de partícula.....	19
-Índice de polidispersión	22
-Potencial Z	23
Conclusiones	25
Bibliografía	26
Agradecimientos	30
Anexo I	31

Resumen

Los transportadores lipídicos nanoestructurados, también conocidos como NLC, son sistemas nanométricos que dan solución a los problemas de sus predecesoras, las SLN, lo que ha hecho que hayan adquirido mayor relevancia. Son numerosos los artículos que estudian su composición y capacidad de carga de fármaco. A pesar de este creciente interés, son prácticamente inexistentes los artículos sobre su conservación. Mientras que para otro tipo de nanopartículas se han identificado los mejores procedimientos y condiciones para lograrlo, para las NLCs no es posible encontrar un procedimiento de conservación que se adapte a los objetivos de interés. En este estudio se busca optimizar un procedimiento de secado que sirva como referencia para este tipo de sistemas.

Para ello se lleva a cabo un proceso de liofilización, capaz de convertirlos en un producto sólido. La etapa de congelación puede ser rápida o lenta, por lo que en este caso se realizan ambas para seleccionar la mejor. Además, es necesario añadir crioprotectores para proteger a las nanopartículas durante el proceso. Según el tipo y concentración de crioprotector la eficacia del proceso varía, siendo necesario analizar un conjunto de ellos a varias concentraciones.

Entre los parámetros que permiten caracterizar este tipo de sistemas se usan el tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Z. Los resultados que se obtienen son introducidos en un software de inteligencia artificial, FormRules®. Con él se modelizan las variables del experimento para conocer las condiciones más adecuadas para que los parámetros varíen lo menos posible, incluso si no son evaluadas experimentalmente.

Una vez evaluados los datos, se puede conocer las mejores condiciones para realizar el proceso de liofilización. Este estudio demuestra que la liofilización es eficaz para conservar los NLCs, sin embargo, debe realizarse bajo unas condiciones determinadas. Los NLCs que mejor mantuvieron sus propiedades iniciales fueron aquellos sometidos a una congelación rápida. Con respecto al crioprotector el uso de trehalosa o glucosa a concentraciones bajas fueron las que menor incremento de tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Z experimentaron.

Nanostructured lipid carriers, also known as NLC, are nanometric systems that solve the problems of their precursors, SLN, what has made them more relevant lately. There are numerous articles that study its composition and drug loading capacity. Despite this growing interest, articles about its conservation are practically non-existent. While for other types of nanoparticles the best procedures and conditions to achieve this have been identified, it is not possible for NLCs to find a conservation procedure that suits the objectives of interest. Therefore, this study seeks to optimize a drying procedure that serves as a reference for this type of systems.

To achieve this, a lyophilization process is carried out, able of turn them into a solid product. The freezing rate can be fast or slow, so in this case both are done to select the best one. In addition, it is necessary to add cryoprotectants to protect the nanoparticles during the process. Depending on the type and concentration of cryoprotectant, the effectiveness of the process varies, being necessary to analyze a set of them at various concentrations.

Among the parameters that allow the characterization of this type of systems, the particle size, polydispersity index and Z potential are used. The results obtained are introduced in an artificial intelligence software, FormRules[®]. The variables of the experiment are modeled to know the most adequate conditions so that the parameters change as little as possible, even if they are not evaluated experimentally.

Once the data have been evaluated, it is possible to know the best conditions for freeze-drying. This study demonstrates that lyophilization is effective in preserving NLCs, however, it must be done under certain conditions. The NLCs that best maintained their initial properties were those exposed to rapid freezing. The use of trehalose or glucose at low concentrations got the lowest increase in particle size, polydispersity index and Z potential experienced.

Palabras clave:

Nanopartículas, sistemas lipídicos nanoestructurados, liofilización, crioprotectores, redes neuronales artificiales, lógica difusa.

Nanoparticles, nanostructured lipid carriers, freeze-drying, cryoprotectant, artificial neural networks, fuzzy logic.

Introducción

La nanomedicina puede suponer una innovadora línea en el desarrollo de nuevas formulaciones para el tratamiento de diversas enfermedades ya que, entre otras cosas, gracias a su tamaño puede penetrar en las células dañadas (1).

El principal objetivo de la nanomedicina es conseguir atravesar las barreras celulares para conseguir una cesión y retención del fármaco óptimas para las necesidades del tratamiento. Con ello, se busca un nivel terapéutico durante un tiempo lo suficientemente prolongado (2).

Se conoce como nanopartícula a una partícula coloidal submicrométrica ($<1\mu\text{m}$) fabricada con polímeros de origen natural (alginato, albúmina) o sintéticos (PLA) (1). Otros compuestos que se utilizan son, por ejemplo, los lípidos o la sílice (2).

Las nanopartículas tienen el objetivo de incrementar la solubilidad y controlar la cesión para disminuir la toxicidad y el número de administraciones (3).

Según su composición pueden ser de dos tipos, nanopartículas poliméricas y lipídicas. Las nanopartículas poliméricas se preparan a partir de polímeros hidrofílicos sintéticos o naturales. El carácter hidrofílico de la estructura ayuda a que sea más soluble en agua y menos sensible a la degradación enzimática. El fármaco puede colocarse en distintas zonas de la estructura quedando encapsulado, atrapado o adsorbido sobre la superficie del polímero (4). En este grupo se encuentran las micelas (5), los dendrímeros (6), las formadas por compuestos inorgánicos como sílice u oro (2, 7), los nanotubos de carbono (7) o los polimerosomas (6).

Al igual que las poliméricas, las nanopartículas lipídicas pueden ser de distintos tipos: liposomas (2), niosomas, nanoemulsiones (6) y las partículas lipídicas sólidas.

Estas últimas, conocidas como Solid lipid nanoparticles (SLN), se forman con lípidos sólidos. Presentan una eficacia de encapsulación de fármacos baja debido a la elevada cristalinidad de los lípidos sólidos, lo que causa que, a largo plazo, el fármaco sea expulsado de la partícula (8).

Los Nanostructured lipid carriers (NLC) son modificaciones de los SLN de reciente incorporación. Están formados por lípidos sólidos y líquidos (8).

Presentan una menor cristalinidad que los SLN, mayores defectos en la matriz y menor densidad de empaquetamiento lipídico. Por ello, su capacidad de encapsulación y

estabilidad son mayores. Otro factor importante es que pueden ser fabricados usando lípidos endógenos o similares a los del organismo (8). Sus matrices pueden incorporar mayor cantidad de fármacos lipofílicos, la expulsión durante la encapsulación es mínima, permiten utilizar una variedad de surfactantes más amplia y presentan una mejor cesión del fármaco (3). Su capacidad de transporte es elevada y experimentan menor degradación.

Como el número de ventajas de este tipo es mucho mayor, están siendo objeto de estudio para el desarrollo de nuevas terapias (3).

Entre los factores a tener en cuenta para su diseño están: la vía de administración, las propiedades del fármaco, la carga necesaria (9), la biocompatibilidad del material y su toxicidad (2). Además, es posible colocar sobre la superficie de la estructura inmunomoduladores y anticuerpos monoclonales, para hacer más específica la unión al sitio de interés (9).

Para saber si se está realizando correctamente el proceso de formación de las nanopartículas se realizan un conjunto de ensayos para su caracterización: eficacia de encapsulación, potencial Z, análisis FT-IR, cesión in vitro... (8).

Las nanopartículas, una vez son introducidas en el organismo, van a tener que superar las distintas barreras biológicas para alcanzar su diana (10).

Su pequeño tamaño es una ventaja, ya que son capaces de atravesar la pared de los capilares sanguíneos. La absorción se puede producir mediante distintos mecanismos como transporte intracelular o paracelular (10). También van a poder experimentar transcitosis (11) y endocitosis (5).

Por otra parte, según cómo se diseñe la nanopartícula es posible dirigirlas a distintas zonas mediante lo que se conoce como vectorización (control de la distribución). La vectorización puede producirse mediante transporte pasivo, que consiste en obtener unas características físicas concretas que modifiquen el paso por sangre. Un ejemplo de esto sería una permeabilidad y retención mejoradas (*Enhanced permeability and retention*, EPR) que aprovecha el mayor flujo de sangre y permeabilidad en la zona de una zona afectada para introducir mayor cantidad de fármaco. Por otra parte, la vectorización activa consigue alcanzar la diana mediante la funcionalización de las nanopartículas con ligandos superficiales, lo que mejora la concentración de fármaco en la zona de interés al darse una unión específica entre ambas estructuras (10).

Las nanopartículas también van a encontrar problemas en su paso por el organismo. Entre ellos el sistema retículo endotelial (RES) que capta rápidamente las nanopartículas que se encuentran en circulación mediante macrófagos (10) y acaban en bazo, pulmones o médula ósea (11). Otras barreras a superar serían la matriz extracelular, la membrana celular, las bombas de eflujo o la degradación lisosomal (10).

Existen casos donde la captación de las nanopartículas por el RES puede ser de utilidad. Aunque normalmente se evita, ya que elimina de la circulación a las nanopartículas, la captación por los macrófagos sería de interés para actuar sobre los patógenos intracelulares que infectan a los macrófagos. La tendencia de los macrófagos a captar las nanopartículas por endocitosis incrementaría la concentración de éstas en su interior y reduciría la aparición de efectos sistémicos (5).

El fármaco dentro de la nanopartícula se cede en la matriz celular por distintos mecanismos como difusión, erosión, degradación o hinchamiento entre otros (5).

Las nanopartículas presentan cierto grado de toxicidad que debe tenerse en cuenta y que puede ser un factor limitante para su uso. Las diferencias entre los distintos sistemas en cuanto a tamaño de partícula, forma, superficie y grado de captación por macrófagos pueden tener un efecto notable en la toxicidad (12).

