



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Desarrollo de sistemas nanoestructurados de poliésteres de licochalcona a funcionalizados con péptidos para el tratamiento de enfermedades oculares

Ruth Milagros Galindo Camacho



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA
ALIMENTACIÓN

**DESARROLLO DE SISTEMAS
NANOESTRUCTURADOS DE POLIÉSTERES DE
LICOCHALCONA A FUNCIONALIZADOS CON
PÉPTIDOS PARA EL TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES OCULARES**

**RUTH MILAGROS GALINDO CAMACHO
2023**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

PROGRAMA DE DOCTORADO

INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y CONTROL DE MEDICAMENTOS

**DESARROLLO DE SISTEMAS NANOESTRUCTURADOS DE
POLIÉSTERES DE LICOCHALCONA A FUNCIONALIZADOS
CON PÉPTIDOS PARA EL TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES OCULARES**

Memoria presentada por **Ruth Milagros Galindo Camacho** para optar
al título de doctor por la Universidad de Barcelona

Dra. María Luisa García López
Directora

Dr. Antoni Camins Espuny
Director

M.Sc. Ruth Milagros Galindo Camacho
Doctoranda

Dra. María Luisa García López
Tutora

Ruth Milagros Galindo Camacho, 2023

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, y Fisicoquímica, y en el Departamento de Farmacología, Toxicología y Química Terapéutica de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Barcelona, y ha sido financiado por:

GENERALITAT DE CATALUNYA

Beca de Doctorado FI-DGR EMC/2199/2017 (DOGC-7459-2017)



BANCO SANTANDER

Becas Santander Investigación: CONVOCATÒRIA D'ESTADES
2022 PER A DOCTORANDS DE LA UB



A mis padres y familia, por ser mis incondicionales, por
su apoyo y cariño infinito.

*“Tu reputación es más importante que tu nómina, y tu
integridad es más valiosa que tu carrera”.*

Ryan Freitas

AGRADECIMIENTOS

De niña, solía jugar con mis primos y hermanos a «inventar» cosas, y las razones eran diversas, desde pequeñas formas de preparar helados de sabores y colores «raros», hasta «formular» mezclas de cremas para «curar» nuestros rasguños ocasionados por las caídas de la bicicleta. Por ello, esta tesis doctoral, es dedicada a aquella niña con curiosidad increíble y constancia inquebrantable para alcanzar sus sueños, sobre todo aquellos que iniciaron como un juego, ¡lo logramos!

Aún recuerdo aquel día en que llegué a los laboratorios del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, y Fisicoquímica de la Universidad de Barcelona, para realizar mi primer trabajo de fin de máster y, años más tarde y con otro propósito, estoy aquí, en el día de cerrar este capítulo maravilloso del «viaje de mi vida». Este trabajo, si bien ha requerido del esfuerzo y dedicación de la autora y sus directores, sin duda, no hubiese sido posible sin el soporte de todas aquellas personas que a continuación se agradecerá, muchas de ellas «compañeras/os de viaje» en momentos cruciales de esta historia:

Agradezco hoy y siempre a mi familia entera, en especial a mis padres Olga y Juan, por ser mis mejores guías de vida y por procurar mi bienestar; gracias mami por ser una mujer admirable, por tu apoyo vital a mis sueños, por todo tu amor y por (casi) enseñarme a volar. A Nelson, por sus consejos, apoyo y ejemplo de esfuerzo y sacrificio. A mis hermanos Christopher, Renato y José, por confiar en mí, hacerme feliz e impulsar mi superación. A mis tíos Maruja, Elsa, Flor y Glicerio, por ser verdaderos ejemplos de sabiduría y tratarme siempre con mucho cariño, el cual aún me siguen demostrando. A Yovi, por estar pendiente de

AGRADECIMIENTOS

mí, por tus consejos reconfortantes y por animarme a continuar. A Fabi, por las llamadas y mensajes que me hicieron sentir acompañada. A mis primos: Pamela, por tu complicidad, alegría y comprensión, con el espléndido recuerdo de nuestra infancia; Elsa, José, Lurdes y Rocío, por enseñarme que todo es posible en esta vida si te lo propones. A mis abuelitos, por demostrarme que el amor es la fuerza más grande que existe. También a mi querida Laila Tamiko, ver tus fotos y vídeos siempre me han animado. Gracias familia, sin Uds. no lo hubiera logrado y, por tanto, este trabajo es también el suyo.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las piezas clave de este trabajo, mis directores de tesis, Dra. María Luisa García y Dr. Antoni Camins, por la paciencia y tesón para encaminar este proyecto, además de su guía experta y compromiso. Marisa, gracias por tu amistad, por demostrarme que puedo contar contigo siempre, por cada consejo y por ser mi confidente; si aún continúo aquí es por ti y lo sabes, gracias por animarme siempre y no soltarme de la mano desde que llegué a la Universidad de Barcelona. Toni, muchas gracias por tu alegría y buena predisposición, preocupándote siempre por todo lo que necesitara, por tu apoyo y orientaciones con las que has sabido direccionar y hacer posible este trabajo.

Un agradecimiento especial al equipo de la unidad de Síntesis y Aplicaciones Biomédicas de Péptidos del IQAC-CSIC, donde invertí la mayor parte de mi tiempo de investigación. A la Dra. Isabel Haro, muchas gracias Isabel, por poner todos los recursos a mi disposición, por confiar en mí y compartir tu valioso conocimiento y apoyo en lo

AGRADECIMIENTOS

profesional, pero sobre todo en lo personal; siempre un café (o mejor un té) nos iba fenomenal. A la Dra. María José Gómara, muchas gracias M^a José por todo tu tiempo y apoyo, aunque ello involucrara invertir más horas de las planificadas, convirtiéndonos en verdaderas expertas en mantenimiento del HPLC (me sale una sonrisa cada vez que lo recuerdo); ¡me alegra haber aprendido de personas tan íntegras como Uds. dos! A mi compañera de aventuras científicas (y cafés matutinos) Cristina, gracias por todo el soporte, pero aún más por tus consejos y complicidad; ya sabes que nos queda conquistar el mundo y regresar al laboratorio a preparar un café turco como se debe y como solo lo saben hacer las investigadoras. A Mayra, aquí compartimos mucho tiempo investigando, y aún más fuera del laboratorio, gracias por tu paciencia, charlas, intentos fallidos de caminatas, nuestros viajes realizados y los que aún nos quedan. Finalmente, gracias a todos los estudiantes de grado y máster con los que logré coincidir en el laboratorio de USiBAP, fue un verdadero placer intercambiar conocimientos.

En el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, y Fisicoquímica, y en el Departamento de Farmacología, Toxicología y Química Terapéutica de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Barcelona, quiero agradecer a todo el personal docente y administrativo (no comienzo a nombrar por no dejarme a alguno fuera), ya que dentro de los ámbitos que a cada uno compete, me han colaborado de la mejor manera y siempre con una sonrisa. A la Dra. Marta Espina, muchas gracias por tu tiempo, bondad, apoyo, amistad y valiosos consejos desde que vine a cursar el primer

AGRADECIMIENTOS

máster, y por ser un ejemplo que debemos seguir ¡eres una persona genial Marta! A Elena, por compartir todos tus conocimientos y estar siempre atenta a cooperar. A Miren, por tu ayuda orientándome al inicio de mis investigaciones. A Cristina, gracias por tu apoyo en todas las consultas técnicas y por el intercambio de conocimientos viajeros. A todos los compañeros de fisicoquímica, especialmente a los que continúan en el laboratorio de nanopartículas, los animo a persistir y compartir sus conocimientos, ¡lo están haciendo muy bien!, y a todos con los que logré coincidir en algún momento, muchos de ellos ahora doctores, mil gracias, siempre aprendemos un poco de todos.

Da mesma forma, os meus mais sinceros agradecimentos à Dra. Eliana B. Souto, pela oportunidade de passar a minha estada na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. A Eliana, é uma profissional maravilhosa e uma pessoa boa, obrigada pelo aconchego do grupo e pela sua forma de trabalhar que me levou a dobrar o tempo de minha estada com muita satisfação. À Dra. Amélia Silva, pelos ensinamentos e orientação nas minhas dúvidas. Agradeço também à equipa com quem tive o prazer de trabalhar: Cristina B., adorei conhecerte, saborear os nossos Pastéis de Nata e bacalhau em todas as suas formas possíveis, os nossos passeios intermináveis para conhecer a cidade e descobrir que o pôr-do-sol no Porto é especial. Raquel da A., muito obrigada pela ajuda e por me mostrares a tua cidade, cultura e gastronomia. Joel F., obrigada pela disposição e apoio com todo o material necessário. Letícia S., obrigada amiga pela alegria, incentivo e por me receberes de bom humor. Filipa S. e Marta G., são ótimas. No geral, agradeço a todo o Departamento de Tecnologia Farmacêutica da

AGRADECIMIENTOS

Universidade do Porto. Menção especial para as minhas amigas Emília e Esther, vocês são muito queridas.

Agradecer también a la Dra. Haydeé Chávez, por ser mi mentora y ser una de las profesionales que más cree en mí desde mis estudios de pregrado en mi alma máter. A los Dres. Aura Molina, Doris Laos, Jorge García, Juan Palomino, Rocío Bendezú, Eliades Yarasca, Felipe Surco, Manuel Valle, Carmela Ferreyra, Ernesto Torres, Rosario Ramos, Juan Guillermo, Marianella Salinas, Juan Tantaleán, (la lista sería interminable), por ser profesionales probos que ayudaron a construir los conocimientos que sigo desarrollando. A la Asociación Científica de Investigación Farmacéutica (ACIF), a la cual tengo el orgullo de pertenecer ¡son una excelente familia!, gracias por recordarme siempre que no hay nada más satisfactorio que obtener logros, distinción y ser premiado por meritocracia verdadera, y que «lo esencial es invisible a los ojos» (Antoine de Saint-Exupéry).

De igual manera, agradezco a los amigos/familia que me regaló Barcelona. A Marisa Heras, gracias por hacerme sentir en casa con todos tus cuidados, detalles y complicidad, ¿qué haría sin tu paella, los vermutos y nuestras horas del café? A Nihan, sin tu apoyo personal todo hubiese sido más complicado; gracias por tu amabilidad y preocupación, pero sobre todo, por tu amistad verdadera. A Evelio, gracias por tus atenciones y ayuda en momentos oportunos. A Dani y toda su familia, gracias por todo el soporte y acompañarme cuando los necesité.

AGRADECIMIENTOS

També vull agrair a la Marta Niñerola, per donar-me l'oportunitat de créixer com a professional, però sobretot com a persona, posant en pràctica encara més l'empatia. Martita ets un veritable exemple de resiliència i sobretot d'equilibri entre el bon humor i la professionalitat, moltes gràcies de debò (i a la «mongeteta»). Eva, gràcies per les teves abraçades (i «enrampades») i carisma cada dia, ja m'arrijaré els cabells per competir amb tu! Anna i Gisela sempre recordaré vostre suport, paciència, però sobretot les bromes i les celebracions (careta feliç). Totes formeu un equip meravellós, i encara que va aparèixer en la última etapa d'aquest camí, el suport que m'heu donat és impressionant per poder arribar a la meva meta, us estimo noies. ¡¡¡Canvi i fora pam pam!!!

Muchas gracias a mis amigos de toda la vida: a mis chicas lindas Giuliana, Jenny y Olga, me han sacado una sonrisa con cada ocurrencia, reuniones virtuales y visitas. To Marlon, thank you my friend for your words of encouragement, for always being by my side, and for the thousands of adventurous trips and challenges we have overcome together.

Finalmente, mi gratitud a todos los que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, y que no he mencionado, pero que saben que agradezco de todo corazón su apoyo, cariño, comprensión y amistad.

ÍNDICE

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN / ABSTRACT	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ADMINISTRACIÓN OCULAR DE FÁRMACOS	3
1.1.1. Anatomofisiología ocular	3
1.1.2. Penetración ocular.....	12
1.2. INFLAMACIÓN EN EL SEGMENTO ANTERIOR DEL OJO.....	19
1.3. LICOCHALCONA A.....	27
1.4. SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA DE FÁRMACOS.....	36
1.4.1. Nanopartículas poliméricas en tratamientos oculares	37
1.4.2. Nanopartículas de PLGA.....	41
1.5. FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NPs CON PÉPTIDOS	
PENETRANTES DE CÉLULAS.....	46
1.6. GELES DE FORMACIÓN IN SITU.....	55
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	65
2.1. HYPOTHESIS.....	67
2.2. OBJECTIVES.....	68
3. RESULTADOS.....	71
3.1. Development of peptide targeted PLGA-PEGylated nanoparticles	
loading Licochalcone-A for ocular inflammation	75

	Pág.
<i>3.2. Cell penetrating peptides-functionalized Licochalcone-A-loaded PLGA nanoparticles for ocular inflammatory diseases: Evaluation of in vitro anti-proliferative effects, stabilization by freeze-drying and characterization of an in-situ forming gel</i>	97
4. DISCUSIÓN	111
<i>4.1. DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y FUNCIONALIZACIÓN DE NPs DE LICO-A</i>	113
<i>4.2. SEGURIDAD Y EFICACIA TERAPÉUTICA DE LAS NPs DE LICO-A</i>	120
<i>4.3. INCORPORACIÓN DE LAS NPs DE LICO-A EN GELES DE FORMACIÓN IN SITU</i>	126
5. CONCLUSIONES	131
6. REFERENCIAS	137

ÍNDICE DE TABLAS DE LA INTRODUCCIÓN

	Pág.
Tabla 1. Clasificación científica de <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.....	32
Tabla 2. Nombre IUPAC, fórmula química y peso molecular de Lico-A.....	33
Tabla 3. Aminoácidos utilizados en la síntesis de los CPPs Tet-1 y B6.....	50
Tabla 4. Geles de formación <i>in situ</i> cargados con nanoportadores.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS DE LA INTRODUCCIÓN

	Pág.
Figura 1. Estructura y segmentos del globo ocular.....	12
Figura 2. Estructura de la película lagrimal.....	15
Figura 3. Rutas oculares de absorción y eliminación de fármacos.....	18
Figura 4. Derivados del ácido araquidónico en la cascada de la inflamación...	20
Figura 5. Signos de uveítis anterior.....	22
Figura 6. Estructura química de las chalconas.....	31
Figura 7. Estructura química del producto natural Licochalcona A.....	34
Figura 8. Representación esquemática de los nanotransportadores clásicos.....	36
Figura 9. Nanopartículas poliméricas.....	40
Figura 10. Síntesis e hidrólisis del ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA)	44
Figura 11. Estructura química de los CPPs Tet-1 y B6.....	53
Figura 12. Polímeros utilizados para la obtención de NPs funcionalizadas con CPPs: (A) B6 y (B) Tet-1	54
Figura 13. Estrategias de administración ocular tópica	59

ABREVIATURAS

Abreviaturas	
AA	Aminoácido
Caco-2	Línea celular de adenocarcinoma de colon humano
CAM	Membrana corioalantoidea
COX	Ciclooxigenasa
CPPs	Péptidos penetrantes de células
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
DoE	Diseño de experimentos
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
EDC	<i>N</i> -(3-Dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida) hidrocloreuro
EE	Eficiencia de encapsulación
ESI-MS	Espectrometría de masas de ionización por electrospray
FBS	Suero bovino fetal
FDA	Food and drug administration
Fmoc	9- fluorenilmetoxicarbonil
HATU	2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato
¹ H-NMR	Resonancia magnética nuclear de protones
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución

ABREVIATURAS

Abreviaturas	
ISFG	Geles de formación <i>in situ</i>
Lico-A	Licochalcona A
LT	Leucotrieno
MC	Metilcelulosa
NHS	<i>N</i> -Hydroxisuccinimida
NPs	Nanopartículas
OII	Índice de irritación ocular
PCS	Espectroscopia de correlación fotónica
PEG	Polietilenglicol
PEO	Polioxietileno
PF127	Pluronic [®] F-127 (Poloxámero 407)
PI	Índice de polidispersión
PLGA	Ácido poli láctico- <i>co</i> -glicólico
PPO	Polioxipropileno
RAW 264.7	Línea celular tumoral inducida por el virus de la leucemia murina de Abelson
RMN	Resonancia magnética nuclear
SA	Araquidonato de sodio
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TFA	Ácido trifluoroacético
TIS	Triisopropilsilano
TX	Tromboxano
Z _{av}	Tamaño promedio de partícula
Z _{pot}	Potencial zeta

RESUMEN / ABSTRACT

RESUMEN

La inflamación, presente en diferentes enfermedades del globo ocular (escleritis, queratitis, uveítis, retinitis o neuritis óptica) y sus anexos (conjuntivitis, blefaritis o inflamación orbitaria), constituye la respuesta local de los tejidos frente a una agresión de diversa etiología, como mecanismo de defensa para aislar y destruir al agente desencadenante y reparar la lesión. La prevalencia de la inflamación en oftalmología es elevada, pudiendo afectar exclusivamente a las estructuras oculares o bien formar parte de una enfermedad sistémica. Los pacientes con inflamación ocular suelen presentar enrojecimiento, dolor, lagrimeo, picor y alteraciones de la agudeza visual, que en casos extremos pueden producir ceguera.

La biodisponibilidad de las formulaciones oftálmicas clásicas para tratar estas afecciones es generalmente baja debido a la rápida eliminación precorneal, y se estima que solo un porcentaje inferior al 5 % de la dosis instilada es capaz de acceder a los tejidos intraoculares para ejercer su acción. Teniendo en cuenta la elevada prevalencia de estas enfermedades, la baja retención de la concentración óptima de fármaco en el lugar de acción y el tratamiento prolongado que requieren, el desarrollo de nuevas estrategias para el abordaje terapéutico resulta necesario. La incorporación de fármacos en nanopartículas incrementa el tiempo de contacto con la córnea, favoreciendo la biodisponibilidad ocular y la liberación prolongada del activo, lo que permite espaciar la frecuencia de administración, mejorando así la adherencia del paciente

al tratamiento y reducir los efectos adversos, constituyendo una alternativa terapéutica eficaz para el tratamiento de estas enfermedades.

Por este motivo, el principal objetivo de este trabajo se centró en el desarrollo y caracterización biofarmacéutica y toxicológica de nanopartículas (NPs) poliméricas biodegradables de PLGA, conteniendo Licochalcona A (Lico-A), compuesto fenólico extraído de la raíz de *Glycyrrhiza glabra* L., con propiedades antiinflamatorias, funcionalizadas con los péptidos penetrantes de células (CPPs) Tet-1 y B6, evaluando su eficacia terapéutica en el tratamiento de enfermedades inflamatorias oculares. Para prolongar su estabilidad durante el almacenamiento, las nanopartículas obtenidas se liofilizaron. Además, se incorporaron en geles de formación *in situ*, con capacidad de transformarse en formas semisólidas en contacto con la superficie ocular, que presentaron características viscoelásticas, mecánicas y mucoadhesivas idóneas para su distribución uniforme sobre la superficie conjuntival.

La metodología utilizada en la preparación (método de desplazamiento del solvente), caracterización y funcionalización de las nanopartículas desarrolladas fue la adecuada, teniendo en cuenta las características fisicoquímicas del fármaco incorporado en la matriz polimérica. Los métodos para la determinación del comportamiento biofarmacéutico y los estudios de estabilidad fueron los más utilizados en este campo. Las NPs de Lico-A PLGA, optimizadas por diseño de experimentos, presentaron forma esférica, superficie lisa, tamaño promedio inferior a 170 nm ($163,81 \text{ nm} \pm 2,29$), con una distribución homogénea de partícula (valores de PI de $0,075 \pm 0,010$, correspondien-

tes a sistemas monodispersos), carga superficial negativa (Z_{pot} de $-24 \text{ mV} \pm 1,4$) y una eficiencia de encapsulación (EE) superior al 50 % ($56,26 \% \pm 0,16$), siendo más estables las almacenadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Las NPs funcionalizadas con los CPPs Tet-1 y B6 presentaron menor tamaño promedio ($128,65 \text{ nm} \pm 7,53$ y $114,24 \text{ nm} \pm 2,42$, respectivamente), con un ligero incremento del PI, y carga superficial positiva, manteniéndose la EE en valores superiores al 50 % en las NPs funcionalizadas con Tet-1.

Tanto los ensayos *in vitro* de citotoxicidad en modelos celulares (Caco-2 y RAW 264.7) como los de tolerancia ocular (HET-CAM[®]) e *in vivo* en conejos albinos New Zealand (test de Draize), así como los ensayos de eficacia terapéutica (en modelo de inflamación ocular), fueron idóneos. Todos estos estudios demostraron que los sistemas desarrollados disminuyeron la inflamación ocular, en mayor grado las NPs de Lico-A PLGA funcionalizadas con el CPP B6 en comparación con las otras formulaciones desarrolladas. Asimismo, los ensayos celulares revelaron que la encapsulación de Lico-A en NPs incrementó la actividad antiinflamatoria y redujo la citotoxicidad inherente.

En conclusión, todos los resultados obtenidos, sugieren que las NPs de Lico-A PLGA funcionalizadas con CPPs y los geles termosensibles desarrollados, podrían constituir, tras el desarrollo clínico adecuado, una nueva herramienta terapéutica en la prevención y tratamiento de procesos inflamatorios oculares.

ABSTRACT

Inflammation, present in different diseases of the eyeball (scleritis, keratitis, uveitis, retinitis, or optic neuritis) and its annexes, (conjunctivitis, blepharitis, or orbital inflammation), constitutes the local response of the tissues against an attack of diverse etiology, as a defense mechanism to isolate and destroy the triggering agent and repair the injury. The prevalence of inflammation in ophthalmology is high, and it may exclusively affect the ocular structures or form part of a systemic disease. Patients with ocular inflammation usually present redness, pain, tearing, itching and changes in visual acuity, which in extreme cases can cause blindness.

The bioavailability of classical ophthalmic formulations to treat these conditions is generally low due to rapid precorneal elimination, and it is estimated that only less than 5 % of the instilled dose is able to access intraocular tissues to exert its action. Considering the high prevalence of these diseases, the low retention of the optimal drug concentration at the site of action, and the prolonged treatment that they require, the development of new strategies for the therapeutic approach is necessary. The incorporation of drugs in nanoparticles increases the contact time with the cornea, favoring ocular bioavailability and prolonged release of the active, which allows spacing the frequency of administration, thus improving patient adherence to treatment, and reducing adverse effects, constituting an effective therapeutic alternative for the treatment of these diseases.

For this reason, the main objective of this work was focused on the development and biopharmaceutical and toxicological characterization of biodegradable polymeric PLGA nanoparticles (NPs), containing Licochalcone A (Lico-A), a phenolic compound extracted from the root of *Glycyrrhiza glabra* L., with anti-inflammatory properties, functionalized with the cell penetrating peptides (CPPs) Tet-1 and B6, evaluating its therapeutic efficacy in the treatment of ocular inflammatory diseases. In order to prolong their stability during storage, the obtained nanoparticles were freeze-dried. In addition, they were incorporated into *in-situ* forming gels, capable of transforming into semisolid forms in contact with the ocular surface, which presented ideal viscoelastic, mechanical, and mucoadhesive characteristics for their uniform distribution on the conjunctival surface.

The methodology used in the preparation (solvent displacement method), characterization, and functionalization of the developed nanoparticles was adequate, taking into account the physicochemical characteristics of the drug incorporated into the polymeric matrix. The methods for the determination of biopharmaceutical behavior and stability studies were the most used in this field. The Lico-A PLGA NPs, optimized by design of experiments, presented spherical shape, smooth surface, average size less than 170 nm ($163.81 \text{ nm} \pm 2.29$), with a homogeneous particle distribution (PI values of 0.075 ± 0.010 , corresponding to monodisperse systems), negative surface charge (Z_{pot} of $-24 \text{ mV} \pm 1.4$) and an encapsulation efficiency (EE) greater than 50 % ($56.26 \% \pm 0.16$), being more stable those stored at 4 °C. The NPs functionalized with the CPPs Tet-1 and B6 presented a smaller average size ($128.65 \text{ nm} \pm 7.53$ and $114.24 \text{ nm} \pm 2.42$, respectively), with a slight

increase in PI, and positive surface charge, remaining EE in values higher than 50 % in NPs functionalized with Tet-1.

Both *in vitro* cytotoxicity assays in cell models (Caco-2 and RAW 264.7) and ocular tolerance (HET-CAM®) and *in vivo* assays in New Zealand albino rabbits (Draize test), as well as therapeutic efficacy assays (in ocular inflammation model) were suitable. All these studies demonstrated that the systems developed decreased ocular inflammation, to a greater degree Lico-A PLGA NPs functionalized with the CPP B6 compared to the other formulations developed. Furthermore, cell assays revealed that the encapsulation of Lico-A in NPs increased anti-inflammatory activity and reduced inherent cytotoxicity.

In conclusion, all the results obtained suggest that the Lico-A PLGA NPs functionalized with CPPs, and the thermosensitive gels developed, could constitute, after adequate clinical development, a new therapeutic tool in the prevention and treatment of ocular inflammatory processes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ADMINISTRACIÓN OCULAR DE FÁRMACOS

1.1.1. Anatomofisiología ocular

El ojo, es una estructura delicada y compleja que constituye uno de los órganos sensoriales más importantes del cuerpo humano, ya que prácticamente el 80 % de los estímulos sensoriales que percibimos nos llegan a través de la vista. Se trata de un órgano par y simétrico, alojado en las órbitas (cavidades óseas de la parte anterior del cráneo). El globo ocular tiene una forma esférica pero algo aplanada en sentido vertical con un diámetro que en el adulto alcanza alrededor de 24,5 mm.

El ojo está compuesto por tres capas concéntricas: (i) una capa externa constituida por la córnea y esclerótica; (ii) una capa media denominada úvea, constituida por el iris, el cuerpo ciliar y la coroides; y (iii) la capa interna que corresponde a la retina, la membrana sensible sobre la cual se proyectan los rayos luminosos. Estas estructuras trabajan juntas para recibir luz reflejada de los objetos, la convierten en impulsos eléctricos y los envían al cerebro para procesar la información, de esta manera, permiten que el cerebro interprete los estímulos visuales del entorno (**Figura 1**).

La *córnea* es una estructura transparente, convexa y avascular que forma la cara anterior de la capa externa del ojo, con función óptica (estructura de mayor capacidad refractiva ocular) y protectora. Está situada por delante del iris y la pupila, que ayuda a enfocar la luz hacia el interior del ojo. Se continúa con la esclerótica opaca, el otro componente de la capa externa. La zona de transición, donde la córnea

1. INTRODUCCIÓN

se convierte en esclerótica, se conoce como limbo esclerocorneal, que es una zona muy vascularizada.

La córnea humana está compuesta por varias capas y tiene una forma ligeramente ovalada. Su diámetro medio es de 12 mm, una dimensión comúnmente citada es 11,7 mm horizontalmente x 10,6 mm verticalmente, con una curvatura de 8,7 mm en su parte central (Downie, Bandlitz *et al.* 2021). Su grosor promedio es de 535 μm en el centro y aproximadamente 100 μm más espeso en la periferia (Brautaset, Nilsson *et al.* 2013). Las capas de la córnea se detallan a continuación:

- **Epitelio:** escamoso estratificado no queratinizado con un grosor de aproximadamente 50 μm y gran capacidad de regeneración y cicatrización. El epitelio corneal está compuesto a su vez de cinco a siete capas de células estrechamente unidas entre sí, que consisten en (i) células epiteliales escamosas superficiales y muy diferenciadas que presentan microvellosidades con las que anclan la película lacrimal; (ii) células epiteliales suprabasales conocidas como «aladas» por las prolongaciones similares que poseen, y (iii) una monocapa de células epiteliales basales columnares, que dan lugar a la reproducción celular o mitosis. Las células epiteliales basales se adhieren a la membrana basal epitelial, adyacente a la membrana de Browman. El epitelio tiene dos funciones: prevenir la entrada de sustancias extrañas y gérmenes, y absorber oxígeno y nutrientes y luego distribuirlos a otras partes de la córnea. El epitelio corneal limita la penetración de fármacos hidrofílicos a través de la córnea debido a su hidrofobicidad y a la presencia de proteínas de unión estrecha entre las células epiteliales de la córnea.

- **Membrana de Bowman** (lámina limitante anterior): se trata de una capa acelular de tejido transparente, situada entre el epitelio y el estroma, por debajo de la membrana basal, con un grosor aproximado de 8 μm , formada por fibrillas de colágeno distribuidas al azar. Se encarga de mantener la integridad estructural de la córnea, ya que esta membrana no solo actúa como barrera protectora frente a la entrada de cualquier agente extraño, sino que además, confiere estabilidad a la córnea y contribuye a mantener su forma. Al no tener capacidad de regeneración, cualquier lesión en la membrana de Bowman deja como resultado la aparición de una cicatriz.

