

Trabajo Fin de Grado

Grado en Farmacia

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS COMO
SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN DE
SUSTANCIAS ACTIVAS: ASPECTOS
TECNOLÓGICOS Y APLICACIONES
TERAPÉUTICAS**



AUTOR/A: ROCÍO BARRIO SARALEGUI

DIRECTOR/A: ANA DEL POZO RODRÍGUEZ

Curso Académico: 2019/2020

RESUMEN

Con los avances tecnológicos en los últimos años, las nanopartículas han demostrado poseer un enorme potencial para su aplicación clínica. Los sistemas lipídicos son los de uso más extendido debido a que presentan propiedades óptimas de biocompatibilidad y biodegradabilidad. Los liposomas fueron los primeros en ser utilizados como sistemas de administración de diferentes tipos de sustancias activas y son los más conocidos, pero actualmente existen otros tipos más avanzados como las nanopartículas sólidas lipídicas (SLN), los transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC) y los conjugados de un lípido y un fármaco (LDC). Las nuevas generaciones de nanopartículas lipídicas se han ido desarrollando como respuesta a los problemas detectados en las estudiadas anteriormente.

Existen numerosos métodos de preparación de nanopartículas lipídicas entre los cuales se debe seleccionar el más adecuado para cada caso. Por ello, en este trabajo se recogen las ventajas e inconvenientes de los principales métodos. Las nanopartículas lipídicas son estructuras coloidales complejas que requieren métodos especializados para su caracterización física y estructural, por lo que también se describen los principales parámetros a medir.

Las características de los diferentes tipos de nanopartículas lipídicas les han permitido ser utilizadas como sistemas de administración de sustancias activas tales como fármacos poco solubles, péptidos y proteínas y ácidos nucleicos, además de aplicaciones cosméticas. Se trata de una estrategia en continuo desarrollo, ya que la formulación de nanopartículas lipídicas ha abierto nuevos horizontes para desarrollar estrategias innovadoras para la administración de sustancias activas que, hasta ahora, a pesar de su conocida actividad terapéutica, no habían encontrado un sistema de administración adecuado.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Nanotecnología, nanomedicina y nanoterapia	1
1.2 Tipos de nanopartículas	1
1.2.1 Sistemas lipídicos	2
1.2.1.1 Liposomas	2
1.2.1.2 Nanoemulsiones	3
1.2.1.3 Nanopartículas lipídicas	3
2. OBJETIVOS.....	4
3. DESARROLLO	4
3.1 Metodología	4
3.2 Nanopartículas lipídicas: clasificación y composición	4
3.2.1 Clasificación	5
3.2.2 Composición.....	6
3.2.2.1 Composición de las SLN.....	7
3.2.2.2 Composición de los NLC.....	8
3.2.2.3 Composición de las LDC.....	9
3.3 Principales métodos de preparación de nanopartículas lipídicas.....	10
3.4 Caracterización de nanopartículas lipídicas: parámetros y técnicas utilizadas	13
3.4.1 Tamaño de partícula y distribución del tamaño de partícula	13
3.4.2 Forma de partícula, morfología y ultraestructura.....	13
3.4.3 Potencial zeta/Carga superficial.....	13
3.4.4 Viscosidad y propiedades reológicas	14
3.4.5 Caracterización de lípidos.....	14
3.4.6 Coexistencia de estructuras coloidales adicionales e interacción con fármacos incorporados	14
3.4.7 Carga de fármaco	14
3.4.8 Eficiencia de encapsulación de fármaco	15
3.4.9 Liberación/disolución de fármacos <i>in vitro</i>	15
3.4.10 Unión, protección y liberación de los ácidos nucleicos.....	16
3.5 Aplicaciones.....	16
3.5.1 Administración de fármacos poco solubles	16
3.5.2 Administración de péptidos y proteínas	17
3.5.3 Administración de ácidos nucleicos	18
3.5.4 Aplicación en cosmética	20
4. CONCLUSIONES	21
5. BIBLIOGRAFÍA.....	22

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Nanotecnología, nanomedicina y nanoterapia

La nanotecnología es la ciencia que interviene en el diseño, la producción y el empleo de estructuras y objetos que se encuentran dentro de la escala nanométrica (1). Este tipo de tecnología se está aplicando en una amplia gama de productos entre los que se encuentran productos médicos, alimentos y cosméticos (2).

La aplicación de la nanotecnología en las ciencias de la salud se denomina nanomedicina, y es una de las ramas de la nanotecnología con más proyección debido a sus importantes aplicaciones, especialmente diagnósticas y terapéuticas. Su objetivo principal es el desarrollo de herramientas para diagnosticar, prevenir y tratar enfermedades cuando están todavía en estados poco avanzados o en el inicio de su desarrollo. La nanomedicina agrupa tres áreas principales: el nanodiagnóstico, la liberación controlada de sustancias activas (nanoterapia) y la medicina regenerativa.

Dentro de estas áreas, la nanoterapia pretende dirigir nanosistemas activos que contengan elementos de reconocimiento para actuar o transportar y liberar moléculas activas exclusivamente en las células o tejidos afectados, con el fin de conseguir un tratamiento más efectivo, minimizando los efectos secundarios (3). Por lo tanto, en este campo la nanotecnología se centra en el desarrollo de diferentes tipos de nanopartículas con las que se busca (4): mejorar la biodisponibilidad de fármacos poco solubles en agua, dirigir las sustancias activas específicamente a determinadas células o tejidos, favorecer el transporte transcelular a través de barreras epiteliales y endoteliales, permitir el acceso de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos) a lugares de acción intracelulares, desarrollar estrategias de administración conjunta de dos o más sustancias activas, combinar la administración de agentes terapéuticos con sistemas de imagen para diagnóstico (nanoteragnosis), y realizar una lectura a tiempo real de la eficacia *in vivo* de un agente terapéutico.

1.2 Tipos de nanopartículas

Se pueden diferenciar dos grandes grupos de nanopartículas: inorgánicas y orgánicas.

Las nanopartículas inorgánicas se obtienen normalmente mediante la precipitación de sales inorgánicas, que están unidas a una matriz; entre ellas se encuentran los puntos cuánticos (del inglés, quantum dots), las nanopartículas magnéticas y las nanopartículas de oro.

Las nanopartículas orgánicas pueden estar compuestas por diferentes tipos de moléculas, diferenciándose principalmente los sistemas poliméricos y los sistemas lipídicos. Una propiedad destacable de las nanopartículas orgánicas, en general, es su

capacidad para cargar sustancias activas, ya sea por conjugación en la superficie o en el núcleo o por encapsulación física. Esta propiedad las convierte en sistemas atractivos para la administración de fármacos y aplicaciones biomédicas (5).

La aplicación clínica de los sistemas poliméricos sigue siendo limitada, debido al coste de producción y de las materias primas, y a la toxicidad que presentan en el organismo los productos de degradación de los polímeros y los solventes utilizados en la fabricación de estas nanopartículas (6). Como alternativa, los sistemas lipídicos están compuestos por lípidos similares a los que se encuentran en el organismo humano de manera fisiológica, lo que hace que sean bien tolerados, y, de hecho, la mayoría de ellos están aprobados para su utilización en medicamentos de uso humano (7).

1.2.1 Sistemas lipídicos

Los sistemas lipídicos se pueden subdividir en sistemas vesiculares (liposomas), nanoemulsiones o nanopartículas lipídicas. Las diferencias estructurales de estos sistemas se recogen en la figura 1.

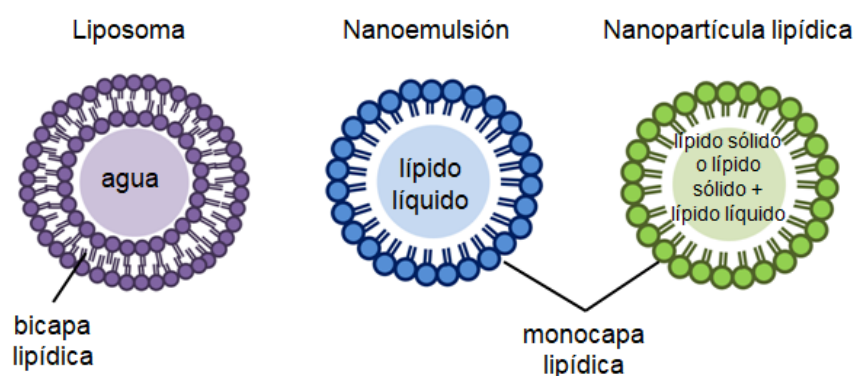


Figura 1. Esquema general de la estructura de los sistemas lipídicos: liposomas, nanoemulsiones y nanopartículas lipídicas.