La superficie de la nanopartícula interacciona con proteínas plasmáticas, células y macrófagos causando procesos de adhesión, crecimiento y diferenciación. Cuando interacciona con la membrana puede producir iones que generan estrés oxidativo, que incrementa la concentración de radicales libres de oxígeno (ROS) que interaccionan con el ADN, causando daño en su estructura y desembocando en muerte celular o mutagénesis (12).

Otras formas de causar toxicidad son: el incremento de la concentración de TNF- α e interleuquinas; el daño en el citoesqueleto dificultando el transporte y la división celular; el daño en mitocondria alterando el metabolismo; la modificación de proteínas de membrana alterando el transporte; el cambio del metabolismo o la promoción de mediadores de la inflamación (12).

Teniendo en cuenta todas las ventajas que ofrecen resultan una potencial línea de investigación a la hora de crear formulaciones más eficaces en el tratamiento de enfermedades.

- Liofilización y crioprotectores

En general, las nanopartículas lipídicas se formulan en solución acuosa. La presencia de agua puede dar lugar a procesos que originan una inestabilidad física, como la agregación de partículas, o química, experimentando degradación hidrolítica o cesión de fármaco durante el almacenamiento (13). Además, el ambiente acuoso también favorece la contaminación microbiana (14).

Uno de los procedimientos habituales para la obtención de nanopartículas en estado sólido es la liofilización (13, 14).

La liofilización es un proceso de deshidratación que consiste en la eliminación de agua a partir de una muestra congelada mediante sublimación y desorción (15). Este proceso consta de tres etapas: congelación, desecación primaria y desecación secundaria. En la desecación primaria se sublima el agua previamente congelada, mientras que la secundaria se evapora el agua residual (13).

Una vez realizada la liofilización, el producto en estado seco debe cumplir un conjunto de características (13). Es necesario que el proceso no modifique las propiedades iniciales de las nanopartículas, como el tamaño de partícula o el contenido en fármaco (15) y, además, que el producto final presente otras características en valores adecuados como un tiempo de resuspensión corto (13) o estabilidad a largo plazo (15).

Sin embargo, durante la liofilización se somete a las nanopartículas a un gran estrés (15) que puede condicionar su estabilidad y propiedades. Esto ocurre debido a que durante la congelación se forman dos fases: una fase de hielo y otra de una suspensión con los componentes de la formulación. Los componentes de la formulación se encuentran muy concentrados en esa fase, por lo que es más fácil que ocurra una agregación. Además, el hielo formado ejerce un estrés mecánico que afecta a las nanopartículas (13).

Para evitar estos efectos se incorporan crioprotectores, excipientes capaces de formar una matriz alrededor de las nanopartículas que las protege del hielo y las inmoviliza, dificultando su agregación (13, 15, 16). Normalmente, son azúcares que interactúan con las nanopartículas mediante enlaces de hidrógeno, manteniéndolas en un estado pseudohidratado que las protege de la deshidratación durante la desecación. (17) Estos azúcares se suelen elegir también por ser químicamente inocuos o poco tóxicos

(13), biodegradables y de bajo coste (17).

Otra de sus características es su capacidad de alterar la temperatura de transición vítrea de la formulación y congelarse a la temperatura de eutexia favoreciendo la solidificación de toda la muestra (13, 15).

La elección del crioprotector y su concentración adecuadas para cada formulación debe realizarse cuidadosamente para conseguir un liofilizado lo más estable posible (15). Entre los azúcares candidatos como crioprotectores se encuentran: la trehalosa, la sacarosa, la fructosa, la glucosa (13), el manitol, la maltodextrina (15) o la lactosa en concentraciones entre un 2-10 % (18).

Otro de los factores que pueden condicionar el resultado del proceso es la velocidad a la que se lleva a cabo la liofilización (13, 15).

Se pueden distinguir en este caso dos tipos: liofilización rápida y liofilización lenta. La diferencia entre ambas es el tiempo de congelación, que puede ser rápido mediante la inclusión de la muestra en nitrógeno líquido, o lento, introduciendo la muestra a -80°C .

Existe información contradictoria acerca del método más adecuado (13,15). Algunos autores afirman que el uso de una elevada concentración de crioprotector y una liofilización rápida son los adecuados (13), mientras que otros no consiguieron resultados satisfactorios en estas condiciones y observaron alteraciones considerables con respecto a sus propiedades iniciales (14).

- Herramientas de Inteligencia Artificial

Durante el proceso de formulación existen muchas variables que influyen en el producto final, pero que en ocasiones resultan difíciles de identificar y controlar. Para interpretar los resultados de la mejor forma, es posible modelizar los datos mediante el uso de Redes Neuronales Artificiales (*ANN, Artificial Neural Networks*) (19).

Las ANNs son modelos matemáticos generados por programas informáticos, cuyo funcionamiento se inspira en las redes neuronales que se establecen en el cerebro (20).

Las ANN son capaces de modelizar bases de datos constituidas por variables y parámetros resultantes de un procedimiento experimental, dando lugar a lo que se conoce como un modelo en *caja negra*. Si este modelo experimental es de la calidad suficiente, será capaz de predecir adecuadamente el resultado de la combinación de

variables sobre los resultados del proceso, tanto las previamente ensayadas como las que nunca se experimentaron. Sin embargo, el hecho de lo modelos de ANN sea en *caja negra* dificulta la comprensión de la influencia de cada una de las variables sobre el resultado del proceso. La combinación de las ANN con la lógica difusa (*FL, Fuzzy logic*) facilita este trabajo. La aplicación de lógica difusa permite la transformación del modelo en un conjunto de reglas con estructura SI...ENTONCES (21). Esta conversión en lenguaje permite un mejor entendimiento de lo que ocurre durante el experimento y un mayor conocimiento de la influencia de una variable inicial sobre el producto final. De esta forma se evita la realización de un número elevado de muestras para determinar la opción más viable y se agiliza el proceso (19).

La inteligencia artificial puede resultar de gran utilidad en el ámbito farmacéutico. Facilita la interpretación de los datos experimentales, haciendo posible, de forma más sencilla y rápida optimizar la elaboración y dosificación de los medicamentos (20). Además, permite conocer cómo las distintas variables del proceso acaban repercutiendo en el producto final y lo que supondría una modificación de sus valores. Una vez que se conocen con exactitud todos los parámetros críticos, se selecciona la mejor combinación posible reduciendo el número de pruebas a realizar. Esto supone un ahorro en tiempo y costes junto con una formulación mucho más eficaz (19).

Objetivos

Este trabajo tiene como objetivo establecer unas condiciones óptimas para la obtención de NLC en estado seco.

Para ello se procederá a la formulación de los transportadores lipídicos nanoestructurados, se ensayarán diversos crioprotectores a distintas concentraciones y diferentes condiciones de liofilización, se evaluarán las características iniciales de la formulación y las finales tras la resuspensión del producto liofilizado.

Los resultados obtenidos deben permitir determinar, mediante inteligencia artificial, las condiciones más adecuadas para minimizar las diferencias entre los NLC en disolución y los productos liofilizados resuspendidos.

Materiales y métodos

- Materiales

Ácido oleico como lípido líquido; Precirol ATO5[®] (obtenido de Gattefosé SAS, Francia) como lípido sólido; lecitina (Epikuron 145V[®], Cargill, USA) como tensoactivo; agua Mili-Q (Millipore Ibérica, Spain) y Tween[®] 80 (Sigma-Aldrich, USA) como tensoactivo. Se usaron como crioprotectores, trehalosa (D-(+)-trehalose dihydrate de Sigma Aldrich, USA), fructosa (D-(-)-fructosa de Sigma Aldrich, USA), lactosa y glucosa (D-glucose anhydre de Fisher Scientific, Reino Unido).

- Preparación de NLC

Se preparó una fase oleosa a partir de 225 mg de ác. oleico (lípido líquido) y 75 mg de lípido sólido (Precirol ATO5[®]) en un Falcon.

En otro Falcon se preparó la fase acuosa con 1,5 mg de lecitina (Epikuron 145V[®]) y 10 mL de Tween[®] 80 al 1,9% (p/v, diluido previamente con agua Mili-Q).

Se colocan ambas preparaciones en un baño termostático (Reyep Thermostatic bath) a 80°C durante cinco minutos. A continuación, se añade la fase acuosa sobre la oleosa y se homogeneiza (IKA T25 digital ULTRA TURRAX[®], Alemania) a 14.800 rpm durante diez minutos.

La suspensión se agita manualmente en baño de hielo durante 2 minutos y se mantiene en nevera.

La suspensión obtenida se introduce en una membrana de diálisis

(Spectra/Por[®] 3 Dialysis Membrane MWCO 3.5 kD, Fisher Scientific, USA) para eliminar aquellos restos de reactivos que no se hayan incorporado a las nanopartículas. La diálisis se mantiene con agitación en placa agitadora (Magnetic Stirrer SBS, Steinger Systems, Polonia) durante 24 horas (Fig. 1). Las NLC dializadas se caracterizan en cuanto a tamaño de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta.



Fig 1. NLCs en membrana de diálisis con agitación

- Liofilización

Se eligieron cuatro crioprotectores: trehalosa, fructosa, lactosa y glucosa. En tubos Eppendorf, se colocaron 2 mL de la formulación dializada con los crioprotectores en estado sólido en cantidades adecuadas para alcanzar concentraciones de 2,5, 5, 10, 15 y 20% y se homogeneizaron hasta no apreciar azúcar en estado sólido. Una vez que se realizó el proceso con cada uno de ellos se congelaron mediante congelación lenta o rápida.



Fig 3. Solución de liofilizado resuspendido en sonicador

La congelación lenta se llevó a cabo introduciendo el Eppendorf en el congelador de -80°C durante 24h, pasadas las cuales, se introdujeron en el liofilizador (Liofilizador Telstar LyoQuest Plus -85°C , Telstar) con bomba de vacío (Telstar 2G-6) otras 24h.