- **Estroma:** es el componente mayoritario y central de aproximadamente 470 μm , representa alrededor del 90 % de la densidad de la córnea y está constituido por fibrillas de colágeno, queratocitos y sustancia fundamental. Tiene carácter hidrofílico y restringe la penetración de fármacos lipofílicos a través de la córnea. Esta capa es responsable de la transparencia de la córnea. Las fibrillas de colágeno forman un entramado de laminillas entrelazadas entre sí y dispuestas, en paralelo, a la superficie corneal, manteniendo una distribución muy regular, formando una red de tejido conectivo de aspecto ordenado (láminas corneales), gracias a la cual la córnea es transparente. Entre estas laminillas, las uniones estrechas entre los haces de fibras de colágeno, se encuentran los queratocitos, que son las células que predominan en el estroma. Son células aplanadas y con grandes prolongaciones. La integridad estructural del estroma corneal es esencial para mantener la transparencia, la refracción y la visión saludables. La enfermedad, las lesiones o el envejecimiento pueden debilitar el estroma de la córnea, dando lugar a una disminución de la transparencia y una modificación

1. INTRODUCCIÓN

de la potencia refractiva. Cuando se produce un daño en el estroma, los queratocitos se desplazan a la zona dañada para provocar la formación de colágeno y la consiguiente cicatrización. Estas cicatrices o «leucomas» pierden la transparencia y, dependiendo de su ubicación y extensión, pueden dar lugar a una disminución o pérdida de la agudeza visual más o menos importante. Las enfermedades del estroma de la córnea, que incluyen el queratocono y la degeneración estromal, en muchos casos, además del tratamiento farmacológico requieren cirugía ocular.

- **Membrana de Descemet** (lámina limitante posterior): es una capa elástica de tejido membranoso (3–20 μm) producida por el endotelio, que aumenta una micra de espesor cada 10 años. Carece de células y está formada, principalmente, por fibrillas de colágeno y proteínas, como la laminina y la fibronectina. Esta membrana es muy importante para mantener la fuerza de la córnea, permitiéndole resistir las presiones internas y externas. Actúa como una barrera protectora contra lesiones e infecciones oculares. Funciona como adhesivo de las células endoteliales de la membrana.

- **Endotelio**: está constituido por una única capa de células poligonales (3–5 μm), de forma predominantemente hexagonal, que tapizan la parte posterior de la córnea en contacto con el humor acuoso que se encuentra en la cámara anterior del ojo. Son células planas, provistas de un núcleo de gran tamaño y gran cantidad de mitocondrias, retículo endoplasmático y aparato de Golgi. El endotelio constituye una barrera semipermeable, que al ser más permeable que el epitelio, permite la penetración de macromoléculas en el humor acuoso, facilitando el paso

de nutrientes desde el humor acuoso hacia el estroma. Al mismo tiempo, contribuye a regular la hidratación corneal bombeando líquido fuera de la córnea para garantizar así su transparencia. Cuando disminuye el número de células endoteliales, ya sea por el paso de los años, traumatismos, cirugía o ciertas patologías, estas no pueden regenerarse e intentan mantener su función mediante un aumento de tamaño. Si se sobrepasa un umbral de pérdida en el que ya no pueden mantener el equilibrio hídrico de la córnea, esta acumula agua y se edematiza. El edema corneal es la primera causa de trasplante de córnea en los países desarrollados.

Se postula la existencia de una sexta capa corneal, la **membrana de Dua** (Dua, Faraj *et al.* 2013) ubicada entre el estroma y la membrana limitante posterior, aunque existe cierta controversia respecto a la aceptación de su presencia (Jester, Murphy *et al.* 2013, McKee, Irion *et al.* 2014). Se trata de una capa fuerte y resistente con un espesor de tan solo 15 μm . Está formada por placas de colágeno que se ramifican para formar el núcleo de una auténtica malla, conocida como malla trabecular, principal vía de drenaje del humor acuoso.

La córnea además de permitir la entrada de luz al ojo, protege al iris y al cristalino frente a agentes nocivos como polvo, gérmenes, etc. Esta estructura además de mantener su transparencia, resulta indispensable que mantenga una curvatura adecuada, ya que el enfoque de los objetos, tanto de lejos como de cerca, depende de esta característica.

1. INTRODUCCIÓN

La córnea constituye la segunda barrera ocular (después de la película lagrimal) que limita la penetración de sustancias exógenas en el ojo. Las capas que forman barreras sustanciales a la penetración de fármacos son el epitelio, el estroma y el endotelio. En general, la córnea actúa como una barrera física a los fármacos hidrofílicos debido a las capas epiteliales superficiales que posee, y a los fármacos lipofílicos debido al estroma.

La **esclerótica** es una membrana resistente y opaca que constituye la capa externa del globo ocular con función principalmente protectora, aunque solo es visible en la parte anterior y popularmente se conoce como el «blanco del ojo». Está recubierta externamente por una membrana mucosa transparente, la **conjuntiva**, que tapiza también la cara interna de los párpados, y protege el globo ocular, manteniendo la superficie frontal del ojo húmeda y lubricada, evitando la entrada de polvo o microorganismos, contribuyendo a nutrir el ojo y los párpados y segregando la mucina que facilita la adhesión de la película lagrimal a la superficie ocular.

La **úvea**, capa vascular del ojo, situada por detrás de la esclerótica, está constituida por tres estructuras:

- El **iris** es el disco pigmentado situado en la parte frontal del globo ocular, entre la córnea y el cristalino, y es el responsable de darle el color a los ojos. En su centro se encuentra un orificio, la pupila, cuyo grado de contracción o dilatación regula el paso de la cantidad de luz al fondo del ojo, con el objetivo de facilitar el enfoque de los objetos

en la retina. El iris tiene dos músculos que contraen (miosis) o dilatan (midriasis) la pupila.

- El **cuerpo ciliar** está formado por dos estructuras: los procesos ciliares, responsables de la producción del humor acuoso, y el músculo ciliar, responsable del cambio de forma del cristalino necesaria para lograr la correcta acomodación (enfoque).
- La **coroides** es una estructura membranosa que se encuentra en la capa media del ojo, provista de abundantes vasos sanguíneos, que proporciona nutrición a las estructuras internas del mismo.

El **cristalino**, ubicado detrás de la córnea, es un disco transparente y elástico, capaz de modificar su forma para facilitar la visión a diferentes distancias. Actúa como una lente biconvexa encargada de refractar la luz para permitir que los estímulos visuales lleguen a la retina. Además, el cristalino contribuye a ajustar la imagen enfocada en la retina, mediante la acción de pequeños músculos, llamados músculos ciliares. Cuando el ojo enfoca un objeto cercano, el cristalino incrementa su curvatura, lo que se conoce como acomodación. El cristalino es una estructura avascular (carece de terminaciones nerviosas y sanguíneas) formada por células en forma de largos prismas hexagonales, apiladas unas contra otras. La composición del cristalino es principalmente agua (60 %) que disminuye con el tiempo, iones minerales, particularmente potasio y fosfatos y un complejo de diferentes proteínas unidas. En general, la densidad y dureza del cristalino aumenta con la edad por la deshidratación y pérdida de plasticidad progresiva que

1. INTRODUCCIÓN

sufre. Por otro lado, el cristalino experimenta un cambio de coloración durante la vida adulta que genera una opacificación denominada catarata.

La **retina**, que constituye la capa más interna del globo ocular (desde su inserción anterior en la *ora serrata* hasta el nervio óptico), consta de retina neurosensorial y epitelio pigmentario de la retina (EPR). El EPR es la capa más externa de la retina, formada por células cúbicas con gránulos de melanina que le dan una pigmentación. La retina neurosensorial está formada básicamente por varias capas de neuronas interconectadas mediante sinapsis. Las células fotosensibles de la retina neurosensorial son los fotorreceptores (FR), fundamentales para el funcionamiento de la retina. En el proceso de la visión, la luz altera pigmentos visuales de los fotorreceptores que originan una respuesta eléctrica. Estos pigmentos visuales son metabolizados por los fotorreceptores y el EPR durante el ciclo visual. Los FR son de dos tipos: conos y bastones. (i) Los conos son responsables de la visión central nítida y detallada y de la visión del color y se agrupan principalmente en la mácula, que es la parte más sensible de la retina, y tiene millones de fotorreceptores de este tipo estrechamente empaquetados. (ii) Los bastones son responsables de la visión nocturna y periférica (lateral), son más numerosos que los conos y mucho más sensibles a la luz, pero no registran el color ni contribuyen a la visión central detallada a diferencia de estos. Los bastones se localizan principalmente en las zonas periféricas de la retina.

La misión de la retina es transformar los estímulos lumínicos procedentes del exterior, en un impulso nervioso que viaja hasta el cerebro a través del nervio óptico (primer par craneal), y se convierte en

las imágenes que percibimos. La luz llega a través de la córnea, cruzando la pupila y el cristalino hasta que alcanza la retina. El punto de la retina donde convergen los rayos luminosos que pasan por las lentes se conoce como fóvea.

En el ojo se diferencian dos segmentos anatómicos principales: el segmento anterior y el segmento posterior. El *segmento anterior* es una parte del globo ocular anterior al cristalino y consiste principalmente en la córnea, la conjuntiva, el iris, el cristalino, el cuerpo ciliar y la porción anterior de la esclerótica. En este segmento se localizan dos cámaras:

- Cámara anterior: limitada en su cara anterior por la córnea y en la posterior por el iris y la pupila.
- Cámara posterior: situada entre el iris y el cristalino.

Ambas cámaras están conectadas por la abertura de la pupila y llenas de humor acuoso (secretado por los procesos ciliares). El humor acuoso, que se reemplaza varias veces al día, proporciona nutrientes para el cristalino y la córnea, y mantiene la presión intraocular (Cunha-Vaz 1997).

En el *segmento posterior*, que contiene la coroides y la retina, se diferencia la cámara vítrea, situada entre el cristalino y la retina. Su interior contiene humor vítreo (gel fluido transparente compuesto mayoritariamente (99 %) por agua, y pequeñas cantidades de cloro, sodio, glucosa, potasio, ácido hialurónico y proteínas). Este fluido de consistencia gelatinosa, que representa el 80 % del volumen del ojo, tiene

1. INTRODUCCIÓN

una función protectora ya que mantiene la forma prácticamente esférica del ojo y la uniformidad de la superficie de la retina para facilitar la recepción nítida de las imágenes.

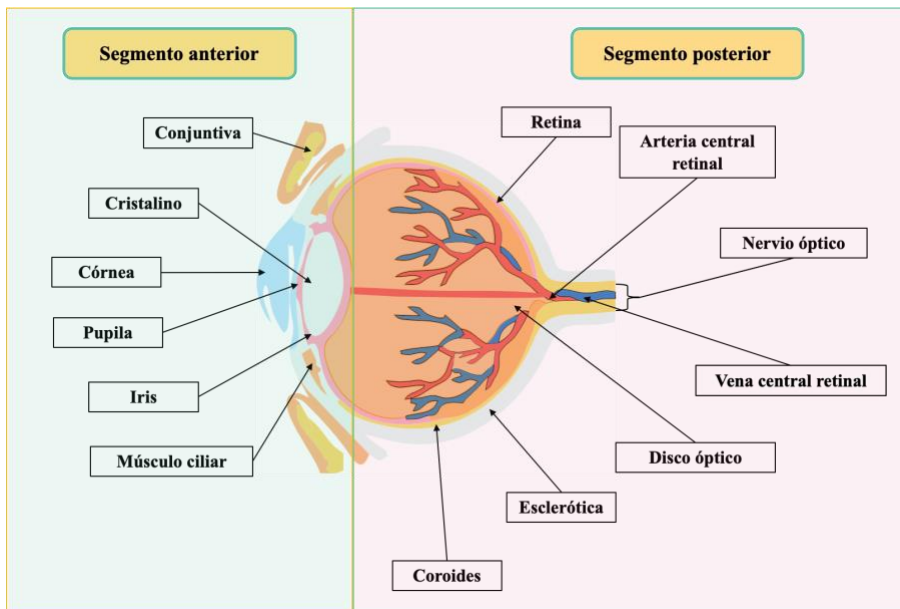


Figura 1. Estructura y segmentos del globo ocular.

1.1.2. Penetración ocular

La **superficie ocular** es la interfase entre el ojo y el entorno. Esta superficie provee protección anatómica, fisiológica e inmunológica y comprende el epitelio conjuntival palpebral y bulbar, el limbo esclerocorneal, el epitelio corneal y la película lagrimal (Holland, Mannis *et al.* 2013). La superficie ocular funciona para mantener la claridad óptica de la córnea, sirve como superficie refractiva para una proyección precisa de la luz a través de los medios oculares y proporciona protección a las estructuras del ojo contra toxinas, traumatismos

mos y microbios, cuya pérdida de su integridad puede comprometer las funciones protectoras, dando lugar a diversas formas de disfunción corneal y conjuntival.

Un tratamiento ocular eficaz implica que el fármaco alcance el lugar de acción a concentración terapéutica, manteniéndose en el tejido diana el tiempo necesario para ejercer su acción. La instilación del fármaco en la superficie ocular (vía tópica) es la vía de administración habitual, ya que es una vía cómoda que, a diferencia de la vía periocular (subconjuntival, subtenoniana y retrobulbar) o intraocular (intracameral e intravítrea), permite la administración del fármaco por el propio paciente, asegurando la máxima liberación del principio activo en el tejido afectado. Sin embargo, dado que un fármaco administrado por vía ocular debe atravesar varias barreras para ejercer su acción a nivel de la cámara anterior o posterior del ojo, solo un porcentaje inferior al 5 % de la dosis inicial del activo es capaz de atravesar la córnea y alcanzar los tejidos intraoculares, ya que la mayor parte, arrastrada por la lágrima, se absorbe sistémicamente por vía nasal. El limitado tiempo de residencia del medicamento en la superficie ocular, debido al recambio lagrimal, conduce a un aporte insuficiente de fármaco a los tejidos intraoculares.

Las diferentes barreras del ojo (corneal, hemato-acuosa y hemato-retiniana), que lo protegen de la entrada de sustancias tóxicas y mantienen el control homeostático, actúan desfavorablemente en la administración ocular de fármacos, ya que dificultan su paso a los tejidos intraoculares a concentración terapéutica eficaz, lo que conduce a una baja biodisponibilidad del fármaco en el lugar de acción.

1. INTRODUCCIÓN

La lágrima humana tiene un volumen total de alrededor de 7~30 μL (según la frecuencia de parpadeo y el volumen del saco conjuntival). Debido a la rápida tasa de renovación lagrimal (de 0,5~2,2 $\mu\text{L}/\text{min}$) y el tiempo corto de restauración (entre 2~3 min) de la película lagrimal (Worakul and Robinson 1997), las formulaciones en gotas oculares se lavan rápidamente y drenan en el conducto nasolagrimal después de la instilación, además de favorecer la unión de las moléculas del fármaco a las proteínas lagrimales.

La película lagrimal es originada por lágrimas, que aunque están compuestas en un 98,2 % de agua, el 1,8 % restante contiene solutos como electrolitos (sodio, potasio, magnesio, calcio, cloro y bicarbonato), diferentes tipos de proteínas (albúmina, inmunoglobulinas, lisozima, lactoferrina, betalisisina y prostaglandinas) y otros compuestos tales como glucosa, colesterol, vitamina A y C, y factores de crecimiento, entre otros, que son de suma importancia para promover la curación y combatir infecciones, ayudando a mantener la salud de la superficie ocular.

La **película lagrimal**, el primer obstáculo al que se enfrentan los exógenos y fármacos de administración tópica, es una fina capa líquida que cubre la córnea y la conjuntiva, es decir, se encuentra en contacto con el aire. Consta de tres capas delgadas (**Figura 2**):

- Capa lipídica: es la más externa, tiene un espesor entre 0,1 y 0,2 μm y se caracteriza por ser de naturaleza oleosa, lo que reduce la velocidad de evaporación las lágrimas, favoreciendo la humectación de la superficie del ojo y facilitando el parpadeo. Otra de sus funciones es

aumentar la tensión superficial y mantener la estabilidad de la película lagrimal.

- Capa acuosa: es la capa intermedia y de mayor espesor, formada, entre otros componentes, por sales, proteínas, glucosa y electrolitos. Su principal función es proporcionar oxígeno a la córnea y limpiarla de agentes externos. Además, esta capa posee ciertas sustancias antibacterianas, lo que protege al ojo de posibles infecciones.
- Capa mucínica o mucinosa: es la capa más fina, más interna y la más próxima a la córnea. Esta masa mucosa se produce en las células caliciformes de la conjuntiva, disminuye la fricción y cambia la polaridad del epitelio (de lipófilo a hidrófilo), favoreciendo la extensión de la capa acuosa sobre el epitelio de la córnea.

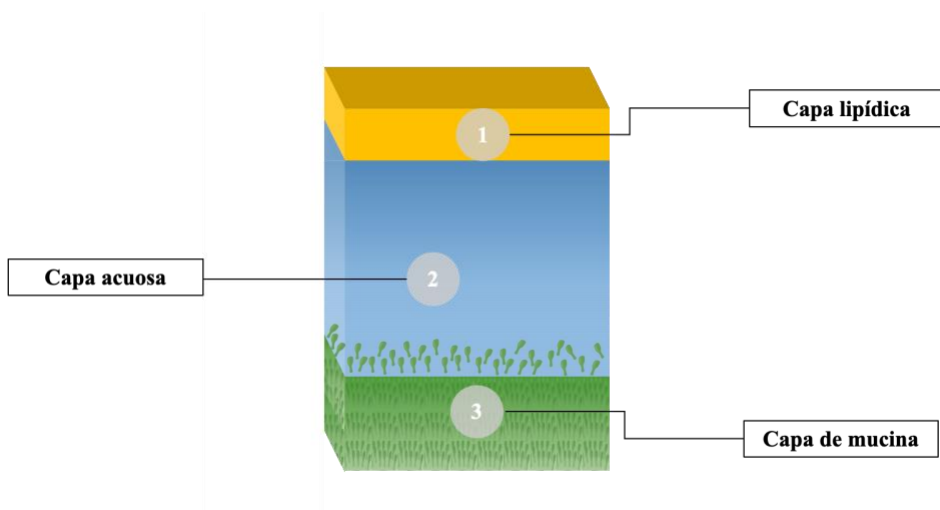


Figura 2. Estructura de la película lagrimal.

1. INTRODUCCIÓN

La *barrera corneal*, representada por el epitelio corneal, restringe la entrada de fármacos hidrosolubles en la córnea y en el humor acuoso.

La *barrera hemato-acuosa*, limita la entrada de sustancias desde la sangre al humor acuoso. El epitelio del iris y el cuerpo ciliar bombean fármacos de carácter aniónico desde el humor acuoso hacia la sangre.

La *barrera hemato-retiniana*, constituida externamente por el EPR y la membrana de Bruch, e internamente por las células endoteliales de los capilares retinianos, limita la entrada de fármacos en el ojo procedentes de la circulación sistémica. La presencia de uniones estrechas entre las células del EPR y del endotelio vascular es esencial para el control del transporte de activos y para prevenir la entrada de moléculas tóxicas y componentes del plasma en la retina.

Otros factores ejercen una acción protectora secundaria tales como: la avascularización de la córnea, que reduce prácticamente el tratamiento por vía sistémica a las alteraciones del polo posterior o la respuesta fisiológica midriática y miótica de la pupila, que puede limitar el paso del principio activo de la cámara anterior a la cámara posterior del ojo.

Los activos administrados por vía tópica se absorben a través de dos rutas: corneal o no corneal (**Figura 3**). El epitelio corneal permite el paso de activos hidrofóbicos de pequeño tamaño ($PM > 100$ Da) a través de las células epiteliales por difusión (ruta transcelular) y el de sustancias hidrofílicas entre los espacios celulares (ruta paracelular). El resto de

activos se eliminan a través de la malla trabecular por el canal de Schlemm hacia la circulación sanguínea sistémica (vía convencional), o a través del iris hacia el tejido uveoescleral y posteriormente hacia la circulación sanguínea sistémica. Una menor proporción de fármaco (de 10 – 100 veces inferiores que en el humor acuoso y córnea), alcanza la cámara posterior a través del iris mediante difusión a través del flujo de humor acuoso.

Los fármacos con baja permeabilidad corneal (elevado peso molecular) penetran en el ojo a través de la conjuntiva y/o la esclerótica (ruta conjuntival-escleral), alcanzando el humor vítreo por difusión pasiva y mecanismos de transporte activo, eliminándose a través del EPR y las células endoteliales capilares retinianas (barrera hematorretiniana) o a través de la circulación coroidea hacia el flujo sanguíneo sistémico. Esta ruta proporciona una concentración de fármaco 20 veces inferior en la cámara anterior que la ruta de absorción corneal.

1. INTRODUCCIÓN

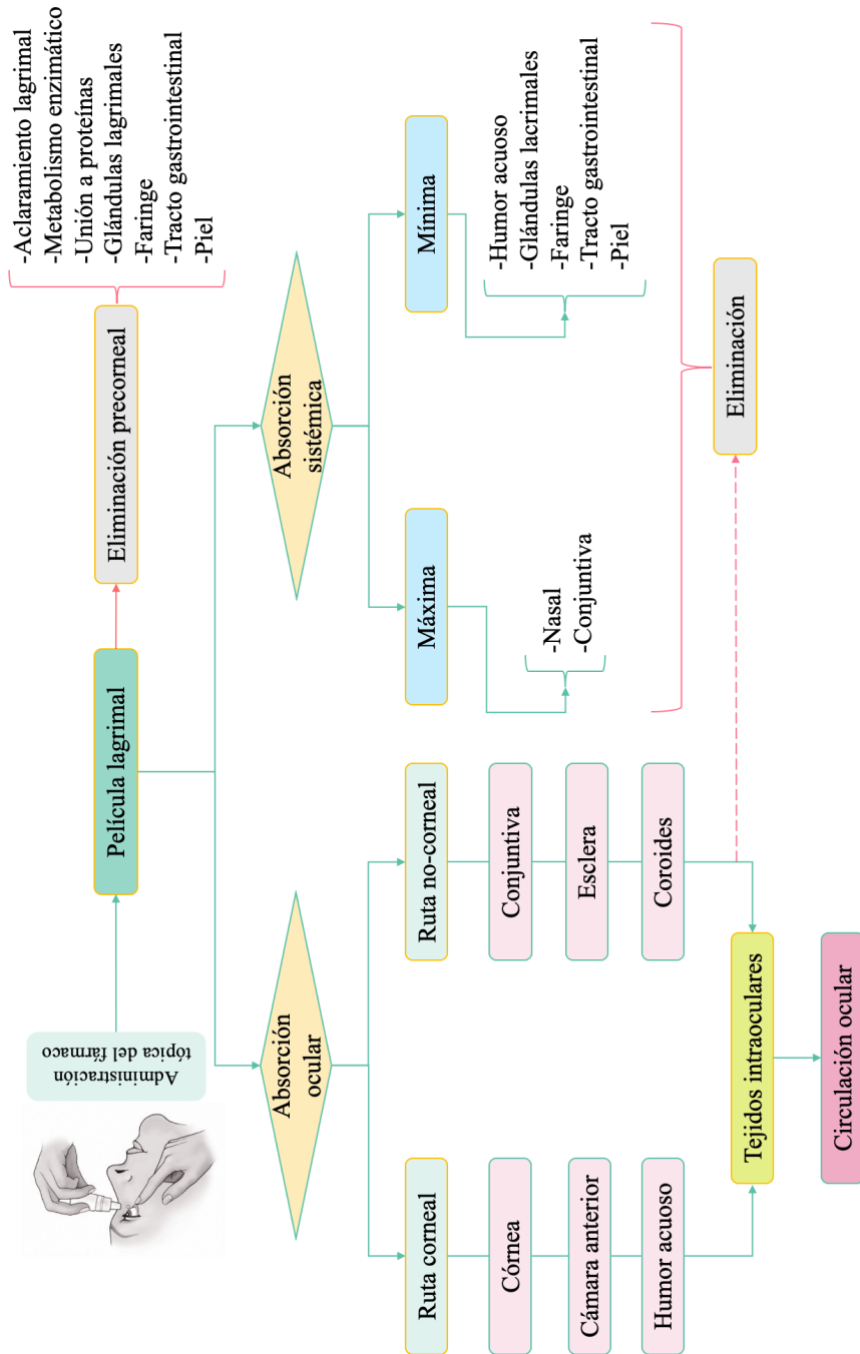


Figura 3. *Rutas oculares de absorción y eliminación de fármacos.*

1.2. INFLAMACIÓN EN EL SEGMENTO ANTERIOR DEL OJO

Los trastornos que ocurren en el segmento anterior incluyen cataratas, ojo seco, glaucoma, inflamaciones, infecciones, enfermedades hereditarias y degenerativas, anomalías congénitas y del desarrollo, tumores, lesiones, traumatismos y manifestaciones oculares de enfermedades sistémicas.

A modo general, la inflamación (**Figura 4**), indicada por los signos cardinales de enrojecimiento, hinchazón, dolor, calor y alteración de la función, es una respuesta del sistema inmune que desencadena fenómenos moleculares, celulares y vasculares con la finalidad de detectar, aislar y eliminar agresiones físicas, químicas o biológicas (finalidad defensiva). Los mastocitos, que se activan frente a una agresión, contienen en su citoplasma gránulos con mediadores de la inflamación, liberándolos junto con otros de carácter lipídico. Esta respuesta se inicia en la membrana del mastocito con activación de la adenilato-ciclasa (AC) y fosfolipasa A₂ (PLA₂). La AC incrementa la concentración de adenosín monofosfato cíclico (cAMP), mientras que la PLA₂, ataca a los lípidos de membrana produciendo ácido araquidónico, incrementando también la permeabilidad de membrana al Ca⁺⁺ (aumento de su concentración en el citoplasma). Ambos incrementos determinan la formación de microtúbulos y el movimiento de los gránulos citoplasmáticos a la membrana, produciéndose la liberación de los mediadores de la inflamación al espacio extracelular: histamina, enzimas proteolíticas (productoras de quininas), factor quimiotáctico del eosinófilo, factor quimiotáctico del neutrófilo y heparina. El ácido

1. INTRODUCCIÓN

araquidónico formado, puede seguir dos vías metabólicas, la de la enzima ciclooxigenasa que determina la producción de prostaglandinas (PG), prostaciclinas y tromboxanos (TX), y la de la lipooxigenasa que conduce a la formación de leucotrienos (LT) y lipoxinas (Nair, Thankachen *et al.* 2021).

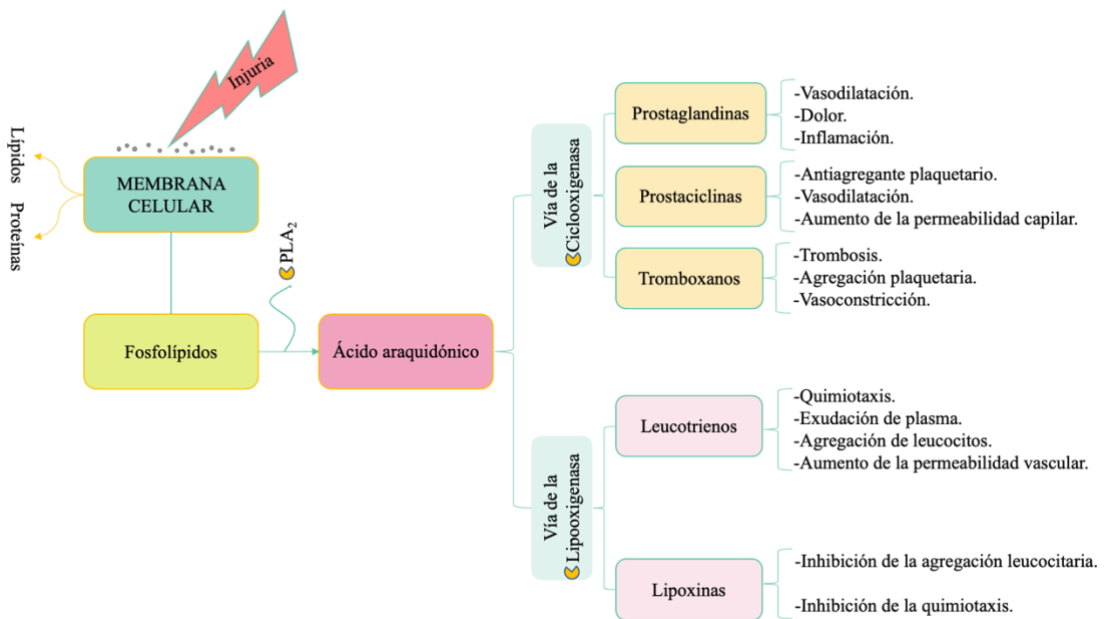


Figura 4. Derivados del ácido araquidónico en la cascada de la inflamación.

La inflamación ocular es una condición causada por una infección, alergia, traumatismo o irritación química. Los síntomas pueden incluir enrojecimiento, dolor, sensibilidad a la luz, lagrimeo, secreción ocular y visión borrosa. El proceso de reparación y aislamiento

del agente que provoca la lesión en el tejido se produce por el desencadenamiento de la producción de factores de crecimiento, citoquinas y el trauma, estimulándose la enzima PLA₂, que da lugar a la síntesis de eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) que regulan procesos inmunopatológicos e inflamatorios, mediante distintas respuestas fisiológicas, homeostasis vascular y agregación plaquetaria (Dennis and Norris 2015, Dammak, Pastrana *et al.* 2023).

Las enfermedades inflamatorias que afectan al globo ocular y a la órbita, incluyen la uveítis, escleritis, queratitis y la patología inflamatoria orbitaria. Estas enfermedades pueden afectar exclusivamente a las estructuras oculares o bien formar parte de una enfermedad sistémica.