1.2.1.1 Liposomas

Los liposomas son vesículas compuestas por bicapas lipídicas concéntricas (compuestas principalmente por fosfolípidos naturales o sintéticos) que rodean un núcleo acuoso. Se puede formar un liposoma en una variedad de tamaños y número de bicapas (8). Los liposomas unilaminares son liposomas formados por una única bicapa lipídica de pequeñas o grandes dimensiones, mientras que los plurilaminares están formados por varias bicapas. Los liposomas se han estudiado ampliamente como sistemas de administración de fármacos debido a sus capacidades únicas para encapsular agentes terapéuticos tanto hidrófilos como hidrófobos con alta eficiencia, y proteger los fármacos encapsulados de agentes externos. Además, se pueden funcionalizar con ligandos específicos que pueden dirigirse a células, tejidos y órganos de interés, y es posible recubrirlos con polímeros inertes y biocompatibles como el

polietilenglicol (PEG), prolongando a su vez la vida media de la circulación de los liposomas *in vivo*. Doxil fue la primera formulación de fármaco liposomal aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU (del inglés, Food and Drug Administration, FDA) para el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) asociado con el sarcoma de Kaposi en 1995. Esta formulación consiste en doxorubicina (un fármaco quimioterapéutico anticancerígeno) en liposomas compuestos de fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol y fosfoetanolamina PEGilada. Doxil permitió aumentar drásticamente la vida media de circulación de doxorubicina mejorando la disposición del fármaco en el tejido tumoral (9).

1.2.1.2 Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones (NE) son dispersiones de aceite en agua (O/W) o agua en aceite (W/O) con un diámetro medio de gota de unos 100 nm. Para obtenerlas dos líquidos inmiscibles son estabilizados con uno o varios agentes tensioactivos apropiados. Las nanoemulsiones están formadas por gotículas de pequeño tamaño y, por lo tanto, se caracterizan por una mayor superficie relativa con respecto a otras formulaciones y por una estabilidad física a largo plazo, porque el pequeño tamaño de las gotas evita los fenómenos de desestabilización como la coalescencia, la formación de cremas y la sedimentación. Pueden utilizarse para resolver problemas de solubilidad y/o estabilidad de las moléculas activas (oxidación, pH, hidrólisis y degradación enzimática a nivel de la mucosa, en condiciones fisiológicas) (10).

1.2.1.3 Nanopartículas lipídicas

Las nanopartículas lipídicas se han desarrollado como alternativa a los liposomas y las nanoemulsiones, aprovechando también sus ventajas, ya que están compuestas por lípidos bien tolerados, son capaces de proteger las sustancias activas y permiten una liberación sostenida (11). Además, las nanopartículas lipídicas presentan otras ventajas como la alta capacidad de carga de sustancias activas, la posibilidad de administrarlas a través de diferentes vías, su mayor estabilidad a largo plazo y la opción de liofilizarlas, esterilizarlas y fabricarlas mediante procesos fácilmente escalables del laboratorio a la industria (12,13). Por todo ello, las nanopartículas lipídicas han demostrado ser una opción interesante como sistemas de administración de diferentes tipos de sustancias activas, por ejemplo, fármacos poco solubles, péptidos y proteínas o ácidos nucleicos.

2. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es hacer una revisión bibliográfica sobre aspectos tecnológicos relacionados con la síntesis y caracterización de nanopartículas lipídicas y sus posibles aplicaciones terapéuticas como sistemas de administración de sustancias activas. Para ello, se plantean los siguientes subobjetivos:

- Describir la clasificación de las nanopartículas lipídicas, su composición y características físico-químicas.
- Detallar los principales métodos de preparación de las nanopartículas lipídicas.
- Resumir las técnicas y métodos de caracterización de las nanopartículas lipídicas.
- Profundizar en las aplicaciones terapéuticas de las nanopartículas lipídicas.

3. DESARROLLO

3.1 Metodología

Para la consecución de los objetivos presentados, se ha realizado una búsqueda de información a modo de revisión bibliográfica en bases de datos (PubMed, Web of Science, Google Scholar) de artículos científicos, capítulos de libros o libros, que contengan información contrastada sobre síntesis, composición, caracterización y posibles aplicaciones de nanopartículas lipídicas. En la búsqueda bibliográfica se han incluido los términos SLN (Solid Lipid Nanoparticles o Nanopartículas Sólidas Lipídicas), NLC (Nanostructured Lipid Carriers o transportadores lipídicos nanoestructurados) y LDC (Lipid Drug Conjugates o nanopartículas de conjugados de lípido-fármaco). Se ha realizado una restricción idiomática ya que sólo han sido seleccionados los artículos escritos en inglés y español.

3.2 Nanopartículas lipídicas: clasificación y composición

Las nanopartículas lipídicas son partículas cuyo tamaño se puede encontrar en el rango de 50-1000 nm, aunque generalmente presentan un tamaño de 150-300 nm, cuya matriz está formada por lípidos sólidos o mezclas de lípidos sólidos y líquidos (14) en las que se pueden incorporar sustancias activas.

Las nanopartículas lipídicas pueden obtenerse de nanoemulsiones de aceite en agua, donde el lípido líquido de las gotas de aceite se reemplaza por un lípido sólido a temperatura corporal. Como consecuencia, las nanopartículas lipídicas permanecen sólidas tras su administración. Esto significa que, al igual que las partículas poliméricas, contienen una matriz que permite controlar la liberación. Además, la matriz puede proteger a los activos químicamente lábiles contra la degradación (15).

3.2.1 Clasificación

Las nanopartículas lipídicas se clasifican en nanopartículas sólidas lipídicas (SLN), transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC) y nanopartículas de conjugados de lípido-fármaco (LDC) (16). En la figura 2 se recoge un esquema con la estructura general de los diferentes tipos de nanopartículas lipídicas.

Las SLN son partículas esféricas en el rango de los nanómetros, formadas por un núcleo o matriz lipídica sólida rodeada de una capa de tensioactivos. Ese núcleo sólido aporta gran estabilidad a estas nanopartículas, y, de hecho, desde su desarrollo en los años 90, muchos grupos han evaluado su eficacia como sistemas de administración de diferentes tipos de moléculas activas (por ejemplo, fármacos poco solubles, péptidos, proteínas o ácidos nucleicos) (8,17–19).

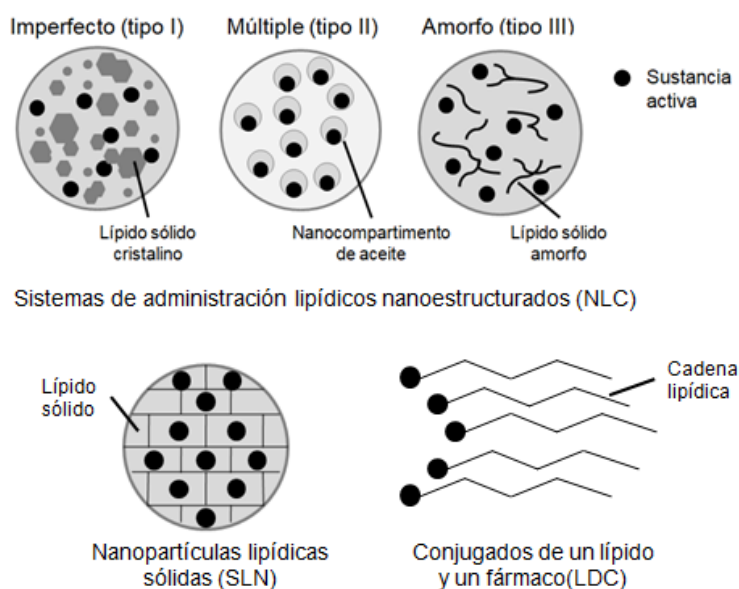


Figura 2. Estructura general de los diferentes tipos de nanopartículas lipídicas. Imagen adaptada a partir de (14,20)

Sin embargo, las SLN presentan ciertas limitaciones, principalmente la baja capacidad de carga de fármacos y la expulsión del fármaco durante el almacenamiento. La capacidad de carga depende de la solubilidad del fármaco en el lípido sólido y de la estructura y el estado polimórfico de la matriz lipídica. Las moléculas activas deben disolverse en el lípido fundido antes de la formación de partículas, y una concentración de fármaco demasiado alta en la masa fundida puede conducir a la expulsión inmediata del fármaco durante el posterior proceso de enfriamiento. Además, contienen matrices de cristales perfectos que no pueden acomodar grandes cantidades de fármaco y, cambios en la estructura cristalina durante el almacenamiento pueden provocar la expulsión del fármaco (21). Para superar estas limitaciones, se han desarrollado los NLC, cuya matriz está compuesta por mezclas de lípidos líquidos y lípidos sólidos a temperatura ambiente, mejorando la capacidad

de carga de sustancias activas y minimizando su expulsión durante el almacenamiento (22). Dependiendo de la composición de las matrices lipídicas, se distinguen tres modelos morfológicos de NLC (23):

- **NLC tipo I o imperfecto.** Consiste en una matriz desordenada con muchos espacios que puede acomodar más cantidad de sustancia activa en grupos amorfos. Esta matriz se obtiene mezclando lípidos líquidos y lípidos sólidos, compuestos por ácidos grasos de longitudes de cadena muy diferentes. Sin embargo, aunque en este tipo de NLC la expulsión del fármaco se reduce con respecto a la que tiene lugar con las SLN, todavía existe cierta expulsión, ya que durante la transición del estado fundido al sólido, tiene lugar la cristalización del lípido.
- **NLC tipo II o múltiple.** Para evitar la expulsión de fármacos liposolubles, se usan altas concentraciones de aceites, siendo el lípido sólido fundido y el aceite miscibles a alta temperatura. Durante el proceso de enfriamiento el aceite precipita en forma de nanocompartimentos en la matriz de lípido sólido, donde el fármaco presenta una mejor disposición. Este tipo de NLC ofrece ventajas como una alta eficiencia de encapsulación de sustancias activas, la liberación controlada y la minimización de la expulsión de las mismas.
- **NLC tipo III o amorfo.** Para la síntesis de este tipo de NLC se seleccionan lípidos específicos como el miristato de isopropilo o el adipato de dibutilo, que forman partículas sólidas pero no cristaliza, dando lugar a una matriz lipídica en un estado amorfo homogéneo. Esto reduce notablemente la expulsión del fármaco.