La congelación rápida se realizó mediante inmersión en nitrógeno líquido e inmediata introducción en el liofilizador. El tiempo y condiciones de liofilización son las mismas que en el caso de la congelación lenta. Una vez liofilizado se obtiene un sólido blanco (Fig. 2)

El liofilizado (50 mg) se resuspende en 10 mL de agua Mili-Q. Se agita manualmente hasta no apreciar restos del sólido y mediante sonicador 30 segundos (Sonicador 700 W Sonic Dismembrator Fisher Scientific) con una potencia que oscila entre 12-17 W. (Fig. 3)

-Caracterización de las NLC dializadas y del liofilizado resuspendido

Las NLC dializadas y las obtenidas tras la resuspensión del liofilizado, se caracterizaron en cuanto a tamaño de partícula, potencial Z e índice de polidispersión mediante un Zetasizer Nanoseries Nano ZS (Malvern Instruments, UK).

Un mililitro de formulación diluida con agua Mili-Q (1/1000) y homogeneizada se



Fig 2. Muestra de NLC liofilizada

introdujo en una cubeta de poliestireno, para medir los parámetros en el Zetasizer Nanoseries Nano ZS a 25°C y con un tiempo de equilibrio de 20s.

El tamaño de partícula y el Pdl se determinaron mediante espectroscopía de correlación de fotones (15). Para el potencial Z se usó una cubeta específica que permite aplicar un campo eléctrico realizando una microelectroforesis de láser Doppler. Esto causa el movimiento de las nanopartículas a una velocidad que se relaciona con su valor de potencial Z (21).

Las determinaciones se realizaron por duplicado.

- Modelización mediante Herramientas de Inteligencia Artificial

Se elaboró una base de datos con los resultados de la caracterización de los NLC (Tabla 2). La modelización se llevó a cabo mediante el software FormRules[®] v4.03 (Intelligensys Ltd, UK), que combina ANN con lógica difusa.

Para entrenar el programa se usan un conjunto de parámetros que vienen recogidos en la Tabla 1.

FormRules: Informe de entrenamiento			
Número de Densidades Establecidas	2		
Densidades Establecidas	2	3	
Minimización de Riesgo Estructural	SRM	C1 = 0.80	C2 = 4.80
Nodos Adaptados	TRUE		
Max. Inputs Por SubModelo	4		
Max. Nodos Por Input	15		

Tabla 1. Parámetros que utiliza el programa como tipo de algoritmo (SRM Structural Risk Minimization), el número de inputs, nudos o el criterio de selección.

Para modelizar el procedimiento se utilizan dos variables (inputs) nominales, el tipo de crioprotector (TC) y la velocidad de congelación (V), y una numérica, la concentración de crioprotector ([CRIO]). Con ellas, se modelizan tres parámetros (outputs): incremento de tamaño de partícula, de índice de polidispersión y de potencial Z.

Con el uso de ANN y FL se obtienen reglas con estructura SI...ENTONCES, que permiten conocer la repercusión de las variables sobre los parámetros de interés.

La calidad de los modelos

La calidad del modelo se evalúa mediante el análisis de varianza (ANOVA) y el coeficiente de determinación. El ANOVA permite conocer si existen diferencias estadísticamente significativas entre lo obtenido a nivel experimental y lo que el modelo predijo (19). Si la f computada es mayor que la f crítica para los mismos grados de libertad, las diferencias entre los valores experimentales y los predichos por el modelo no son significativas.

El R^2 , o coeficiente de determinación, permite conocer la predictibilidad del modelo en porcentaje. Para calcular el valor de R^2 se utiliza la siguiente ecuación (21):

$$R^2 = \left[1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_i')^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - y_i'')^2} \right] \times 100\%$$

Y_i corresponde al valor obtenido a nivel experimental. Y_i' hace referencia al valor que predijo el modelo. Por su parte, Y_i'' es el valor medio de la variable dependiente. Si el R^2 es mayor del 70% indica que la variabilidad entre ambos es aceptable (21).

Con los resultados del ANOVA y los valores de R^2 , podemos saber que el modelo es adecuado en cuanto a predictibilidad y significancia (21).

Resulta fundamental la observación de las reglas obtenidas por el modelo. Las variables en las que se va a basar el modelo (velocidad de congelación, tipo y concentración de crioprotector) se clasifican según su valor en bajo, medio o alto. Los parámetros que van a caracterizar la formulación (incremento de tamaño de partícula, incremento de Pdl e incremento de potencial Z) se agrupan en bajo o alto. Además, cada uno se acompaña de lo que se conoce como grado de pertenencia. Este grado de pertenencia va de 0 a 1. Cuanto más próximo a 1, mayor pertenencia al grupo. Este valor permite saber lo similar que es esa clasificación de bajo o alto al valor numérico obtenido. Este concepto se puede entender mediante la imagen de la Figura 4.

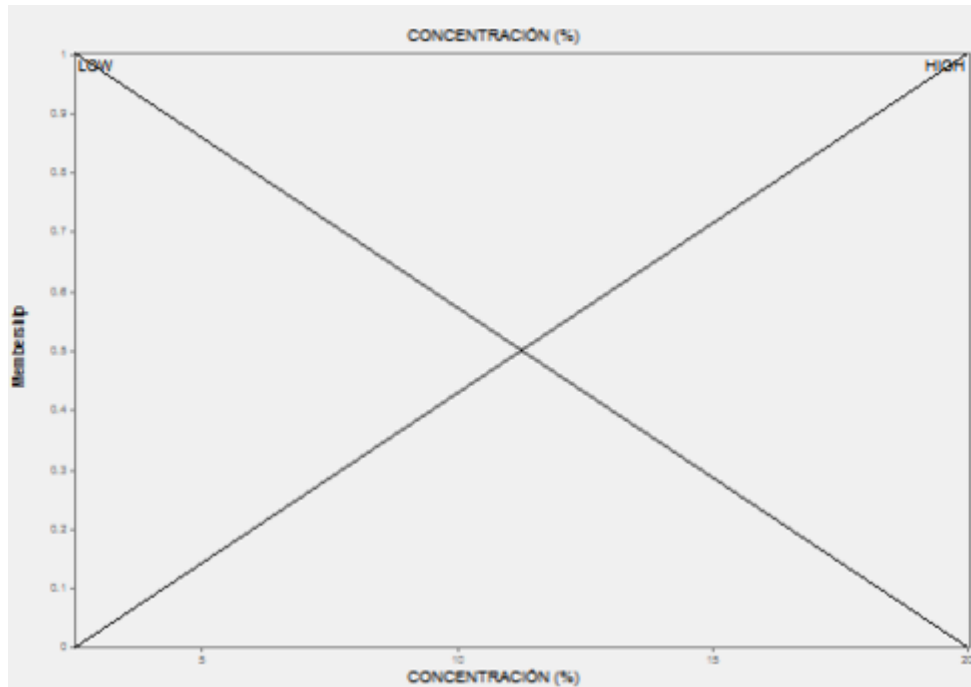


Fig. 4. Representación del grado de pertenencia correspondientes a cada concentración de crioprotector para el parámetro incremento de tamaño de partícula. El eje X representa concentraciones de crioprotector utilizadas, entre 0 y 20%. El grado de pertenencia es representado en el eje Y, con valores de 0 a 1. La zona de intersección de ambas líneas marca la clasificación de la concentración de crioprotector en baja o alta.

Mediante gráficas, se puede establecer los aspectos de la formulación que más influyen a la hora de obtener un resultado concreto y observar relaciones entre las variables de inicio que crean submodelos

Resultados y discusión

Los transportadores lipídicos nanoestructurados son considerados como formulaciones recientes en el ámbito de la nanomedicina. Surgieron como solución al problema de las SLN de ser incapaces de introducir en su interior una cantidad de fármaco que pudiera ser efectiva. Al añadir un lípido líquido la matriz resulta más irregular, lo que mejora la estabilidad del sistema y permite introducir una mayor cantidad de fármaco que sus predecesoras (14). Estas características supusieron una mejora que ha causado el incremento cada vez mayor del número de investigaciones que estudian estos transportadores. Este hecho también ha supuesto el descubrimiento de nuevas aplicaciones, como el bloqueo de las bombas de eflujo (14).

Por sus características fisicoquímicas resulta muy útil su aplicación para fármacos con una biodisponibilidad oral reducida, como es el caso de la rifabutina. Este tipo de fármacos suelen ser aquellos pertenecientes a la clase II y IV del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica o los de naturaleza proteica y peptídica, solucionando así problemas de solubilidad y permeabilidad (24).

- Caracterización de los NLCs en suspensión acuosa

Con el procedimiento que se diseñó y optimizó previamente en nuestro laboratorio para la elaboración de los transportadores lipídicos nanoestructurados de rifabutina, las nanopartículas obtenidas presentaron un tamaño de partícula de $140,37 \pm 5,35$ nm, un Pdl de $0,29 \pm 0,04$ y un potencial Z de $-26,78 \pm 2,66$ mV.

Estos valores resultan adecuados para la aplicación que se pretende. Partículas con un tamaño entre 120 y 200 nm son capaces de evadir la filtración producida por el hígado y el bazo, evitándose de esta forma la eliminación prematura de la formulación (25). Según la vía de administración, es importante que los NLCs no sobrepasen un determinado tamaño de partícula para no perjudicar la efectividad del tratamiento. El rango de tamaño más adecuado debe ser seleccionado según la zona de administración (23).

El Pdl indica la dispersión de tamaño de partícula del sistema. Valores próximos a 0 son indicativos de sistemas monodispersos. Se consideran adecuados los valores de Pdl inferiores a 0,3 para mantener la estabilidad.