La uveítis (**Figura 5**) clásicamente hace referencia a un conjunto de problemas inflamatorios intraoculares que afectan una o más estructuras de la úvea o túnica vascular (conjunto de estructuras oculares que forman una capa pigmentada y controlan funciones del ojo como la adaptación a los diferentes niveles de luz o a las distancias de los objetos) (Kesav, Palestine *et al.* 2020). La úvea es la capa media del ojo que se encuentra debajo de la esclerótica, formada por el iris (que funciona como el diafragma de una cámara fotográfica, regulando la cantidad de luz que penetra en el ojo), el cuerpo ciliar (que genera el humor acuoso y modifica la forma del cristalino, permitiendo el enfoque y, por tanto, la visión a distintas distancias) y la coroides (capa profusamente

1. INTRODUCCIÓN

irrigada de vasos sanguíneos y células pigmentadas, que proporciona oxígeno a la retina). Aunque el término uveítis se ha ampliado a la inflamación de las estructuras intraoculares adyacentes, como la retina, el humor vítreo y el nervio óptico (Denniston and Murray 2014).

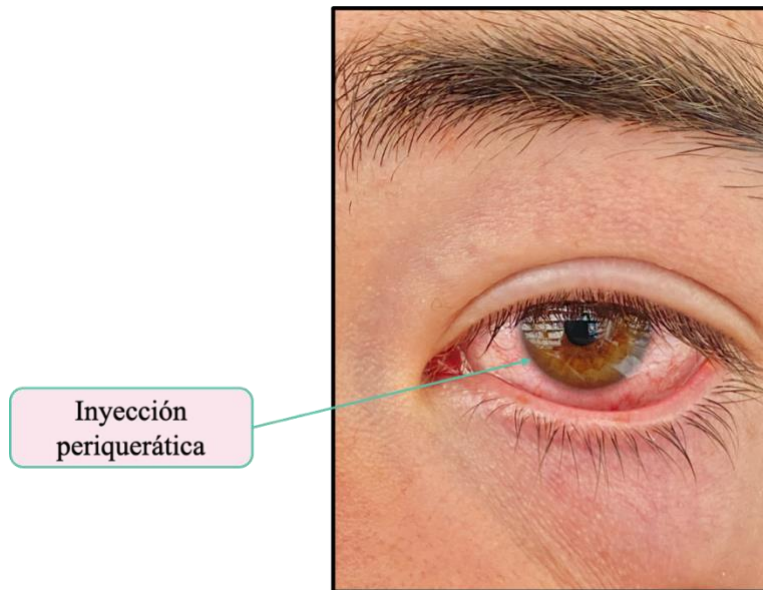


Figura 5. *Signos de uveítis anterior.*

La uveítis es una de las principales causas de discapacidad visual grave y ceguera. En los países desarrollados es la quinta o sexta causa principal de ceguera, representando entre el 10 –15 % de todos los casos; mientras que en los países en vías de desarrollo representa el 25 %. A diferencia de otras enfermedades oftálmicas, como el glaucoma o la degeneración macular relacionada con la edad, que generalmente afectan a las poblaciones de edad avanzada, la uveítis puede ocurrir en todos los

grupos de edad y, a menudo, afecta a adultos jóvenes (20 – 50 años) (Joltikov and Lobo-Chan 2021, Chen, Kong *et al.* 2023).

La uveítis se puede clasificar:

- Según la localización anatómica:
 - a) Uveítis anterior: es la forma más frecuente, y se da cuando la inflamación se origina en el iris o en el cuerpo ciliar. A su vez, se divide en nueve tipos diferentes, incluyendo iritis, iridociclitis, uveítis ciliar, corioretinitis, coroiditis, síndrome de oclusión de la vena central de la retina, queratouveítis, síndrome de Fuchs y uveítis sifilítica.
 - b) Uveítis intermedia: se refiere a la inflamación que afecta principalmente al humor vítreo o sustancia gelatinosa presente en la cámara vítrea del ojo. A veces también se la denomina vitritis o pars planitis.
 - c) Uveítis posterior: es la inflamación que afecta las capas posteriores del ojo, como la coroides (coroiditis) o la retina (retinitis). También puede afectar a los vasos sanguíneos de la retina, este trastorno recibe el nombre de vasculitis.
 - d) Panuveítis: también denominada uveítis difusa. Es el término que describe la presencia de inflamación tanto en la parte anterior como en la posterior del ojo.

1. INTRODUCCIÓN

- Según la lesión anatomopatológica puede ser: granulomatosa o no granulomatosa.

- Según la evolución puede ser: aguda, crónica o recidivante.

- Según la etiología puede ser diversa: autoinmune, infecciosa, traumática, síndrome de enmascaramiento, idiopática, exógena o endógena, siendo las tres primeras las más habituales.
 - a) Autoinmune: el sistema inmune es un sistema de defensa del organismo frente a patógenos extraños, como las bacterias o los virus. Cuando el sistema inmunitario falla, no distingue lo «propio» de lo «extraño» y ataca el propio cuerpo, en este caso, el ojo. A menudo la inflamación se limita al ojo, pero puede estar asociada con otros trastornos médicos autoinmunes. Algunas personas tienen predisposición genética a desarrollar ciertas enfermedades autoinmunes, lo que a la vez se traduce en un mayor riesgo de desarrollo de uveítis. Dichas enfermedades incluyen la espondilitis anquilosante, la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn o la psoriasis, entre muchas otras.

 - b) Infecciosa: resulta menos frecuente que la inflamación esté asociada a una infección. Virus, bacterias o parásitos pueden acceder al interior de la cavidad ocular y provocar una infección. Existen algunos virus como el herpes, que una vez resuelta la infección, pueden persistir y en un momento determinado son capaces de reactivarse y producir un nuevo episodio inflamatorio.

- c) Traumática: cualquier traumatismo ocular, incluida la cirugía ocular, puede conducir al desarrollo de una inflamación.

Los síntomas dependerán principalmente del tipo de uveítis. No todos los signos y/o síntomas deben estar presentes a la vez. En el caso de la uveítis anterior, se manifiesta por enrojecimiento, dolor o sensibilidad a la luz e incluso visión borrosa. Mientras que la uveítis intermedia y posterior normalmente no presentan síntomas de dolor a no ser que se asocien con una uveítis anterior. En muchos casos, se aprecia la presencia de «moscas volantes» (puntos negros y/o telarañas) y pérdida o distorsión de la visión. Dichos síntomas pueden aparecer de manera repentina y durar solo unas semanas o pueden aparecer de forma gradual durante un periodo de varias semanas y durar incluso meses. En su mayor parte, los casos de uveítis anterior son agudos y se presentan de manera recurrente, alternándose con periodos de inactividad entre brotes.

Patogenéticamente, la distinción entre uveítis infecciosa y no infecciosa (autoinmune) no es muy clara, ya que, en ambos casos, los procesos de daño tisular y las células involucradas pueden ser muy similares. Además, a veces puede ser difícil determinar si el daño al tejido se puede atribuir directamente al agente infeccioso o a las respuestas inmunitarias inducidas en el huésped contra ese organismo. Dado que la enfermedad infecciosa latente está tan extendida, existe incluso la posibilidad de que la uveítis autoinmune (y la enfermedad autoinmune en general) pueda desencadenarse por los efectos adyuvantes de los organismos albergados por el huésped (Forrester 2010).

1. INTRODUCCIÓN

El tratamiento puede incluir gotas oculares, inyecciones intravítreas, medicamentos orales o incluso cirugía. Los pacientes con uveítis deben recibir seguimiento regular para prevenir complicaciones potencialmente graves, como la ceguera.

La terapia principal para el control de la inflamación en la uveítis se basa en el uso de corticosteroides tópicos, perioculares, intravítreos o sistémicos. Los agentes anti-prostaglandinas tópicos y sistémicos tienen efectos mínimos sobre la inflamación intraocular, y ninguna otra clase de agentes antiinflamatorios tiene un efecto inmediato sobre la inflamación. La administración localizada de corticoides minimiza los efectos adversos sistémicos al mismo tiempo que maximiza la administración del fármaco y normalmente incluye el enfoque de inyección periocular e intravítrea (Sen, Vitale *et al.* 2014); sin embargo, estos fármacos pueden inducir efectos adversos a nivel ocular como la hipertensión ocular y el glaucoma, que deben considerarse en tratamientos prolongados (Daniel, Pistilli *et al.* 2017).

1.3. LICOCHALCONA A

Actualmente, los antibióticos y muchos otros medicamentos en el mercado producen reacciones no deseadas, cierto grado de toxicidad, sumándose además el problema de la aparición de microorganismos patógenos resistentes (El-Saber Batiha, Magdy Beshbishy *et al.* 2020). En este sentido, las plantas medicinales y sus metabolitos naturales, como fuente importante para descubrir nuevas moléculas farmacéuticas, han ganado una mayor aceptación debido a la percepción de que estas plantas, como productos naturales, tienen menos efectos secundarios y mayor eficacia en comparación con sus contrapartes sintéticas, siendo de gran interés para el tratamiento de enfermedades y cuidado de la salud humana (Sharma, Katiyar *et al.* 2018, Orozco, Vázquez-Hernández *et al.* 2019).

El género *Glycyrrhiza* (Leguminosae), que consta de aproximadamente 30 especies y proviene de los vocablos griegos, acuñados por el médico griego del primer siglo Dioscórides, γλυκύς *glykús*, que significa «dulce», y ρίζο *rizo* (este de ρίζωμα *rízōma*), que significa «raíz» (Grieve 2015), es también conocido como regaliz (Gan-Cao en chino), cuya raíz, además de ser empleada en la industria alimentaria como aromatizante y edulcorante natural, ha sido ampliamente usada en la medicina tradicional asiática, definida como «progenitor de las hierbas» y se encuentra en numerosas fórmulas tradicionales (Taufel 1996, Friis-Møller, Chen *et al.* 2002, Zhang and Ye 2009) para el tratamiento de diversas enfermedades como úlcera gástrica y duodenal (Chang and But 2014), hepatitis C (Arase, Ikeda *et al.* 1997), asma bronquial, enfermedades de la piel (Olukoga and Donaldson 2000),

1. INTRODUCCIÓN

tos, resfriados e influenza (Pastorino, Cornara *et al.* 2018) y como potencial terapéutico para el tratamiento del Coronavirus 2019 (COVID-19) (Chen, Hu *et al.* 2020, Luo, Liu *et al.* 2020, Murck 2020). Además, estudios clínicos y experimentales indican que poseen muchas otras propiedades farmacológicas como emoliente, antiinflamatorio, antioxidante, antiviral, antimicrobiano, anticancerígeno, inmunomodulador, hepatoprotector y cardioprotector (Numazaki 2003, Mukhopadhyay and Panja 2008, Li, Chen *et al.* 2014).

El regaliz es una hierba perenne que tiene una altura de 70 a 200 cm, que en la actualidad es ampliamente cultivada en toda Europa, Medio Oriente y Asia, aunque originaria de la región mediterránea, del centro al sur de Rusia y de Asia Menor a Irán. Las partes comercialmente importantes de la planta, de las que se preparan los extractos, son las raíces largas y enredadas y los tallos subterráneos que se encuentran al ras del suelo (Fenwick, Lutomski *et al.* 1990). Su cultivo fue registrado por primera vez por Piero de Cresenzi de Bolonia en el siglo XIII. Las raíces cultivadas se cosechan después de tres o cuatro años de crecimiento. Éstas y los estolones contienen glicirricina (también conocida como ácido glicirricico o glicirricinico, alrededor del 59 % en peso), un compuesto que es unas 50 – 170 veces más dulce que la sacarosa (Mukhopadhyay and Panja 2008).

La raíz de regaliz contiene saponinas triterpenoides (42,4 %), principalmente glicirricina, una mezcla de sales de potasio y calcio del ácido glicirricico; flavonoides (0,1 %), principalmente las flavanonas

liquiritina y liquiritigenina, chalconas, isoliquiritina, isoliquiritigenina e isoflavonoides (formononetina); aminas (1,2 %), asparagina, betaína y colina; aminoácidos; 31,5 % de glucosa y sacarosa; almidón (23,0 %); polisacáridos (arabinogalactanos); esteroides (*b*-sitosterol); cumarinas (glicerina); resina; y aceites volátiles (0,0047 %) (Bruneton 2016, Tang and Eisenbrand 2013). Sin embargo, la composición exacta varía mucho según la especie, las condiciones de cultivo, el entorno de crecimiento, las técnicas de recolección y procesamiento, etc., pudiendo afectar el contenido de metabolitos secundarios y sus propiedades terapéuticas (Zhang and Ye 2009, Oloumi and Hassibi 2011, Ahmadi Hosseini, Kazem Souri *et al.* 2014). De acuerdo con los resultados de un estudio de regaliz de Moldavia, el contenido de glicirricina, azúcares y extractos aumentaron con la edad de la planta, siendo más elevados en las raíces horizontales y pivotantes. Los niveles máximos se encontraron en los períodos más calurosos del año, que también correspondían a la terminación de la floración. En base a esto se sugiere que las raíces se deben recolectar al final de la tercera temporada (Fenwick, Lutomski *et al.* 1990).

Glycyrrhiza glabra, *G. uralensis* y *G. inflata* son las especies más comunes de este género, están reconocidas oficialmente en la farmacopea china y son las especies generalmente empleadas en el comercio (Gongheguo 2000).

Las aplicaciones terapéuticas modernas de la raíz de regaliz se sustentan en base a su uso en sistemas bien establecidos de medicina tradicional, en investigaciones fitoquímicas bien documentadas, en acciones farmacológicas reportadas en estudios *in vitro* e *in vivo* en

1. INTRODUCCIÓN

animales y en estudios clínicos en humanos. Además, de su uso reciente en el sistema de liberación de fármacos, especialmente en el enfoque de la nanomedicina, aplicación cosmeceútica y veterinaria (Alagawany, Elnesr *et al.* 2019, Ciganović, Jakimiuk *et al.* 2019, Rani, Devi *et al.* 2021, Bisht, Rashid *et al.* 2022).

Los flavonoides que forman parte de una importante clase de productos naturales, se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, donde brindan protección UV y color a sus productores. Éstos, dependiendo de sus estados oxidativos y sustituyentes, se pueden clasificar en chalconas, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavonoles, dihidroflavonoles, isoflavonoles, auronas, neoflavonoides y antocianidinas (Zhou, Yang *et al.* 2021). La mayoría de estos compuestos comparten un esqueleto C₆-C₃-C₆ que consta de dos anillos aromáticos A y B y un anillo de (dihidro)benzopirano C, adyacente a A y se derivan de tres malonil-CoA y un cinamoil- o *p*-cumaroil-CoA (Harborne and Williams 2001).

Químicamente las chalconas son 1,3-diaril-2-propen-1-onas, donde los anillos A y B están unidos por un puente de carbonilo insaturado de tres carbonos (**Figura 6**) (Zhou, Yang *et al.* 2021), pudiendo modificarse por prenilación, lo que a menudo aumenta la lipofilicidad y mejora su afinidad por las proteínas y las membranas celulares, y por lo tanto la actividad biológica.

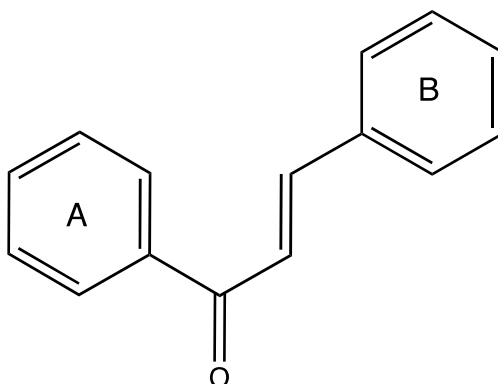


Figura 6. Estructura química de las chalconas.

Las chalconas muestran una amplia gama de actividades biológicas y farmacológicas, incluidas actividades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, citotóxicas, antitumorales, antiinflamatorias y antialérgicas (Harborne 2017). Algunas de ellas también se consideran candidatas potenciales para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y enfermedades vasodilatadoras (Harborne and Williams 2001).

Las licochalconas (Zhang, Zhou *et al.*) son chalconas oxigenadas aisladas de la raíz de regaliz, que presentan actividad antiparasitaria y antitumoral y parece interferir con la respiración mitocondrial (Park, Ji *et al.* 2021). Se han clasificado, según sus estructuras químicas, en licochalcona A, B, C, D, E, F y G. Las licochalconas A y B se aíslan principalmente de *G. glabra* L. (Saitoh and Shibata 1975), mientras que las licochalconas C y D de *G. inflata* (Kajiyama, Demizu *et al.* 1992, Haraguchi, Tanimoto *et al.* 1998). Se ha informado que *G. glabra* L. muestra una actividad antiinflamatoria similar a una hormona esteroide

1. INTRODUCCIÓN

(hidrocortisona) al inhibir la actividad de la enzima fosfolipasa A₂, que es crucial para varios procesos inflamatorios. Además, un estudio *in vitro* demostró que suprime la actividad de la ciclooxigenasa y la formación de prostaglandina E₂, inhibiendo indirectamente la agregación plaquetaria (Harwansh, Patra *et al.* 2011).

La licochalcona A (Lico-A), pigmento natural de color marrón amarillento, es el principal compuesto fenólico extraído de *Glycyrrhiza glabra* L. (familia: Fabaceae) **Tabla 1**, con una estructura molecular característica (3-dimetilalil-4,4' -dihidroxi-6-methoxichalcona) **Tabla 2**, posee una unidad prenilo en el C-5 del anillo B (**Figura 7**). Se puede describir químicamente como una cetona bisfenólica α,β -insaturada (esqueleto de chalcona) sustituido con dos grupos hidroxilo fenólicos, un resto metoxi y una cadena lateral isoprenoide (Souza, de Carvalho *et al.* 2020).

Tabla 1. Clasificación científica de *Glycyrrhiza glabra* L.

Taxón	Nombre
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae (Leguminosae)
Género	<i>Glycyrrhiza</i>
Especie	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.

Tabla 2. Nombre IUPAC, fórmula química y peso molecular de Lico-A.

Nomenclatura IUPAC	Fórmula Química	Peso Molecular
(E)-3-[4-Hidroxi-2-metoxi-5-(2-metilbut-3-en-2-il) fenil]-1-(4-hidroxifenil) prop-2-en-1-ona	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	338,39 g/mol

Se cree que desempeña una función importante en el sistema inmune de las plantas, ayudando a combatir las infecciones y protegerlas de daños. La Lico-A es usada como colorante alimentario y en la industria del tabaco; así también, diversos estudios demuestran que esta sustancia química, posee actividad antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana, antiviral, antimicobacteriana y antileishmanial y osteogénica (Chen, Christensen *et al.* 1993, Friis-Møller, Chen *et al.* 2002, Yoon, Jung *et al.* 2005, Gatta Daniela, Franceschelli *et al.* 2019, Souza, de Carvalho *et al.* 2020, Li, Xie *et al.* 2022). Además, también se ha demostrado que esta sustancia tiene un efecto protector contra el daño inducido por los radicales libres en el organismo. Estudios recientes reportan una función farmacológica con actividad antiinflamatoria (Yang, Lee *et al.* 2018), como antiinflamatorio en el modelo de enfermedad de Parkinson (Huang, Liu *et al.* 2017), inmunoterapia contra el cáncer (Yuan, Jiang *et al.* 2021) y enfermedad de Alzheimer (Lee, Chiu *et al.* 2018). También se ha investigado como un tratamiento potencial para afecciones inflamatorias de la piel como la rosácea eritematosa, la psoriasis, la dermatitis atópica y el acné (Weber, Ceilley *et al.* 2006, Yang, Lee *et al.* 2018).

1. INTRODUCCIÓN

En la industria cosmética, la Lico-A se ha utilizado ampliamente en productos para mejorar la apariencia de la piel, protectores solares, entre otros, y se continúa estudiando como inhibidores de la melanogénesis y cosméticos blanqueadores (Hong, Cao *et al.* 2018, Wang, Xue *et al.* 2021, Puaratanaarunkon and Asawanonda 2022).

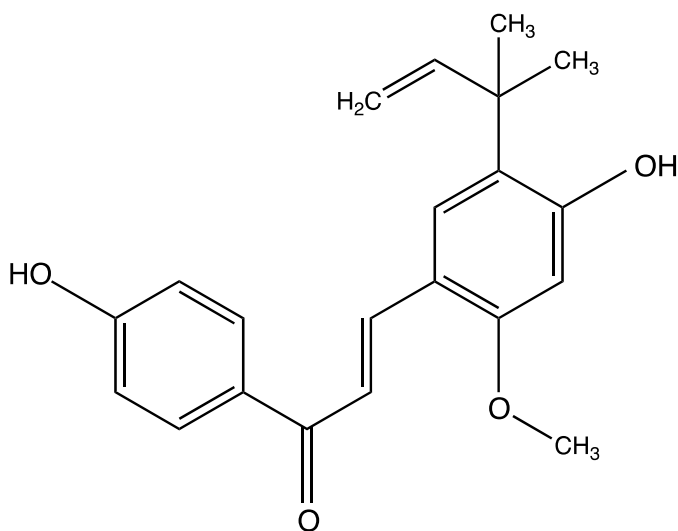


Figura 7. Estructura química del producto natural Licochalcona A.

Dentro de la amplia gama de actividades biológicas que posee la Lico-A, las propiedades antiinflamatorias tienen interés para su evaluación en procesos inflamatorios oculares.

Recientemente, varios estudios han demostrado que la Lico-A puede tener un efecto antiinflamatorio en el ojo. Li *et al.* (2021) reportaron que la Lico-A suprimió la fosforilación de p38 y la liberación de factores pro-inflamatorios como el factor de necrosis tumoral

(TFN- α), la interleucina 1 β (IL-1 β) y la interleucina 6 (IL-6) en modelos animales con neuropatía crónica (Li, Yu *et al.* 2021). Experimentos llevados a cabo por Bisht *et al.* (Bisht, Rashid *et al.* 2022), han puesto de manifiesto que la Lico-A, tiene la capacidad de inhibir la producción de óxido nítrico (NO), IL-6 y PGE2. En este mismo sentido, otro estudio ha demostrado que la Lico-A inhibió la transición endotelial-mesenquimal (EndMT), implicada en la patogénesis de la neovascularización coroidea (CNV), a través de la vía de señalización PI3K/AKT en modelos animales de CNV inducida por láser, aliviando la CNV que puede ser secundaria a la enfermedad inflamatoria ocular (Zhang, Zhou *et al.* 2023). Estos resultados indican que la Lico-A puede ser potencialmente útil como tratamiento antiinflamatorio para la uveítis y otras enfermedades inflamatorias oculares.

1. INTRODUCCIÓN

1.4. SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA DE FÁRMACOS

Los sistemas de liberación prolongada son formas de dosificación que permiten la liberación del fármaco de forma sostenida y controlada a lo largo del tiempo, a una velocidad y/o en una localización determinadas, asegurando una biodisponibilidad adecuada y garantizando un correcto efecto terapéutico en el paciente. Estos sistemas mejoran por tanto, la eficacia terapéutica y la seguridad del medicamento, ya que disminuyen los efectos adversos asociados a la terapia empleada. Además, minimizan la degradación del principio activo e incrementan la vida media del fármaco en el interior del órgano diana.

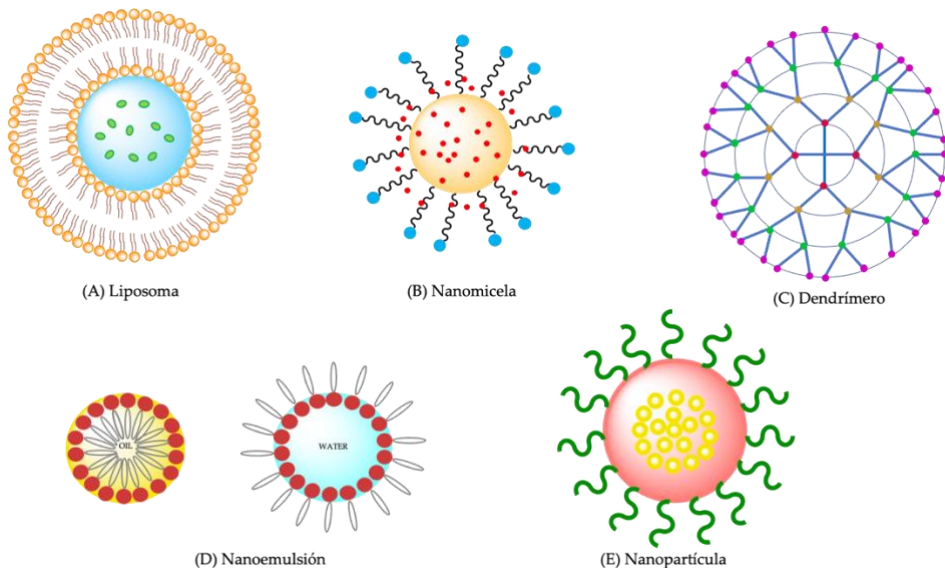


Figura 8. Representación esquemática de los nanotransportadores clásicos.

En general, los nanotransportadores utilizados como sistemas de administración de fármacos incluyen liposomas, micelas, dendrímeros, nanoemulsiones y nanopartículas (**Figura 8**).

1.4.1. Nanopartículas poliméricas en tratamientos oculares

Los tejidos extraoculares o intraoculares constituyen los objetivos terapéuticos de los fármacos para tratar las enfermedades relacionadas con el segmento anterior del ojo. De esta manera, si el objetivo es aliviar los signos y síntomas causados por trastornos inflamatorios de la superficie ocular de la córnea y conjuntiva, como el síndrome del ojo seco y enfermedades alérgicas, se debe pensar en mejorar la biodisponibilidad en tejidos extraoculares. Por el contrario, si la finalidad es tratar infecciones y enfermedades complejas que amenazan la visión tales como el glaucoma o la uveítis (inflamación intraocular), el enfoque sería incrementar la biodisponibilidad en tejidos intraoculares.

Es necesario precisar que, además de la absorción corneal, los fármacos administrados tópicamente pueden absorberse en el segmento anterior a través de una vía no corneal: la vía de la conjuntiva/esclerótica, ya que la conjuntiva tiene un área de superficie mayor que la córnea (17 frente a $\sim 1 \text{ cm}^2$) (Watsky, Jablonski *et al.* 1988, Wang and Wang 2022). La conjuntiva es una barrera limitante de la velocidad de permeación de fármacos solubles en agua (Ahmed, Gokhale *et al.* 1987, Prausnitz and Noonan 1998) debido a la rápida eliminación del fármaco por el flujo sanguíneo y linfático conjuntival. Los fármacos que logran evadir la eliminación conjuntival, penetran a través de la esclerótica para

1. INTRODUCCIÓN

alcanzar el segmento anterior (vía transescleral). En esta vía, debido a la gran superficie de la esclera y una permeabilidad relativamente más alta que la córnea, el tamaño de las moléculas resulta más importante para la permeación transescleral que su lipofilia (Janagam, Wu *et al.* 2017).

Como ya se mencionó anteriormente, las formulaciones tópicas oculares convencionales se aplican en la porción anterior del ojo, aunque la mayor parte se pierde debido a su mecanismo defensivo (drenaje lagrimal por lagrimeo basal y reflejo). Por este motivo, se continúa dirigiendo mucho esfuerzo, con el desafío de lograr una concentración adecuada y mayor retención de la dosis aplicada en la superficie ocular y, por consiguiente, un mejor efecto terapéutico y disminución de los efectos adversos locales y/o sistémicos.

En este sentido, la formulación de sistemas de administración ocular centrándose en la biodisponibilidad ocular mejorada y el efecto prolongado del fármaco en los tejidos diana, es una herramienta terapéutica necesaria. Con el desarrollo de un sistema de administración de fármacos oftálmicos, que eluda los problemas asociados con los sistemas convencionales y proporcione las ventajas de la administración dirigida del medicamento durante períodos de tiempo prolongados y sea fácil de usar para el paciente, se podría contribuir con un enfoque alternativo a la necesidad de altas dosis y al uso de tratamientos invasivos (inyecciones intraoculares). Todas estas ventajas se describen en la literatura con el uso de nanopartículas. Cabe resaltar que también se han desarrollado otras estrategias para la administración ocular prolongada de fármacos en el segmento anterior como lentes de contacto con activos y sistemas basados en nanoobleas (Janagam, Wu *et al.* 2017).

Las nanopartículas (NPs) son sistemas dispersos, de tamaño nanométrico de partículas sólidas, que según su uso, pueden o no contener fármaco. Estas tienen grandes áreas superficiales y pueden estar preparadas con diferentes tipos de materiales. Cuando se requiere administrar NPs en el tratamiento de un paciente, es muy importante que los componentes del sistema nanoestructurado sean inocuos. De todos estos sistemas, las NPs poliméricas son los sistemas coloidales de características más biodegradables y biocompatibles existentes, con tamaños entre 10 y 1000 nm (Kumari, Yadav *et al.* 2010). En la bibliografía se describen sistemas de liberación controlada obtenidos a partir de dispersiones sólidas del fármaco con polímeros biodegradables formadores de sistemas matriciales, entre ellos, el ácido poli láctico (PLA), el ácido poli láctico-*co*-glicólico (PLGA), etilcelulosa o copolímeros metacrílicos, que dan lugar a sistemas matriciales inertes, o polímeros como la hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) o el alcohol polivinílico (PVA) que originan sistemas matriciales hidrófilos. También es posible encontrar una combinación de ambos tipos de sistemas.

Las nanopartículas se subdividen en dos categorías: nanoesferas y nanocápsulas (**Figura 9**). Las nanoesferas son sistemas matriciales, donde el fármaco se encuentra disperso en el interior de una matriz polimérica y/o adsorbido en la superficie. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares, que actúan como una especie de reservorio, constituidos por una membrana polimérica en cuyo interior se aloja el fármaco, generalmente disuelto en un vehículo oleoso (Rao and Geckeler 2011). Estas diferencias entre ambos tipos de NPs condicionan sus propiedades

1. INTRODUCCIÓN

respecto a la liberación del activo. La selección del tipo de NP dependerá del método de elaboración, las propiedades fisicoquímicas y las características del fármaco a encapsular.