Los LDC son los sistemas de nanopartículas basadas en lípidos más aceptados para la administración de fármacos hidrófilos, ya que mejoran la capacidad de carga de este tipo de sustancias activas respecto a las SLN y los NLC. En los LDC los fármacos hidrófilos se conjugan primero con los componentes lipídicos mediante la unión covalente entre un grupo amino o un grupo hidroxilo del fármaco y grupos carboxilo del núcleo lipídico para obtener un complejo lipofílico (24). Los LDC están atrayendo cada vez más atención, especialmente en el campo de las aplicaciones biomédicas y farmacéuticas, ya que su tecnología representa un nuevo y prometedor enfoque para extender el uso de fármacos hidrófilos de alta potencia con un bajo índice terapéutico (25).

3.2.2 Composición

La composición de SLN, NLC y LDC consiste normalmente en lípidos (sólidos y/o líquidos), tensioactivos, cotensioactivos, sustancias activas y agua. Los lípidos deben

ser biodegradables, no tóxicos y generalmente reconocidos como seguros (GRAS). Además, las propiedades fisicoquímicas de los lípidos y los tensioactivos determinan las características de las nanopartículas (vía de administración, tamaño de las partículas, liberación de las sustancias activas, estabilidad de almacenamiento). Otros ingredientes importantes son: modificadores de la carga superficial, crioprotectores, disolventes miscibles en agua, moléculas con propiedades de enmascaramiento, contraiones y conservantes.

Las sales orgánicas y los polímeros iónicos se emplean como contraiones en la formulación de nanopartículas lipídicas para superar el desafío de encapsular sustancias activas solubles en agua. Los modificadores de superficie son otros excipientes utilizados para reducir al mínimo su absorción fagocítica por los macrófagos en el sistema reticuloendotelial. Las partículas se recubren con polímeros hidrófilos (por ejemplo, PEG) para aumentar el tiempo de residencia de las sustancias activas en la circulación sistémica. La modificación de la superficie ofrece ventajas como mayor estabilidad física y biocompatibilidad, distribución de las sustancias activas específicamente en tejidos o células diana, mayor transporte a través del epitelio (23).

Los tensioactivos utilizados incluyen lípidos de membrana como lecitinas, sales biliares como taurocolato de sodio y no iónicos biocompatibles como los copolímeros de óxido de etileno/óxido de propileno. La concentración de tensioactivo afecta notablemente al tamaño de las nanopartículas lipídicas. En general, se ha observado que cuando se elige una relación tensioactivo/lípido más alta los tamaños de las partículas son más pequeños. La disminución de la concentración de tensioactivo da lugar a un aumento del tamaño de partícula durante el almacenamiento (26).

3.2.2.1 Composición de las SLN

Las SLN están formadas por una combinación de lípidos sólidos a temperatura ambiente, tensioactivos o surfactantes y agua.

Entre los lípidos sólidos más utilizados para la preparación de SLN se encuentran:

- **Compritol ATO 888 y Plecirol ATO 5.** El Compritol o behenato de glicerol presenta una cadena de ácidos grasos más larga que el Plecirol o palmitoestearato de glicerol (22C frente a 16C-18C), por lo que requiere más tiempo para que se produzca su cristalización. Esta degradación de su estructura es reversible en las condiciones de almacenamiento estudiadas (5 semanas almacenadas a 50°C). Ambas sustancias son ampliamente utilizadas

como bases glicéricas para la preparación de SLN debido a varias ventajas como la estabilidad y el efecto de liberación sostenida (27).

- **Monoestearato de glicerina (GMS) y monooleato de glicerina (GMO).** El punto de fusión de GMS es de 50-55°C, mientras que el de GMO es de 35-45°C. La eficiencia de encapsulación de sustancias activas del GMS es mayor que la del GMO (28). Ambos agentes se preparan mediante el proceso de esterificación que aumenta la absorción linfática de los glicéridos (29).
- **Ácidos grasos.** El ácido tetradecanoico, el ácido esteárico y el ácido palmítico se utilizan para la preparación de SLN. El ácido esteárico muestra la mayor eficiencia de encapsulación debido a que presenta una mayor longitud en su cadena de ácidos grasos (30).
- **Alcoholes grasos.** Los alcoholes grasos utilizados para la preparación de SLN son alcohol cetílico y alcohol estearílico. Estos elementos son metabolizados por la deshidrogenasa de alcoholes grasos (FADH) presente en el hígado (31).
- **Cera.** La manteca de cacao, el palmitato de cetilo y la cera de abeja se utilizan principalmente para la preparación de SLN. La manteca de cacao muestra un carácter más lipofílico y una mayor tasa de liberación de sustancias activas frente a la cera de abeja. El palmitato de cetilo muestra mejor estabilidad, menor toxicidad *in vitro* y mejor tasa de degradación *in vitro* que el compritol y los glicéridos (32).

Algunos de los tensioactivos utilizados habitualmente en la formulación de SLN son: **Poloxamer 188 o 407, Tween 20 o 80, Span 20, alcohol polivinílico (PVA), lecitina.**

3.2.2.2 Composición de los NLC

El componente principal de los NLC son los lípidos (líquidos y sólidos), que controlan la capacidad de carga de las sustancias activas, y prolongan la acción y la estabilidad de las formulaciones. Los lípidos sólidos utilizados suelen ser los mismos que se utilizan en la preparación de SLN, como por ejemplo Compritol ATO 888 o Precitol ATO 5. Algunos ejemplos de lípidos líquidos son los triglicéridos caprílicos/cápricos (8C/10C), la vitamina E y sus derivados (TOS, TPGS), los monoacilgliceroles, la lecitina de soja, el escualeno y el ácido oleico (33). Los lípidos condicionan el tipo de NLC formulado (imperfecto, múltiple o amorfo). La solubilidad o el coeficiente de reparto de las sustancias activas en el lípido son los mejores criterios para elegir un lípido adecuado. La solubilidad de las sustancias activas en los lípidos en estado líquido afecta a la carga de la sustancia activa y a la eficiencia de encapsulación.

El tipo y las concentraciones del surfactante influyen sobre la calidad y la eficacia de los NLC, ya que la toxicidad, la estabilidad física y la cristalinidad de los NLC están muy influenciadas por la elección del surfactante. Los tensioactivos utilizados son los mismos que se utilizan en la preparación de SLN, como por ejemplo Tween 20 o Poloxamer 188. Son elegidos en función de la ruta de administración, el valor del balance hidrofílico-lipofílico (HLB), el efecto sobre el tamaño de las partículas y la modificación de los lípidos. La modificación de los tensioactivos controla la miscibilidad de los componentes químicos en los NLC y, en consecuencia, la estabilidad (23).

3.2.2.3 Composición de las LDC

Los LDC están formados principalmente por lípidos, surfactantes y solventes. Existen diferentes estrategias de conjugación con los fármacos hidrófilos en función del lípido utilizado para ello (34):

- **Ácidos grasos.** Los ácidos grasos contienen una cadena hidrocarbonada y un ácido carboxílico reactivo. La estrategia utilizada habitualmente es conjugar el extremo carboxílico del lípido con un grupo hidroxilo o amina del fármaco para formar un enlace estable de éster o amida. Algunos ejemplos de este tipo son el ácido docosahexaenoico, el ácido esteárico y el ácido palmítico.
- **Esteroides.** El colesterol y los derivados del ácido cólico son esteroides que han sido conjugados con fármacos. El grupo hidroxilo unido al anillo de los esteroides es el principal lugar de conjugación en la mayoría de los estudios. El ácido cólico es otro esteroide utilizado en forma de ácido ursodesoxicólico (UDCA) y ácido litocólico (LCA). El UDCA, a diferencia del colesterol, tiene tres grupos hidroxilos disponibles para la conjugación, de los cuales el más utilizado como sitio de conjugación ha sido normalmente el grupo hidroxilo más alejado.
- **Glicéridos.** Los triglicéridos (TG) se forman al combinar glicerol con tres moléculas de ácidos grasos a través de enlaces tipo éster. Se ha desarrollado una estrategia para reemplazar uno de estos grupos de acilo graso, generalmente en la posición 2, por un fármaco para aprovechar las vías de metabolismo de los TG, como la vía de desacilación-reacilación de los TG. Los fármacos conjugados con glicéridos aprovechan la vía de transporte linfático para mejorar la absorción de fármaco y potenciar la focalización linfática.
- **Fosfolípidos.** Hay dos estrategias de conjugación de un fármaco con un fosfolípido: la unión en el grupo fosfato o la unión en la posición 2 de la cadena del glicerol.

3.3 Principales métodos de preparación de nanopartículas lipídicas

El método de preparación debe ser seleccionado valorando parámetros como las propiedades fisicoquímicas de las sustancias activas, la estabilidad física, química y biológica de las sustancias activas, las características deseadas de la nanoformulación final, la viabilidad de la producción y los factores económicos, entre otros.