El potencial Z es aceptable cuando sus valores rondan los 30 mV o los 20 mV si la formulación contiene tensoactivo, para asegurar que las nanopartículas tarden más tiempo en agregarse (26).

El procedimiento de elaboración de los NLCs se basa en el optimizado por Rouco et al (21). En el estudio, se modifican las condiciones de elaboración hasta obtener unos resultados determinados. Estas condiciones se replican en este trabajo, consiguiendo valores similares para los parámetros de interés, es decir, tamaño de partícula, Pdl y potencial Z. Con ello se confirma la robustez del procedimiento realizado.

Este desarrollo supone una mejora con respecto a los NLCs obtenidos por otros autores como Mendes et al (26) y Quiang et al (28) en lo que respecta al tamaño de partícula y Pdl, alcanzándose unos valores menores en estos dos parámetros

TIPO CRIO	[CRIO] %	V	Tamaño medio (nm)	PDI	POT Z (mV)	ΔT (nm)	ΔPDI	$\Delta POT Z$ (mV)
BLANCO	0	Lenta	216,65	0,46	-31,70	78,05	0,2	-7,15
TREHALOSA	2,5	Lenta	198,13	0,43	-28,16	61,16	0,16	1,83
TREHALOSA	5	Lenta	178,83	0,35	-27,04	41,70	0,08	-0,08
TREHALOSA	10	Lenta	180,88	0,42	-29,56	46,74	0,15	-2,61
TREHALOSA	15	Lenta	185,16	0,46	-29,29	48,03	0,21	-2,25
TREHALOSA	20	Lenta	191,44	0,57	-25,26	55,31	0,30	3,14
FRUCTOSA	2,5	Lenta	202,66	0,43	-28,04	61,97	0,20	0,77
FRUCTOSA	5	Lenta	198,61	0,44	-28,26	61,76	0,20	3,43
FRUCTOSA	10	Lenta	232,03	0,49	-25,04	95,17	0,30	5,37
FRUCTOSA	15	Lenta	232,33	0,57	-28,18	92,61	0,27	-1,16
FRUCTOSA	20	Lenta	297,01	0,76	-27,86	157,31	0,49	-0,40
LACTOSA	2,5	Lenta	219,58	0,45	-27,26	55,17	0,18	1,05
LACTOSA	5	Lenta	188,71	0,43	-28,58	46,29	0,22	-0,66
LACTOSA	10	Lenta	196,81	0,50	-30,66	54,39	0,23	-0,30
LACTOSA	15	Lenta	198,11	0,64	-29,73	55,69	0,38	-0,41
GLUCOSA	2,5	Lenta	201,83	0,41	-27,03	61,89	0,10	-0,04
GLUCOSA	5	Lenta	211,83	0,46	-27,34	74,51	0,19	0,01
GLUCOSA	10	Lenta	210,76	0,52	-27,41	73,44	0,24	-0,27
GLUCOSA	15	Lenta	228,53	0,66	-27,34	91,19	0,39	0,63
GLUCOSA	20	Lenta	258,76	0,77	-24,66	121,44	0,50	1,81

Tabla 2. Tamaño de partícula, Pdl y potencial Z junto con sus incrementos obtenidos para todos los crioprotectores probados a distintas concentraciones y aplicando la liofilización lenta.

TIPO CRIO	[CRIO] %	V	Tamaño medio (nm)	PDI	POT Z (mV)	ΔT (nm)	ΔPDI	$\Delta POT Z$ (mV)
BLANCO	0	rápida	204,00	0,39	-30,11	62	0,08	-1,43
TREHALOSA	2,5	rápida	190,93	0,42	-27,58	48,51	0,13	0,22
TREHALOSA	5	rápida	176,83	0,35	-27,45	38,88	0,12	1,56
TREHALOSA	10	rápida	192,15	0,46	-29,39	54,19	0,19	0,08
TREHALOSA	15	rápida	177,63	0,49	-26,26	41,18	0,21	-3,92
TREHALOSA	20	rápida	255,46	0,37	-25,40	72,51	0,10	4,08
FRUCTOSA	2,5	rápida	202,15	0,42	-24,11	58,25	0,11	3,12
FRUCTOSA	5	rápida	186,59	0,41	-26,30	42,48	0,11	2,33
FRUCTOSA	10	rápida	190,93	0,39	-27,96	46,78	0,09	0,68
FRUCTOSA	15	rápida	207,35	0,54	-26,96	63,23	0,23	1,75
FRUCTOSA	20	rápida	230,63	0,57	-27,38	86,53	0,27	1,27
LACTOSA	2,5	rápida	186,44	0,42	-28,14	42,66	0,08	0,90
LACTOSA	5	rápida	185,22	0,44	-27,78	41,40	0,06	1,26
LACTOSA	10	rápida	185,54	0,48	-24,59	41,74	0,14	4,41
LACTOSA	15	rápida	198,40	0,46	-27,76	54,64	0,12	1,28
GLUCOSA	2,5	rápida	188,20	0,43	-27,65	36,46	0,14	-5,34
GLUCOSA	5	rápida	188,73	0,37	-26,88	32,86	0,06	-5,29
GLUCOSA	10	rápida	197,91	0,45	-29,19	42,01	0,13	-4,54
GLUCOSA	15	rápida	197,24	0,48	-29,54	41,36	0,16	-4,89
GLUCOSA	20	rápida	245,20	0,68	-27,65	84,31	0,36	-3,00

Tabla 2_continuación. Tamaño de partícula, Pdl y potencial Z junto con sus incrementos obtenidos para todos los crioprotectores probados a distintas concentraciones y aplicando la liofilización rápida.

- Caracterización de los NLC tras la resuspensión de los liofilizados

La tabla 2 presenta los valores de los NLCs tras ser resuspendidos después de la liofilización en las diferentes condiciones ensayadas.

Los parámetros obtenidos se vieron alterados, observándose que las muestras liofilizadas sin crioprotector (blanco) incrementaron, tanto en la liofilización lenta como en la rápida. Mientras que la lenta, las muestras de blanco incrementan su tamaño en 78,05 nm, la rápida consigue un valor inferior con 62 nm. lo que puede condicionar su viabilidad para ciertas vías. El índice de polidispersión incrementó en la lenta en 0,2 y en 0,08 para la rápida, alejándose de la situación ideal de un sistema monodisperso. Por su parte, el potencial Z no cambia de signo, pero se hace más negativo, sin suponer un riesgo de agregación.

Existen diversos trabajos sobre el efecto de la congelación en sistemas nanométricos que intentan explicar su influencia en los resultados obtenidos. Sin embargo, escasean aquellos que aborden este método de secado en los NLCs, ya que la mayoría de los estudios utilizan nanopartículas poliméricas o SLN (13, 17, 29).

Esto mismo ocurre para los distintos crioprotectores usados, por lo tanto, surge la necesidad de realizar un proyecto capaz de aportar información acerca de todo lo relativo al proceso de secado mediante la liofilización en el ámbito de los transportadores lipídicos nanoestructurados. Los crioprotectores seleccionados fueron la trehalosa, fructosa, lactosa y glucosa. Esta selección se basó en resultados obtenidos para otro tipo de nanopartículas. En muchos trabajos, la trehalosa resulta ser el más adecuado al presentar los mejores resultados, pero no siempre ocurre y son alguno de los mencionados antes los que mejoran las propiedades, en especial la glucosa (29, 30, 31, 32). Además, estos resultados parecen estar influidos por el tipo de formulación, por lo que resulta interesante estudiar cómo pueden interaccionar los crioprotectores a los compuestos que forman las nanopartículas lipídicas.

-Análisis macroscópico de los productos liofilizados

Las muestras liofilizadas deberían ser un polvo blanco fácilmente redispersable. Sin embargo, las muestras de blanco y con 2,5% de crioprotector presentan una consistencia más pastosa, que va a ser relevante a la hora de redispersar el sólido en

agua. Esto dos tipos de muestra resultan más difíciles de resuspender y el tiempo invertido en conseguir una disolución homogénea es mayor. A nivel macroscópico se aprecia que cuanto mayor es la concentración del crioprotector más seco parece. Esta observación está en consonancia con la realizada por otros autores como Umerska et al, que apreciaron que la ausencia de crioprotector dificultaba la obtención de una solución homogénea (17), mientras que un 1% de crioprotector suponía una gran mejora

En el presente estudio, aquellos sistemas que incorporan mayor cantidad de crioprotector resultan fácilmente resuspendibles y no existe una gran diferencia entre las distintas concentraciones en este aspecto. De esta forma, la dispersión a partir del 5% es buena en todos los casos, aunque algunos artículos mencionan que mejora considerablemente a mayor concentración y a mayor velocidad de congelación (15). Sin embargo, cabe mencionar una excepción: las muestras con fructosa. Se observó que para estas, la incorporación de concentraciones crecientes da lugar a una consistencia pegajosa y al 20% resulta complicado disolver el sólido.

Con respecto a la influencia de la velocidad de liofilización en este aspecto, no se apreció ninguna diferencia entre ambos tipos, influyendo principalmente la concentración de crioprotector.

-Modelos obtenidos mediante FormRules®

FormRules® fue capaz de modelizar con éxito los valores de incremento de tamaño de partícula, Pdl y potencial Z en función del tipo de crioprotector y su concentración y la velocidad de congelación utilizada durante la liofilización.

La Tabla 3 presenta los inputs que explican la variabilidad de cada parámetro, junto con los valores de R^2 que indican en todos los casos una predictibilidad mayor del 84%. También figuran los parámetros del ANOVA, que sugieren que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores experimentales y los predichos por el modelo, lo que indica que los modelos tienen la calidad adecuada (21).