Se puede resumir las ventajas del uso de las NPs en el tratamiento de inflamaciones oculares en su capacidad de mejorar la permeabilidad del fármaco a través de la barrera hematoacuosa y la córnea, prolongar el tiempo de contacto del fármaco con los tejidos oculares, administrar el fármaco en un tejido específico de manera controlada, proteger al fármaco de la degradación y el metabolismo manteniendo su estabilidad, favorecer la liberación del fármaco durante semanas a meses (disminución en la frecuencia de aplicación), tener baja o nula toxicidad y efectos secundarios, mantener una larga vida útil y no necesitar reconstitución ni extracción quirúrgica. Todas estas ventajas, mejoran la adherencia al tratamiento por parte del paciente.

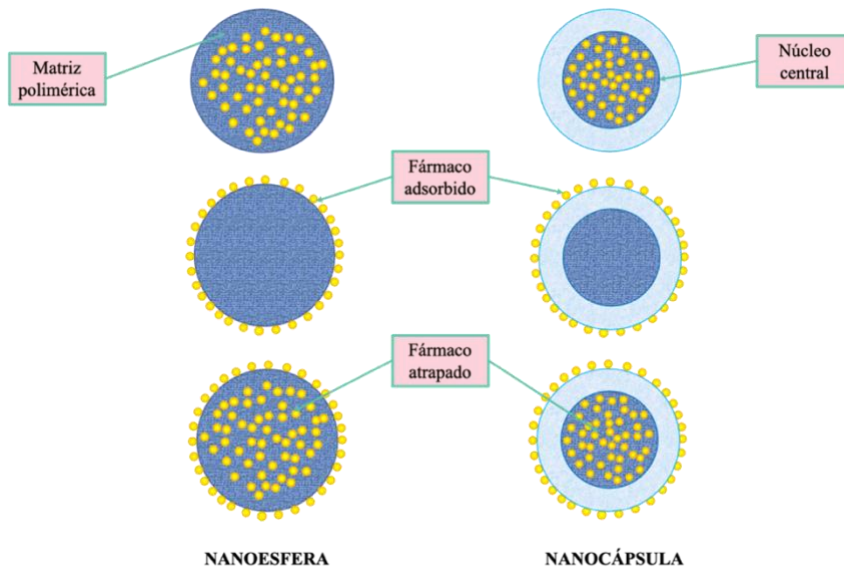


Figura 9. *Nanopartículas poliméricas.*

1.4.2. Nanopartículas de PLGA

La formulación de polímeros biodegradables como sistema coloidal es muy prometedora para la administración de fármacos oftálmicos. Un sistema coloidal es adecuado para fármacos poco solubles en agua, como el caso de la Lico-A, y permitiría su administración manteniendo la actividad del fármaco en el sitio de acción.

Las nanopartículas poliméricas se pueden preparar usando varios métodos desarrollados y utilizados con éxito como el método de evaporación de solvente, desplazamiento del solvente o nanoprecipitación, emulsificación espontánea/difusión de solventes, salting out y diálisis.

El método de desplazamiento del solvente ofrece sencillez de procedimiento, menor necesidad de purificación, alta facilidad de escalado y alta eficiencia de atrapamiento y seguridad de los fármacos cargados. Debido a la miscibilidad del solvente con la fase acuosa, este método es eficiente solo para fármacos muy poco solubles en agua, como la Lico-A.

Dado que las NPs cargadas con fármaco residen en los tejidos diana y en circulación durante un período de tiempo prolongado, la biocompatibilidad y la biodegradabilidad de los polímeros utilizados en su preparación son los dos requisitos previos básicos. Los polímeros afectan de manera importante a las propiedades y estructura de las NPs,

1. INTRODUCCIÓN

y condicionan tanto sus posibles aplicaciones como su vía de administración (Pires, Mascarenhas-Melo *et al.* 2023).

En este sentido, los ácidos poli láctico (PLA), poli glicólico (PGA) y sus copolímeros poli láctico-*co*-glicólico (PLGA) (**Figura 10**) han sido frecuentemente utilizados para la elaboración de nanopartículas debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad y resistencia mecánica. Estos poliésteres están aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para su utilización en humanos en diversas aplicaciones biomédicas, tales como suturas reabsorbibles e implantes (Gilding and Reed 1979), así como para el desarrollo de sistemas de liberación sostenida. Además, en comparación con los polímeros naturales, estos polímeros sintéticos muestran una mayor reproducibilidad, son fáciles de formular y permiten el control y la predicción de la cinética de degradación (Ramezani Dana and Ebrahimi 2023). Por lo tanto, constituyen un grupo de elección para la elaboración de nanopartículas cargadas con diversos fármacos.

Las NPs se diferencian de los objetos macroscópicos por sus propiedades submicrónicas, como una gran área superficial y energía, y el movimiento de las partículas en medios líquidos (movimiento browniano). En la liberación del fármaco y la degradación de las nanopartículas influyen el tamaño, la morfología y el estado físico del fármaco encapsulado, así como el peso molecular y la cristalinidad del polímero. La carga superficial de las nanopartículas determina el rendimiento del sistema de nanopartículas en el cuerpo, como las interacciones con las membranas celulares.

La información de la carga superficial de las NPs se obtiene mediante mediciones del potencial zeta (Z_{pot}). Valores de potencial zeta suficientemente altos por encima de ± 30 mV indican una dispersión coloidal estable (Benita and Levy 1993). Es importante que el tamaño de partícula para aplicaciones oftálmicas esté dentro del rango nanométrico, porque con tamaños más grandes puede producir una sensación de irritación o roce, además de influir en la absorción o permeación a través de las barreras oculares. La eficiencia de carga de fármacos de las partículas depende del tamaño y la forma de los portadores. Estudios demuestran que la captación de partículas de PLGA en células epiteliales conjuntivales de conejo dependía del tamaño de las partículas. Las partículas más pequeñas (100 nm) exhibieron la captación más alta en comparación con las partículas más grandes (800 nm y 1000 nm) y las partículas de 100 nm pudieron incluso penetrar a través de la barrera corneal (Nagarwal, Kant *et al.* 2009).

Las nanopartículas poliméricas de PLGA elaboradas por el método de desplazamiento del solvente, tienen tamaños de partícula en el rango de 100 – 200 nm y potenciales zeta negativos.

1. INTRODUCCIÓN

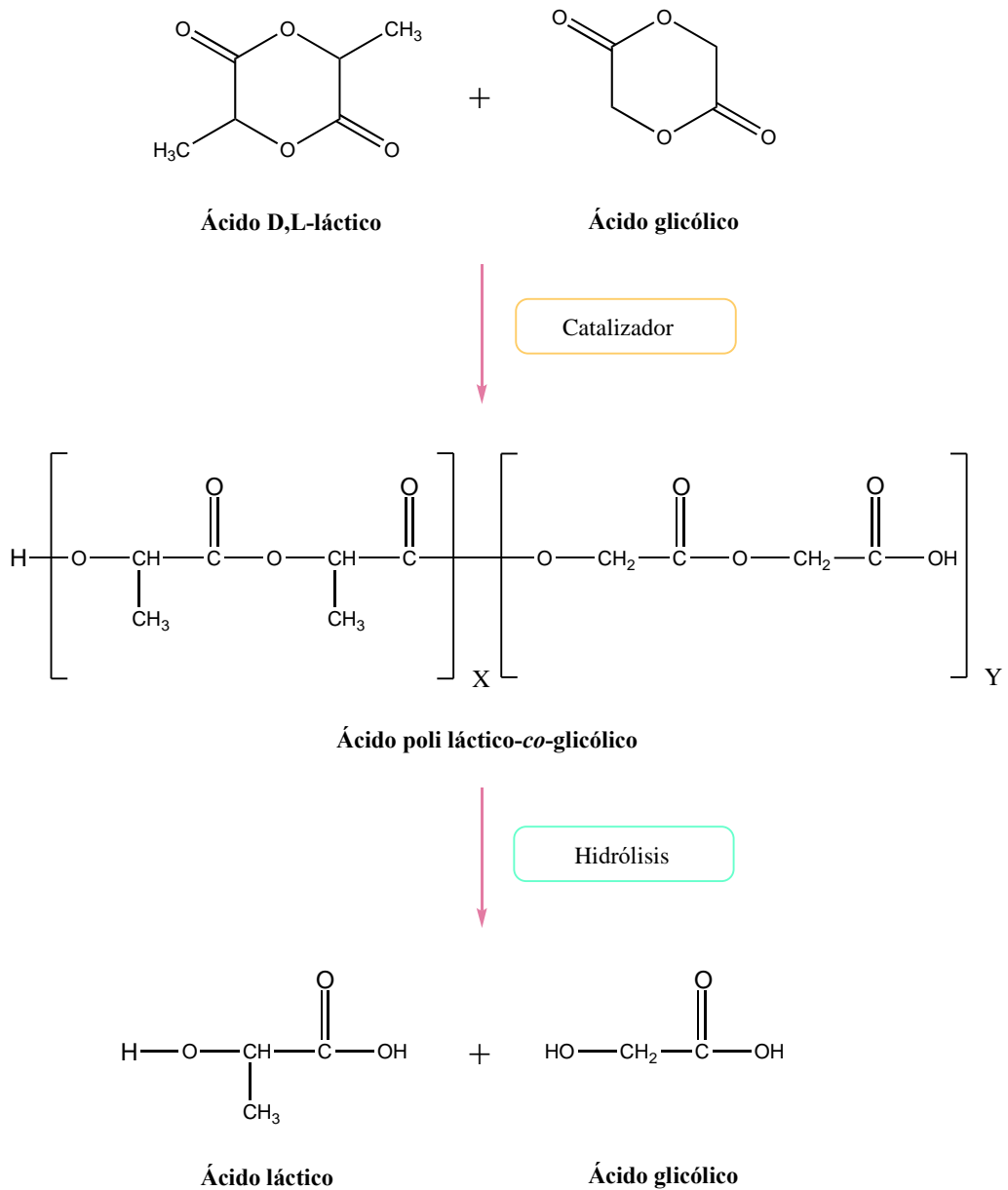


Figura 10. Síntesis e hidrólisis del ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA).

La modificación de la superficie o el recubrimiento con polímeros biocompatibles (hidrofílicos) como el PEG (polietilenglicol), poloxámeros y poloxaminas mejoran la absorción de nanopartículas y su estabilidad. En el presente estudio, el uso de PEG en la superficie de las NPs desarrolladas para tratamientos oftálmicos, favorece que queden atrapadas en la capa mucínica de la película lagrimal, pudiendo luego interactuar íntimamente (por la formación de cadenas/materiales poliméricos bioadhesivos propio de estos grupos multifuncionales) con los tejidos extraoculares y así prolongar el tiempo de residencia de los fármacos cargados, disminuir el drenaje del principio activo y mejorar su biodisponibilidad en tejidos extraoculares (Ludwig 2005). Además, estas NPs pueden lograr la penetración tisular en el interior del ojo por un mecanismo de endocitosis, logrando así una mejor biodisponibilidad. La penetración depende de varios factores como el tamaño, la carga superficial, la química de la superficie y la hidrofiliidad/hidrofobicidad de los sistemas nanoparticulados (Hillaireau and Couvreur 2009). Diferentes estudios avalan los beneficios del recubrimiento de NPs poliméricas con PEG (Fresta, Panico *et al.* 1999, Giannavola, Bucolo *et al.* 2003).

1.5. FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NPs CON PÉPTIDOS PENETRANTES DE CÉLULAS

La membrana celular, compuesta de una bicapa lipídica, proteínas, carbohidratos y sus conjugados, es una organización altamente compleja y dinámica, responsable de muchos procesos celulares vitales (Sezgin, Levental *et al.* 2017). El control de transporte de material es una de las funciones más críticas de la membrana celular, que resulta ser determinante para la administración exitosa de fármacos intracelulares. La mayoría de los fármacos de molécula pequeña pueden atravesar libremente las membranas celulares para dirigirse al ADN o las proteínas del interior de las células. Por el contrario, las biomacromoléculas, a menudo muestran una permeabilidad celular deficiente, y como consecuencia, un gran número de moléculas con elevada actividad terapéutica resultan inactivas por no ser capaces de alcanzar su diana molecular (An, Wei *et al.* 2023).

La permeación ocular, atravesando adecuadamente las barreras oculares, se convierte en un desafío farmacológico para la obtención de concentraciones terapéuticas de fármaco en el tejido a tratar. Por ello, en los últimos años, el empleo de péptidos penetrantes de células (cell penetrating peptides, CPPs), como nueva tecnología para la internalización de macromoléculas y fármacos en las células oculares, constituye un enfoque novedoso ya que muestran alta eficiencia de transducción (eficiencia de internalización de los CPPs en la membrana celular) y una baja citotoxicidad. La transducción de moléculas acopladas a los CPPs tiene varias ventajas sobresalientes ya que son compuestos fáciles de sintetizar, producen una rápida y eficiente

transferencia del compuesto al núcleo o citoplasma, tienen baja toxicidad y poca interacción con otros medicamentos, poseen elevada eficacia frente a distintas líneas celulares y no se acumulan en tejidos no diana, todo esto resulta en una mayor facilidad de administración del fármaco (González-Cruz, Hernández-Juárez *et al.* 2022).

Los CPPs son secuencias peptídicas entre 5 a 30 aminoácidos (AA) con la capacidad de internalizarse en la célula de forma no invasiva mediante mecanismos energéticos con receptores específicos y no energéticos (sin mediación de receptores). Se clasifican en hidrófobos, anfipáticos y catiónicos de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas. Los catiónicos tienen características positivas por sus secuencias ricas en residuos de arginina (Arg) (Guidotti, Brambilla *et al.* 2017).

TAT, la proteína activadora de la transcripción del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1) fue la primera proteína aislada con propiedades para internalizar macromoléculas mediante formación de poros y penetración directa (Frankel and Pabo 1988, Green and Loewenstein 1988). Identificada la secuencia que permite la internalización celular, se denominó péptido TAT (TAT₄₉₋₅₇, RKKRRQRRR) (Vivès, Brodin *et al.* 1997) , y se ha utilizado ampliamente en el transporte de proteínas terapéuticas y de otros sistemas de liberación como NPs (Shi, Qi *et al.* 2014). Esta capacidad de penetración a través de la membrana, asignada a secuencias peptídicas altamente ricas en residuos básicos catiónicos se denominaron Dominios de Transducción de Proteínas (PTDs) o Péptidos Penetrantes de Células (CPPs). Asimismo, el homeodominio de Antennapedia, descubierta por primera vez en *Drosophila* en 1994 (Derossi, Joliot *et al.* 1994), también

1. INTRODUCCIÓN

manifestó estas propiedades de translocación. Las homeoproteínas son una clase de factores de transcripción que se unen al ADN a través de secuencias específicas de 60 aminoácidos denominados homeodominios, cada uno de éstos consta de tres α -hélices. La tercera hélice del homeodominio Antennapedia es la responsable del proceso de translocación. Esta secuencia penetrante que corresponde con los residuos comprendidos entre 43–58 de Antennapedia se denominó Penetratina (pAntp, RQIKIWFQNRRMKWKK). Años más tarde, se encontró que la proteína estructural VP22 (NAATATRGRSAASRPTQRPRAPARSASRPRRPVQ) del virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1), también presentaba estas propiedades penetrantes (Elliott and O'Hare 1997). Con todo esto, queda demostrado que una secuencia sintética de 8 Arg (poliarginina, R8) es suficiente para la traslocación celular. Los grupos guanidinas de la cadena lateral de la Arg interaccionan a través de puentes de hidrógeno con los grupos cargados negativamente, como grupos carboxílicos, sulfatos y fosfatos de las proteínas de membrana, fosfolípidos y mucopolisacáridos favoreciendo la internalización celular, por endocitosis o penetración directa (Pescina, Ostacolo *et al.* 2018).

Por otro lado, resulta necesario precisar, que no todas las familias de péptidos tienen el mismo mecanismo de internalización, y más aún, un mismo CPP podría usar más de un tipo de internalización en condiciones variables. En la actualidad, aún existe controversia sobre los detalles moleculares responsables de los diferentes métodos de translocación al interior de la célula por parte de los CPPs. En líneas generales, el transporte puede ser *pasivo*, sin necesidad de un aporte extra de energía, llevándose a cabo en el sentido a favor de un gradiente de

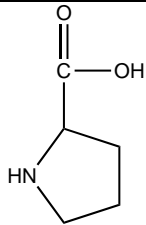
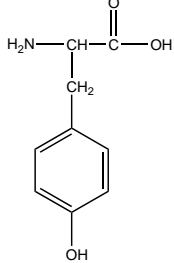
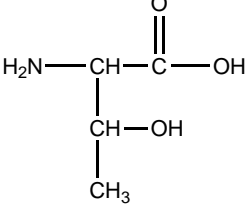
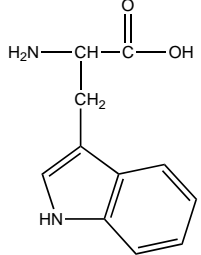
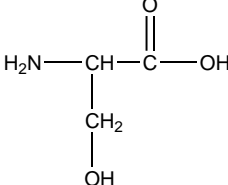
concentración. El intercambio de contraiones por los grupos guanidino de los residuos de arginina, permiten al péptido adquirir un carácter hidrofílico o hidrofóbico según necesidad hasta alcanzar el interior de la célula (Sakai and Matile 2003). En cuanto al transporte *activo*, es dependiente de energía por llevarse a cabo en contra de un gradiente de concentración, es así como la endocitosis (que incluye la fagocitosis y pinocitosis) es el proceso de la ingestión celular con la cual la membrana plasmática se pliega hacia el interior aportando diferentes sustancias a la célula. Mediante la fagocitosis, llevada a cabo por macrófagos y neutrófilos, se internalizan partículas grandes, a diferencia de la pinocitosis (macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina o endocitosis mediada por caveolina), que tiene lugar en todo tipo de células para la absorción de material extracelular líquido con posibles moléculas disueltas. Diversos estudios avalan la translocación por endocitosis (Richard, Melikov *et al.* 2005, Laniel, Marouseau *et al.* 2023).

En esta investigación, entre varios péptidos, Tet-1 y B6 (**Figura 11**) fueron seleccionados como candidatos adecuados para la administración ocular de fármacos. Tet-1 es un péptido de 12-AA, con la secuencia HLNILSTLWKYR (**Tabla 3**), que tiene las características de unión de la toxina tetánica, puede interactuar específicamente con las neuronas motoras y es capaz de cesión retrógrada en los tejidos neuronales debido a su afinidad por el receptor del gangliósido GT1b (Mathew, Fukuda *et al.* 2012, Zhang, Zhou *et al.* 2014, Jia, Sun *et al.* 2016). Por lo tanto, el péptido Tet-1 podría aumentar la internalización celular también en los tejidos oculares debido a la presencia de

1. INTRODUCCIÓN

Aminoácido	Código	Fórmula	Estructura química
Cisteína (Cys)	C	$C_3H_7NO_2S$	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array} $
Glicina (Gly)	G	$C_2H_5NO_2$	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array} $
Histidina (His)	H	$C_6H_9N_3O_2$	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{Imidazole ring} \end{array} $
Isoleucina (Ile)	I	$C_6H_{13}NO_2$	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Leucina (Leu)	L	$C_6H_{13}NO_2$	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Lisina (Lys)	K	$C_6H_{14}N_2O_2$	$ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{O}=\text{C} \\ \\ \text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \end{array} $

1. INTRODUCCIÓN

Aminoácido	Código	Fórmula	Estructura química
Prolina (Pro)	P	$C_5H_9NO_2$	
Tirosina (Tyr)	Y	$C_9H_{11}NO_3$	
Treonina (Thr)	T	$C_4H_9NO_3$	
Triptófano (Trp)	W	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	
Serina (Ser)	S	$C_3H_7NO_3$	

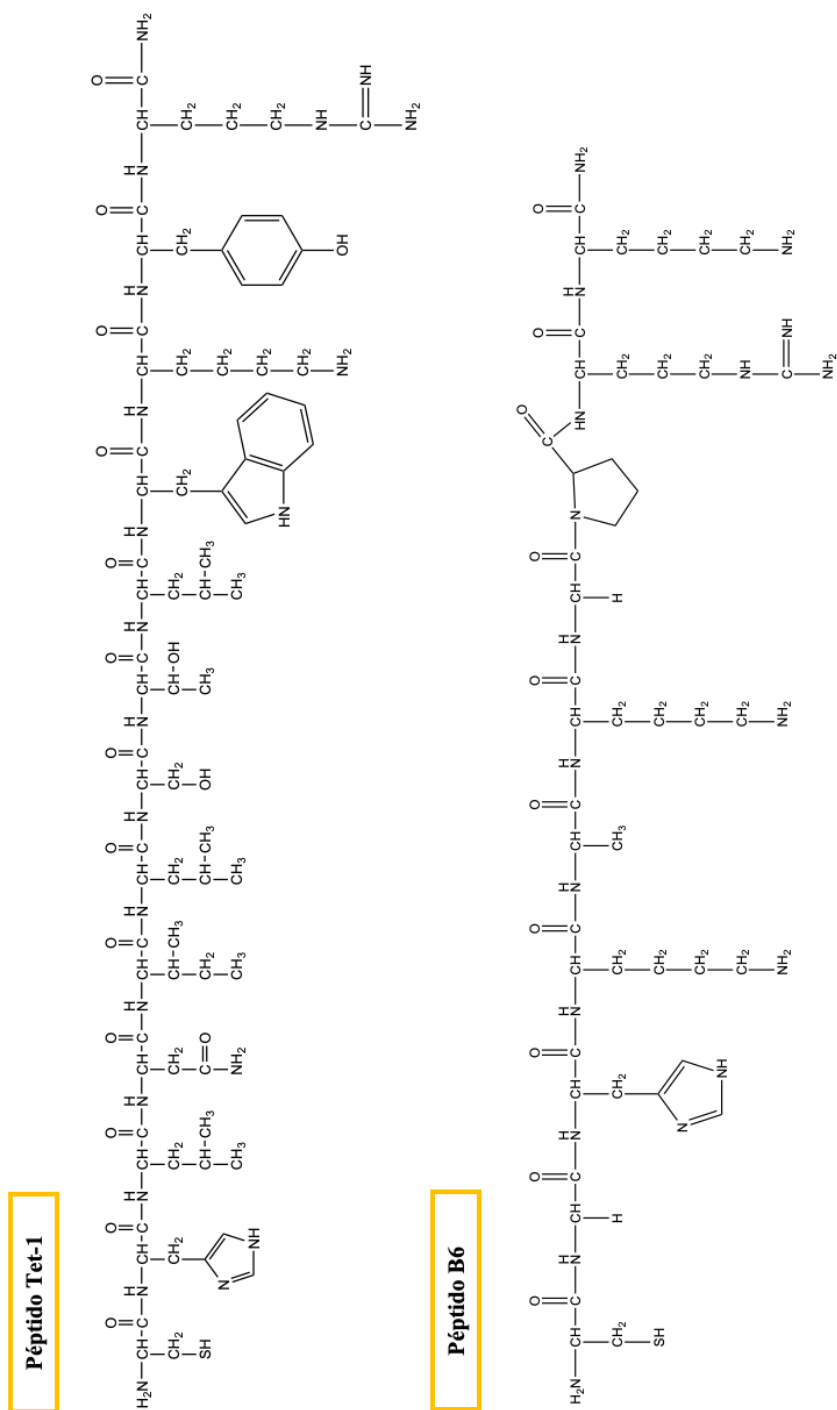


Figura 11. Estructura química de los CPPs Tet-1 y B6.

1. INTRODUCCIÓN

Hasta la fecha no se ha realizado ningún intento utilizando los CPPs Tet-1 o B6 para la funcionalización de compuestos destinados a la administración ocular de fármacos. Los polímeros conteniendo los CPPs empleados para la elaboración de NPs funcionalizadas se muestran en la **Figura 12**.

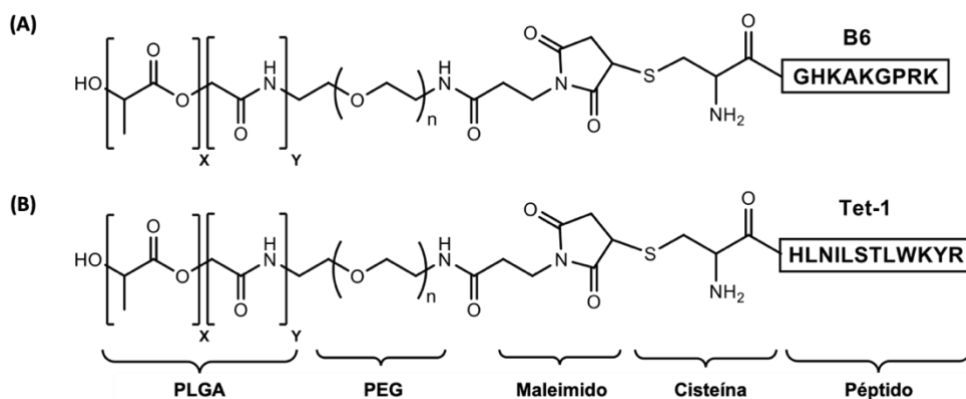


Figura 12. Polímeros utilizados para la obtención de NPs funcionalizadas con CPPs: (A) B6 y (B) Tet-1.

1.6. GELES DE FORMACIÓN *IN SITU*

Las vías usuales de administración ocular son tópica, subconjuntival, intracameral e intravítrea. En su mayoría, los trastornos del segmento anterior se tratan con gotas o ungüentos para los ojos, ya que son productos no invasivos y autoadministrables. Sin embargo, la eficacia de los tratamientos con colirios y pomadas es baja debido a la existencia de barreras oculares, incluidas las barreras de la córnea y la conjuntiva que cubren la superficie ocular, y el drenaje lagrimal, por lo que solo porcentajes inferiores al 5 % de los fármacos administrados llegan al humor acuoso (Wadhwa, Paliwal *et al.* 2009, Janagam, Wu *et al.* 2017). Se han investigado otras formas de dosificación oftálmica, como geles e insertos poliméricos, en un intento de extender el tiempo de residencia ocular de los medicamentos para aplicación tópica en ojo (Gratieri, Gelfuso *et al.* 2011); el tiempo de contacto de la córnea se ha incrementado en grados variables por estas formas de dosificación, sin embargo, no se han aceptado completamente, debido a la visión borrosa (ungüentos) o a la falta de cumplimiento por parte del paciente (insertos).

No obstante, para tratar las inflamaciones oculares, la terapia local resulta más favorable que las terapias sistémicas (oral o intravenosa), debido a que la cantidad y velocidad de eliminación de los fármacos tópicos, son mucho menores en comparación con la administración sistémica, ya que la cantidad de vasos y flujo del ojo es pequeña en comparación con el sistema circulatorio sanguíneo de todo el cuerpo. Además, la presencia de la barrera ocular hematoacuosa, limita la penetración del fármaco desde la circulación sistémica al segmento anterior del ojo.

1. INTRODUCCIÓN

La formulación de las NPs funcionalizadas y cargadas con fármaco en un vehículo acuoso adecuado, tienen la ventaja de que se aplica en forma líquida al igual que las soluciones de gotas para los ojos, evitando, como ya se mencionó, las molestias asociadas a la aplicación de preparados viscosos como los ungüentos, que conducen a una visión borrosa total si se administran correctamente.

Para superar el problema de la visión borrosa y la escasa biodisponibilidad de los fármacos, se ha sugerido el uso de sistemas basados en el concepto de sistema de respuesta ambiental (geles de formación *in situ*), basándose en la conversión de una formulación de gotas oftálmicas líquidas a un gel viscoelástico tras la administración ocular (**Tabla 4**), resultando en una mayor biodisponibilidad de los fármacos (Kumar, Haglund *et al.* 1994). Los estímulos que inducen diversas respuestas para provocar la gelificación incluyen *estímulos físicos*, como cambios de temperatura, campos eléctricos, luz, presión, sonido y campos magnéticos; *estímulos químicos*, como cambios en el pH y activación de iones de fluidos biológicos; y *estímulos biológicos o bioquímicos*, como cambios en el nivel de glucosa. Sin embargo, para provocar la gelificación en el entorno precorneal de los sistemas de administración de fármacos oftálmicos, solo se utilizan estímulos de cambios de pH, el contenido iónico o la temperatura, para lo cual se necesita una adecuada selección del polímero a usar.

Los polímeros usados para estos sistemas de gelificación exhiben transiciones de fase reversibles. Por su parte, los hidrogeles son polímeros dotados de la capacidad de hincharse en agua o disolventes acuosos e inducir una transición líquido-gel.

Los derivados del ácido poli (acrílico) ligeramente reticulados con propiedades de gelificación *in situ* activadas por el pH, tales como Carbopol[®], ya han sido explotados comercialmente como excipientes farmacéuticos. Sin embargo, debido a su naturaleza aniónica, es probable que los diferentes tipos de Carbopol[®] tengan una utilidad limitada para los fármacos catiónicos, que pueden formar complejos insolubles que conducen a la separación de fases. Por lo tanto, existe una clara necesidad en el desarrollo de sistemas gelificantes *in situ* basados en polímeros no iónicos, en los que las propiedades gelificantes no se vean afectadas por la complejación con fármacos iónicos.