Los métodos utilizados para la preparación de nanopartículas lipídicas se dividen, a grandes rasgos, en tres categorías principales: métodos de alta energía, métodos de baja energía y otros métodos que no dependen de la intensidad de energía (figura 3).

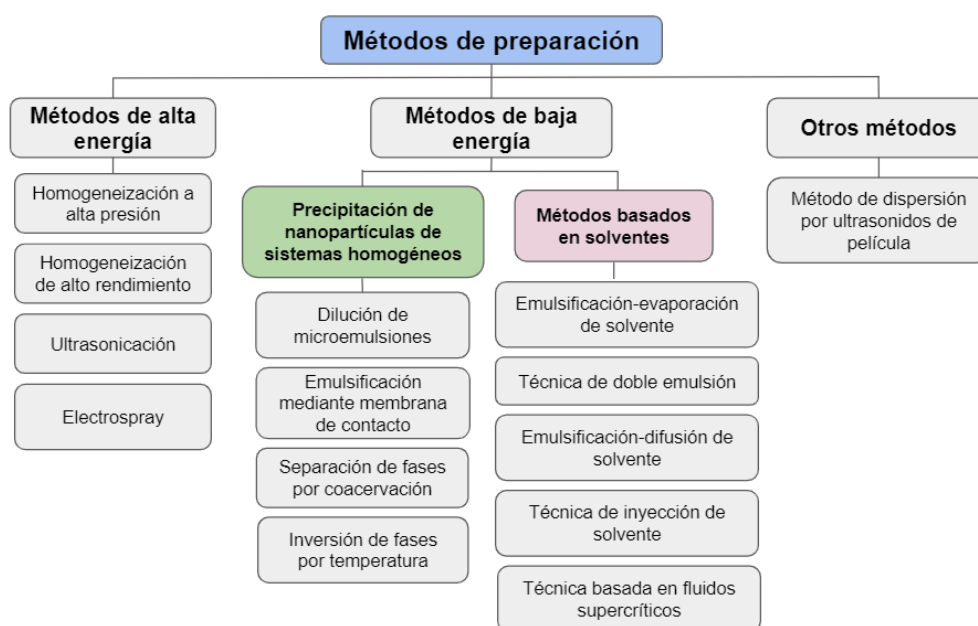


Figura 3. Clasificación de los métodos de preparación de SLN.

En la tabla 1 se muestran las ventajas y desventajas de cada método junto con su mecanismo de reducción de tamaño (22,26,35).

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los métodos de preparación de nanopartículas lipídicas.

Método de preparación	Mecanismo de reducción de tamaño	Ventajas	Desventajas
Homogeneización de alta presión en caliente	Fuerzas de cizalla y cavitación	<ul style="list-style-type: none"> - Adecuado para nanopartículas de alto contenido lipídico - Bajo coste - Buena estabilidad - Fácil de producir a escala de laboratorio e industrial - Alta reproducibilidad de los resultados - Método ampliamente aceptado 	<ul style="list-style-type: none"> - Proceso de alta energía. - Elevado índice de polidispersión - No adecuado para sistemas sensibles al cizallamiento y termosensibles - Inadecuado para sustancias hidrofílicas - Homogeneización ineficiente por alta temperatura - Se producen modificaciones complejas de los lípidos durante la fusión

Tabla 1 (continuación). Ventajas y desventajas de los métodos de preparación de nanopartículas lipídicas.

Método de preparación	Mecanismo de reducción de tamaño	Ventajas	Desventajas
Homogenización de alta presión en frío	Fuerzas de cizalla y cavitación	<ul style="list-style-type: none"> - Método adecuado para sustancias termosensibles - Mejora la capacidad de carga de las sustancias activas, especialmente de las sustancias hidrofílicas - No hay modificaciones complejas de los lípidos durante la fusión, se minimiza la pérdida de sustancia activa 	<ul style="list-style-type: none"> - Proceso de alta energía - Elevado índice de polidispersión - Mayor expulsión de sustancias activas en el almacenamiento a largo plazo
Homogenización de alto rendimiento	Fuerzas de cizalla interpartículas debido al cizallamiento entre el rotor y el estator	<ul style="list-style-type: none"> - Evita el uso de grandes cantidades de surfactantes y solventes orgánicos - Método simple y económico 	<ul style="list-style-type: none"> - Proceso de alta energía - Físicamente inestable debido a las altas fuerzas de cizalla - Posible contaminación por metales - Elevado índice de polidispersión
Ultrasonificación	Cavitación	<ul style="list-style-type: none"> - Baja fuerza de cizalla - Montaje fácil de limpiar - Mejor control del proceso debido al control de la amplitud de las ondas sonoras 	<ul style="list-style-type: none"> - Posible contaminación por metales - Proceso de alta energía - Inestabilidad en el almacenamiento
Electrospray	Pulverización de las gotas de lípidos solidificadas mediante un campo eléctrico	<ul style="list-style-type: none"> - Se obtienen partículas monodispersas - Baja probabilidad de aglomeración de las partículas - Facilidad de fabricación 	<ul style="list-style-type: none"> - Desestabilización del sistema en una mayor exposición al campo eléctrico
Dilución de microemulsiones	Cristalización de los lípidos durante la rápida solidificación de una microemulsión	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere poca energía - No necesita un equipo sofisticado - Fácilmente escalable - Menos agregación de partículas 	<ul style="list-style-type: none"> - Baja concentración de nanopartículas - Adecuado sólo para nanopartículas de bajo contenido en lípidos
Emulsificación mediante membrana de contacto	Enfriamiento de la emulsión formada tras la inserción forzada de la fase lipídica a través de una membrana con solución acuosa surfactante	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere poca energía - Fácilmente escalable - Control preciso del tamaño de partícula 	<ul style="list-style-type: none"> - Obstrucción de la membrana - El alto cizallamiento de la membrana requiere un reemplazo frecuente - Mayor variación entre lotes
Separación de fases por coacervación	Precipitación de lípidos en forma de nanopartículas como consecuencia del intercambio de protones debido a la disminución del pH de la solución de ácidos grasos en presencia del estabilizador.	<ul style="list-style-type: none"> - Adecuado para fármacos lipofílicos e hidrofóbicos - Evita el uso de solventes - No necesita un equipo sofisticado - Fácilmente escalable - Se obtienen partículas monodispersas 	<ul style="list-style-type: none"> - No adecuado para sustancias activas sensibles al pH - Aplicable solo para lípidos que contienen sales alcalinas

Tabla 1 (continuación). Ventajas y desventajas de los métodos de preparación de nanopartículas lipídicas.

Método de preparación	Mecanismo de reducción de tamaño	Ventajas	Desventajas
Inversión de fases por temperatura	Cambio en el valor HLB del tensioactivo que resulta en la inversión de fase de las emulsiones y la precipitación de lípidos debido al enfriamiento irreversible	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere poca energía - Evita el uso de solventes orgánicos y tensioactivos - Adecuado para sustancias activas termosensibles debido al corto tiempo de exposición a altas temperaturas 	<ul style="list-style-type: none"> - Inestabilidad de la emulsión - Mayor agregación de partículas - Impacto de los excipientes en el comportamiento de inversión de fase
Emulsificación- evaporación de solvente	Cristalización de los lípidos mediante la evaporación del solvente utilizado en la fase orgánica de la emulsión	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere poca energía - Pequeño tamaño de partícula - Adecuado para sustancias termosensibles - No necesita un equipo sofisticado - Fácilmente escalable 	<ul style="list-style-type: none"> - Inestabilidad de la emulsión - Solvente orgánico residual - Aglomeración de partículas debido a menores tasas de evaporación de los solventes - Adecuado sólo para sistemas de bajo contenido en lípidos
Técnica de doble emulsión	Solidificación de la emulsión con simultaneidad de la cristalización de los lípidos	<ul style="list-style-type: none"> - No necesita un equipo sofisticado - Requiere poca energía 	<ul style="list-style-type: none"> - Adecuado sólo para sistemas de bajo contenido en lípidos
Emulsificación- difusión de solvente	Cristalización de los lípidos producida por la difusión del solvente de la fase acuosa interna a la externa	<ul style="list-style-type: none"> - No necesita un equipo sofisticado - Fácilmente escalable 	<ul style="list-style-type: none"> - Adecuado sólo para sistemas de bajo contenido en lípidos
Técnica de inyección de solvente	Inyección del solvente miscible en agua, que contiene la sustancia activa, en la fase acuosa fría del surfactante	<ul style="list-style-type: none"> - Producción rápida - Requiere poca energía - Adecuado para sustancias termosensibles - No necesita un equipo sofisticado - Fácilmente escalable 	<ul style="list-style-type: none"> - Solvente orgánico residual - Adecuado sólo para sistemas de bajo contenido en lípidos
Técnica basada en fluidos supercríticos	Precipitación de las nanopartículas causada por la cristalización de los lípidos debido a la adición de antisolvente o a la rápida expansión del disolvente	<ul style="list-style-type: none"> - Método muy eficiente para la rápida eliminación de solventes - Evita el uso de solventes orgánicos - Partículas obtenidas como polvo seco, en lugar de suspensión - Condiciones suaves de presión y temperatura - Adecuado para sustancias termolábiles y sensibles al pH 	<ul style="list-style-type: none"> - Elevado coste de los equipos y solventes fluidos supercríticos - El método no está bien establecido para NLC
Método de dispersión por ultrasonidos de película	Emulsión de los lípidos de la película al añadir agua, mayor reducción del tamaño de las gotas debido a los ultrasonidos	<ul style="list-style-type: none"> - No necesita un equipo sofisticado 	<ul style="list-style-type: none"> - Amplia distribución del tamaño de las partículas - Inestabilidad - Posible contaminación por metales - El uso de solvente es obligatorio

3.4 Caracterización de nanopartículas lipídicas: parámetros y técnicas utilizadas

Las nanopartículas lipídicas son estructuras coloidales complejas que requieren métodos especializados para su caracterización física y estructural.