Output	Submodelo	Input de FormRules®	R ²	F calculada	Grados libertad	F<0,01
ΔTamaño (nm)	Submodelo 1	[CRIO]	95,92	27,65	17 y 37	3,01
	Submodelo 2	TC x [CRIO] x V				
Δ Pdl	Submodelo 1	TC x [CRIO] x V	87,17	8,91	16 y 37	2,99
ΔPot Z	Submodelo 1	TC x [CRIO] x V	84,75	3,01	24 y 37	3,58

Tabla 3. Inputs seleccionados por el modelo, coeficiente de determinación (R²) y parámetros del ANOVA para cada modelo. El submodelo más importante está marcado en negrita. Concentración ([CRIO]), tipo de crioprotector (TC), velocidad (V), Potencial Z (Pot Z).

La modelización de los datos mediante FormRules® permite generar reglas SI...ENTONCES, que facilitan entender los resultados y saber qué inputs explican la variabilidad de los parámetros medidos (Tabla S1 Anexo I).

- Tamaño de partícula

Como ya se señaló, el tamaño de partícula condiciona la capacidad de los sistemas para atravesar las membranas biológicas, entrar a los tejidos y su captación por el Sistema Retículo Endotelial (33). Además, su variación refleja la estabilidad del sistema. Si la modificación del tamaño es aceptable, el proceso de liofilización resulta útil. Sin embargo, una desviación exagerada refleja un proceso de agregación o degradación (13).

La modelización del incremento de tamaño de partícula puso de manifiesto que las tres variables, pero particularmente la concentración de crioprotector explican la variabilidad de este parámetro (Tabla 3).

Como se deriva de las reglas SI...ENTONCES (Tabla S1) y se pone de manifiesto en la Figura 5, los incrementos de tamaño menores se obtienen con una congelación rápida y utilizando como crioprotector trehalosa o glucosa a una concentración baja (< 5%). Sin embargo, este último presenta mayor variabilidad.

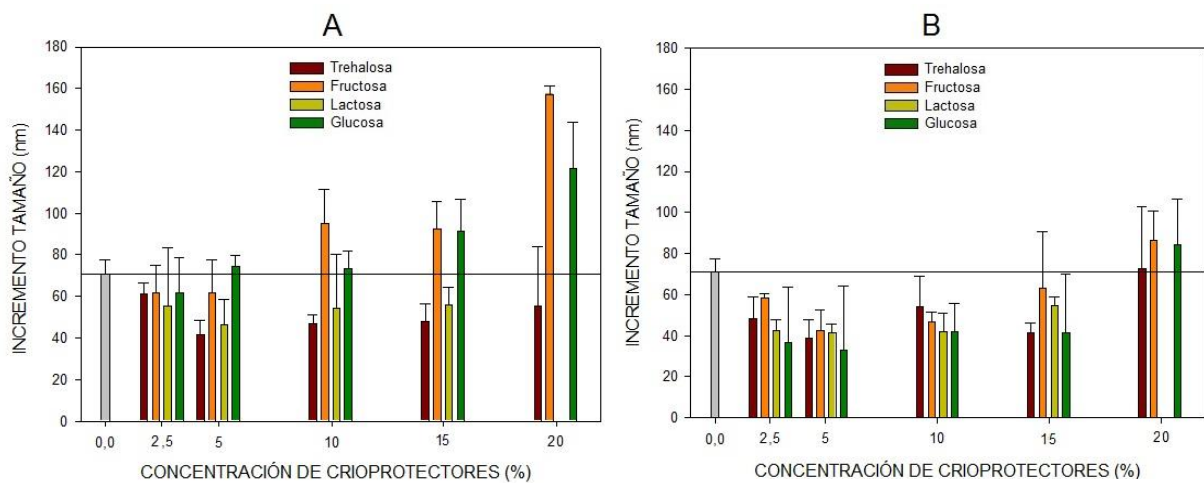


Fig 5. Incremento en el tamaño de partícula según es sometido a una liofilización lenta (A) o rápida (B). La línea horizontal marca el valor del proceso realizado sin crioprotector (blanco). Valores inferiores a este serían adecuados ya que reflejan la eficacia del crioprotector durante la liofilización.

Como se observa en la Figura 5, una congelación más lenta para la trehalosa consigue un tamaño medio menor. Sin embargo, como han observado otros autores, para el resto de crioprotectores probados el mejor resultado corresponde al uso de nitrógeno líquido (34). La liofilización rápida consigue además una variabilidad de resultados menor. Esta rápida congelación disminuye el tiempo que las nanopartículas están en contacto entre ellas y por lo tanto resulta menos probable que se agreguen entre sí. Los cristales de hielo que se forman son más pequeños, ejerciendo un estrés mecánico menor (13, 15, 34). Este resultado también se obtuvo en el estudio realizado por Abdelwahed et al (15).

Si comparamos ambas figuras, parece que el efecto más notable se da en la glucosa donde el incremento experimentado es menor.

Fonte et al (13) por otra parte establecen que la liofilización lenta podría mejorar la estabilidad al permitir crear una fase donde el crioprotector protegiera a las nanopartículas. Sin embargo, este mejor efecto de la liofilización lenta que obtuvieron podría ser debido a que las nanopartículas poliméricas usadas en el estudio interaccionan de distinta forma para esas condiciones debido a su composición.

La concentración de crioprotector es una variable que por sí sola no consigue explicar el incremento de tamaño, ya que independientemente de la concentración de crioprotector el incremento es siempre elevado, tal como se observa en las reglas

SI...ENTONCES de la Tabla S1. Sin embargo, estas reglas se modifican en función del tipo de crioprotector que se utilice.

Se observan los menores incrementos de tamaño de partícula en aquellas muestras que contienen un tipo concreto de crioprotector a una concentración baja. El crioprotector genera una estructura amorfa que otorga mayor espacio interno y reduce la presión ejercida por los cristales de hielo, reduciendo el riesgo de un incremento de tamaño (32).

Todas las concentraciones de trehalosa consiguieron reducir el incremento de tamaño, pero el efecto es más notable se da a concentraciones menores.

La trehalosa obtuvo mejores resultados que el blanco en ambas liofilizaciones, excepto para el 20% usando el nitrógeno. El crioprotector que mejor conservó el tamaño de partícula inicial de los sistemas lipídicos nanoestructurados fue la trehalosa al 5%, tanto en liofilización lenta como en la rápida.

Seguido de la trehalosa aunque con mayor variabilidad, se encuentra la glucosa que en la liofilización rápida consigue reducir el incremento de tamaño con respecto al blanco, a excepción del 20%. Este orden de eficacia de ambos crioprotectores concuerda con Schwarz et al (36) y Fonte et al (13).

La lactosa en ambas liofilizaciones supuso mejora con respecto al blanco a todas las concentraciones, pero en algunos casos con un incremento mayor al obtenido con la trehalosa y la fructosa. La lactosa es capaz de formar una fase cristalina que puede influir a la hora de mantener las propiedades de los NLCs (28).

Para la fructosa, concentraciones superiores al 10% congelando a -80°C no consiguen un incremento menor al obtenido sin crioprotector. Sin embargo, con la liofilización rápida ese resultado solo se daría con concentraciones de crioprotector del 20%. Los valores obtenidos para este crioprotector serían los menos favorables (30, 35).

El efecto del crioprotector se encuentra relacionado con la capacidad para formar enlaces de hidrógeno. La poca disponibilidad de enlaces de hidrógeno para unirse a las nanopartículas de la fructosa o su naturaleza de monosacárido reductor podrían influir en este aspecto (35).

Cabe mencionar que en la mayoría de los estudios realizados acerca de la liofilización, el crioprotector más usado es la trehalosa y en muchos casos el más efectivo (13, 15, 16, 29, 34). Los buenos resultados que se suelen obtener en la trehalosa pueden ser

debidos a la capacidad del azúcar para reducir la higroscopicidad del sistema y por su flexibilidad, al presentar menos enlaces de hidrógeno en su estructura interna (16).

-Índice de polidispersión

La variación del índice de polidispersión es un parámetro que refleja la estabilidad del sistema coloidal. La figura 6 presenta los incrementos experimentados en los valores de Pdl. Incrementos de Pdl importantes tras la reconstitución de los liofilizados dan idea de una aglomeración de las partículas durante el proceso (26).

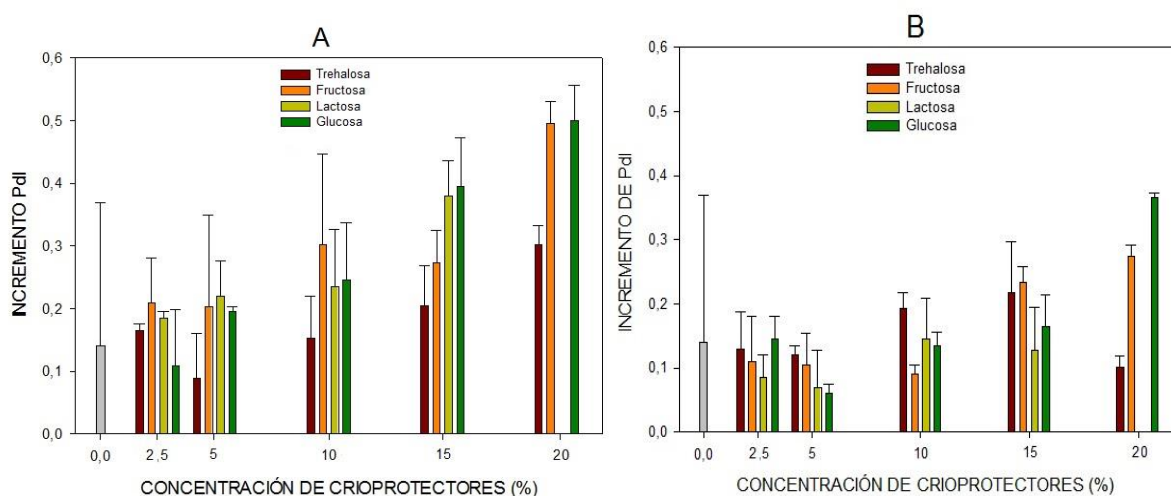


Fig 6. Variación en el incremento de Pdl para la liofilización lenta (A) y la liofilización rápida (B).