Los copolímeros tribloque de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO), disponibles comercialmente como Pluronic[®], son materiales no iónicos, solubles en agua que han atraído mucho interés como excipientes farmacéuticos. Estos polímeros tienen un carácter anfifílico, presentan propiedades tensioactivas y son capaces de interactuar con superficies hidrófobas y membranas biológicas (Al Khateb, Ozhmukhametova *et al.* 2016). También se sabe que son capaces de formar geles *in situ* en respuesta al aumento de temperatura y, debido a que estos compuestos son transparentes, no interfieren con la visión normal, por lo tanto, son más adecuados para aplicaciones en oftalmología. Estos hidrogeles son líquidos a temperatura ambiente (20 – 25 °C) y forman gel en contacto con fluidos corporales (35 – 37 °C), debido al aumento de temperatura. El uso de biopolímeros cuya transición de sol a gel se desencadena por un aumento de la temperatura es una forma atractiva de abordar la formación de gel *in situ* (Ruel-Gariépy and Leroux 2004). Los polímeros termosensibles tienen una menor temperatura crítica del disolvente

1. INTRODUCCIÓN

(LCST) y se contraen cuando se calientan por encima de esta temperatura. La LCST es una temperatura por debajo de la cual los componentes de la mezcla son miscibles en todas las proporciones. La temperatura crítica ideal para este sistema es la temperatura ambiente y fisiológica para que la transición de fase no requiera ninguna fuente externa de calor que no sea el calor corporal. La temperatura de gelificación de los copolímeros se puede determinar midiendo la temperatura a la que se observa por primera vez la inmovilidad del menisco en cada solución. El Pluronic® F-127 es un polímero con una viscosidad de solución que aumenta cuando su temperatura se eleva hasta la temperatura del ojo (35 °C aproximadamente).

Los sistemas de administración de fármacos *in situ* tienen varias ventajas tales como la reducción de la frecuencia de administración y la mejora de la adherencia del paciente, ya que constituye una interesante alternativa para lograr una concentración plasmática efectiva, que es la principal ventaja en comparación con los sistemas de entrega convencionales de fármacos. Además, el sistema de gelificación *in situ* ofrece una precisión de dosis, así como la prolongación del tiempo de residencia del fármaco en contacto con la membrana mucosa, disminuyendo la pérdida del fármaco, superando así los problemas propios de las formas de dosificación semisólidas.

La incorporación de NPs funcionalizadas en geles de formación *in situ* es una combinación sinérgica (**Figura 13**) para alcanzar la concentración terapéutica y provocar la respuesta farmacológica

deseada, originando una liberación más continua y prolongada, evitando el «efecto de estallido» propio de las NPs (liberación rápida del fármaco) (Correa, Grosskopf *et al.* 2021), durante las primeras horas (**Tabla 4**). Esta estrategia es un enfoque novedoso para el manejo de la enfermedad inflamatoria, ya que el producto se administra cómodamente en forma líquida y al gelificar en la superficie ocular, favorece la biodisponibilidad intraocular del activo, constituyendo una herramienta terapéutica casi ideal para el tratamiento de una variedad de trastornos oculares.

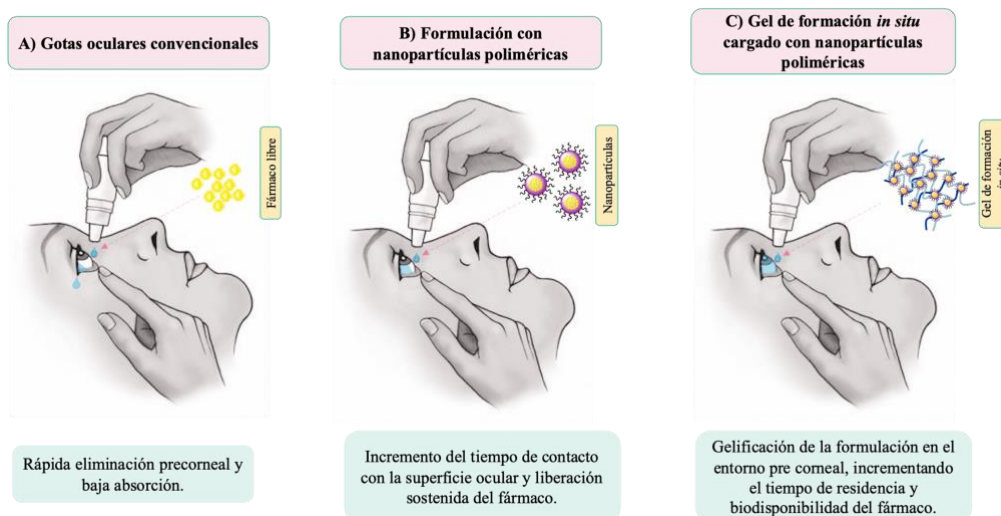


Figura 13. Estrategias de administración ocular tópica.

Tabla 4. Geles de formación *in situ* cargados con nanoportadores.

Molécula cargada	Matriz del nanoportador	Polímeros sensibles	Estímulo de gelificación	Resultado sinérgico	Referencia
Amfotericina B y lactoferrina	PLGA-PEG-PEI	Poloxamer 188 y poloxamer 407	Temperatura (34 °C)	Aumento de la permeabilidad corneal y liberación a largo plazo de moléculas bioactivas. Mejora el perfil farmacocinético y farmacodinámico <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	(Elhabal, Ghaffar <i>et al.</i> 2023)
Eritromicina	Soluplus® y Kolliphor® HS 15	Carbopol® 934P	pH	Incremento de la permeabilidad corneal. Liberación prolongada del fármaco y mayor penetración en ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	(Sipos, Budai-Szűcs <i>et al.</i> 2022)
Flurbiprofeno	Compritol® 888 ATO y Miglyol® 812	Poloxamer 188 y poloxamer 407	Temperatura (entre 28,5 °C ± 0,4 y 32,8 °C ± 0,9)	Incremento de la biodisponibilidad, mucoadhesión oftálmica y las propiedades de penetración del fármaco.	(Wu, Feng <i>et al.</i> 2022)
Brinzolamida	Monoestearato de glicerilo y aceite de soja	Carboximetil quitosano y poloxamer 407	Dual: pH y temperatura	Aumento de la permeabilidad transcorneal, 4,54 veces mayor que las gotas oculares comercializadas. Liberación prolongada del fármaco de más de 24 h en ensayos <i>in vitro</i> .	(Chakole, Sahoo <i>et al.</i> 2022)

Molécula cargada	Matriz del nanoportador	Polímeros sensibles	Estímulo de gelificación	Resultado sinérgico	Referencia
Clorhidrato de moxifloxacina	Capmul® MCM C8	HPMC 15 cps, HPMC K4M	Temperatura (entre 31,1 y 33,4 °C)	Aumento del tiempo de retención en el sitio de aplicación y liberación sostenida del fármaco hasta por 12 h.	(Prajapati, Patel <i>et al.</i> 2021)
Aceite de cúrcuma Zedoaria	MCT, miristato de isopropilo, aceite de soja y aceite de ricino	Poloxamer 407 y Poloxamer188	Temperatura (27,4 °C)	Formulación no irritante e incremento de fijación del fármaco en el ojo.	(Wang, Gu <i>et al.</i> 2021)
Clorhidrato de betaxolol	Niosomas de Span® 40 y colesterol	Carbopol® 934P y HEC	pH	Aumento de la biodisponibilidad en comparación con las gotas oculares comercializadas y mejora de la residencia ocular.	(Allam, Elsbahy <i>et al.</i> 2021)
Levofloxacino y acetato de prednisolona	PLGA	Quitosano y gelatina	Temperatura (34,3 °C ± 0,3)	Liberación sostenida de ambos fármacos durante 7 días en ensayos <i>in vitro</i> .	(Cheng, Chang <i>et al.</i> 2021)
Travoprost	Lecitina y colesterol	Goma gellan y Carbopol® 934	Temperatura (35 °C ± 0,5)	Mejora la biodisponibilidad (mayor concentración del fármaco en el humor acuoso) en comparación con el producto comercializado. Efecto terapéutico prolongado del gel en comparación con la formulación de liposomas.	(Shukr, Ismail <i>et al.</i> 2021)

Molécula cargada	Matriz del nanoportador	Polímeros sensibles	Estímulo de gelificación	Resultado sinérgico	Referencia
Dexametasona	Lecitina de soja	Poloxamer 188, Poloxamer 407 y PCP	Temperatura (33,2 °C)	Mejora la bioadhesión del fármaco en la córnea y su liberación sostenida. Mayor biodisponibilidad en la farmacocinética <i>in vivo</i> .	(Wen, Jia <i>et al.</i> 2021)
Tartrato de brimonidina	PLGA y succinato de polietilenglicol de vitamina E	Poloxamer 407	Temperatura	Mejora la residencia precorneal y liberación sostenida del fármaco en comparación con la formulación comercializada.	(Sharma, Sandal <i>et al.</i> 2021)
Tranilast	2-hidroxipropil-β-ciclodextrina	MC SM-4	Temperatura (37 °C)	Prolongación del tiempo de contacto precorneal y preconjuntival del fármaco e incremento de su concentración en córnea y conjuntiva.	(Nagai, Minami <i>et al.</i> 2020)
Ciprofloxacino	Fitantriol y Lutrol F127	Quitosan	Temperatura	Incremento de la penetración ocular, el tiempo de retención y la actividad del fármaco (2,54 veces) en comparación con la formulación comercializada.	(Alharbi and Hosny 2020)
Atorvastatina	PLGA recubierto con quitosano	Pluronic® F127 e HPMC	Temperatura (35,17 °C y 36,93 °C)	Formulación no irritante e incremento de la permeabilidad y tiempo de retención del fármaco en córnea.	(Arafa, Girgis <i>et al.</i> 2020)

Molécula cargada	Matriz del nanoportador	Polímeros sensibles	Estímulo de gelificación	Resultado sinérgico	Referencia
Fluorometolona	PLGA	Poloxamer 407 y MC	Temperatura (34 °C)	Mejora la retención precorneal, la biodisponibilidad y actividad del fármaco.	(Gonzalez-Pizarro, Carvajal-Vidal <i>et al.</i> 2019)
Acetónido de triamcinolona	Compritol® 888 ATO y monoestearato de glicerilo	Goma gellan	Iónico	Incremento del tiempo de residencia precorneal y administración sostenida del fármaco en los tejidos oculares del segmento anterior y posterior.	(Tatke, Dudhipala <i>et al.</i> 2018)
Dexametasona	Lipídica	Pluronic® F127 y F68	Temperatura (34,4 °C)	Aumento de biodisponibilidad y permeación corneal.	(Mo, Ban <i>et al.</i> 2018)
Natamicina	Niosomas de Span® 60 y colesterol	Poloxamer 407 e HPMC K4M	Temperatura (36,2 °C ± 2,12)	Incremento del tiempo de retención corneal y liberación prolongada del fármaco hasta 24 h en comparación con la formulación comercializada. Mejora la permeabilidad transcorneal.	(Paradkar and Parmar 2017)
5-Fluorouracilo	Quitosan	Conjugados de amonio cuaternario con quitosan	Temperatura (30 – 35 °C)	Incremento de la biodisponibilidad y liberación sostenida del fármaco.	(Fabiano, Bizzarri <i>et al.</i> 2017)

HEC: Hidroxietil celulosa; **HPMC:** Hidroxipropilmetilcelulosa; **MC:** Metilcelulosa; **MCT:** Triglicéridos de cadena media; **PLGA:** Ácido poli láctico-*co*-glicólico; **PEG:** polietilenglicol; **PEI:** Polietilen imina; **PCP:** Policarbofil.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HYPOTHESIS

Lico-A, a natural compound isolated from the root of *Glycyrrhiza glabra* L., shows suitable anti-inflammatory activities against ocular inflammation, but its extremely low water solubility, hinders ocular bioavailability after administration as conventional eye drops. In addition, the barriers of the eye make it difficult for the drug to penetrate through the cornea, so less than 5 % of the initial drug amount administered is able to reach inner ocular tissues, being the most part eliminated by lacrimal turnover.

Nanotechnology drug delivery systems constitutes a suitable approach for active compounds encapsulation and their delivery into target sites, maximizing drug efficacy, reducing side effects and improving patient compliance. Functionalization of PLGA NPs surface with CPPs increases their transport across physiological barriers and facilitates eye cell internalization. Among these systems, cationic CPPs, such as Tet-1 (with affinity for the ganglioside GT1b receptor present in the eye) and B6 (with high affinity for transferrin receptor) are suitable candidates for ocular drug delivery. The present research is based on the hypothesis that the incorporation of Lico-A in PLGA nanoparticles functionalized with CPPs could improve ocular drug bioavailability.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.2. OBJECTIVES

The **main objective** of this research was the development, physicochemical characterization, and biopharmaceutical behaviour evaluation of biodegradable polymeric nanostructured systems containing Lico-A for the treatment of ocular inflammatory disorders. The ocular safety and therapeutic efficacy in the treatment or prevention of inflammatory eye diseases were also evaluated.

The **specific objectives** of this study were as follows:

- To optimize, by design of experiments (DoE), and characterize the physicochemical properties of polymeric biodegradable PLGA nanoparticles, prepared by the solvent displacement method.
- To synthesize and conjugate the CPPs (Tet-1 and B6) to Lico-A-loaded maleimide-PEG-PLGA nanoparticles.
- To determine the biopharmaceutical behaviour of functionalized Lico-A PLGA NPs, analysing the *in vitro* drug release profile.
- To stabilize functionalized Lico-A PLGA NPs through freeze-dried.
- To evaluate the ocular safety of Lico-A PLGA NPs by *in vitro* (HET-CAM[®] and Alamar Blue[®]) and *in vivo* (Draize test) assays.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- To determine the ocular anti-inflammatory efficacy of the developed PLGA NPs by means of *in vitro* (cell culture) and *in vivo* assays, in a rabbit eye inflammatory model, induced by sodium arachidonate.
- To develop *in-situ* forming gels, containing functionalized Lico-A-loaded NPs: morphometrical and rheological characterization.

3. RESULTADOS

Los resultados derivados de la realización del presente trabajo de investigación, han dado lugar a dos artículos científicos, publicados en revistas de gran prestigio, los cuales se presentan a continuación:

- 3.1. Development of peptide targeted PLGA-PEGylated nanoparticles loading Licochalcone-A for ocular inflammation. *Pharmaceutics* (2022), **14** (2): 285. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020285>

- 3.2. Cell penetrating peptides-functionalized Licochalcone-A-loaded PLGA nanoparticles for ocular inflammatory diseases: Evaluation of *in vitro* anti-proliferative effects, stabilization by freeze-drying and characterization of an *in-situ* forming gel. *International Journal of Pharmaceutics* (2023), **639**: 122982. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122982>

3.1. Development of peptide targeted PLGA-PEGylated nanoparticles loading Licochalcone-A for ocular inflammation

Ruth Galindo, Elena Sánchez-López, María José Gómara, Marta Espina, Miren Ettcheto, Amanda Cano, Isabel Haro, Antoni Camins and María Luisa García.

Pharmaceutics 2022, 14(2): 285

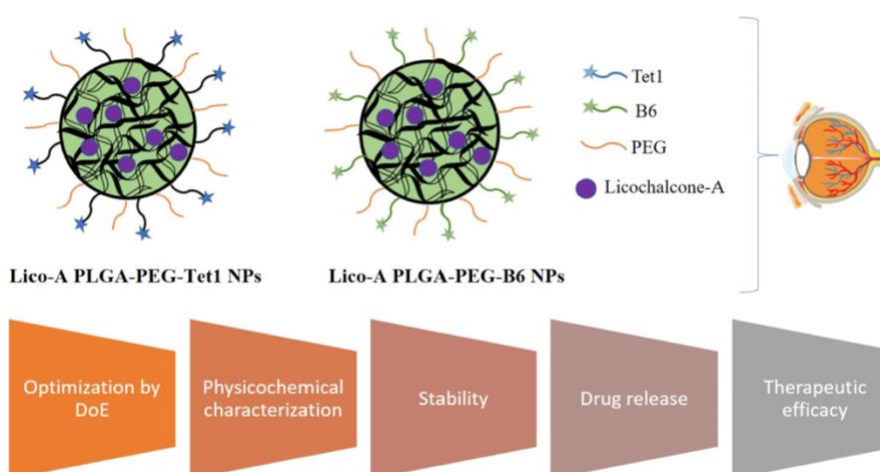
Doi: 10.3390/pharmaceutics14020285

Impact factor (JCR): 6.525

Rank: 39/279 Pharmacology and Pharmacy (Q1)

MDPI (ISSN: 1999-4923)

Graphical Abstract





Article

Development of Peptide Targeted PLGA-PEGylated Nanoparticles Loading Licochalcone-A for Ocular Inflammation

Ruth Galindo ^{1,2,†}, Elena Sánchez-López ^{1,2,3,4,*,†}, María José Gómara ², Marta Espina ^{1,3}, Miren Ettcheto ^{4,5}, Amanda Cano ^{1,3,4}, Isabel Haro ², Antoni Camins ^{4,5,†} and María Luisa García ^{1,3,4,†}

¹ Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; ruth.galindo@ub.edu (R.G.); m.espina@ub.edu (M.E.); acanofernandez@ub.edu (A.C.); marisagarcia@ub.edu (M.L.G.)

² Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides, IQAC-CSIC, 08034 Barcelona, Spain; mjgpp@cid.csic.es (M.J.G.); isabel.haro@iqac.csic.es (I.H.)

³ Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

⁴ Biomedical Research Networking Centre in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), 28031 Madrid, Spain; mirenetcheto@ub.edu (M.E.); camins@ub.edu (A.C.)

⁵ Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

* Correspondence: esanchezlopez@ub.edu

† These authors contribute equally to this work.



Citation: Galindo, R.; Sánchez-López, E.; Gómara, M.J.; Espina, M.; Ettcheto, M.; Cano, A.; Haro, I.; Camins, A.; García, M.L. Development of Peptide Targeted PLGA-PEGylated Nanoparticles Loading Licochalcone-A for Ocular Inflammation. *Pharmaceutics* 2022, 14, 285. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020285>

Academic Editor: Uday B. Kompella

Received: 23 December 2021

Accepted: 20 January 2022

Published: 26 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Licochalcone-A is a natural compound with anti-inflammatory properties. However, it possesses low water solubility, making its application for the treatment of ocular inflammation difficult. To overcome this drawback, biodegradable nanoparticles incorporating Licochalcone-A have been developed. Additionally, to avoid fast clearance and increase cellular internalization into the ocular tissues, PLGA nanoparticles have been functionalized using PEG and cell penetrating peptides (Tet-1 and B6). To optimize the formulations, a factorial design was carried out and short-term stability of the nanoparticles was studied. Moreover, morphology was also observed by transmission electron microscopy and in vitro drug release was carried out. Ocular tolerance of the formulations was ensured in vitro and in vivo and anti-inflammatory therapeutic efficacy was also assessed. Surface functionalized nanoparticles loading Licochalcone-A were developed with an average size below 200 nm, a positive surface charge, and a monodisperse population. The formulations were non-irritant and showed a prolonged Licochalcone-A release. Despite the fact that both Licochalcone-A Tet-1 and B6 functionalized nanoparticles demonstrated to be suitable for the treatment of ocular inflammation, B6 targeted nanoparticles provided greater therapeutic efficacy in in vivo assays.

Keywords: Licochalcone-A; nanoparticles; ocular inflammation; cell-penetrating peptides; PLGA

1. Introduction

One of the most prevalent conditions in ophthalmology is ocular inflammation. This inflammation constitutes the local response of ocular tissues and annexes against an external or internal insult. Moreover, this process may be able to produce irreversible damage to the ocular function [1]. The inflammation process triggers the production of growth factors and cytokines and stimulates the enzyme phospholipase A2 (PLA2), which leads to the synthesis of eicosanoids from a phospholipid found in cell membranes, arachidonic acid (AA). AA can stimulate the production of pro-inflammatory cytokines and initiate apoptosis. Moreover, AA-derived eicosanoids regulate immunopathological and inflammatory processes through different physiological responses, vascular homeostasis, and platelet aggregation [2].

For the treatment of ocular inflammation, non-steroidal anti-inflammatory drugs as well as corticoids are currently used. However, both cause several adverse effects [3]. In

this area, research on novel approaches avoiding side effects constitutes an unmet medical need. In this sense, Licochalcone-A (Lico-A) is a characteristic chalcone isolated from the root of *Glycyrrhiza inflata*, which has been used in traditional medicine to treat various disorders such as gastric ulcer, bronchial asthma, and inflammation [4]. The biological properties of Lico-A include antiparasitic, antiproliferative, antitumoral, antimicrobial, antiviral, osteogenic, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities [5,6]. Moreover, Lico-A exhibits a carrageenan-induced anti-inflammatory effect in a murine model [6]. Despite the suitable properties of Lico-A against ocular inflammation, its solubility in water is extremely low, making its topical administration as conventional eye-drops difficult [7,8]. Moreover, it has also been reported that less than 5% of conventional ocular formulations are able reach inner ocular tissues [9].

In order to overcome these problems, nanotechnological drug delivery constitutes a suitable approach for active compounds encapsulation and their delivery into target sites [10–12]. Controlled administration of drugs, specially at the ocular level, can offer enormous benefits, including maximizing drug efficacy, minimizing side effects, and improving patient compliance [13,14].

Nanocarriers, such as nanoparticles (NPs), with sizes ranging between 10 and 1000 nm are of particular interest as drug delivery platforms for treating ocular diseases [15]. Among several carriers, biodegradable polymeric nanoparticles provide several advantages, such as protect the drug from inactivation by enzymes present in the tear film or corneal epithelium, facilitate transcorneal penetration, prolong its stability in the precorneal area, and avoid adverse effects in other organs [1]. Among them, biodegradable polymers such as poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) have been widely used to produce NPs due to their biodegradability, biocompatibility, and mechanical resistance. In addition, PLGA is also approved by the Food and Drug Administration (FDA) for its use in various biomedical applications, such as absorbable sutures and implants, as well as for the development of sustained release systems [16,17]. Furthermore, compared to natural polymers, these synthetic polymers show greater reproducibility, are easier to formulate, and allow the control and prediction of degradation kinetics [18].

In addition, PLGA nanocarriers can be functionalized on their surface and targeted towards specific cells or ocular structures, increasing their transport across physiological barriers with a sustained and controlled release over time and reducing adverse effects of drugs [19,20]. PLGA nanocarriers minimize drug degradation and increase its half-life inside the target organ thus improving its efficacy and safety [21]. However, PLGA suffers from fast elimination in body tissues [22]. In order to overcome this problem, PEGylation is one of the most suitable approaches. Therefore, encapsulation of active compounds into poly(ethylene glycol) (PEG)-coated NPs offers the possibility to increase the transport across biological layers and increase drug protection against degradation [23].

Furthermore, during recent years, functionalization of NPs using cell-penetrating peptides (CPPs) has emerged as a new technology to facilitate the internalization of macromolecules and drugs in ocular cells, constituting a revolutionary approach due to their high transduction efficiency and low cytotoxicity [24,25]. CPPs are peptide sequences between 5 and 30 amino acids (AA) long with the ability to be internalized in the cell [26,27]. Among the different types of CPPs, cationic CPPs possess a highly positive surface charge due to their sequence rich in arginine residues (Arg) [28]. In this area, one of the most novel approaches is peptide functionalization of PLGA NPs by coupling selected CPPs to the NPs surface increasing cellular internalization. Among several peptides, Tet-1 and B6 were selected as suitable candidates for ocular drug delivery (Figure S1). Tet-1 is a 12-AA peptide, with the sequence HLNILSTLWKYR, which has the binding characteristics of tetanus toxin, can interact specifically with motor neurons, and is capable of retrograde delivery in the neuronal tissues due to its affinity to ganglioside GT1B receptor [29–31]. Therefore, Tet-1 peptide might increase cellular internalization also on the ocular tissues due to the presence of ganglioside receptors in this organ [30–33]. Moreover, a peptide showing high affinity to transferrin receptor (GHKAKGPRK, namely B6) has been described to increase transport

across the BBB [20,34]. Since ocular tissues, and more specifically, corneal layers, have been reported to possess transferrin receptors, hereby, we postulate that B6 targeting may also be useful for ocular drug delivery [35–37]. To our knowledge, to date no attempt has been carried out using Tet-1 or B6 CPPs for surface functionalization aimed at ocular drug delivery.

Therefore, the main goal of this study was the entrapment of Lico-A inside surface functionalized Tet-1 or B6 PLGA-PEG NPs for ocular administration. PLGA NPs, synthesized by the solvent displacement method, were optimized using the design of experiments (DoE) approach, analyzing their physicochemical properties and stability. Subsequently, the study of drug release, ocular tolerance, and *in vivo* therapeutic efficacy of Lico-A PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG-Tet1 NPs, and Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs was carried out.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The active compound Lico-A was obtained from Amadis Chemical (Hangzhou, China) and the polymer PLGA 50:50 Resomer[®] RG 503 H, 34 KD, from Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany). Maleimide-PEG-NH₂ (5KDa) was from Jenkem (Beijing, China). NovaSyn TGR resin and 9-fluorenyl-methoxycarbonyl (Fmoc) protected amino acids were purchased from Novabiochem (Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Peptide-synthesis-grade dimethylformamide (DMF) and trifluoroacetic acid (TFA) were obtained from Scharlau (Barcelona, Spain). HPLC-grade acetonitrile and acetone were purchased from Fisher Scientific (Loughborough, UK). The coupling reagent, 2-(1H-7-azabenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetra-methyluronium hexafluorophosphate methanaminium (HATU) was from Genscript (Piscataway, NJ, USA). Diisopropylethylamine (DIPEA), piperidine, triisopropylsilane (TIS), 2-mercaptoethanol, *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethyl sulfoxide-d₆ (DMSO-d₆), and sodium arachidonic acid (SA) were purchased from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Methanol and diethyl ether were purchased from Merck (KGaA, Darmstadt, Germany). Water filtered through the Millipore[®] MilliQ system was used for all experiments and the other chemicals and reagents used in the study were of analytical grade.

2.2. Preparation of Licochalcone-A PLGA Nanoparticles

For the elaboration of Lico-A PLGA NPs, the solvent displacement method was used [38,39]. Briefly, this technique consists of the preparation of two phases, namely organic and aqueous phases. First, 80 mg of PLGA Resomer[®] RG 503 H and 10 mg of the drug Lico-A were dissolved in 5 mL of acetone (volatile organic solvent). Subsequently, this solution was dispersed dropwise, under moderate mechanical stirring, in 10 mL of the aqueous phase containing Tween 80; this process was carried out at room temperature. Afterwards, the organic solvent was evaporated from the suspension under reduced pressure using a rotary evaporator.

2.3. Physicochemical Characterization of Licochalcone-A PLGA Nanoparticles

In order to measure the physicochemical properties of Lico-A PLGA NPs, average size (Z_{av}), polydispersity index (PI), zeta potential (ZP), and entrapment efficiency (EE) were determined.

Z_{av} and PI were placed in disposable cells (Malvern Instruments) and measured by photon correlation spectroscopy (PCS), after a 1:10 dilution with MilliQ[®] water, using the Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) at 25 °C. The surface charge of the particles was evaluated by means of ZP and determined by laser-Doppler electrophoresis with the M3 PALS system in a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) [29].

EE was determined indirectly by measuring the non-entrapped Lico-A. The non-loaded drug was separated from NPs by ultracentrifugation at 4 °C and 25,000 rpm for

3. RESULTADOS

25 min, using a Beckman Optima[®] Ultracentrifuge (Indianapolis, IN, USA), and the EE was evaluated according to Equation (1) [30].

$$EE (\%) = \frac{\text{total amount of Lico - A} - \text{free amount of Lico - A}}{\text{total amount of Lico - A}} \times 100 \quad (1)$$

Quantification of Lico-A in the aqueous phase was performed by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) using a method described elsewhere [40,41]. HPLC Waters 2695 separation module (Waters, Milford, MA, USA) and a Kromasil[®] C18 column (5 μm , 150 \times 4.6 mm) (Teknokroma Analitica, Barcelona, Spain) were employed. Moreover, two mobile phases were used consisting of a water phase containing 0.2% acetic acid and an organic phase consisting of acetonitrile. A gradient was applied at 1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ (during the first 10 min an initial 35% mobile phase B was used until 100% mobile phase B, maintaining this percentage for 7 min more, and after that it was progressively modified for 5 min until 100% of mobile phase A). For the calibration curve, a concentration range from 10 to 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was used. Agilent 1260 Infinity Variable Wavelength Detector VL standard version at a wavelength of 254 nm was utilized to identify Lico-A and data were handled using Empower 3[®] Software. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated as described elsewhere being 2.48 and 8.27 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ [42].

2.4. Optimization of Licochalcone-A PLGA Nanoparticles

Optimization of Lico-A PLGA NPs was carried out prior to CPP addition by means of the Design of Experiments (DoE) approach. A 2³ central composite factorial design was carried out (Table 1) using StatGraphics Centurion XV, to analyze the effects of the independent variables over the dependent variables [43]. A total of 16 experiments were carried out by triplicate, with varying concentrations of drug (Lico-A), surfactant (Tween 80), and polymer. The effects of these variables on the dependent variables Z_{av}, PI, ZP, and EE were studied.

Table 1. Matrix of the factorial design.