3.4.1 Tamaño de partícula y distribución del tamaño de partícula

El tamaño de partícula y la distribución del tamaño de partícula son parámetros muy importantes que van a condicionar la aplicación de la formulación en términos de parámetros fisicoquímicos, liberación de fármacos, biodistribución y estabilidad de las nanopartículas (36). La presencia de estructuras coloidales coexistentes como micelas o nanocristales puede dificultar la determinación del tamaño de partícula exacto de estas nanopartículas (37,38). La dilución de la muestra y el secado pueden causar una reducción en las estructuras coloidales existentes. Los métodos utilizados para determinar el tamaño de partícula son: espectroscopía de correlación de fotones (PCS), LD, fraccionamiento de flujo de campo (FFF) y contador Coulter (CC).

3.4.2 Forma de partícula, morfología y ultraestructura

La forma, morfología y ultraestructura de las nanopartículas juegan un papel importante en la liberación de sustancias activas, la eficiencia de encapsulación y la estabilidad de las nanopartículas. Las partículas esféricas tienen el volumen de partículas más bajo, el área de superficie específica y las vías de difusión más altas, lo que ofrece una liberación controlada de las sustancias activas encapsuladas. Los métodos utilizados para determinar la forma de partícula son métodos microscópicos, tales como microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM). Para medir la ultraestructura de las partículas se utilizan métodos como PCS y LD.

3.4.3 Potencial zeta/Carga superficial

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 (39).

La cantidad de repulsión o atracción electrostática entre las partículas de nanodispersión de SLN está determinada por el potencial eléctrico existente en la interfaz de las nanopartículas y el medio de dispersión. Cuanto mayores sean los valores de potencial zeta ($> +30$ mV o < -30 mV), mayor será la estabilización de las nanopartículas debido a la repulsión electrostática. Previene la agregación causada por la repulsión, debido a una mayor carga superficial (37,40–44). El potencial Z se mide utilizando la velocimetría por láser Doppler (LDV) (37,45).

3.4.4 Viscosidad y propiedades reológicas

Las propiedades reológicas de la nanodispersión son parámetros esenciales para determinar los ingredientes de la formulación, así como la facilidad de procesamiento y administración. El carácter reológico de los sistemas de nanopartículas lipídicas varía de baja a muy baja viscosidad. La prueba de oscilación, la prueba de barrido de oscilación dinámica y la reometría de corte continuo se utilizan para medir la viscosidad de las nanodispersiones (46).

3.4.5 Caracterización de lípidos

La caracterización de lípidos consiste en la determinación del punto de fusión, la cristalinidad y el polimorfismo, que condicionan el patrón de liberación, la estabilidad y la solidificación de las nanopartículas. Los métodos utilizados para detectar el punto de fusión, el cambio en el punto de fusión, la cristalinidad y el polimorfismo de los lípidos son: calorimetría diferencial de barrido (DSC), difracción de rayos X de polvos, dispersión de rayos X, RMN, ESR, espectroscopía infrarroja, espectroscopía Raman y espectroscopía de reflexión externa (36).

3.4.6 Coexistencia de estructuras coloidales adicionales e interacción con fármacos incorporados

Durante la formación de SLN se puede producir la formación de estructuras coloidales adicionales, como micelas y liposomas. La presencia de estos sistemas puede alterar el patrón de liberación del fármaco, lo que a su vez puede aumentar los efectos secundarios y también afectar a la estabilidad de las SLN. Las técnicas utilizadas para detectar la presencia de otros nanosistemas incluyen la RMN y la ESR (36).

3.4.7 Carga de fármaco

Las técnicas de caracterización expuestas anteriormente son las relacionadas con las propias nanopartículas, pero estas pueden ser utilizadas para administrar diferentes sustancias activas (fármacos convencionales, péptido o proteínas, o ácidos nucleicos, entre otros). Los fármacos, péptidos y proteínas normalmente se encapsulan, mientras que los ácidos nucleicos se adsorben a la superficie por interacciones electrostáticas con nanopartículas de carga positiva. Por ello, también existen técnicas relacionadas con las sustancias activas como la carga de fármaco, la eficiencia de encapsulación de fármaco y la liberación o disolución de fármacos *in vitro*.

En el caso de los ácidos nucleicos, la caracterización de su unión a las nanopartículas se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa y la determinación del tamaño y de la carga de la partícula. Existen también métodos cuantitativos como RiboGreen, un

colorante fluorescente patentado que se utiliza en la detección y cuantificación de los ácidos nucleicos, tanto ADN como ARN.

La carga de fármaco (DL) es la cantidad total de fármaco encapsulado dividido entre el peso total del sistema de administración (incluido todos los ingredientes).

$$\%Carga\ de\ fármaco = \frac{Cantidad\ de\ fármaco\ en\ las\ partículas}{Cantidad\ de\ fármaco + excipientes\ añadidos\ a\ la\ formulación} \times 100$$

Las propiedades fisicoquímicas del fármaco, como la solubilidad/miscibilidad del fármaco en los lípidos, las propiedades fisicoquímicas y el comportamiento polimórfico de los lípidos son los principales factores que afectan la capacidad de carga (incorporación) del fármaco de las nanopartículas (37,46).

3.4.8 Eficiencia de encapsulación de fármaco

La eficiencia de encapsulación es un parámetro que determina la eficiencia de las nanopartículas para atrapar el fármaco dentro de la matriz lipídica. La relación entre porcentaje de fármaco incorporado en las partículas y la cantidad total de fármaco añadido a la formulación se conoce como eficiencia de encapsulación (%EE). Se puede determinar por estimación de la concentración de fármaco libre en el medio de dispersión (46–48).

$$\%EE = \frac{Cantidad\ de\ fármaco\ en\ las\ partículas}{Cantidad\ de\ fármaco\ añadidos\ a\ la\ formulación} \times 100$$

Los métodos utilizados para separar el fármaco libre de las nanopartículas son el método de mini columna de centrifugación, ultracentrifugación y cromatografía de filtración o de permeación en gel (49). Una vez separado, se cuantifica mediante HPLC o, en el caso de péptidos y proteínas, mediante ELISA.

3.4.9 Liberación/disolución de fármacos *in vitro*

La liberación del fármaco desde la matriz de las nanopartículas sigue dos mecanismos principales: la difusión del fármaco y la degradación de los lípidos *in vivo* por enzimas. La liberación rápida inicial del fármaco de las nanopartículas puede deberse a una mejora en la solubilidad del fármaco o a una mayor concentración de fármaco cerca de la superficie. Entre los factores que rigen la liberación del fármaco de las nanopartículas se incluyen parámetros de formulación como propiedades fisicoquímicas del fármaco y los lípidos, relación fármaco:lípido, tipo y concentración de lípidos utilizados, modelo de incorporación del fármaco en el sistema de nanopartículas, tipo y concentración de tensioactivo, tipo y concentración de cotensioactivos y otros relacionados con la producción, tales como temperatura, ciclos de homogeneización y presión y velocidad de homogeneización. Los métodos utilizados para determinar el perfil de liberación de fármaco *in vitro* de las

nanopartículas lipídicas son las células de difusión vertical o de Franz, diálisis inversa y los ensayos de disolución USP (46).

3.4.10 Unión, protección y liberación de los ácidos nucleicos

La caracterización de los ácidos nucleicos se lleva a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa. En él se puede observar la unión del ácido nucleico a la nanopartícula, la protección del ácido nucleico por parte de la nanopartícula de agentes extra e intracelulares, y su liberación, es decir, cómo se hubiera liberado el ácido nucleico de la nanopartícula para simular que queda libre en la célula para su posterior transcripción y traducción. La cuantificación de los ácidos nucleicos puede realizarse utilizando colorantes fluorescentes como el RiboGreen que emiten fluorescencia cuando se unen a los ácidos nucleicos.

En la tabla 2 se resumen los métodos principalmente utilizados para la evaluación de cada parámetro (49):

Tabla 2. Resumen de los parámetros evaluados y los principales métodos utilizados en la caracterización de nanopartículas lipídicas.

Parámetro evaluado	Método utilizado
Tamaño y forma de partícula	1. Espectroscopía de correlación de fotones (PCS) 2. Microscopía electrónica de barrido (SEM) 3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) 4. Microscopía de fuerza atómica (AFM)
Potencial Zeta o carga superficial	Velocimetría por láser Doppler
Eficiencia de encapsulación	1. Mini columna de centrifugación 2. Ultracentrifugación 3. Cromatografía de filtración o de permeación en gel
Grado de cristalinidad y modificación lipídica	1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) 2. Dispersión de rayos X 3. Espectroscopía infrarroja y Raman
Eficiencia de unión, protección y liberación de ácidos nucleicos	Electroforesis
Liberación y disolución <i>in vitro</i>	1. Células de difusión vertical o de Franz 2. Diálisis inversa 3. Ensayos de disolución USP

3.5 Aplicaciones

Las nanopartículas lipídicas presentan ciertas características que les permiten ser utilizadas para la administración de sustancias activas como fármacos poco solubles, péptidos y proteínas y ácidos nucleicos o para aplicaciones cosméticas.