Al igual que ocurría con el incremento de tamaño, como se observa en la Tabla 3, el incremento en los valores de Pdl también viene determinado por el tipo de crioprotector, su concentración y la velocidad de congelación.

La liofilización rápida es capaz de mantener mejor los valores de Pdl (29), como se observa en la Tabla S2 y en la figura 6. Con respecto al crioprotector, la lactosa y glucosa a concentraciones bajas consiguen un menor incremento.

Sin embargo, parece que lo que más influye en el Pdl es la velocidad a la que se lleve a cabo la liofilización. Al igual que ocurre con el tamaño, la liofilización rápida reduce el tiempo de las nanopartículas en disolución pudiendo conseguir de esta forma mantener el sistema más monodisperso (13).

Con la congelación rápida, todas las muestras presentaban valores de Pdl en torno a 0,45 (Tabla 2) excepto para la trehalosa al 5%. Concentraciones de 2,5% para todos

los crioprotectores mejoran con respecto al blanco y en el caso de la trehalosa hasta el 10% el incremento es menor.

En el caso de usar nitrógeno líquido, el número de muestras cuyo valor de Pdl se acerca más al 0,3, y por lo tanto a un sistema más monodisperso, es considerablemente mayor. El uso de nitrógeno líquido permite que el incremento de Pdl sea menor en todos los casos y aumenta las muestras con valores mejores a no usar crioprotector, pudiendo usarse concentraciones de 20 % para la trehalosa o 15% para la glucosa.

Umerska et al (17) no apreciaron un incremento del Pdl una vez liofilizado, pero se debe tener en cuenta que el uso de otro tipo diferente de nanopartícula puede alterar el efecto de la liofilización sobre el Pdl.

A concentraciones bajas de cualquier crioprotector, el incremento de Pdl es pequeño en todos los crioprotectores probados para ambas liofilizaciones. Al incrementar la cantidad de crioprotector, a diferencia de lo que ocurre en el anterior caso, la velocidad lenta no es capaz de mantener un Pdl bajo. Esto solo se consigue con una velocidad de congelación rápida. Este resultado también se obtuvo en el estudio realizado por Lee et al (34), donde los valores más polidispersos se obtuvieron en muestras con más crioprotector. Otros estudios obtuvieron mayores incrementos a concentraciones bajas de azúcar. Sin embargo, los incrementos recogidos son notablemente mayores a lo que se consiguieron en este estudio (35).

En este caso, el efecto de la trehalosa no resulta tan notable como ocurría para el incremento de tamaño, pero se debería tener en cuenta igualmente. Sin embargo, sí que se mantiene el efecto favorable de la lactosa sobre los NLCs, especialmente a bajas concentraciones en la liofilización rápida. También la glucosa a las mismas concentraciones resulta eficaz en el mantenimiento del Pdl. La fructosa sigue siendo el de menor interés para la conservación de las nanopartículas.

-Potencial Z

El potencial Z permite conocer la estabilidad del sistema al proporcionar información sobre la superficie de las nanopartículas (15). Su valor refleja la interacción de las nanopartículas entre sí (13) y con las membranas biológicas (37). Como se muestra

en la Tabla 2, todas las formulaciones mantienen un potencial Z negativo en torno a $[-30]$ mV indicativo de estabilidad (26).

Como en el caso de los dos parámetros anteriores, el modelo para el incremento del potencial Z, se explica en función de las tres variables, el tipo y concentración de crioprotector y la velocidad de congelación.

Teniendo en cuenta lo indicado en la tabla S3 según las reglas SI...ENTONCES y lo representado en la figura 7, la liofilización rápida causa una menor variación de los valores de potencial Z. Con respecto a los crioprotectores, concentraciones bajas lo alteran en menor medida. También se aprecia que la trehalosa es el crioprotector que experimenta menor variación del potencial.

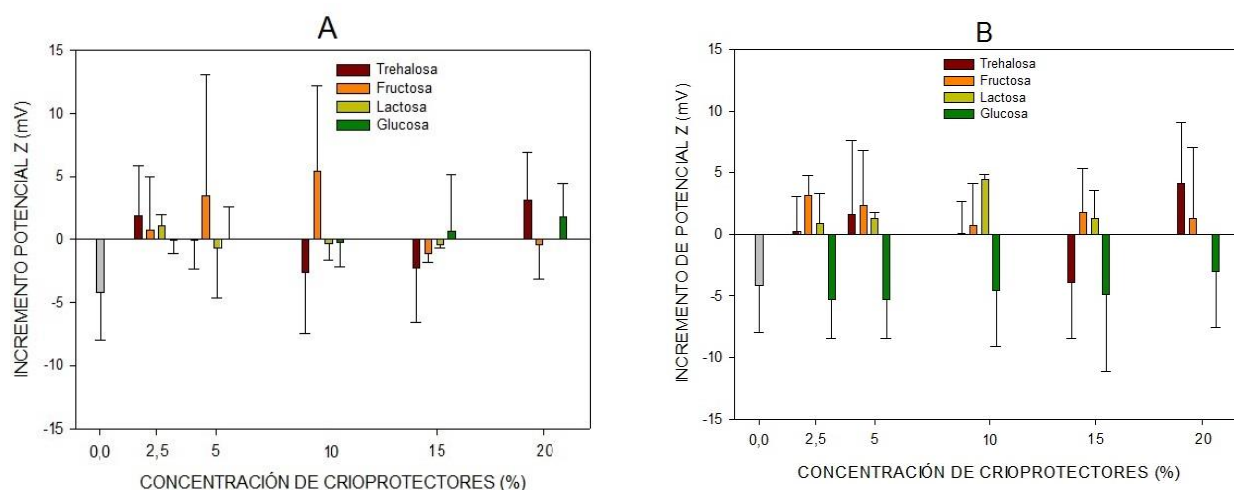


Fig 7. Aumento del potencial Z según la influencia de una liofilización lenta (A) y rápida (B).

El incremento de potencial Z es bajo en general. En ningún caso se alteró el signo del parámetro, aunque se apreciaron incrementos en positivo y negativo. Las concentraciones de 2,5 y 20% incrementan hacia la neutralidad. Es importante destacar que el uso de una congelación rápida causó un incremento positivo a excepción de la trehalosa al 5%.

Resulta difícil comparar los valores obtenidos para este parámetro, no solo por su escasa variedad de valores, sino también porque la mayoría de los artículos no mencionan las variaciones de potencial Z y se centran en el tamaño de partícula.

En el caso de Umerska et al (17), el potencial Z de las nanopartículas obtenidas no resultó alterado en ningún caso a diferencia de este estudio que en todos los casos se

vio modificado, pero la diferente composición de ambas formulaciones complica la comparación.

Wang et al (18) obtuvieron valores que sí que variaron en función del tipo de crioprotector y concentración. Este estudio analiza el efecto de la trehalosa y lactosa entre otros. Los datos en valor absoluto son menores que los que se muestran aquí.

Conclusiones

Los NLC son nanopartículas que en los últimos años han ido ganando cada vez más importancia por las ventajas que ofrecen. Sin embargo, son pocos los trabajos que estudian el efecto que el proceso de liofilización tiene sobre ellos. La liofilización es una etapa clave para conseguir su conservación y almacenamiento. Con la ayuda de las herramientas de inteligencia artificial, este estudio demuestra que la liofilización es un procedimiento eficaz para la conservación de las nanopartículas. Esta eficacia se aprecia sobre todo al usar el nitrógeno líquido, que consigue mejores resultados que la congelación a -80°C . Este efecto se debe probablemente a la reducción del tiempo de contacto entre las nanopartículas, lo que dificulta la agregación. Sin embargo, la velocidad a la que se produce la congelación no es el único factor condicionante. Para proteger la formulación del estrés originado durante el proceso se deben añadir crioprotectores. El tipo de crioprotector y la concentración a la que se añada también resultan imprescindibles para conseguir una liofilización que altere lo menos posible las condiciones iniciales de los transportadores lipídicos nanoestructurados.

Este estudio obtiene los parámetros de tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Z con menor variación con respecto al estado inicial mediante el uso de concentraciones bajas de crioprotector. Estos parámetros comienzan a empeorar a partir de concentraciones del 10%, siendo más adecuado seleccionar concentraciones sobre todo al 5%. Con respecto a la selección del crioprotector, se debería tener en cuenta la capacidad de la trehalosa y glucosa para proteger a los NLCs durante el proceso de secado, al conseguir un incremento de tamaño, Pdl y potencial Z reducido.