Variables	Coded Levels				
	−1.68	−1.00	0.00	1.00	1.68
Lico-A (mg/mL)	0.16	0.50	1.00	1.50	1.80
PLGA (mg/mL)	4.16	4.50	5.00	5.50	5.84
Tween 80 (%)	0.46	0.60	0.80	1.00	1.14

2.5. Short-Term Stability of Licochalcone-A PLGA Nanoparticles

The stability of Lico-A PLGA NPs stored at 4, 25, and 38 °C was studied by analyzing light backscattering (BS) profiles by means of Turbiscan[®] Lab (Formulation, Toulouse, France) [44]. For this purpose, 20 mL of Lico-A PLGA NPs were introduced into a glass measurement cell. The light source was a pulsed near infrared light source ($\lambda = 880 \text{ nm}$) and it was detected by a BS detector at an angle of 45° from the incident beam. BS data were obtained scanning the sample every hour during 24 h. The mean results of each month were plotted and BS profiles were compared monthly at each temperature.

2.6. Synthesis of Cell Penetrating Peptides

CPPs, Tet-1, and B6 (Figure S1) were selected based on their high affinity for cell receptors and were synthesized by manual solid phase synthesis following a 9-fluorenylmethoxycarbonyl/tbutyl (Fmoc/tBut) orthogonal protection strategy [45]. The C-terminal amino acid (AA) remains anchored to a resin (NovaSyn TGR 0.19 meq/g for Tet-1 and 0.22 meq/g for peptide B6) bound by its carboxyl group while the peptide is synthesized by elongating the chain at the N-terminal end. Amino acid side-chain

protection was carried out using the following compounds: triphenylmethyl (Trt) for asparagine and histidine; tert-butyl (tBu) for serine, threonine, and tyrosine; 2,2,5,7,8-pentamethyl-chroman-6-sulfonyl (Pmc) for arginine and tert-butoxycarbonyl (Boc) for lysine and tryptophan. A residue of Fmoc-S-triphenylmethyl-L-cysteine (Fmoc-Cys(Trt)-OH) was incorporated at the N-terminal end of both peptides, Tet-1 and B6, for their conjugation to the polymer. Sequential incorporation of the Fmoc-L-amino acids is accomplished through a series of coupling and deprotection steps. The coupling reactions were performed using three-fold molar excesses of the amino acid derivatives activated by treatment with HATU and DIPEA throughout the synthesis. The Fmoc deprotection was accomplished twice with 20% (v/v) piperidine in DMF for 10 min. All coupling and deprotection steps were checked by the ninhydrin test for primary amines, or the chloranil test for secondary amino groups. Finally, peptides were cleaved from the solid support by means of treatment with TFA/TIS/H₂O/2-mercaptoethanol (94:2.5:2.5:1) (v/v) for 5 h. The TFA was evaporated under N₂ flow. Diethyl ether was added to precipitate the crude peptides, which were isolated by centrifugation. The precipitates were dissolved in acetic acid 10%, frozen in a dry ice/acetone bath, and lyophilized. The peptides were stored in an argon environment to avoid their possible oxidation. Peptides were characterized by Ultra performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (UPLC-MS) on Waters ACQUITY UPLC (Waters Corporation, Milford, MA, USA) with the column ACQUITY UPLC BEH C18 (RP, 2.1 × 100 µm, particle size 1.7 µm) with both a UV-Vis detector and an electrospray ionization mass spectrometer (ESI-MS) Waters LCT Premier XE (Micromass Waters, Milford, MA, USA).

2.7. Conjugation of PEG and Cell Penetrating Peptides (CPPs) to the Polymer and Preparation of Lico-A PLGA-PEG-CPP NPs

In order to functionalize PLGA (Figure 1), first the PLGA-NHS polymer was synthesized, for which the equivalent of 32.3 µmol of PLGA 50:50 Resomer[®] RG 503 H (inherent viscosity 0.32–0.44 dL/g) was weighed out and dissolved in 2 mL of chloroform. Subsequently, 234.6 µmol of NHS and the same equivalents of EDC were added and the mixture was left to react for between 16 and 24 h under continuous mechanical stirring in a hermetically sealed glass vial at room temperature. Once the PLGA-NHS was obtained, it was precipitated with cold diethyl ether and centrifuged at 4000 rpm for 10 min at room temperature. After removing the supernatant, the pellet was redissolved in 2 mL of chloroform and precipitated with cold diethyl ether. This dissolution–precipitation process was carried out in triplicate. The PLGA-NHS polymer obtained was dried using nitrogen gas (N₂) and lyophilized.

Subsequently the activated polymer was conjugated with maleimide-PEG-NH₂ and DIEA was used as the activator. The obtained PLGA-PEG-maleimide copolymer was lyophilized and stored at −20 °C.

The conjugation of the selected peptides to the PLGA-PEG-maleimide polymer was carried out by dissolving 2.7 µmol of each CPP in 250 µL of acetonitrile/DMF and was added later to a solution of 100 mg of dissolved PLGA-PEG-maleimide in 1 mL of chloroform. The reaction was left for 16–24 h under magnetic stirring at room temperature. The product was precipitated with 1 mL of cold ether:methanol (50:50) and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant was discarded, and the product was redissolved in 0.5 mL of chloroform. This cycle was repeated two additional times [11]. The final product was lyophilized and stored at −20 °C. Conjugation evaluation was carried out by proton nuclear magnetic resonance (1H-NMR) as previously described [19]. The PLGA-PEG-maleimide was dissolved in deuterated chloroform and the PLGA-PEG-peptide in dimethyl sulfoxide (DMSO)-d₆. The spectrum was recorded at 298 K on a Varian Inova 400 MHz spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). PLGA-PEG-CPP NPs containing Lico-A were prepared by the solvent displacement method as described in Section 2.2. The physicochemical properties of Lico-A PLGA-PEG-CPP NPs were determined as described in Section 2.3.

3. RESULTADOS

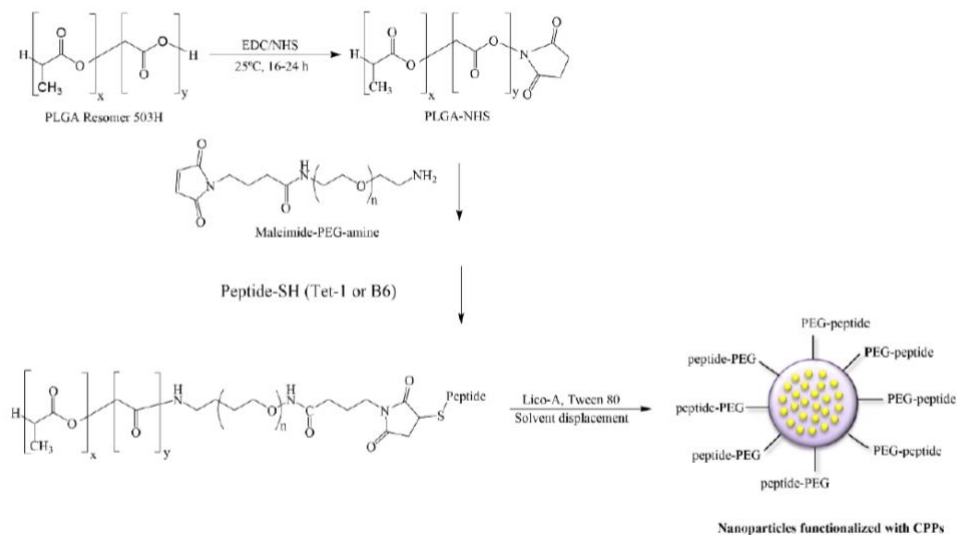


Figure 1. Conjugation of PEG and cell penetrating peptides (CPPs) to PLGA and preparation of Lico-A PLGA-PEG-CPP NPs.

2.8. Transmission Electron Microscopy of Licochalcone-A Functionalized Nanoparticles

Morphologies of Lico-A PLGA NPs, Lico-A-PLGA-PEG-Tet1 NPs, and Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs were studied by transmission electron microscopy (TEM) on a JEOL 1010 microscope (Akishima, Japan). To visualize the NPs, samples were previously diluted (1:5) and the Holey Carbon grids were activated with UV light. Samples were placed on the grid surface and negative staining was performed with uranyl acetate (2%) [46].

2.9. Drug Release of Licochalcone-A Functionalized Nanoparticles

The *in vitro* release profiles of Lico-A PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG-Tet1 NPs, and Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs from the polymeric matrix were determined by bulk-equilibrium direct dialysis [47]. Briefly, 9 mL of Lico-A NPs were placed in a dialysis bag (Medicell International Ltd. MWCO 12–14,000) and dialyzed against 150 mL of release medium. In order to accomplish sink conditions, release medium was composed of ethanol–water 75:25, at 32 °C (temperature of corneal surface) and 0.3 mL of samples were withdrawn at regular time intervals during 24 h [48]. Lico-A content was analyzed by HPLC as previously described. Moreover, the total volume of release medium was kept constant by replacement with fresh medium throughout the experiment.

2.10. Ocular Tolerance of Licochalcone-A Functionalized Nanoparticles

2.10.1. In Vitro Ocular Tolerance

In order to assess the *in vitro* ocular tolerance, the HET-CAM (hen’s egg–chorioallantoic membrane) test was developed as described in the INVITTOX protocol No. 15 [49,50]. This method is based on the observation of the irritating effects (hemorrhage, vasoconstriction, and coagulation) that may appear during the first five minutes after the application of 300 µL of the studied formulation on the chorioallantoic membrane (CAM) of a 10-day embryonated egg. These eggs were kept at a temperature of 12 ± 1 °C for at least 24 h before placing them in the incubator with controlled temperature (37.8 °C) and humidity (50–60%) during the days of incubation [46]. Free Lico-A (dissolved in DMF:PEG 400:MQ Water; 1:49:50), Lico-A PLGA NPs, and Lico-A PLGA-PEG-CPP NPs were evaluated. Controls

were created using SDS 1% (positive control for slow irritation), NaOH 0.1 N (positive control for rapid irritation), and NaCl 0.9% (negative control).

Data were analyzed by calculating the ocular irritation index (OII) by applying Equation (2) ($n = 3/\text{group}$).

$$\text{OII} = \frac{301 - H}{300} \times 5 + \frac{301 - V}{300} \times 7 + \frac{301 - C}{300} \times 9 \quad (2)$$

where H is the time in seconds in which the hemorrhage appears; V is the time in seconds in which vasoconstriction appears; C is the time in seconds in which coagulation appears.

According to the OII score, the products were classified into four categories as described elsewhere [44].

2.10.2. In Vivo Ocular Tolerance

In order to confirm the in vitro results, the primary eye irritation test of Draize et al. was used [46,51]. Young adult male albino New Zealand rabbits with an average weight of 2.5 kg housed in individual cages were used. Animals were maintained in controlled temperature (17–23 °C) and relative humidity (60–80%) conditions with food and water supplemented ad libitum. This test was carried out in accordance with the Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona and current legislation (Decree 214/97, Gencat). The products Lico-A PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs, and Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs were evaluated. Each product (50 µL) was instilled in the conjunctival sac of the right eye and a gentle massage was applied to ensure correct circulation of the sample. Readings were carried out 30 min after the application of the sample, using the left eye as a negative control ($n = 3/\text{group}$). OII was determined as previously described elsewhere [52].

2.11. Anti-Inflammatory Therapeutic Efficacy of Licochalcone-A Functionalized Nanoparticles

The ability of the developed formulations to revert to ocular inflammation was demonstrated in New Zealand rabbits. Therefore, Lico-A PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs, and Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs were evaluated in vivo in New Zealand rabbits [52].

In order to induce ocular inflammation, 50 µL of SA 0.5% (w/v) dissolved in PBS (pH 7.4) were instilled in the right eye. After 30 min of the induction of inflammation, 50 µL of each formulation (Lico-A PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs, and Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs or isotonic saline serum) were instilled in the conjunctival sac of the right eye, using the left eye as a control. Inflammation was evaluated 30 min after instillation of the formulations, and then at 60, 90, 120, 150, 180, and 210 min, according to a modified Draize scoring system [53,54]. Ocular inflammation score was calculated and expressed as mean \pm SD. Moreover, inhibition inflammation % was also calculated according to Equation (3):

$$\text{Inflammation inhibition (\%)} = \frac{C - T}{C} \times 100 \quad (3)$$

C = saline serum ocular inflammation (control group)

T = treated group ocular inflammation

2.12. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed by using one-way ANOVA with Tukey post hoc test. All analyzed data were presented as mean \pm SD. GraphPad Prism® 6.01 software was used to analyze the data.

3. Results and Discussion

3.1. Optimization and Characterization of Licochalcone-A PLGA NPs

In order to optimize the formulation, Lico-A PLGA NPs were prepared by solvent displacement technique and optimized by DoE, analyzing the effect of independent variables (drug, surfactant, and polymer concentrations) on the dependent variables (Z_{av} , PI, ZP,

3. RESULTADOS

and EE). The results obtained for different formulations of the central composite factorial design can be observed in Table 2.

Table 2. Results of the factorial design developed to optimize Lico-A NPs formulation.

Experiment Number	Independent Variables						Dependent Variables			
	Lico-A		PLGA		Tween 80		Z _{av} (nm)	PI	ZP (mV)	EE (%)
	Coded Level	mg/mL	Coded Level	mg/mL	Coded Level	%				
1	−1	0.5	−1	4.5	−1	0.6	130.6	0.103	−39.2	18.80
2	1	1.5	−1	4.5	−1	0.6	144.8	0.098	−36.3	55.43
3	−1	0.5	−1	4.5	1	1.0	126.7	0.091	−35.4	10.38
4	1	1.5	−1	4.5	1	1.0	130.4	0.088	−31.8	19.92
5	−1	0.5	1	5.5	−1	0.6	136.0	0.078	−32.7	30.04
6	1	1.5	1	5.5	−1	0.6	155.0	0.082	−33.4	61.72
7	−1	0.5	1	5.5	1	1.0	166.1	0.103	−33.8	7.02
8	1	1.5	1	5.5	1	1.0	143.5	0.079	−31.6	32.32
9	1.68	1.84	0	5.0	0	0.8	149.6	0.095	−31.7	59.53
10	−1.68	0.16	0	5.0	0	0.8	129.6	0.100	−37.8	35.55
11	0	1.0	0	5.0	1.68	1.136	134.8	0.111	−31.3	8.65
12	0	1.0	0	5.0	−1.68	0.464	135.7	0.085	−33.4	45.46
13	0	1.0	1.68	5.84	0	0.8	139.5	0.088	−35.1	16.25
14	0	1.0	−1.68	4.16	0	0.8	124.4	0.096	−31.6	12.50
15	0	1.0	0	5.0	0	0.8	132.9	0.092	−32.6	13.62
16	0	1.0	0	5.0	0	0.8	128.1	0.099	−30.5	14.14

Data obtained was analyzed in order to observe the trends that Lico-A PLGA NPs follow. Regarding the Z_{av}, it can be observed that low Lico-A concentrations are able to provide smaller NPs size (Figure 2A). Moreover, high PLGA amounts tend to slightly increase NPs Z_{av} (Figure S2). This fact correlates with previous studies carried out using polymeric NPs where increased PLGA concentration causes higher Z_{av} [43]. Moreover, Z_{av} varies when low surfactant concentrations are used observing that at high surfactant amounts lower Z_{av} is obtained. Importantly, even with low surfactant amounts, all the formulations obtained showed Z_{av} below 200 nm. Moreover, increased amounts of Tween 80 favor lower PI values and, as observed for Z_{av}, high Lico-A amounts tend to increase the PI (Figure 2B). Therefore, medium-low Lico-A concentrations will be used in order to reduce PI. Moreover, as can be observed in the Pareto chart, low amounts of Tween 80 also favor the EE (Figure 2C). Concerning this parameter, low Lico-A values tend to increase the EE ($p < 0.05$) (Figure 2D). This might be due to the fact that it is easier to encapsulate low amounts of drug, thus obtaining high EE values.

After analyzing the trends obtained and due to the fact that even at high PLGA amounts all Lico-A loaded NPs showed average sizes below 200 nm, the optimized formulation was developed and characterized containing 1 mg/mL of Lico-A, 8 mg/mL of PLGA, and 0.4% Tween. The physicochemical properties of the optimized NPs were suitable for ocular drug delivery since Z_{av} (163.81 ± 2.29) was below 200 nm, PI (0.075 ± 0.010) corresponded to monodisperse particles, ZP (-24 ± 1.4) was highly negative, and EE (56.26 ± 0.16) was superior to 50%.

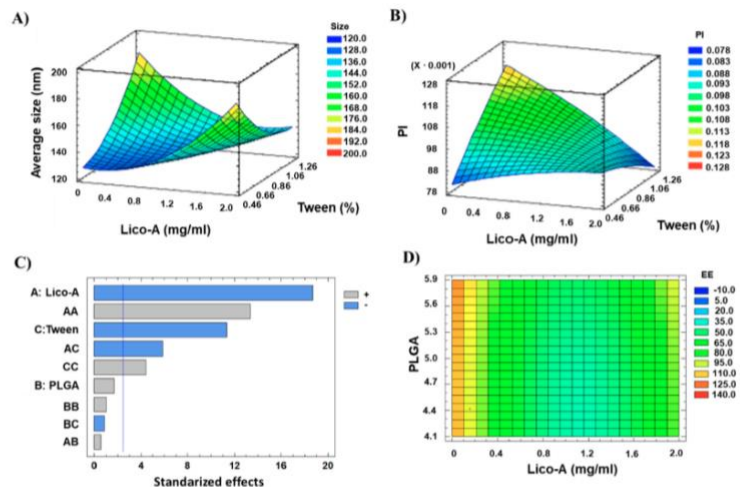


Figure 2. Design of experimental results. (A) Surface response plot for Z_{av} , (B) Surface response plot for PI, (C) Pareto chart for EE (A: Lico-A concentration; B: PLGA concentration; C: Tween concentration; vertical blue line indicates significant effect), (D) Contoured surface response plot for EE.

3.2. Short-Term Stability of Licochalcone-A PLGA NPs

The optimized Lico-A PLGA NPs were stored at three different temperatures (4, 25, and 38 °C) in order to study their short-term stability. As can be observed in Figure 3, Lico-A PLGA NPs were stable at 4 °C and 25 °C even after 3 months of storage. However, at 38 °C, the formulations were clearly unstable obtaining variations of the BS superior to 10% [55,56]. These results correlate with other obtained by previous authors using PLGA nanocarriers [43]. Moreover, differences in the BS profile at 4 and 25 °C were below 10%, which indicates a suitable short-term stability at both temperatures. However, a slight difference after two months of storage can be observed at 25 °C which may indicate an initial instability process, whereas at 4 °C the profiles were almost identical. Therefore, 4 °C will be the most suitable temperature for storing Lico-A PLGA NPs.

3.3. Synthesis of CPP and Polymer Conjugation

In order to functionalize Lico-A PLGA NPs, two CPPs were synthesized by solid phase peptide synthesis. A residue of Cys was incorporated at the N-terminal end of both Tet-1 and B6 peptides to perform a covalent linkage with the PLGA-PEG-maleimide copolymer previously synthesized. Peptide characterization by ESI-MS is shown in Table S1 of the supplementary material. The PLGA polymer was activated with NHS and covalently coupled to the maleimide-PEG-NH₂ by formation of an amide group in liquid phase. Afterwards, conjugation of PLGA-PEG-maleimide with CPP Tet-1 and B6 was carried out in solution, being confirmed by ¹H-NMR.

3. RESULTADOS

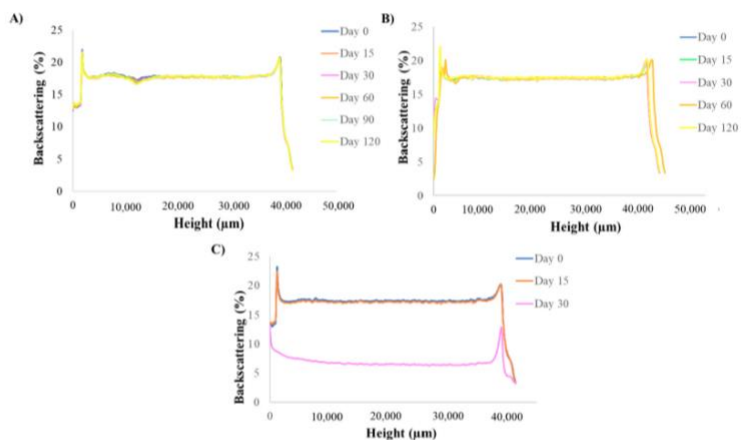


Figure 3. Turbiscan backscattering profile at different temperatures analyzed monthly. (A) 4 °C, (B) 25 °C and (C) 38 °C.

3.4. Physicochemical Characterization of Licochalcone-A Functionalized Nanoparticles

Table 3 shows the results of the physicochemical properties of surface functionalized Lico-A NPs. It can be observed that both formulations (Lico-A PLGA-PEG-Tet1 NPs and Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs) show optimal physicochemical properties for ocular administration. Interestingly, the conjugation of a CPP to the polymer allows to obtain Lico-A NPs with lower Z_{av} , probably due to polymer interactions with the positive peptide charge compacting the NPs core. Moreover, CPP conjugation increases the PI in a slight manner, but all the formulations PI remain below 0.2. However, it can be observed that average size and PI of Lico-A PLGA-PEG-Tet1 NPs are slightly higher than Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs probably because B6 has a higher positive AA ratio (4 positive AA /9 total AA) than Tet-1 (2 positive AA/12 total AA). Therefore, B6 higher positive charge may favor PLGA interaction, thus contributing to smaller and more homogeneous NPs than Tet-1. In addition, ZP of the obtained peptide targeted NPs showed a surface charge modification from negative to highly positive. This has been previously described by other authors using CPP [8]. Furthermore, this positive charge will ensure better interaction with corneal tissues due to their negative charge [57]. The EE values of Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs are significantly lower than Lico-A PLGA NPs and Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs where the EE is higher than 50% of the initial drug added. This may be due to the smaller Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs Z_{av} that might cause lower EE values [58].

Table 3. Physicochemical parameters of the optimized formulation (1 mg/mL of Lico-A, 8 mg/mL of PLGA, and 0.4% Tween 80) without peptide addition, with PEG and Tet-1 peptide, and with PEG and B6 peptide.

Formulation	Z_{av} (nm) ± SD	PI ± SD	ZP ± SD	EE (%)
Lico-A PLGA NPs	163.81 ± 2.29	0.075 ± 0.010	−24.2 ± 1.4	56.26 ± 0.16
Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs	128.65 ± 7.53	0.149 ± 0.016	16.02 ± 0.58	53.26 ± 0.62
Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs	114.24 ± 2.42	0.122 ± 0.012	10.49 ± 1.02	31.36 ± 0.60

3.5. Morphology of Licochalcone-A Functionalized Nanoparticles

Lico-A PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs, and Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs were observed by TEM after negative staining (Figure 4). In all the cases, Lico-A loaded NPs showed a spherical shape and a smooth surface, characteristic of this type of drug delivery

system, without any aggregation phenomena [52]. As expected, NPs size measured by TEM was similar to the size obtained by PCS [59].

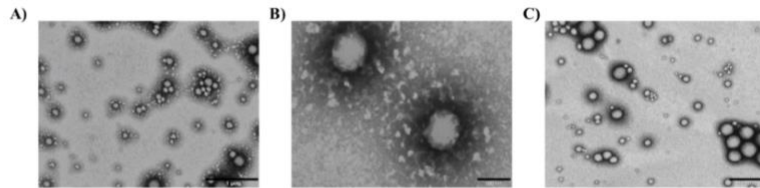


Figure 4. Transmission electron microscopical images of Lico-A NPs. (A) Lico-A-PLGA NPs (scale bar corresponds to 1 μm), (B) Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs (scale bar corresponds to 100 nm), and (C) Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs (scale bar corresponds to 500 nm).

3.6. Drug Release of Licochalcone-A Functionalized Nanoparticles

In order to study the release of Lico-A from Lico-A PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG-Tet1 NPs, and Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs, a direct dialysis experiment was carried out. In all Lico-A NPs, an initial fast release corresponding to a burst effect of the Lico-A placed on the NPs surface followed by a sustained Lico-A release can be observed (Figure 5).

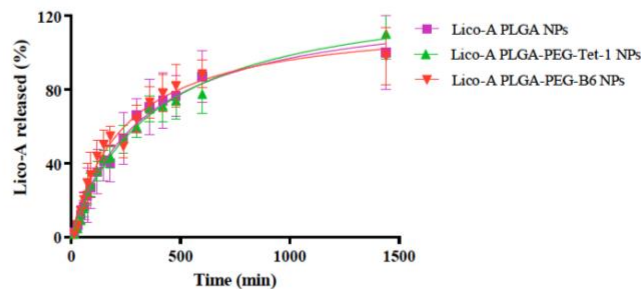


Figure 5. Lico-A release profile carried out by direct dialysis method for studying several formulations (Lico-A PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG-Tet1 NPs, and Lico-A-PLGA-PEG-B6 NPs).

Moreover, release profiles of all the formulations were very similar, being able to release Lico-A within the first 24 h after their application. In addition, this release from biodegradable nanocarriers is usually governed by a diffusion process since it is much faster than the matrix degradation [55]. Release data were fitted to a hyperbola equation [60–62]. Although all of the formulations were very similar, as can be observed in Table 4, Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs showed the higher K_d (equilibrium dissociation constant) thus meaning that diffusion of Lico-A is slower than the observed in the other formulations, indicating that the formulation obtained with the Tet-1 peptide conjugated to the polymer is able to delay Lico-A delivery. Moreover, in all cases, B_{max} was around 100%, thus indicating that all of the Lico-A encapsulated is released within 24 h [43].

3. RESULTADOS

Table 4. Release data fitted to a hyperbola equation (meaning K_d , half of the time when Lico-A is released at equilibrium and B_{max} maximum % of Lico-A released).

	Lico-A PLGA NPs	Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs	Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs
B_{max} (%)	128.9 ± 9.3	136.0 ± 10.6	119.3 ± 9.5
K_d (min)	328.6 ± 51.4	379.3 ± 61.6	242.0 ± 46.4
Goodness of Fit			
R^2	0.8937	0.8891	0.8338

3.7. Ocular Tolerance of Licochalcone-A Surface Functionalized Nanoparticles

The potential risk of eye irritation caused by the developed formulations was evaluated by ocular tolerance tests using in vitro and in vivo methods.

An in vitro HET-CAM test was carried out and OII was calculated. Images were recorded before and after 5 min of the product application to the CAM (Figure 6). Moreover, OII was calculated showing that neither Lico-A PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG Tet-1 NPs, nor Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs were irritants. Therefore, all the formulations obtained an OII around 0 without observing any irritation phenomena and they were classified as non-irritant.

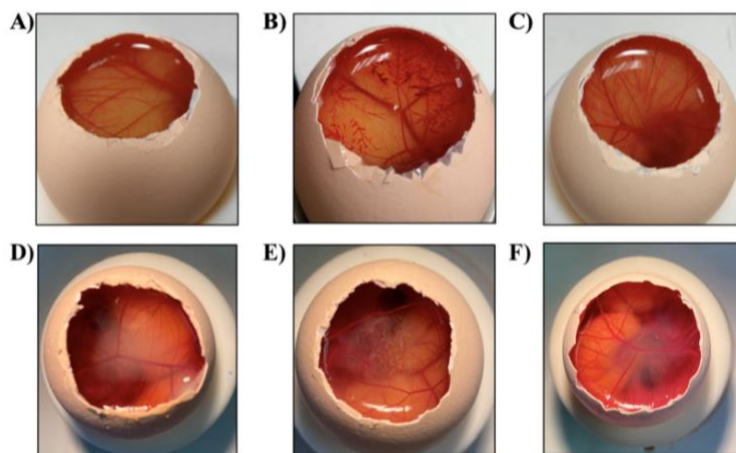


Figure 6. HET-CAM assessment images after 5 min of the product application. (A) NaCl, (B) NaOH, (C) SDS 1%, (D) Lico-A PLGA NPs, (E) Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs, (F) Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs.

However, since the in vitro results are not able to reproduce all of the in vivo conditions, Draize eye irritation of free Lico-A, Lico-A PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG-Tet1 NPs, and Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs was carried out to confirm the HET-CAM classification [63].

The results of the in vivo test showed excellent ocular tolerance for all the formulations evaluated (Figure S3). No signs of eye irritation were detected in any of the formulations, being classified as non-irritating substances. Therefore, these results agree with those obtained by the HET-CAM test confirming its suitability for the evaluation of the ocular tolerance of pharmaceutical products [44].

3.8. Anti-Inflammatory Therapeutic Efficacy of Licochalcone-A Functionalized Nanoparticles

The anti-inflammatory efficacy of the Lico-A NPs functionalized with Tet-1 or B6 peptides was assessed in a model of ocular inflammation.

As can be observed in Figure 6, during the first timepoints, all of the Lico-A NPs and free Lico-A showed statistically significant differences against the control group ($p < 0.001$).

This may be due to the potent Lico-A anti-inflammatory capacity previously reported by other groups and demonstrated here for ocular applications [64,65]. Among all the formulations, Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs presented significantly increased anti-inflammatory activity compared to the other formulations and free Lico-A (Figure 7). This correlates with the faster initial Lico-A release obtained *in vitro* as well as with the fact that B6 peptide has a higher positive charge than Tet-1, thus increasing the interactions with negative ocular layers and allowing Lico-A enhanced penetration and therapeutic effects. Furthermore, Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs also possess a smaller average size which may facilitate their cellular internalization and pharmacological effects [66]. Moreover, free Lico-A showed an initial superior activity compared to Lico-A PLGA NPs and Lico-A PLGA-PEG-Tet1 NPs but after 90 min no significant differences between the formulations were obtained. Moreover, all of the assessed formulations were able to reduce inflammation compared to the saline serum control in a significant manner, even after 210 min after the inflammation induction.