3.5.1 Administración de fármacos poco solubles

La escasa solubilidad de los fármacos es un desafío importante y frecuente para los nuevos productos farmacéuticos, ya que la absorción de estas moléculas es muy variable y condiciona su eficacia. El diseño de formulaciones innovadoras para los fármacos poco solubles es esencial para lograr una biodisponibilidad adecuada, reduciendo la dosis requerida y permitiendo la administración oral de medicamentos

que de otro modo requerirían una administración parenteral. Se ha demostrado que los sistemas lipídicos aumentan notablemente la absorción oral de los fármacos poco solubles, lo que puede aumentar varias veces su biodisponibilidad. Los mecanismos implicados incluyen el aumento aparente de solubilidad del fármaco y disolución en el tracto gastrointestinal, y/o la modulación de la permeabilidad del fármaco a través de la barrera intestinal. A pesar de ello, hay varios factores que justifican el bajo número de productos comerciales en el mercado, como la complejidad de fabricación e instrumentos y procedimientos costosos. Además, la falta de una comprensión completa del efecto de los lípidos en la absorción de fármacos en el tracto gastrointestinal contribuye a la escasez de productos comercializados.

Durante los últimos años, varios grupos de investigación han estado trabajando en los mecanismos mediante los cuales los NLC modifican la disolución y/o permeabilidad de los fármacos, y la influencia de los factores tecnológicos y de formulación que intervienen en estos procesos. Fármacos altamente lipofílicos han sido encapsulados en los NLC para mejorar su biodisponibilidad oral, la mayoría de la clase II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (baja solubilidad y alta permeabilidad), como vinpocetina, lovastatina, simvastatina, miconazol, resveratrol, fenofibrato, montelukast, atorvastatina, olmesartán medoxomil y tacrolimus, entre otros. También se han incluido en los NLC fármacos de clase IV (baja solubilidad y baja permeabilidad), como etopósido, saquinavir, oleato-docetaxel y areméter-lumefantrina (20). En uno de estos estudios, olmesartán medoxomil fue encapsulado en NLC (OLM-NLC) compuestos por los lípidos sólidos Gelucire® 44/14 y Precirol® ATO 5, el lípido líquido Capmul® MCM EP y el surfactante tocoferol polietilenglicol succinato (TPGS). Estos OLM-NLC presentaron un tamaño de 129,9 nm y un PDI de 0.25, y mostraron *in vitro* la liberación prolongada del fármaco (8 horas frente a 3 horas sin encapsular), el aumento de la captación de los NLC en cultivos celulares y una mejor biodisponibilidad oral de la nanoformulación tras su administración a ratas Sprague Dawley. Los parámetros farmacocinéticos obtenidos con el fármaco encapsulado en NLC tras una sola administración oral fueron muy superiores a los obtenidos en suspensión, ya que se obtuvo una $C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g/ml}$) de 19,51 frente a 3,89 y un AUC_{total} ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$) de 80,61 frente a 16.64 (50).

3.5.2 Administración de péptidos y proteínas

Hay un gran interés en la administración oral de proteínas y péptidos bioactivos debido a sus posibles beneficios para la salud. Sin embargo, son susceptibles a la desnaturalización, agregación o hidrólisis dentro de productos comerciales o del tracto gastrointestinal. Las nanopartículas lipídicas pueden ser diseñadas para encapsular,

retener, proteger y liberar proteínas bioactivas. Una proteína bioactiva puede permanecer encapsulada y estable durante el almacenamiento y posteriormente durante el paso a través de la boca y el estómago, para luego liberarse dentro del intestino delgado donde puede ser absorbida. Las SLN formadas a partir de emulsiones w/o/w se pueden usar para encapsular y proteger proteínas bioactivas. Algunas proteínas y péptidos que podrían beneficiarse de su incorporación a sistemas de administración basados en nanopartículas lipídicas son hormonas como la insulina, enzimas digestivas como la lactasa y la lipasa, vacunas, antimicrobianos e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (51). La insulina ha sido encapsulada en SLN producidas mediante la técnica de doble emulsión empleando trimiristato de glicerol (Dynasan 114) como fase lipídica y lecitina de soja y PVA (P.M. 22.000 g/mol) como emulsionante primario y secundario, respectivamente, con un tamaño de 91 nm y un PDI de 0,005. Esta formulación ha demostrado en los estudios *in vitro* que la insulina podía encapsularse eficazmente en las SLN y protegerse contra la degradación de las enzimas en condiciones gástricas simuladas. Además, los estudios *in vivo* demostraron que la administración de insulina encapsulada en SLN a ratas diabéticas presentó un aumento apreciable (5 veces más) de la biodisponibilidad oral en comparación con la administración de insulina no encapsulada (52).

3.5.3 Administración de ácidos nucleicos

Uno de los principales desafíos para la aplicación clínica de medicamentos basados en ácidos nucleicos es la disponibilidad de sistemas de administración adaptados específicamente a sus características y finalidad. Actualmente, alrededor del 70% de los ensayos clínicos con ácidos nucleicos utilizan virus recombinantes como sistemas de administración. A pesar de su alta eficacia de transfección, estos sistemas presentan potencial oncogénico e inmunogénico y una limitación con respecto al tamaño del ácido nucleico que pueden transportar. Los sistemas no virales, como las nanopartículas lipídicas, son seguros, su producción es simple, económica y reproducible en comparación con los vectores virales, y el tamaño del ácido nucleico no supone una limitación. Su principal inconveniente es la menor eficacia de transfección respecto a los vectores virales, aunque los avances llevados a cabo en los últimos años han permitido mejorarla.

El principal componente de las nanopartículas lipídicas como sistemas de administración de ácidos nucleicos son los lípidos catiónicos, capaces de interactuar con el material genético mediante interacciones electrostáticas y formar un complejo. De esta forma, protegen el ácido nucleico de la degradación y la desnaturalización siendo mínimamente tóxicos y evitando la respuesta inmunológica. También podrían

ser útiles para programar el perfil de liberación de la sustancia activa, mejorar el perfil farmacocinético, reducir la toxicidad para órganos y tejidos sanos y aumentar el tiempo de circulación sanguínea (53).

Los ácidos nucleicos terapéuticos son ácidos nucleicos o compuestos estrechamente relacionados que se utilizan para tratar o prevenir una determinada enfermedad. Son inestables en el medio biológico, y deben acceder a un compartimento intracelular específico (generalmente el citoplasma o el núcleo); por ello, el desarrollo de productos terapéuticos con ácidos nucleicos es mucho más costoso y lento, y el proceso de aprobación para la realización de ensayos clínicos por parte de las administraciones sanitarias regulatorias es mucho más complejo. En función de la enfermedad a la que van destinados, los mecanismos de acción pueden ser suplementación génica, supresión génica y edición génica. Con la suplementación génica se consigue expresar una secuencia nucleotídica para inducir la producción de una determinada proteína que no se expresa o que se sintetiza de forma defectuosa en un paciente, y así revertir los síntomas de la enfermedad. La suplementación génica se puede conseguir con la administración de plásmidos de ADN o ARN mensajero (ARNm). El objetivo de la supresión génica es disminuir o anular la expresión de una proteína específica y se puede conseguir con numerosas estrategias como ARN de interferencia (ARNi), ribozimas o aptámeros. La edición génica se basa en la utilización de nucleasas de edición génica, compuestas por un dominio que reconoce una secuencia específica de ADN, y una nucleasa, que produce un corte en la doble cadena. Tras la rotura del ADN, la reparación se puede producir por dos mecanismos: recombinación homóloga, o recombinación no homóloga. En la recombinación no homóloga, se elimina la secuencia específica, y puede ser utilizada para silenciar o corregir un gen patogénico. En la reparación homóloga, se inserta una secuencia de ADN “donante” para corregir un gen o para añadir uno nuevo. La tecnología de edición génica más conocida es la CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) (54).

Las nanopartículas lipídicas, y especialmente las SLN, han demostrado eficacia en estudios preclínicos para diferentes enfermedades abordadas mediante suplementación génica (enfermedades de la córnea (55), fibrosis quística (56)) y supresión génica (amiloidosis hereditaria mediada por transtiretina (57)). Más recientemente también se ha demostrado la eficacia de las nanopartículas lipídicas para la administración de ARNm. En este caso la eficacia suele ser mayor, porque el ARNm no tiene que penetrar en el núcleo celular, una de las principales limitaciones para la aplicación terapéutica de ADN.

Las vacunas de ARNm pueden ser utilizadas tanto para la vacunación profiláctica como terapéutica. Sus ventajas sobre las vacunas de proteínas o ADN permiten la aplicación de ARNm como profiláctico contra enfermedades en las que las vacunas convencionales no han demostrado una eficacia suficiente. Debido a los cortos tiempos de producción, las vacunas de ARNm también pueden ser utilizadas para responder rápidamente a amenazas emergentes (por ejemplo, SARS-Cov-2 (58)) o cepas estacionales de patógenos (59). Esta estrategia ha sido utilizada para la administración de ARNm modificado con nucleósidos que codifica anticuerpos altamente neutralizantes en busca de una vacuna profiláctica frente al VIH-1, mostrando protección en ratones humanizados (60). En un estudio reciente, la administración de ARNm viral replicado que codifica antígenos del virus Zika formulado en NLC protegió completamente a los ratones contra el desafío letal de Zika. Este logro representa lo que podría ser el enfoque más potente hasta la fecha de cualquier vacuna de Zika (53).