Bibliografía

- 1- [I](#)akedatsu H, Mitsuyama K, Torimura T. Nanomedicine and drug delivery strategies for treatment of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 2015; 21(40): 11343–11352.
- 2 -[A](#)rmstead A, Li B. Nanomedicines as an emerging approach against intracellular pathogens. *International Journal of Nanomedicine*, 2011; 6: 3281–3293.
- 3- [S](#)ato M, Oshiro J, Machado R, de Souza P, Campos D, Pavan F, da Silva P, Chorilli M. Nanostructured lipid carriers for incorporation of copper (II) complexes to be used against Mycobacterium tuberculosis. *Drug Design, Development and Therapy*, 2017; 11: 909–921.
- 4- [W](#)ang X, Yang M, Chen Z, Shin D, Application of Nanotechnology in Cancer Therapy and Imaging. *A Cancer Journal for Clinicals*, 2008; 58 (2): 97-110.
- 5-[R](#)anjita S, Loaye A S, Khalil M. Present status of nanoparticle research for the treatment of tuberculosis. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 2011; 14(1): 100 - 116.
- 6-[K](#)aul S, Gulati N, Verma D, Mukherjee S, Nagaich U. Role of Nanotechnology in Cosmeceuticals: A Review of Recent Advances. *Journal of Pharmaceutical Science*, 2018; 2018: 3420204.
- 7-[J](#)urj A, Braicu C, Pop L, Tomuleasa C, Gherman C, Berindan-Neagoe I. The new era of nanotechnology, an alternative to change cancer treatment, *Drug Design, Development and Therapy*, 2017; 11: 2871–2890.
- 8-[P](#)inheiro M, Ribeiro R, Vieira A, Andrade F, Reis S. Design of a nanostructured lipid carrier intended to improve the treatment of tuberculosis. *Drug Design, Development and Therapy*, 2016; 10: 2467–2475.
- 9-[S](#)arkar S, Suresh M. An overview of tuberculosis chemotherapy. A literature review. *J Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 2011; 14(2): 148 - 161.
- 10-[K](#)halid A, Persanom S, Shen H, Zhao Y, Blanco E, Ferrari M, Wolfram J. Strategies for improving drug delivery: nanocarriers and microenvironmental priming. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2017; 14(7): 865–877.
- 11-[K](#)reuter J. Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery. *Journal of Anatomy*, 1996; 189 (Pt 3): 503–505.

- 12- [Aj](#)dary M, Moosavi M A, Rahmati M, Falahati M, Mahboubi M, Mandegary A, Jangjoo S, Mohammadinejad R, Varma R. Health Concerns of Various Nanoparticles: A Review of Their in Vitro and in Vivo Toxicity. *Nanomaterials*, 2018; 8(9): 634.
- 13- [F](#)onte P, Reisa S, Sarmento B. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2016; 225: 75-86.
- 14- [B](#)eloqui A, Solinís M^Á, Rodríguez-Gascón A, Almeida AJ, Pr^éat V. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine*, 2016; 12(1):143-61.
- 15- [A](#)bdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006; 58 (15): 1688-1713.
- 16- [O](#)beidat WM, Schwabe K, Müller RH, Keck CM. Preservation of NLC. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2010; 76(1):56-67.
- 17- [U](#)merska A, Paluch KJ, Santos-Martínez MJ, Corrigan OI, Medina C, Tajber L. Freeze drying of polyelectrolyte complex Nps: effect of Np composition and cryoprotectant selection. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018; 552(1-2): 27-38.
- 18- [W](#)ang L, Ma Y, Gu Y, Liu Y, Zhao J, Yan B, Wang Y. Cryoprotectant choice and analyze of freeze-drying drug suspension on nanoparticles with functional stabilizers. *Journal of Microencapsulation*. 2018; 35 (3): 241-248.
- 19- Landin M, Rowe RC. Introducción al uso de sistemas de Inteligencia Artificial para modelizar, comprender y optimizar formulaciones farmacéuticas. En: de Sousa H, Braga M, Sosnik A. (eds.) *Biomateriales aplicados al diseño de sistemas terapéuticos avanzados*. Imprensa da Universidade de Coimbra; 2015. p. 521-550
- 20- [A](#)gatonovic-Kustrin S, Beresford R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2000; 22(5):717-27.
- 21- [R](#)ouco H, Diaz-Rodriguez P, Rama-Molinos S, Remuñán-López C, Landin M. Delimiting the knowledge space and the design space of nanostructured lipid carriers through Artificial Intelligence tools. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018; 553: 522–530.

- 22- [I](#)alegaonkar S, Bhattacharyya A. Potential of Lipid Nanoparticles (SLNs and NLCs) in Enhancing Oral Bioavailability of Drugs with Poor Intestinal Permeability. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 2011; 20(3):121.
- 23- [I](#)qbal A, Shadab M, Kaur J, Baboota S, Dang S, Ali J. Nanostructured lipid carriers system: Recent advances in drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 2012; 20(10): 813-830.
- 24- [T](#)eixeira M, Carbone C, Souto E.B. Beyond liposomes: Recent advances on lipid based nanostructures for poorly soluble/poorly permeable drug delivery. *Progress in Lipid Research*, 2017; 68:1-11.
- 25- [S](#)outo EB, Müller RH. Lipid nanoparticles: effect on bioavailability and pharmacokinetic changes. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2010; 197:115-41.
- 26- [M](#)endes M, Soares H, Arnaut L, Sousa J, Pais A, Vitorino C. Can lipid nanoparticles improve intestinal absorption? *International Journal of Pharmaceutics*, 2016; 515(1-2):69-83.
- 27- [W](#)itayadom P, Klinkesorn U. Effect of surfactant concentration and solidification temperature on the characteristics and stability of nanostructured lipid carrier (NLC) prepared from rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) kernel fat. *Journal of Colloid Interface Science*, 2017; 505:1082-1092.
- 28- [Q](#)uiang X, Kong R. Freeze-Drying and Characterization of Vitamin a Palmitate-Loaded Nanostructured Lipid Carriers (NLC). *Materials Science Forum*, 2011; 694: 365-369.
- 29- [D](#)oktorovova S, Shegokar R, Fernandes L, Martins-Lopes P, Silva AM, Müller R, Souto E. Trehalose is not a universal solution for solid lipid nanoparticles freeze-drying. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2014;19(8):922-9
- 30- [Z](#)immermann E, Müller R, Mäder K. Influence of different parameters on reconstitution of lyophilized SLN. *International Journal of Pharmaceutics*, 2000; 196: 211–213.
- 31- [B](#)ozdag S, Dillen J, Vandervoort L. The effect of freeze-drying with different cryoprotectants and gamma-irradiation sterilization on the characteristics of ciprofloxacin HCl loaded poly (D,L-lactide-glycolide) nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2005; 57: 699–707.

- 32- [S](#)aez A, Guzman M, Molpeceres J, Aberturas MR. Freeze Drying of polycaprolactone and poly (D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000; 50: 379–387._
- 33- [I](#)slam MA, Barua S, Barua D. A multiscale modeling study of particle size effects on the tissue penetration efficacy of drug-delivery nanoparticles. *BMC Systems Biology*, 2017;11(1):113._
- 34- [L](#)ee M K, Min Y, Sujung K, Jonghwi L. Cryoprotectants for freeze drying of drug nano-suspensions: Effect of freezing rate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009; 98(12):4808-17._
- 35- [P](#)raveen V, Date, Samad A, Devarajan P. Freeze Thaw: A simple approach for prediction of optimal cryoprotectant for freeze drying. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 2010; 11(1): 304–313._
- 36-[S](#)chwarz C, Mehnert W. Freeze-drying of drug-free and drug loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 1997; 157:171–179._
- 37- [C](#)logston JD, Patri AK. Zeta potential measurement. *Methods in Molecular Biology*, 2011; 697:63-70.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a la profesora Mariana Landín por facilitarme realizar durante estos meses este trabajo experimental, que me ha permitido adquirir conocimientos en el ámbito de la investigación farmacéutica. Además, agradecerle su continuo interés en los avances del trabajo y por buscar siempre un hueco para ayudarme y orientarme.

También me gustaría dar las gracias a Helena Rouco, por ofrecerme siempre su ayuda y comprensión. Este trabajo no habría sido posible sin ella y su buen humor y sus acertadas soluciones ante los problemas que siempre aparecen en este tipo de procesos.

Gracias al grupo I+D Farma por su buena acogida y por abrirme las puertas cada vez que lo necesitaba, literalmente.

Por último, gracias a mi familia y amigos por el continuo apoyo y cariño que me animaron a continuar en todo momento año tras año. Sin ellos no hubiera sido posible.

Anexo I

Las siguientes tablas recogen las reglas SI...ENTONCES, obtenidas a partir de FormRules®, para el incremento de los parámetros analizados (tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Z) y el grado de pertenencia de cada una. Las reglas marcadas con azul son aquellas que generan el valor más alto para el parámetro que analizan y las marcadas con rojo las que obtienen el valor más bajo.

SubModel:1		
IF CONCENTRACIÓN is LOW	THEN Δ Particle Size is	HIGH (1.00)
IF CONCENTRACIÓN is HIGH	THEN Δ Particle Size is	HIGH (0.93)
SubModel:2		
IF VELOCIDAD is lenta AND CRIOPROTECTOR is TREHALOSA AND CONCENTRACIÓN is LOW	THEN Δ Particle Size is	LOW (1.00)
IF VELOCIDAD is lenta AND CRIOPROTECTOR is TREHALOSA AND CONCENTRACIÓN is HIGH	THEN Δ Particle Size is	LOW (1.00)
IF VELOCIDAD is lenta AND CRIOPROTECTOR is FRUCTOSA AND CONCENTRACIÓN is LOW	THEN Δ Particle Size is	LOW (1.00)
IF VELOCIDAD is lenta AND CRIOPROTECTOR is FRUCTOSA AND CONCENTRACIÓN is HIGH	THEN Δ Particle Size is	HIGH (0.98)
IF VELOCIDAD is lenta AND CRIOPROTECTOR is LACTOSA AND CONCENTRACIÓN is LOW	THEN Δ Particle Size is	LOW (1.00)
IF VELOCIDAD is lenta AND CRIOPROTECTOR is LACTOSA AND CONCENTRACIÓN is HIGH	THEN Δ Particle Size is	LOW (1.00)
IF VELOCIDAD is lenta AND CRIOPROTECTOR is GLUCOSA AND CONCENTRACIÓN is LOW	THEN Δ Particle Size is	LOW (1.00)

Tabla S1.- Reglas IF... THEN (SI ... ENTONCES) para el parámetro incremento de tamaño de partícula, obtenidas por el software FormRules®.