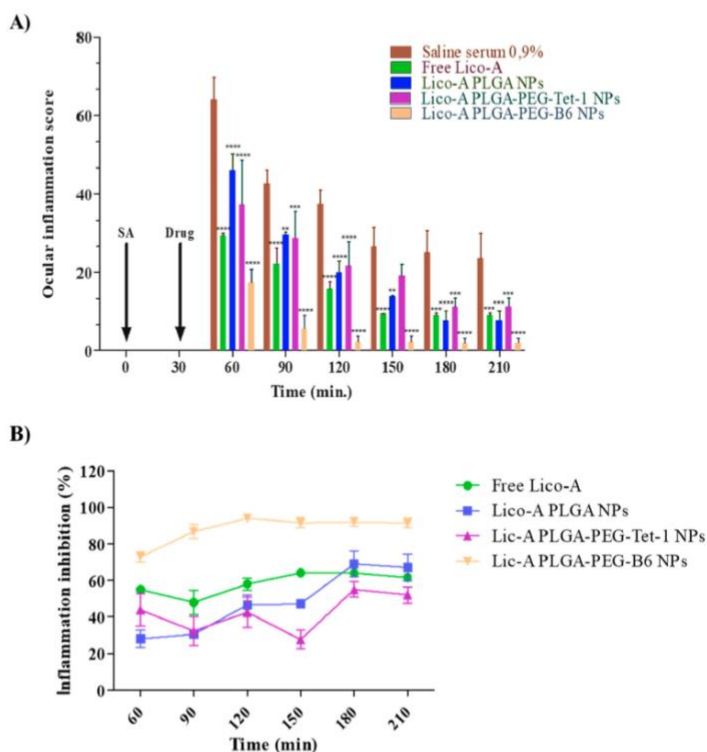


Figure 7. Ocular anti-inflammatory results. (A) Ocular inflammation score. (B) Inhibition of inflammation (%). Significant differences compared to the saline serum group: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$; **** $p < 0.0001$.

Therefore, these results demonstrate that Lico-A could be used for ocular inflammation treatment and that surface functionalized NPs were able to decrease inflammation in a more prolonged manner than the free drug. Moreover, Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs constitute the best strategy to administer Lico-A in ocular tissues, being able to reduce inflammation in a significantly effective manner.

4. Conclusions

In the present manuscript, two formulations of Lico-A loaded peptide-functionalized biodegradable NPs were developed. Moreover, the DoE approach was confirmed to be a suitable method to optimize Lico-A PLGA NPs that showed a suitable short-term stability. In addition, PLGA surface was functionalized with PEG and custom-synthesized CPP obtaining two formulations: Lico-A PLGA-PEG-Tet1 NPs and Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs. These formulations were characterized by obtaining an average size below 200 nm and a monodisperse system with highly positive surface charge. In addition, they demonstrated to provide a prolonged Lico-A release, slightly slower for Lico-A PLGA-PEG-Tet1 NPs. In addition, none of the formulations were irritants in vitro or in vivo. Furthermore, the ocular anti-inflammatory efficacy of Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs was significantly superior compared to free Lico-A and Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs. Despite that, in all the cases the formulations developed showed significant anti-inflammatory effects against the control. However, Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs were demonstrated to reduce inflammation in a highly effective manner constituting a promising system to be topically administered for ocular inflammation.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics14020285/s1>, Figure S1: Chemical structure of CPPs. (A) Tet-1 peptide, (B) B6 peptide; Figure S2: Average size DoE analysis. (A) Pareto chart of average size, (B) surface response corresponding to average size obtained with 0.8% of Tween. Figure S3: Ocular tolerance Draize test results after 30 min of the product application. (A) Saline serum (control group), (B) Lico-A PLGA NPs, (C) Lic-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs, (D) Lic-A PLGA-PEG-B6 NPs; Table S1. Peptide characterization by ESI-MS.

Author Contributions: Conceptualization, R.G.; M.J.G., M.E. (Marta Espina), M.E. (Miren Ettcheto), A.C. (Amanda Cano), I.H. and E.S.-L.; methodology, M.J.G., M.E. (Miren Ettcheto), A.C. (Amanda Cano); validation, R.G., E.S.-L.; formal analysis, M.E. (Marta Espina), I.H. and M.L.G.; investigation, R.G., A.C. (Antoni Camins); resources, A.C. (Antoni Camins); I.H., M.L.G.; writing—original draft preparation, R.G., E.S.-L., M.L.G., M.J.G.; writing—review and editing, E.S.-L.; M.J.G., I.H.; supervision, E.S.-L., M.J.G., A.C. (Antoni Camins), M.L.G.; funding acquisition, I.H., A.C. (Antoni Camins), M.L.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by grant RTI2018-094120-B-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ and by “ERDF A way of making Europe”, by the Spanish Ministry of Science and Innovation and CIBER of neurodegenerative diseases (CIBERNED) (Grant CB06/05/2004 to AC and Instituto de Salud Carlos III).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of the University of Barcelona (protocol code 326/19 approved the 13 May 2021).

Data Availability Statement: Data is contained within the article or Supplementary Materials. The data presented of this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The first author, RG, acknowledges the financial support of the Generalitat de Catalunya for the PhD scholarship FI-DGR EMC/2199/2017 (DOGC-7459-2017).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sánchez-López, E.; Esteruelas, G.; Ortiz, A.; Espina, M.; Prat, J.; Muñoz, M.; Cano, A.; Calpena, A.C.; Ettcheto, M.; Camins, A.; et al. Dexamethasone biodegradable nanoparticles: One step closer towards a better ocular interaction study. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Dennis, E.A.; Norris, P.C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 511–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Yasir, M.; Goyal, A.; Bansal, P.; Sonthalia, S. *Corticosteroid Adverse Effects*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2021.

4. De Freitas, K.S.; Squarisi, I.S.; Acésio, N.O.; Nicoletta, H.D.; Ozelin, S.D.; Reis Santos de Melo, M.; Guissone, A.P.P.; Fernandes, G.; Silva, L.M.; da Silva Filho, A.A.; et al. Licochalcone A, a licorice flavonoid: Antioxidant, cytotoxic, genotoxic, and chemopreventive potential. *J. Toxicol. Environ. Health Part A Curr. Issues* **2020**, *83*, 673–686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Guo, I.M.W.; Liu, B.; Yin, Y.; Kan, X.; Gong, Q.; Li, Y.; Cao, Y.; Wang, J.; Xu, D.; Ma, H.; et al. Licochalcone A protects the blood milk barrier integrity and relieves the inflammatory response in LPS-Induced mastitis. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Funakoshi-Tago, M.; Nakamura, K.; Tsuruya, R.; Hatanaka, M.; Mashino, T.; Sonoda, Y.; Kasahara, T. The fixed structure of Licochalcone A by α , β -unsaturated ketone is necessary for anti-inflammatory activity through the inhibition of NF- κ B activation. *Int. Immunopharmacol.* **2010**, *10*, 562–571. [[CrossRef](#)]
7. Wang, Z.; Xue, Y.; Zeng, Q.; Zhu, Z.; Wang, Y.; Wu, Y.; Shen, C.; Zhu, H.; Jiang, C.; Liu, L.; et al. Glycyrrhiza acid-Licochalcone A complexes for enhanced bioavailability and anti-melanogenic effect of Licochalcone A: Cellular uptake and in vitro experiments. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2022**, *68*, 103037. [[CrossRef](#)]
8. Silva, L.M.; Marconato, D.G.; Nascimento Da Silva, M.P.; Barbosa Raposo, N.R.; De Faria Silva Facchini, G.; MacEdo, G.C.; Teixeira, F.D.S.; Da Silveira Salvadori, M.C.B.; De Faria Pinto, P.; De Moraes, J.; et al. Licochalcone A-loaded solid lipid nanoparticles improve antischistosomal activity in vitro and in vivo. *Nanomedicine* **2021**, *16*, 1641–1655. [[CrossRef](#)]
9. Sánchez-López, E.; Espina, M.; Doktorovova, S.; Souto, E.B.; García, M.L. Lipid nanoparticles (SLN, NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye—Part I—Barriers and determining factors in ocular delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *110*, 58–69. [[CrossRef](#)]
10. Sahu, T.; Ratre, Y.K.; Chauhan, S.; Bhaskar, L.V.K.S.; Nair, M.P.; Verma, H.K. Nanotechnology based drug delivery system: Current strategies and emerging therapeutic potential for medical science. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2021**, *63*, 102487. [[CrossRef](#)]
11. Gonzalez-pizarro, R.; Parrotta, G.; Vera, R.; Sánchez-lópez, E.; Galindo, R.; Kjeldsen, F.; Badia, J.; Baldoma, L.; Espina, M.; García, M.L. Ocular penetration of fluorometholone-loaded PEG-PLGA nanoparticles functionalized with cell-penetrating peptides. *Nanomedicine* **2019**, *14*, 3089–3104. [[CrossRef](#)]
12. Amadio, M.; Pascale, A.; Cupri, S.; Pignatello, R.; Osera, C.; D'Agata, V.; D'Amico, A.G.; Leggio, G.M.; Ruozi, B.; Govoni, S.; et al. Nanosystems based on siRNA silencing HuR expression counteract diabetic retinopathy in rat. *Pharmacol. Res.* **2016**, *111*, 713–720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Khiev, D.; Mohamed, Z.A.; Vichare, R.; Paulson, R.; Bhatia, S.; Mohapatra, S.; Lobo, G.P.; Valapala, M.; Kerur, N.; Passaglia, C.L.; et al. Emerging nano-formulations and nanomedicines applications for ocular drug delivery. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Shah, N. *Nanocarriers: Drug Delivery System*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2021; ISBN 9789813344969.
15. Kumari, A.; Yadav, S.K.; Yadav, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, *75*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Arafa, M.G.; Girgis, G.N.S.; El-Dahan, M.S. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for enhanced ocular anti-inflammatory efficacy of atorvastatin calcium. *Int. J. Nanomed.* **2020**, *15*, 1335–1347. [[CrossRef](#)]
17. Sah, A.K.; Suresh, P.K.; Verma, V.K. PLGA nanoparticles for ocular delivery of loteprednol etabonate: A corneal penetration study. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2017**, *45*, 1156–1164. [[CrossRef](#)]
18. Mir, M.; Ahmed, N.; ur Rehman, A. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**, *159*, 217–231. [[CrossRef](#)]
19. Vasconcelos, A.; Vega, E.; Pérez, Y.; Gómara, M.J.; García, M.L.; Haro, I. Conjugation of cell-penetrating peptides with poly(lactico-glycolic acid)-polyethylene glycol nanoparticles improves ocular drug delivery. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 609–631. [[CrossRef](#)]
20. Abrego, G.; Alvarado, H.; Souto, E.B.; Guevara, B.; Bellows, L.H.; Parra, A.; Calpena, A.; Garcia, M.L. Biopharmaceutical profile of pranoprofen-loaded PLGA nanoparticles containing hydrogels for ocular administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *95*, 261–270. [[CrossRef](#)]
21. Janagam, D.R.; Wu, L.; Lowe, T.L. Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *122*, 31–64. [[CrossRef](#)]
22. Sharma, S.; Parmar, A.; Kori, S.; Sandhir, R. PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *80*, 30–40. [[CrossRef](#)]
23. Liu, Z.; Gao, X.; Kang, T.; Jiang, M.; Miao, D.; Gu, G.; Hu, Q. B6 Peptide-Modified PEG-PLA Nanoparticles for Enhanced Brain Delivery of Neuroprotective Peptide. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 997–1007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Torchilin, V.P. Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 548–558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Brooks, H.; Lebleu, B.; Vivès, E. Tat peptide-mediated cellular delivery: Back to basics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 559–577. [[CrossRef](#)]
26. Rizzuti, M.; Nizzardo, M.; Zanetta, C.; Ramirez, A.; Corti, S. Therapeutic applications of the cell-penetrating HIV-1 Tat peptide. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 76–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Jones, S.W.; Christison, R.; Bundell, K.; Joyce, C.J.; Brockbank, S.M.V.; Newham, P.; Lindsay, M.A. Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *145*, 1093–1102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Guidotti, G.; Brambilla, L.; Rossi, D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, *38*, 406–424. [[CrossRef](#)]

3. RESULTADOS

29. Mathew, A.; Fukuda, T.; Nagaoka, Y.; Hasumura, T.; Morimoto, H.; Yoshida, Y.; Maekawa, T.; Venugopal, K.; Kumar, D.S. Curcumin loaded-PLGA nanoparticles conjugated with Tet-1 peptide for potential use in Alzheimer's disease. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32616. [CrossRef]
30. Jia, T.T.; Sun, Z.G.; Lu, Y.; Gao, J.; Zou, H.; Xie, F.Y.; Zhang, G.Q.; Xu, H.; Sun, D.X.; Yu, Y.; et al. A dual brain-targeting curcumin-loaded polymersomes ameliorated cognitive dysfunction in intrahippocampal amyloid- β 1-42-injected mice. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 3765–3775. [CrossRef]
31. Zhang, J.; Zhou, X.; Yu, Q.; Yang, L.; Sun, D.; Zhou, Y.; Liu, J. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)-stabilized selenium nanoparticles coated with Tet-1 peptide to reduce amyloid- β aggregation and cytotoxicity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 8475–8487. [CrossRef]
32. Blackburn, C.C.; Swank-Hill, P.; Schnaarb, R.L. Gangliosides Support Neural Retina Cell Adhesion. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 2873–2881. [CrossRef]
33. Yang, Z.; Zhao, Z.; Panjwani, N. Gangliosides of Migrating and Nonmigrating Corneal Epithelium in Organ and Cell Culture. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1996**, *37*, 501–510.
34. Fan, S.; Zheng, Y.; Liu, X.; Fang, W.; Chena, X.; Liao, W.; Jing, X.; Lei, M.; Tao, E.; Ma, Q.; et al. Curcumin-loaded plga-peg nanoparticles conjugated with b6 peptide for potential use in alzheimer's disease. *Drug Deliv.* **2018**, *25*, 1044–1055. [CrossRef] [PubMed]
35. Daudouin, C.; Brignole, F.; Fredj-Reygrobeller, D.; Negre, F.; Boyle, J.; Gostoud, P. Transferrin Receptor Expression by Retinal Pigment Epithelial Cells in Proliferative Vitreoretinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1992**, *33*, 2822–2829.
36. Lauweryns, B.; Van Den Oord, J.J.; Missotten, L. The Transitional Zone Between Limbus and Peripheral Cornea. An Immunohistochemical Study. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1993**, *34*, 1991–1999.
37. Tan, P.H.; King, W.J.; Chen, D.; Awad, H.M.; Mackett, M.; Lechler, R.I.; Frank, D.; Larkin, P.; George, A.J.T. Transferrin receptor-mediated gene transfer to the corneal endothelium. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **2001**, *71*, 552–560. [CrossRef]
38. Esteruelas, G.; Halbaut, L.; García-Torra, V.; Espina, M.; Cano, A.; Ettcheto, M.; Camins, A.; Souto, E.B.; Luisa García, M.; Sánchez-López, E. Development and optimization of Riluzole-loaded biodegradable nanoparticles incorporated in a mucoadhesive in situ gel for the posterior eye segment. *Int. J. Pharm.* **2021**, *612*, 121379. [CrossRef]
39. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*, R1–R4. [CrossRef]
40. Nadelmann, L.; Tjørnelund, J.; Christensen, E.; Hansen, S.H. High-performance liquid chromatographic determination of licochalcone A and its metabolites in biological fluids. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **1997**, *695*, 389–400. [CrossRef]
41. Xie, J.; Zhang, Y.; Wang, W. HPLC analysis of glycyrrhizin and licochalcone a in *Glycyrrhiza inflata* from Xinjiang (China). *Chem. Nat. Compd.* **2010**, *46*, 148–151. [CrossRef]
42. Lister, A.S. Validation of HPLC methods in pharmaceutical analysis. *Sep. Sci. Technol.* **2005**, *6*, 191–217. [CrossRef]
43. Sánchez-López, E.; Egea, M.A.; Cano, A.; Espina, M.; Calpena, A.C.C.; Ettcheto, M.; Camins, A.; Souto, E.B.B.; Silva, A.M.M.; García, M.L.L. PEGylated PLGA nanospheres optimized by design of experiments for ocular administration of dexibuprofen—In vitro, ex vivo and in vivo characterization. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2016**, *145*, 241–250. [CrossRef] [PubMed]
44. López-Machado, A.; Diaz-Garrido, N.; Cano, A.; Espina, M.; Badia, J.; Balmora, L.; Calpena, A.C.; Souto, E.B.; García, M.L.; Sánchez-López, E. Development of Lactoferrin-Loaded Liposomes for the Management of Dry Eye Disease and Ocular Inflammation. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1698. [CrossRef] [PubMed]
45. Jaradat, D.M.M. Thirteen decades of peptide synthesis: Key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation. *Amino Acids* **2018**, *50*, 39–68. [CrossRef] [PubMed]
46. Sánchez-López, E.; Egea, M.A.; Davis, B.M.; Guo, L.; Espina, M.; Silva, A.M.; Calpena, A.C.; Souto, E.M.B.; Ravindran, N.; Ettcheto, M.; et al. Memantine-Loaded PEGylated Biodegradable Nanoparticles for the Treatment of Glaucoma. *Small* **2018**, *14*, 1–12. [CrossRef]
47. Andreani, T.; Mizziara, L.; Lorenzón, E.N.; De Souza, A.L.R.; Kiill, C.P.; Fanguero, J.F.; Garcia, M.L.; Gremião, P.D.; Silva, A.M.; Souto, E.B. Effect of mucoadhesive polymers on the in vitro performance of insulin-loaded silica nanoparticles: Interactions with mucin and biomembrane models. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *93*, 118–126. [CrossRef]
48. Elmsmari, F.; González Sánchez, J.A.; Duran-Sindreu, F.; Belkadi, R.; Espina, M.; García, M.L.; Sánchez-López, E. Calcium hydroxide-loaded PLGA biodegradable nanoparticles as an intracanal medicament. *Int. Endod. J.* **2021**, *54*, 2086–2098. [CrossRef]
49. Warren, M.; Atkinson, K.; Steer, S. INVITOX: The ERGATT/FRAME data bank of in vitro techniques in toxicology. *Toxicol. Vitro* **1990**, *4*, 707–710. [CrossRef]
50. Gupta, H.; Aqil, M.; Khar, R.K.; Ali, A.; Bhatnagar, A.; Mittal, G. Biodegradable levofloxacin nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *J. Drug Target.* **2011**, *19*, 409–417. [CrossRef]
51. Abrego, G.; Alvarado, H.L.; Egea, M.A.; Gonzalez-Mira, E.; Calpena, A.C.; Garcia, M.L. Design of nanosuspensions and freeze-dried PLGA nanoparticles as a novel approach for ophthalmic delivery of pranoprofen. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103*, 3153–3164. [CrossRef]
52. López-Machado, A.; Diaz, N.; Cano, A.; Espina, M.; Badia, J.; Balmora, L.; Calpena, A.C.; Biancardi, M.; Souto, E.B.; García, M.L.; et al. Development of topical eye-drops of lactoferrin-loaded biodegradable nanoparticles for the treatment of anterior segment inflammatory processes. *Int. J. Pharm.* **2021**, *609*, 121188. [CrossRef]

53. Vega, E.; Egea, M.; Valls, O.; Espina, M.; García, M. Flurbiprofen loaded biodegradable nanoparticles for ophthalmic administration. *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95*, 2393–2405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Vega, E.; Egea, M.A.; Calpena, A.C.; Espina, M.; García, M.L. Role of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on freeze-dried and gamma-irradiated PLGA and PLGA–PEG diblock copolymer nanospheres for ophthalmic flurbiprofen delivery. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 1357–1371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Folle, C.; Díaz-Garrido, N.; Sánchez-López, E.; Marqués, A.M.; Badia, J.; Baldomà, L.; Espina, M.; Calpena, A.C.; García, M.L. Surface-modified multifunctional thymol-loaded biodegradable nanoparticles for topical acne treatment. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Folle, C.; Marqués, A.M.; Díaz-Garrido, N.; Espina, M.; Sánchez-López, E.; Badia, J.; Baldomà, L.; Calpena, A.C.; García, M.L. Thymol-loaded PLGA nanoparticles: An efficient approach for acne treatment. *J. Nanobiotechnol.* **2021**, *19*, 359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Sahoo, S.K.; Dilnawaz, F.; Krishnakumar, S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 144–151. [[CrossRef](#)]
58. Song, X.; Zhao, Y.; Hou, S.; Xu, F.; Zhao, R.; He, J.; Cai, Z.; Li, Y.; Chen, Q. Dual agents loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *69*, 445–453. [[CrossRef](#)]
59. Liu, P.; Chen, N.; Yan, L.; Gao, F.; Ji, D.; Zhang, S.; Zhang, L.; Li, Y.; Xiao, Y. Preparation, characterisation and in vitro and in vivo evaluation of CD44-targeted chondroitin sulphate-conjugated doxorubicin PLGA nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *213*, 17–26. [[CrossRef](#)]
60. Espinoza, L.C.; Silva-Abreu, M.; Clares, B.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Halbaut, L.; Cañas, M.A.; Calpena, A.C. Formulation strategies to improve nose-to-brain delivery of donepezil. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 64. [[CrossRef](#)]
61. Sánchez-López, E.; Eitchetto, M.; Egea, M.A.; Espina, M.; Calpena, A.C.; Folch, J.; Camins, A.; García, M.L. New potential strategies for Alzheimer’s disease prevention: Pegylated biodegradable dexibuprofen nanospheres administration to APP^{swe}/PS1^{DE9}. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2017**, *13*, 1171–1182. [[CrossRef](#)]
62. Espinoza, L.C.; Vera-García, R.; Silva-Abreu, M.; Domènech, Ò.; Badia, J.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Clares, B.; Calpena, A.C. Topical pioglitazone nanoformulation for the treatment of atopic dermatitis: Design, characterization and efficacy in hairless mouse model. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 255. [[CrossRef](#)]
63. Mohsen, A.M. Cationic Polymeric Nanoparticles for Improved Ocular Delivery and Antimycotic Activity of Terconazole. *J. Pharm. Sci.* **2021**, *111*, 458–468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Jia, T.; Qiao, J.; Guan, D.; Chen, T. Anti-Inflammatory Effects of Licochalcone A on IL-1 β -Stimulated Human Osteoarthritis Chondrocytes. *Inflammation* **2017**, *40*, 1894–1902. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Phan, H.T.L.; Kim, H.J.; Jo, S.; Kim, W.K.; Namkung, W.; Nam, J.H. Anti-inflammatory effect of licochalcone a via regulation of ORAI1 and K⁺ channels in T-Lymphocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 847. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Salatin, S.; Maleki Dizaj, S.; Yari Khosroushahi, A. Effect of the surface modification, size, and shape on cellular uptake of nanoparticles. *Cell Biol. Int.* **2015**, *39*, 881–890. [[CrossRef](#)]

Supplementary Materials: Development of Peptide Targeted PLGA-PEGylated Nanoparticles Loading Licochalcone-A for Ocular Inflammation

Ruth Galindo, Elena Sánchez-López, María José Gómara, Marta Espina, Miren Ettcheto, Amanda Cano, Isabel Haro, Antoni Camins and María Luisa García

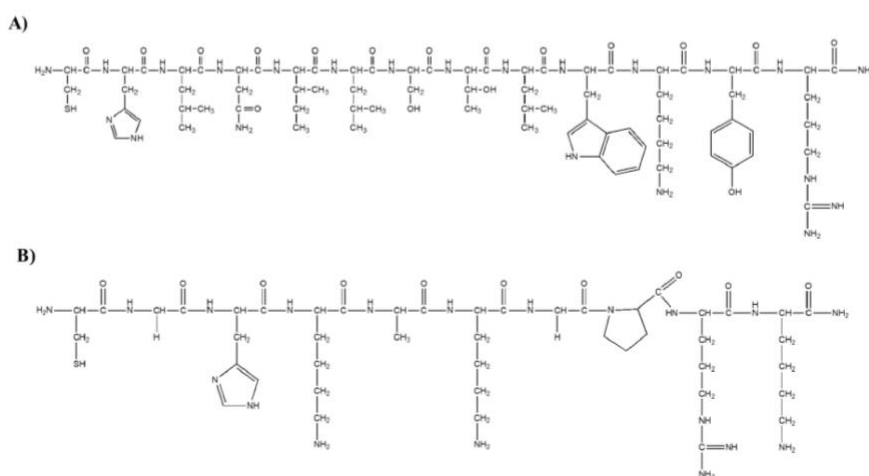


Figure S1. Chemical structure of CPPs. A) Tet-1 peptide, B) B6 peptide.

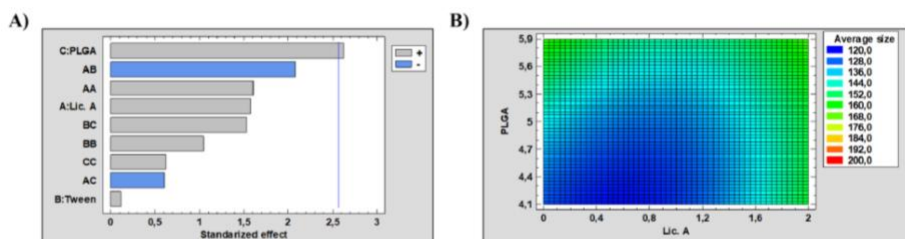


Figure S2. Average size DoE analysis. A) Pareto's chart of average size, B) Surface response corresponding to average size obtained with 0.8 % of Tween.

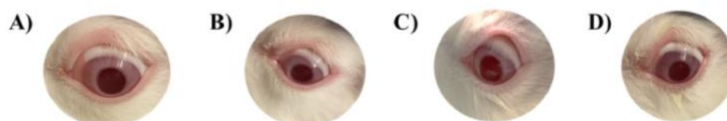


Figure S3. Ocular tolerance Draize test results after 30 min of the product application. A) Saline serum (control group); B) Lico-A PLGA NPs, C) Lic-A PLGA-PEG-Tet-1Cys NPs, D) Lic-A PLGA-PEG-B6 NPs.

3. RESULTADOS

2 of 2

Table S1. Peptide characterization by ESI-MS.

	MW (g/mol)	ESI-MS m/z	theoretical m/z	experimental m/z
Cys-Tet-1 <chem>C76H119N21O18S</chem>	1646.98	[M+2H] ²⁺	824.48	823.97
		[M+3H] ³⁺	549.99	549.64
		[M+4H] ⁴⁺	412.75	412.73
Cys-B6 <chem>C48H80N18O11S</chem>	1081.31	[M+2H] ²⁺	541.65	541.96
		[M+3H] ³⁺	361.44	360.88

3.2. Cell penetrating peptides-functionalized Licochalcone-A-loaded PLGA nanoparticles for ocular inflammatory diseases: Evaluation of *in vitro* anti-proliferative effects, stabilization by freeze-drying and characterization of an *in-situ* forming gel

Ruth M. Galindo-Camacho, Isabel Haro, María J. Gómara, Marta Espina, Joel Fonseca, Carlos Martins-Gomes, Antoni Camins, Amélia M. Silva, María L. García, Eliana B. Souto.