Más allá de las vacunas, la administración de ARNm ha sido estudiada en suplementación génica para mejorar la eficacia de la terapia de reemplazo de enzimas en la enfermedad de Fabry. Para ello, se encapsuló ARNm sintetizado *in vitro* que codifica la enzima α -galactosidasa humana (hGLA) en nanopartículas lipídicas compuestas por el lípido catiónico C12-200. Los resultados mostraron que la secreción prolongada de la proteína dio lugar a un perfil de exposición farmacocinética ampliado, así como a una mayor eficacia terapéutica en un modelo de ratón knockout (61).

3.5.4 Aplicación en cosmética

Los liposomas son los sistemas de administración de cosméticos más ampliamente reconocidos. La crema antienvjecimiento Captur[®] (Dior, 1986) fue el primer producto cosmético liposomal introducido en el mercado. Sin embargo, los liposomas presentan dos importantes desventajas, baja solubilidad y su corta semivida. Las nanopartículas lipídicas presentan características que las convierten en sistemas de administración adecuados para aplicaciones cosméticas, como por ejemplo la protección de compuestos sensibles contra la degradación química, la mejora de la hidratación de la piel, la liberación prolongada, la mejora de la penetración en la piel junto a la posibilidad de dirigir específicamente las sustancias activas y la reducción de la absorción sistémica (62). Se ha investigado su uso para la administración de protectores solares, activos contra el acné y el envejecimiento. En los productos cosméticos, es importante reducir el deseo de rascarse y dañar la piel y, dado que estas formulaciones se parecen a la estructura de la piel, no hay alteración ni efecto tóxico cuando se usan de forma tópica (63).

La crema Cutanova Nanorepair Q10 fue el primer producto cosmético formulado con NLC que se introdujo en el mercado en octubre de 2005. La hidratación de la piel aumentó significativamente después de la aplicación de esta crema en comparación con una crema convencional con el mismo contenido de lípidos y coenzima Q10 (64). En 2013, se realizó un estudio cuyo objetivo fue preparar NLC cargados de coenzima Q10 (Q10-NLC) y evaluar su efecto de focalización epidérmica. En él, Q10-NLC mostró una liberación rápida durante las primeras 3 horas y liberación prolongada después en la liberación *in vitro*. En el estudio de permeación de la piel *in vitro*, la absorción acumulativa de Q10 en la epidermis de Q10-NLC fue 10 veces mayor que la emulsión Q10 (65). Otro ejemplo es FloraGlo®, una solución viscosa del antioxidante natural luteína en aceite de cártamo mezclado con un lípido sólido y surfactantes para producir formulaciones estables de NLC, que mostraron una liberación controlada de luteína y una mejora de su permeabilidad a través de la piel (66). Otras sustancias activas de uso cosmético encapsuladas en NLC son oxibenzona y quercetina. Oxibenzona es un filtro solar y la formulación en NLC ha demostrado aumentar el factor de protección solar *in vitro* (67). Quercetina es un flavonoide cuya permeabilidad y retención en la epidermis aumenta cuando es formulada en NLC potenciando sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios (68). Según los datos obtenidos en las sustancias estudiadas, queda demostrado que los NLC representan un enfoque apasionante a ser explotado para el desarrollo de productos cosméticos comerciales.

4. CONCLUSIONES

Las nanopartículas lipídicas sustituyen a los liposomas y las nanoemulsiones como sistemas de administración de sustancias activas basados en lípidos debido a la alta capacidad de carga de sustancias activas, la posibilidad de administrarlas a través de diferentes vías, su mayor estabilidad a largo plazo y la opción de liofilizarlas, esterilizarlas y fabricarlas mediante procesos fácilmente escalables del laboratorio a la industria.

Los NLC mejoran la capacidad de carga de fármaco y expulsión del fármaco durante el almacenamiento de las SLN, y los LDC mejoran la capacidad de carga de fármacos hidrófilos respecto a SLN y NLC.

Existen numerosos métodos de preparación de nanopartículas lipídicas entre los cuales se debe seleccionar el más adecuado para cada caso. Además, es importante medir los parámetros descritos para su caracterización, tanto física como estructural, ya que facilitan el paso de la producción a pequeña escala a la producción industrial.

El desarrollo de nanopartículas lipídicas como sistemas de administración de sustancias activas es una estrategia en continuo desarrollo ya que su formulación ha abierto nuevos horizontes para desarrollar estrategias innovadoras para la administración de moléculas activas que, hasta ahora, a pesar de su conocida actividad terapéutica, no habían encontrado un sistema de administración adecuado. De cara al futuro, se espera que las nanopartículas lipídicas lleguen al mercado en forma de medicamento, aunque antes deberán superar los problemas éticos asociados a la nanotecnología.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Nanotecnologías [Internet]. European Union. [citado 20 Mar 2020]. Disponible en: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/es/nanotecnologias/index.htm#1
2. Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology [Internet]. U.S. Food and Drug Administration. 2014. Disponible en: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considering-whether-fda-regulated-product-involves-application-nanotechnology>
3. Lechuga LM. Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud [Internet]. [citado 20 Mar 2020]. Disponible en: https://digital.csic.es/bitstream/10261/44635/1/7_Nanomedicina.pdf
4. Farokhzad OC, Langer R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano*. 2009;3(1):16-20.
5. Sanvicens N, Marco MP. Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine. *Trends Biotechnol*. 2008;26(8):425-433.
6. Almeida H, Amaral MH, Lobão P, Silva AC, Lobo JMS. Applications of polymeric and lipid nanoparticles in ophthalmic pharmaceutical formulations: present and future considerations. *J Pharm Sci*. 2014;17(3):278-293.
7. del Pozo-Rodríguez A, Solinís MÁ, Rodríguez-Gascón A. Applications of lipid nanoparticles in gene therapy. *Eur J Pharm Biopharm*. 2016;109:184-193.
8. Mansoori Agrawal MAM, Jawade S, Khan S, I M. A review on liposome. *Int J Adv Res Pharm Amp Bio Sci*. 2012;2(1):453-465.
9. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:975-999.
10. Bonferoni MC, Rossi S, Sandri G, Ferrari F, Gavini E, Rassa G, et al. Nanoemulsions for “Nose-to-Brain” Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2019;11(2).
11. Swathi G, Prasanthi N, Manikiran S, Ramarao N. Solid lipid nanoparticles: colloidal carrier systems for drug delivery. *IJPSR*. 2010;1:1-16.
12. Liu D, Liu C, Zou W, Zhang N. Enhanced gastrointestinal absorption of N3-O-toluy-fluorouracil by cationic solid lipid nanoparticles. *J Nanoparticle Res*. 2010;12(3):975-984.
13. Chime SA, Attama AA, Builders PF, Onunkwo GC. Sustained-release diclofenac potassium-loaded solid lipid microparticle based on solidified reverse micellar solution: in vitro and in vivo evaluation. *J Microencapsul*. 2013;30(4):335-345.
14. Battaglia L, Serpe L, Foglietta F, Muntoni E, Gallarate M, Del Pozo Rodriguez A, et al. Application of lipid nanoparticles to ocular drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016;13(12):1743-1757.