IF VELOCIDAD is lenta AND CRIOPROTECTOR is GLUCOSA AND CONCENTRACIÓN is HIGH	THEN Δ Particle Size is	HIGH (0.53)
IF VELOCIDAD is rápida AND CRIOPROTECTOR is TREHALOSA AND CONCENTRACIÓN is LOW	THEN Δ Particle Size is	LOW (1.00)
IF VELOCIDAD is rápida AND CRIOPROTECTOR is TREHALOSA AND CONCENTRACIÓN is HIGH	THEN Δ Particle Size is	LOW (1.00)
IF VELOCIDAD is rápida AND CRIOPROTECTOR is FRUCTOSA AND CONCENTRACIÓN is LOW	THEN Δ Particle Size is	LOW (1.00)
IF VELOCIDAD is rápida AND CRIOPROTECTOR is FRUCTOSA AND CONCENTRACIÓN is HIGH	THEN Δ Particle Size is	LOW (1.00)
IF VELOCIDAD is rápida AND CRIOPROTECTOR is LACTOSA AND CONCENTRACIÓN is LOW	THEN Δ Particle Size is	LOW (1.00)
IF VELOCIDAD is rápida AND CRIOPROTECTOR is LACTOSA AND CONCENTRACIÓN is HIGH	THEN Δ Particle Size is	LOW (1.00)
IF VELOCIDAD is rápida AND CRIOPROTECTOR is GLUCOSA AND CONCENTRACIÓN is LOW	THEN Δ Particle Size is	LOW (1.00)
IF VELOCIDAD is rápida AND CRIOPROTECTOR is GLUCOSA AND CONCENTRACIÓN is HIGH	THEN Δ Particle Size is	LOW (1.00)

Tabla S1. Continuación. -Reglas IF... THEN (SI ... ENTONCES) para el parámetro incremento de tamaño de partícula, obtenidas por el software FormRules®.

SubModel:1		
IF CONCENTRACIÓN (%) is LOW AND VELOCIDAD is lenta AND CRIOPROTECTOR is TREHALOSA	THEN Δ PDI is	LOW (0.89)
IF CONCENTRACIÓN (%) is LOW AND VELOCIDAD is lenta AND CRIOPROTECTOR is FRUCTOSA	THEN Δ PDI is	LOW (0.73)
IF CONCENTRACIÓN (%) is LOW AND VELOCIDAD is lenta AND CRIOPROTECTOR is LACTOSA	THEN Δ PDI is	LOW (0.74)
IF CONCENTRACIÓN (%) is LOW AND VELOCIDAD is lenta AND CRIOPROTECTOR is GLUCOSA	THEN Δ PDI is	LOW (0.88)
IF CONCENTRACIÓN (%) is LOW AND VELOCIDAD is rapida AND CRIOPROTECTOR is TREHALOSA	THEN Δ PDI is	LOW (0.80)
IF CONCENTRACIÓN (%) is LOW AND VELOCIDAD is rapida AND CRIOPROTECTOR is FRUCTOSA	THEN Δ PDI is	LOW (0.96)
IF CONCENTRACIÓN (%) is LOW AND VELOCIDAD is rapida AND CRIOPROTECTOR is LACTOSA	THEN Δ PDI is	LOW (0.96)
IF CONCENTRACIÓN (%) is LOW AND VELOCIDAD is rapida AND CRIOPROTECTOR is GLUCOSA	THEN Δ PDI is	LOW (0.98)
IF CONCENTRACIÓN (%) is HIGH AND VELOCIDAD is lenta AND CRIOPROTECTOR is TREHALOSA	THEN Δ PDI is	LOW (0.52)
IF CONCENTRACIÓN (%) is HIGH AND VELOCIDAD is lenta AND CRIOPROTECTOR is FRUCTOSA	THEN Δ PDI is	HIGH (0.85)
IF CONCENTRACIÓN (%) is HIGH AND VELOCIDAD is lenta AND CRIOPROTECTOR is LACTOSA	THEN Δ PDI is	HIGH (0.83)
IF CONCENTRACIÓN (%) is HIGH AND VELOCIDAD is lenta AND CRIOPROTECTOR is GLUCOSA	THEN Δ PDI is	HIGH (0.99)
IF CONCENTRACIÓN (%) is HIGH AND VELOCIDAD is rapida AND CRIOPROTECTOR is TREHALOSA	THEN Δ PDI is	LOW (0.78)
IF CONCENTRACIÓN (%) is HIGH AND VELOCIDAD is rapida AND CRIOPROTECTOR is FRUCTOSA	THEN Δ PDI is	LOW (0.54)
IF CONCENTRACIÓN (%) is HIGH AND VELOCIDAD is rapida AND CRIOPROTECTOR is LACTOSA	THEN Δ PDI is	LOW (0.78)
IF CONCENTRACIÓN (%) is HIGH AND VELOCIDAD is rapida AND CRIOPROTECTOR is GLUCOSA	THEN Δ PDI is	HIGH (0.54)

Tabla S2.- Reglas IF... THEN (SI ... ENTONCES) para el parámetro incremento del índice de polidispersión (PDI), obtenidas por el software FormRules®.

SubModel:1		
IF CRIOPROTECTOR is TREHALOSA AND VELOCIDAD is lenta AND CONCENTRACIÓN (%) is LOW	THEN Δ POT Z is	LOW (0.50)
IF CRIOPROTECTOR is TREHALOSA AND VELOCIDAD is lenta AND CONCENTRACIÓN (%) is MID	THEN Δ POT Z is	LOW (1.00)
IF CRIOPROTECTOR is TREHALOSA AND VELOCIDAD is lenta AND CONCENTRACIÓN (%) is HIGH	THEN Δ POT Z is	HIGH (0.92)
IF CRIOPROTECTOR is TREHALOSA AND VELOCIDAD is rapida AND CONCENTRACIÓN (%) is LOW	THEN Δ POT Z is	LOW (0.55)
IF CRIOPROTECTOR is TREHALOSA AND VELOCIDAD is rapida AND CONCENTRACIÓN (%) is MID	THEN Δ POT Z is	LOW (0.81)
IF CRIOPROTECTOR is TREHALOSA AND VELOCIDAD is rapida AND CONCENTRACIÓN (%) is HIGH	THEN Δ POT Z is	HIGH (0.53)
IF CRIOPROTECTOR is FRUCTOSA AND VELOCIDAD is lenta AND CONCENTRACIÓN (%) is LOW	THEN Δ POT Z is	LOW (0.53)
IF CRIOPROTECTOR is FRUCTOSA AND VELOCIDAD is lenta AND CONCENTRACIÓN (%) is MID	THEN Δ POT Z is	HIGH (0.64)
IF CRIOPROTECTOR is FRUCTOSA AND VELOCIDAD is lenta AND CONCENTRACIÓN (%) is HIGH	THEN Δ POT Z is	LOW (0.75)
IF CRIOPROTECTOR is FRUCTOSA AND VELOCIDAD is rapida AND CONCENTRACIÓN (%) is LOW	THEN Δ POT Z is	HIGH (0.56)
IF CRIOPROTECTOR is FRUCTOSA AND VELOCIDAD is rapida AND CONCENTRACIÓN (%) is MID	THEN Δ POT Z is	LOW (0.59)
IF CRIOPROTECTOR is FRUCTOSA AND VELOCIDAD is rapida AND CONCENTRACIÓN (%) is HIGH	THEN Δ POT Z is	LOW (0.54)
IF CRIOPROTECTOR is LACTOSA AND VELOCIDAD is lenta AND CONCENTRACIÓN (%) is LOW	THEN Δ POT Z is	LOW (0.60)
IF CRIOPROTECTOR is LACTOSA AND VELOCIDAD is lenta AND CONCENTRACIÓN (%) is MID	THEN Δ POT Z is	LOW (0.69)
IF CRIOPROTECTOR is LACTOSA AND VELOCIDAD is lenta AND CONCENTRACIÓN (%) is HIGH	THEN Δ POT Z is	LOW (0.64)
IF CRIOPROTECTOR is LACTOSA AND VELOCIDAD is rapida AND CONCENTRACIÓN (%) is LOW	THEN Δ POT Z is	LOW (0.60)
IF CRIOPROTECTOR is LACTOSA AND VELOCIDAD is rapida AND CONCENTRACIÓN (%) is MID	THEN Δ POT Z is	HIGH (0.69)
IF CRIOPROTECTOR is LACTOSA AND VELOCIDAD is rapida AND CONCENTRACIÓN (%) is HIGH	THEN Δ POT Z is	LOW (0.87)

Tabla S3.- Reglas IF... THEN (SI ... ENTONCES) para el parámetro incremento del Potencial Z, obtenidas por el software FormRules®.

IF CRIOPROTECTOR is GLUCOSA AND VELOCIDAD is lenta AND CONCENTRACIÓN (%) is LOW	THEN Δ POT Z is	LOW (0.64)
IF CRIOPROTECTOR is GLUCOSA AND VELOCIDAD is lenta AND CONCENTRACIÓN (%) is MID	THEN Δ POT Z is	LOW (0.66)
IF CRIOPROTECTOR is GLUCOSA AND VELOCIDAD is lenta AND CONCENTRACIÓN (%) is HIGH	THEN Δ POT Z is	LOW (0.52)
IF CRIOPROTECTOR is GLUCOSA AND VELOCIDAD is rapida AND CONCENTRACIÓN (%) is LOW	THEN Δ POT Z is	LOW (1.00)
IF CRIOPROTECTOR is GLUCOSA AND VELOCIDAD is rapida AND CONCENTRACIÓN (%) is MID	THEN Δ POT Z is	LOW (0.97)
IF CRIOPROTECTOR is GLUCOSA AND VELOCIDAD is rapida AND CONCENTRACIÓN (%) is HIGH	THEN Δ POT Z is	LOW (0.86)

Tabla S3. Continuación. - Reglas IF... THEN (SI ... ENTONCES) para el parámetro incremento del Potencial Z, obtenidas por el software FormRules®.