15. Müller RH, Shegokar R, Keck CM. 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. *Curr Drug Discov Technol.* 2011;8(3):207-227.
16. Mehanna M, Motawaa A, Samaha M. Pharmaceutical Particulate Carriers: Lipid - Based Carriers. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol.* 2012;2(1):10-22.
17. Kesharwani R, Sachan A, Singh S, Patel D. Formulation and Evaluation of Solid Lipid Nanoparticle (SLN) Based Topical Gel of Etoricoxib. *J Appl Pharm Sci.* 2016;6:124-131.
18. de La Torre LG, de Pinho SC. Lipid Matrices for Nanoencapsulation in Food: Liposomes and Lipid Nanoparticles. *Food Nanoscience and Nanotechnology.* Springer International Publishing; 2015: 99-143.
19. Jafar G, Darijanto S, Mauludin R. Formulasi Solid Lipid Nanoparticle Ceramide. *Jurnal Pharmascience.* 2015;2(2):80-87.
20. Beloqui A, del Pozo-Rodríguez A, Isla A, Rodríguez-Gascón A, Solinís MÁ. Nanostructured lipid carriers as oral delivery systems for poorly soluble drugs. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2017;42:144-154.
21. Puri A, Loomis K, Smith B, Lee J-H, Yavlovich A, Heldman E, et al. Lipid-Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers: From Concepts to Clinic. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2009;26(6):523-580.
22. Yoon G, Park JW, Yoon I-S. Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs): recent advances in drug delivery. *J Pharm Investig.* 2013;43(5):353-362.
23. Chauhan I, Yasir M, Verma M, Singh A. Nanostructured Lipid Carriers: A Groundbreaking Approach for Transdermal Drug Delivery. *Advanced Pharmaceutical Bulletin.* 2020;10(2):150-165.
24. Torrecilla J, Rodríguez-Gascón A, Solinís MÁ, del Pozo-Rodríguez A. Lipid nanoparticles as carriers for RNAi against viral infections: current status and future perspectives. *BioMed Res Int.* 2014;2014:161794.
25. Banerjee S, Kundu A. Lipid-drug conjugates: a potential nanocarrier system for oral drug delivery applications. *DARU J Pharm Sci.* 2018;26(1):65-75.
26. Das RJ, Baishya K, Pathak K. Recent advancement of lipid drug conjugate as nanoparticulate drug delivery system. 2013;6.
27. Hamdani J, Moës AJ, Amighi K. Physical and thermal characterisation of Precirol® and Compritol® as lipophilic glycerides used for the preparation of controlled-release matrix pellets. *International Journal of Pharmaceutics.* 2003;260:47-57.
28. Ekambaram P, Abdul HS. Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles of ramipril. *J Young Pharm JYP.* 2011;3(3):216-220.
29. Kumar VV, Chandrasekar D, Ramakrishna S, et al. Development and evaluation of nitrendipine loaded solid lipid nanoparticles: influence of wax and glyceride lipids on plasma pharmacokinetics. *Int J Pharm.* 2007;335(1-2):167-175.
30. Rawat MK, Jain A, Mishra A, Muthu MS, et al. Effect of lipid matrix on repaglinide-loaded solid lipid nanoparticles for oral delivery. *Ther Deliv.* 2010;1(1):63-73.
31. Dong X, Mumper RJ. The metabolism of fatty alcohols in lipid nanoparticles by alcohol dehydrogenase. *Drug Dev Ind Pharm.* 2006;32(8):973-980.
32. Kim B-D, Na K, Choi H-K. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles (SLN) made of cacao butter and curdlan. *Eur J Pharm Sci.* 2005;24(2-3):199-205.
33. Beloqui A, Solinís MA, Rodríguez-Gascón A, Almeida AJ, Préat V. Nanostructured Lipid Carriers: promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 2015.

34. Irby D, Du C, Li F. Lipid–Drug Conjugate for Enhancing Drug Delivery. *Mol Pharm.* 2017;14(5):1325-1338.
35. Grumezescu AM. Lipid nanocarriers for drug targeting. Elsevier; 2018. 676 p. (Pharmaceutical Nanotechnology).
36. Shah R, Eldridge D, Palombo E, Harding I. Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability. Springer Briefs in Pharmaceutical Science & Drug Development. 2015;193.
37. Svilenov H, Tzachev C. Solid Lipid Nanoparticles: a promising drug delivery system. 2013:187-237.
38. Chen Y, Jin R, Zhou Y, Zeng J, Zhang H, Feng Q. Preparation of solid lipid nanoparticles loaded with Xionggui powder-supercritical carbon dioxide fluid extraction and their evaluation in vitro release. *China J Chin Mater Med.* 2006;31(5):376-379.
39. Hunter H. Electrokinetics of particles. Hubbard, A (Ed), Encyclopedia of Surface and Colloid Science. 2002;1907-1919.
40. Shafiq S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ahmad FJ, Khar RK, Ali M. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007;66(2):227-243.
41. Schoenitz M, Joseph S, Nitz A, et al. Controlled polymorphic transformation of continuously crystallized solid lipid nanoparticles in a microstructured device: a feasibility study. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;86(3):324-331.
42. Triplett MD, Rathman JF. Optimization of β -carotene loaded solid lipid nanoparticles preparation using a high shear homogenization technique. *J Nanoparticle Res.* 2009;11(3):601-614.
43. Müller RH, Mehnert W, Lucks J, Schwarz C, Zur Muhlen A, Weyhers H, et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) - An alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *European J Pharm Biopharm.* 1995;41(1):62-96.
44. Li J, Guo X, Liu Z, Okeke CI, et al. Preparation and evaluation of charged solid lipid nanoparticles of tetrandrine for ocular drug delivery system: pharmacokinetics, cytotoxicity and cellular uptake studies. *Drug Dev Ind Pharm.* 2014;40(7):980-987.
45. Ye J, Wang Q, Zhou X, Zhang N. Injectable actarit-loaded solid lipid nanoparticles as passive targeting therapeutic agents for rheumatoid arthritis. *Int J Pharm.* 2008;352(1):273-279.
46. Yazan Y. Solid lipid nanoparticles for drug delivery. Ravikumar MNV (Ed), Handbook of Particulate Drug Delivery. 2008;1:1245-1265.
47. Manjunath K, Venkateswarlu V. Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration. *J Control Release.* 2005;107(2):215-228.
48. Manjunath K, Reddy JS, Venkateswarlu V. Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2005;27(2):127-144.
49. Waghmare A, Grampurohit N, Gadhave M, et al. Solid lipid nanoparticles: a promising drug delivery system. *Int Res J Pharm.* 2012;3(4):100-107.
50. Kaithwas V, Dora CP, Kushwah V, Jain S. Nanostructured lipid carriers of olmesartan medoxomil with enhanced oral bioavailability. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017;154:10-20.
51. McClements DJ. Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review. *Adv Colloid Interface Sci.* 2018;253:1-22.
52. Ansari MJ, Anwer MK, Jamil S, Al-Shdefat R, et al. Enhanced oral bioavailability of insulin-loaded solid lipid nanoparticles: pharmacokinetic bioavailability of insulin-loaded solid lipid nanoparticles in diabetic rats. *Drug Deliv.* 2016;23(6):1972-1979.

53. Gómez-Aguado I, Rodríguez-Castejón J, Vicente-Pascual M, Rodríguez-Gascón A, Solinís MÁ, del Pozo-Rodríguez A. Nanomedicines to Deliver mRNA: State of the Art and Future Perspectives. *Nanomaterials*. 2020;10(2).
54. Del Pozo Rodriguez A, Rodríguez Gascón A, Solinís Aspiazu MÁ. *Terapia génica*. 1.^a ed. Síntesis; 2018. 320 p.
55. Vicente-Pascual M, Albano A, Solinís MÁ, Serpe L, Rodríguez-Gascón A, Foglietta F, et al. Gene delivery in the cornea: in vitro & ex vivo evaluation of solid lipid nanoparticle-based vectors. *Nanomed*. 2018;13(15):1847-1854.
56. Robinson E, MacDonald KD, Slaughter K, McKinney M, Patel S, Sun C, et al. Lipid Nanoparticle-Delivered Chemically Modified mRNA Restores Chloride Secretion in Cystic Fibrosis. *Mol Ther*. 2018;26(8):2034-2046.
57. Alnylam Pharmaceuticals. Expanded Access Protocol of Patisiran for Patients With Hereditary Transthyretin-Mediated Amyloidosis (hATTR Amyloidosis) With Polyneuropathy [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2020 may [citado 19 May 2020]. Report No.: NCT02939820. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02939820>
58. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). Phase I, Open-Label, Dose-Ranging Study of the Safety and Immunogenicity of 2019-nCoV Vaccine (mRNA-1273) in Healthy Adults [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2020 abr [citado 19 May 2020]. Report No.:NCT04283461. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04283461>
59. Reichmuth AM, Oberli MA, Jaklenec A, Langer R, Blankschtein D. mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Ther Deliv*. 2016;7(5):319-334.
60. Pardi N, Serezo AJ, Shan X, Debonera F, Glover J, Yi Y, et al. Administration of nucleoside-modified mRNA encoding broadly neutralizing antibody protects humanized mice from HIV-1 challenge. *Nat Commun*. 2017;8(1):14630.
61. DeRosa F, Smith L, Shen Y, Huang Y, Pan J, Xie H, et al. Improved Efficacy in a Fabry Disease Model Using a Systemic mRNA Liver Depot System as Compared to Enzyme Replacement Therapy. *Mol Ther*. 2019;27(4):878-889.
62. Khezri K, Saeedi M, Maleki Dizaj S. Application of nanoparticles in percutaneous delivery of active ingredients in cosmetic preparations. *Biomed Pharmacother*. 2018;106:1499-1505.
63. Naseri N, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. *Adv Pharm Bull*. 2015;5(3):305-313.
64. Pardeike J, Schwabe K, Müller RH. Influence of nanostructured lipid carriers (NLC) on the physical properties of the Cutanova Nanorepair Q10 cream and the in vivo skin hydration effect. *Int J Pharm*. 2010;396(1):166-173.
65. Chen S, Liu W, Wan J, Cheng X, Gu C, Zhou H, et al. Preparation of Coenzyme Q10 nanostructured lipid carriers for epidermal targeting with high-pressure microfluidics technique. *Drug Dev Ind Pharm*. 2013;39(1):20-28.
66. Carbone C, Cupri S, Leonardi A, Puglisi G, Pignatello R. Lipid-based nanocarriers for drug delivery and targeting: a patent survey of methods of production and characterization. *Pharm Pat Anal*. 2013;2(5):665-677.
67. Sanad RA, AbdelMalak NS, elBayoomy TS, Badawi AA. Formulation of a Novel Oxybenzone-Loaded Nanostructured Lipid Carriers (NLCs). *AAPS PharmSciTech*. 2010;11(4):1684-1694.
68. Sun M, Nie S, Pan X, Zhang R, Fan Z, Wang S. Quercetin-nanostructured lipid carriers: characteristics and anti-breast cancer activities in vitro. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;113:15-24.