International Journal of Pharmaceutics 2023, 639: 122982

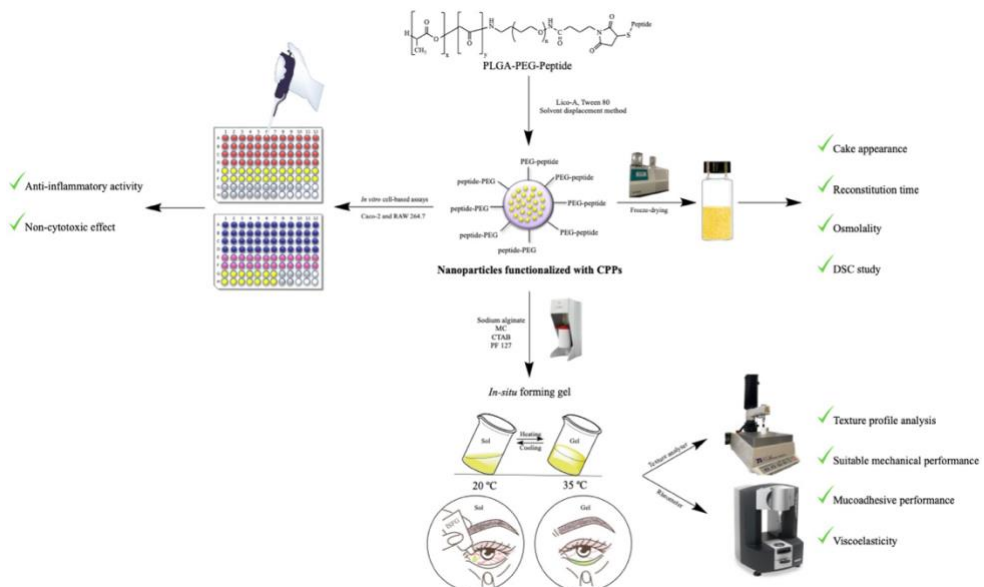
Doi: 10.1016/j.ijpharm.2023.122982

Impact factor (JCR): 6.510

Rank: 40/279 Pharmacology and Pharmacy **Q1**

ELSEVIER (ISSN: 0378-5173)

Graphical Abstract





Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Cell penetrating peptides-functionalized Licochalcone-A-loaded PLGA nanoparticles for ocular inflammatory diseases: Evaluation of *in vitro* anti-proliferative effects, stabilization by freeze-drying and characterization of an in-situ forming gel

Ruth M. Galindo-Camacho^{a,b,c,d}, Isabel Haro^c, María J. Gómara^c, Marta Espina^{b,d},
Joel Fonseca^a, Carlos Martins-Gomes^{e,f}, Antoni Camins^{g,h}, Amélia M. Silva^{e,f},
María L. García^{b,d}, Eliana B. Souto^{a,i,j,*}

^a Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal

^b Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

^c Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides, IQAC-CSIC, 08034 Barcelona, Spain

^d Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

^e Department of Biology and Environment, University of Trás-os-Montes e Alto Douro, UTAD, Quinta de Prados, P-5001-801 Vila Real, Portugal

^f Centre for Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Sciences, CITAB, UTAD, Quinta de Prados, P-5001-801 Vila Real, Portugal

^g Biomedical Research Networking Centre in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), 28031 Madrid, Spain

^h Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

ⁱ UCIBIO – Applied Molecular Biosciences Unit, MEDTECH, Laboratory of Pharmaceutical Technology, Department of Drug Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Porto, 4050-313 Porto, Portugal

^j Associate Laboratory I4HB - Institute for Health and Bioeconomy, Faculty of Pharmacy, University of Porto, 4050-313 Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Keywords:

Licochalcone-A
PLGA nanoparticles
Cell penetrating peptide
Freeze-drying
In-situ forming gel
Ocular anti-inflammatory

ABSTRACT

Licochalcone-A (Lico-A) PLGA NPs functionalized with cell penetrating peptides B6 and Tet-1 are proposed for the treatment of ocular anti-inflammatory diseases. In this work, we report the *in vitro* biocompatibility of cell penetrating peptides-functionalized Lico-A-loaded PLGA NPs in Caco-2 cell lines revealing a non-cytotoxic profile, and their anti-inflammatory activity against RAW 264.7 cell lines. Given the risk of hydrolysis of the liquid suspensions, freeze-drying was carried out testing different cryoprotectants (e.g., disaccharides, alcohols, and oligosaccharide-derived sugar alcohol) to prevent particle aggregation and mitigate physical stress. As the purpose is the topical eye instillation of the nanoparticles, to reduce precorneal wash-out, increase residence time and thus Lico-A bioavailability, an in-situ forming gel based on poloxamer 407 containing Lico-A loaded PLGA nanoparticles functionalized with B6 and Tet-1 for ocular administration has been developed. Developed formulations remain in a flowing semi-liquid state under non-physiological conditions and transformed into a semi-solid state under ocular temperature conditions (35 °C), which is beneficial for ocular administration. The pH, viscosity, texture parameters and gelation temperature results met the requirements for ophthalmic formulations. The gel has characteristics of viscoelasticity, suitable mechanical and mucoadhesive performance which facilitate its uniform distribution over the conjunctiva surface. In conclusion, we anticipate the potential clinical significance of our developed product provided that a synergistic effect is achieved by combining the high anti-inflammatory activity of Lico-A delivered by PLGA NPs with B6 and Tet-1 for site-specific targeting in the eye, using an in-situ forming gel.

* Corresponding author at: Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy of University of Porto, R. Jorge de Viterbo Ferreira 228, 4050-313 Porto, Portugal.

E-mail address: ebouto@ff.up.pt (E.B. Souto).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122982>

Received 2 December 2022; Received in revised form 17 April 2023; Accepted 21 April 2023

Available online 26 April 2023

0378-5173/© 2023 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3. RESULTADOS

1. Introduction

One of the most common signs of eye disorders is ocular inflammation, which can affect both the anterior and the posterior segments of the eye (El-Haddad et al., 2021). Topical administration of anti-inflammatory drugs, namely corticosteroids, are effective in treating ocular surface and anterior segment inflammation, including pain and post-operative inflammation, seasonal allergic conjunctivitis keratitis or anterior uveitis (Mazet et al., 2020). But these drugs are associated with side effects including elevation of intraocular pressure and cataract formation (Comstock and DeCory, 2012), the reason why new therapeutic strategies to treat ocular inflammatory diseases are in the pipelines.

Special attention is being paid to herbal medicines derived from natural compounds because of their minimal or negligible side effects on normal tissues compared to synthetic compounds (Mittal and Kakkar, 2021). Licochalcone-A (Lico-A), a chalconoid (natural phenolic compound), isolated from the *Glycyrrhiza* species, shows many pharmacological activities, such as anti-cancer, anti-inflammatory, anti-viral and anti-angiogenic activities (Guo et al., 2019; Liu et al., 2021). Anti-inflammatory ocular activity of this drug was also reported (Galindo et al., 2022); however, the high partition coefficient and poor water solubility exhibited by Lico-A significantly affect its bioavailability when administered topically (Wang et al., 2022).

In the last few decades, nanoparticle-based drug delivery systems have been widely used, also for targeting drugs to ocular tissues (Yun et al., 2015). Among these, polymeric nanoparticles have been proposed as a suitable approach to improve corneal permeation of class II/IV drugs improving either their stability or solubility, or by promoting targeted-specific delivery (Wang et al., 2021). Synthetic polymers such as poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) have been extensively employed in NPs production because they are approved by the US Food and Drug Administration (FDA) as they are biocompatible, biodegradable, and are able to maintain the physicochemical stability of many drugs (Badran et al., 2018).

During the last years, cell penetrating peptides (CPPs) have emerged as versatile tools to facilitate transport inside cells (Gessner and Neundorff, 2020). We have previously demonstrated that polymeric nanoparticles functionalized with two CPPs, Tet-1 and B6, increases cell penetration and efficient drug delivery to ocular cells (Galindo et al., 2022). However, PLGA NPs, when stored for a long time in liquid form, may gradually release the encapsulated drug into the medium as a consequence of hydrolysis (Makadia and Siegel, 2011). A promising method for effective long-term stabilization of these nanosized drug delivery systems is freeze-drying (Sylvester et al., 2018) during which water is removed from nanosuspensions (frozen) under vacuum by sublimation. In this process, the use of cryoprotectants is required to inhibit particle aggregation and mitigate physical stress (Kadowaki et al., 2022; Luo et al., 2021).

The topical delivery of drugs continues to be the most appropriate option for the treatment of ocular diseases, attributed to a greater patient's compliance as formulations are easy to apply. However, conventional ocular dosage forms such as solutions, suspensions, and ointments have disadvantages, including enhanced precorneal elimination, high variation of inter-individual responses and treatment efficiency, and may also cause blurred vision (Mohd Shahrizan et al., 2022). In addition, it is known that <5 % of the applied dose is bioavailable, i.e., able to reach intraocular tissues after corneal penetration. Most of these conventional forms are washed-out from the surface of the eye by blinking and lacrimal drainage in first 15–30 s after instillation, and also because of the presence of the corneal epithelium which is a barrier to drugs, and the clearance from the vasculature in the conjunctiva (Gause et al., 2016; Maulvi et al., 2021). To overcome these drawbacks, the development of formulations that ensure an extended corneal residence time and improved permeation of the drug product, thus increasing its bioavailability, is an interesting option. For that, *in-situ* forming gels are

instilled in liquid form (exact and precise application) on-site where the gelling mechanism takes place induced by changes of temperature, pH and ionic strength, inherent to the administration site (ocular environment) (Bai et al., 2022).

Poloxamers, triblock copolymers formed by polyethylene oxide (PEO) and polypropylene oxide (PPO) units arranged in a PEO-PPO-PEO structure, also known as Pluronic, are non-ionic, water-soluble materials that have attracted much interest as pharmaceutical excipients (de Castro et al., 2022). These polymers have an amphiphilic character, presenting surface-active properties and are capable of interacting with hydrophobic surfaces and biological membranes (Singla et al., 2022). Pluronics form gels *in situ* in response to increased temperature; besides, as these polymers are transparent, they do not interfere with normal vision and are therefore more suitable for applications in ophthalmology (Bai et al., 2022).

This study focuses on the development and characterization of Lico-A, loaded in biodegradable polymeric PLGA NPs as a potential formulation for the topical administration onto the eye, improving their stability by freeze-dried, and by developing an *in-situ* forming gel system based on poloxamer 407.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Lico-A was purchased from Amadis Chemical (Hangzhou, China) and the polymer PLGA 50:50 Resomer® RG 503H, 34 kD from Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany). Maleimide-PEG-NH2 (5 kDa) was obtained from Jenkem (Beijing, China), Tween® 80, sucrose, D-(+)-trehalose dihydrate, sorbitol and maltitol were provided by Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Glycerol anhydrous was by AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany). Poloxamer 407 (PF127) and Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) were obtained from Sigma-Aldrich (Chemie GmbH, Steinheim, Germany). Methocel A4M (MC) was from Colorcon GmbH (Idstein, Germany). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, L-glutamine, 0.05 % trypsin-EDTA were obtained from Gibco (Alfagene, Portugal). Alamar Blue® was from Invitrogen, Life-Technologies (Porto, Portugal). Caco-2 (Human colon adenocarcinoma cell line) and RAW 264.7 (mouse macrophages, Abelson murine leukemia virus-induced tumor cell line) were purchased from Cell Lines Service GmbH (CLS, Eppelheim, Germany). Acetone was purchased from Fisher Scientific (Loughborough, UK). Methanol and diethyl ether were obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Water filtered through the Millipore® MilliQ system was used for all experiments and the other chemicals and reagents used in the study were of analytical grade.

2.2. Production and optimization of Licochalcone-A PLGA nanoparticles

Lico-A PLGA NPs were developed by the solvent displacement method and optimized in a 2³ central composite factorial design, previously described by us (Galindo et al., 2022). Briefly, 10 mg of Lico-A and 80 mg of PLGA Resomer® RG 503H were solubilized in 5 mL of acetone. Once completely dissolved, this solution was dispersed dropwise, with moderate mechanical stirring, in 10 mL of the of the aqueous phase containing 0.4 % of Tween 80; this process was carried out at room temperature. Then, the organic solvent was evaporated from the suspension under reduced pressure using a rotary evaporator.

The physicochemical properties of Lico-A PLGA NPs, average size (Z_{av}) and polydispersity index (PI) were measured by Photon Correlation Spectroscopy (PCS), after a 1:10 dilution with MilliQ® water, using the Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) at 25 °C. The surface charge of the particles was evaluated by means of zeta potential (ZP) and determined by laser-Doppler electrophoresis with the M3 PALS system in a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK).

The entrapment efficiency (EE) was determined indirectly by measuring the non-entrapped drug, and the quantification of Lico-A in the aqueous phase was performed by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) (Galindo et al., 2022), using equation (1):

$$EE(\%) = \frac{\text{total amount of Lico-A} - \text{free amount of Lico-A}}{\text{total amount of Lico-A}} \times 100 \quad (1)$$

For this study, the formulation with the most appropriate physico-chemical and EE characteristics was selected.

2.3. Synthesis of cell penetrating peptides and conjugation with PEG to the polymer and preparation of Lico-A PLGA-PEG-CPP NPs

The synthesis of B6 and Tet-1 peptides, their conjugation with PEG to the PLGA Resomer® RG 503H, and respective characterization were described in a previous work (Galindo et al., 2022). After that, PLGA-PEG-CPP NPs containing Lico-A were prepared by the optimized solvent displacement method described in section 2.2.

2.4. In vitro Cell-based assays

2.4.1. Cell maintenance and handling

In this study, two cell lines (Caco-2 and RAW 264.7) were used to evaluate, respectively, the anti-proliferative/cytotoxicity and anti-inflammatory activity of the drug Lico-A, blank NPs (PLGA NPs), and Lico-A PLGA-PEG-CPP NPs. Cells were maintained in complete culture media (Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS), 1 mM L-glutamine and antibiotics (100 U/mL of penicillin and 100 µg/mL streptomycin)) in an incubator (5 % CO₂/95 % air; 37 °C, controlled humidity). Near-confluence, cells were treated as described in Silva et al., (2020). Cells were seeded into 96-well microplates (5 × 10⁴ cells/mL, 100 µL/well), maintained in incubator, and were allowed to adhere and stabilize for 48 h, for other details see (Andreani et al., 2014; Carbone et al., 2018; Severino et al., 2014).

2.4.1.1. Cell Viability/Cytotoxicity assay. Alamar Blue® assay (Andreani et al., 2014) was used to assess the cytotoxic effect of Lico-A and NPs on Caco-2 and RAW 264.7 cell lines. Stock solution of Lico-A, at 10 mM (3.38 mg/mL) was prepared in DMSO; and the final concentration of DMSO, in test solutions, was never higher than 1 %. Nanoformulations contain Lico-A at 1 mg/mL. After adherence and stabilization, cell culture media was removed and replaced with test solutions (100 µL/well), prepared by dilution of stock solution or of NPs formulation in FBS-free culture medium, to achieve the desired concentrations. Nanoformulations of Lico-A (at 1 mg/mL of formulation) were diluted to achieve concentrations of Lico-A from 0 to 100 µg/mL in test solution (or equivalent concentrations of carriers, from blank NPs). After 24 h exposure to test solutions, test solutions were removed and replaced by Alamar Blue solution (100 µL/well; at 10 % (v/v), in FBS-free culture medium). Absorbance was read, after 5 h incubation, at 570 nm and 620 nm, using a microplate reader (Multiskan EX, MTX LabSystems, USA). In each assay, controls were considered, non-treated cells as positive control and Alamar Blue solution alone as negative control. Positive control cells were subjected to the same procedures (i.e., replacing of media (with only FBS-free culture media), Alamar Blue solution exposure) at the same time-point as cells exposed to the test solutions. Results are expressed as cell viability (% of control, i.e., positive control), calculated as described by Andreani et al. (2014). Three independent assays were performed, each one in quadruplicates. The IC₅₀ values were calculated as described in Silva et al. (Silva et al., 2019).

2.4.1.2. Anti-inflammatory activity. The anti-inflammatory activity of Lico-A and NPs was evaluated in RAW 264.7 cells, as described (Silva

et al., 2021). Briefly, RAW 264.7 cells were seeded in 96-well plates (5 × 10⁴ cells/mL, 100 µL/well) and, after 48 h, culture media was removed and replaced by test solutions at non-cytotoxic concentrations of Lico-A and of NPs (8 wells per condition), then cells were incubated for 4 h. After incubation, test solutions were removed and cells were exposed to FBS-free culture media (4 wells per condition) or to FBS-free culture media supplemented with lipopolysaccharide (LPS; at 1 µg/mL; 4 wells per condition), for additional 24 h. LPS activates TLR-4 receptors at RAW 264.7 cells plasmatic membrane, resulting in the production of cytokines and other inflammatory markers, as nitric oxide (NO) production and release; anti-inflammatory activity is here then measured by the reduction in NO release. After cells incubation (24 h), from each well, 50 µL of supernatant was removed and transferred to a new 96-wellplate, to which 50 µL/well of Griess reagent [0.1 % (w/v) N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride in water and 1 % (w/v) sulfanilamide in 5 % (w/v) H₃PO₄ (v/v)] was added. After 15 min incubation (room temperature, in the dark), absorbance was read at 550 nm (Multiskan EX microplate reader; MTX LabSystems, USA). Quantification of NO was made with resource to a standard curve performed with sodium nitrite (NaNO₂; in the range 0 to 100 µM) and results were expressed as percentage of positive control (i.e., nitrite production by cells only exposed to LPS), set to 100 %, that is 0 % of anti-inflammatory effect. At the end of the experiment, the other 50 µL of culture media were removed and 100 µL/well of Alamar Blue solution were added to assess the cell viability. Cell viability was assessed as described above for Caco-2 cells.

2.5. Freeze-drying of nanoparticles

For a preliminary screening, the excipients glycerol, maltitol, sucrose, trehalose, or sorbitol were selected and added to the blank NPs at 0.5, 1, and 3 % (w/v). 4 mL of each nanoparticle formulation were transferred to a glass vial and then frozen at -80 °C using a freezer Arcetiko ULUF 125® (Arcetiko, Denmark) and subjected to the freeze-drying process for 48 h at a pressure of 0.137 mBar in a Telstar Cryodos-80 freeze drier (Terrassa, Barcelona, Spain). The dried cakes obtained were stored at -20 °C. Once the most suitable cryoprotectant and its optimal percentage were selected, the samples were prepared with drug nanoparticles Lico-A PLGA NPs and functionalized with CPPs Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs and Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs. Since the focus of this study was on obtaining a suitable preservation method with cryoprotectants, the same preservative freeze-drying cycle was used for all nanoparticle formulations.

2.6. Osmolality

The osmolality (mOsm/kg) of nanoparticles formulations and formulations prepared with cryoprotectants, were measured in an Osmometer Type 15 (Löser Messtechnik, Berlin, Germany).

2.7. Reconstitution of Freeze-dried nanoparticles

For the reconstitution of each freeze-dried nanoparticle formulation, a modification of the standardized protocol developed by Kulkarni et al. (Kulkarni et al., 2018) was used. Briefly, freeze-dried cakes were equilibrated to room temperature before being reconstituted. After that, to each formulation, the initial volume of MilliQ® water was added (milliliters of product before the freeze-drying). Each vial was manually swirled at 90 rpm in a circular motion. Swirling of the vial involved rotating around the circumference of a circle with a diameter of 10 cm. Swirling was paused at 2 min for 15 s to visually assess progress, taking care to keep the vial upright and stable to avoid it from tipping and any unsuspended cake residue moving to other parts of the vial. The vial was again swirled for 1 min followed by another 15 s observational pause. The next swirling period was 2 min (with 15 s pause). Finally, two more periods of 2-minute swirling and 15-second observational pause were

3. RESULTADOS

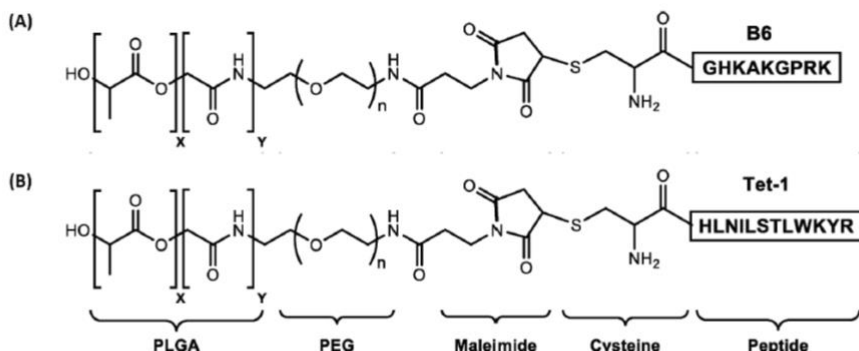


Fig. 1. (A) PLGA-PEG-B6 polymer, (B) PLGA-PEG-Tet-1 polymer.

used, and this was noted as the endpoint of reconstitution. The reconstituted solutions were visually inspected with the same criteria and the one that was totally dissolved and similar in appearance to the non-freeze-dried nanoparticles suspension control was chosen.

2.8. Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC analysis was used to determine the physical state of Lico-A, the components of NPs formulation, and the freeze-dried functionalized nanoparticles. This study was performed in a DSC 200 F3 Maia® (NETZSCH, Germany). It consists of a double oven with two positions, one for the sample crucible to be analyzed and another for the reference crucible, which is normally empty. Samples (between 2 and 5 mg) were weighed into an aluminum crucible, which is then closed and placed in the oven. The samples are subjected to a temperature program between 10 °C and 240 °C (maximum temperature above the sample with the highest melting point), at a heating rate of 10 °C/min. The result of the analysis is translated into a thermogram, and the determination of the parameters (enthalpy, melting start temperature and melting point) is performed with the Proteus® 6.1.0B Thermal Analysis software (NETZSCH, Germany).

2.9. Preparation of *in-situ* forming gels

Gels were prepared dispersing 0.25 % of sodium alginate in NPs suspensions (blank NPs and Lico-A NPs) with the help of the mixer Unguator® (Gako Deutschland GmbH, Schesslitz, Germany) at 800 rpm for 3 min. One day later, MC (0–1 % w/v) and CTAB (0.2 % w/v) were added and mixed at 800 rpm for 3 min. These preparations were left to stand for a day and after that, the P407 (20 % w/v) was added and mixed to yield gels at 1000 rpm for 5 min. The *in-situ* forming gels were adjusted to pH 7.4 with NaOH and stored at 8 °C (Gonzalez-Pizarro et al., 2019).

2.10. Determination of gelation temperature of *in-situ* forming gels

To determine the gelation temperature, 2 mL of each formulation were prepared in glass tubes and placed in a water bath (Huber Kältemaschinenbau AG, Germany) with an initial temperature of 15 °C and then slowly heated at a rate of 1 °C/min. until detection of phase change (from solution to gel) determined by no change in the meniscus and no flow of the formed gel when tilting the vial at an angle of 180° (Mahboobian et al., 2020). The formulation with the most optimal gelation temperature near the ocular surface temperature (32–35 °C), was selected.

2.11. Characterization of *in-situ* forming gels

2.11.1. Texture profile analysis

This study is based on the TA-XT2i® texture analyzer from Stable Micro Systems® (Stable Micro Systems, Godalming, UK) using different probes and the Exponent software (version 6.1.12.0). For all analyzed *in-situ* Forming gels hardness, firmness, mucoadhesiveness, and spreadability at 20 °C and 35 °C were assessed. Data acquisition and analysis was performed using a computer equipped with the Texture Expert® software for all cases.

2.11.1.1. Hardness. The hardness test measures the force required to push the probe into the sample. The probe selected was P/2 2 mm Dia Cylinder Stainless with a crosshead speed of 1.5 mm s⁻¹ and contact area of 3.14 mm². The parameter measured is the maximum force.

2.11.1.2. Firmness. The penetration method was used to determine this parameter, which measure necessary force to produce a deformation. The probe selected was P/0.5 ½” Dia Delrin Aoa which penetrated the sample with a load cell of 5 kg, a trigger force of 0.05 N, a penetration depth of 5 mm, a velocity of 3 mm.s⁻¹ and a contact area of 126.68 mm². The obtained results were plotted as force (N) vs distance (mm).

2.11.1.3. Mucoadhesiveness. An adhesive test was used to compare the surface stickiness of *in-situ* forming gels. The probe (A/MUC Mucoadhesion Test RIG) applied a force of 5 g on the surface of the sample at a test speed of 0.5 mm.s⁻¹ holding it for 60 sec. After this time the probe was withdraw at 8 mm.s⁻¹. The maximum force necessary to overcome the attractive forces between the surface of the product and the surface of the probe was recorder as the mucoadhesiveness.

2.11.1.4. Spreadability. The spreadability test was carried out as described in a previous study (Oliveira et al., 2022). The probe was properly selected (HDP/SR Spreadability RIG) and connected to the equipment at an initial position of 25 mm after its calibration. Samples were inserted into the female cone (bottom probe) and kept in a stove at 25 °C or 35 °C ± 1 °C for 30 min before testing. For measurement, according to the method, the upper probe (male cone) penetrated the sample in the female cone at a speed of 3 mm.s⁻¹ over a distance of 23 mm and then the probe returned to the starting position, providing the result. Compression and tangential forces were involved due to the conical shape of the probe.

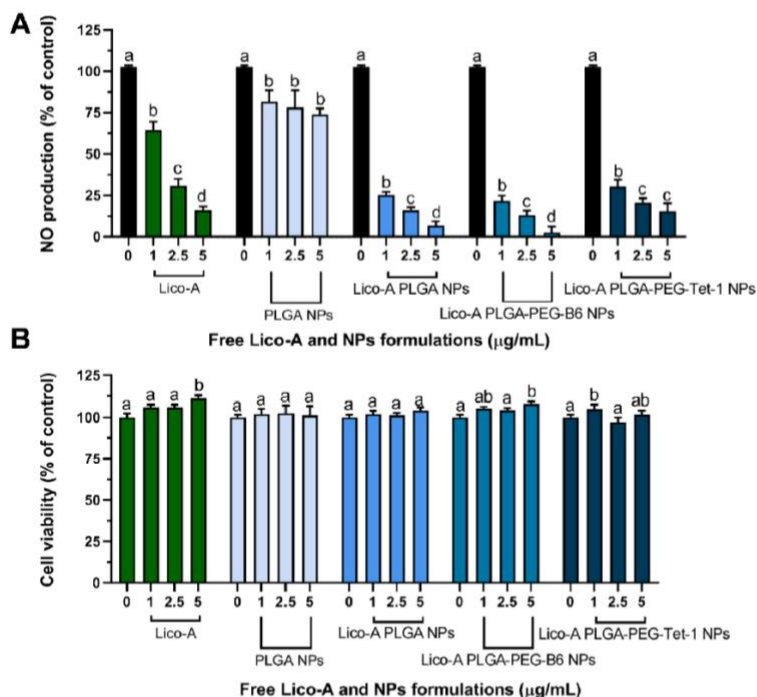


Fig. 3. Anti-inflammatory activity (A) and cell viability (B) of Lico-A, non-loaded NPs (PLGA NPs) and NPs formulations containing Lico-A (Lico-A PLGA NPs) and cell penetrating peptides B6 (Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs) and Tet-1 (Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs) using the LPS-stimulated RAW 264.7 cell model. Anti-inflammatory activity was assessed by quantifying the NO released into the culture media (see methods), and cell viability was performed at the end of the assay (see methods for details). Results are expressed as mean \pm SD ($n = 4$). Statistically significant differences ($p < 0.05$) between the control and sample concentrations are denoted with different letters within the same sample.

anti-inflammatory action of Lico-A and of four formulations was assessed by their ability to reduce the amount of NO released by LPS-stimulated macrophages, and results are shown in Fig. 3A. Lico-A has been reported as anti-inflammatory agent (Cai et al., 2023; Funakoshi-Tago et al., 2010; Galindo et al., 2022) and, indeed, it dose-dependently reduces NO release from LPS-stimulated macrophages. Raw 264-7 cells exposed for 4 h to 5 μ g/mL of Lico-A only released ~ 16 % of NO compared to control (a NO reduction of ~ 84 % of control), denoting its action on TLR4 signalling pathways (Tun et al., 2018) and anti-inflammatory activity. At this concentration Lico-A was not cytotoxic to Raw 264-7 cells as cell viability assay indicates ~ 100 % cell viability (Fig. 3B). Blank NPs (PLGA NPs) *per se* reduce NO release, probably due to its lipid interference and potential competitive binding to TLR4 reducing the LPS activity; however, the action of NPs lipids on reduction of NO release needs further evaluation. Lico-A PLGA NPs show increased anti-inflammatory activity, compared to Lico-A in solution, probably due to improved delivery of Lico-A to the cells surface. Addition of cell penetrating peptides to Lico-A-PLGA NPs maintained the anti-inflammatory activity as shown in Fig. 3A (two rightmost panels). None of the formulations was toxic to RAW 264.7 cells, as cell viability is maintained at 100 % (Fig. 3B).

It is commonly reported that, when CPPs are administered alone, the cell viability is lower than the control; however, when linked to NPs, the toxicity is lower, increasing the biocompatibility of nanoparticles. This was the case of PC12 cells exposed to B6 peptide which showed a decrease in 35 % of viability compared to non-exposed cells (cell viability ~ 65 % of control), the same decrease was observed when exposed to SA-Se-NPs. However, and as reported by Yin et al. (2015) (Yin et al., 2015) when cells were treated with SA-Se-NPs conjugated with B6 peptide (B6-SA-Se-NPs) the cell viability was only reduced in 10

% from control. This means that functionalization of NPs with B6 resulted in lower toxicity, as happened in our work. In a study using curcumin as delivering molecule and B6 as CPP, Fan et al. (2018) (Fan et al., 2018) assessed the viability of HT22 cells exposed to different concentrations of curcumin (Cur). Cur-loaded PLGA-PEG, Cur-loaded PLGA-PEG-B6, and PLGA-PEG-B6. In this case, the authors observed no statistical differences between all samples, but cells exposed to Cur-loaded PLGA-PEG-B6 showed on average higher viability. This study also indicates that the functionalized particles were no more cytotoxic. In other study, published by Zhang et al. (2014) (Zhang et al., 2014), PC12 cells treated with EGCG-stabilized selenium nanoparticles coated with Tet-1 peptide (Tet-1-EGCG@Se) showed higher viability than cells exposed to EGCG@Se (selenium nanoparticles with EGCG attached onto the surface), also showing that the binding of CPPs to NPs does not increase cell toxicity. Conjugation of PLGA coated-curcumin nanoparticles with Tet-1, was also shown to result in biocompatible nanoparticles, without reporting higher toxicity against GI-1 glioma cells (Mathew et al., 2012).

In our study, we showed that encapsulation of LicoA reduces the inherent toxicity of the drug, attributed to the controlled drug release obtained when using nanoparticles. Besides, the functionalization of NPs with both CPPs improves biocompatibility (by reducing cell toxicity even more), as evidenced by the increase of the IC50. The aim of this work was the delivery of an anti-inflammatory drug while maintain cell viability. We show that encapsulation reduces the toxicity of LicoA and also improved the anti-inflammatory effect of LicoA. Also, conjugation of NPs with CPPs, namely with Tet-1, resulted in an increase of biocompatibility while with B6 it was equal to the NPs.

3. RESULTADOS

Table 2
Osmolality values of PLGA NPs nanoparticles in presence of different percentages of cryoprotectants.

Cryoprotectant % (w/v)	PLGA NPs Osmolality (mOsm/kg)	
	Without cryoprotectant	With cryoprotectant
Glycerol	0.5	282
	1	282
	3	286
Maltitol	0.5	286
	1	286
	3	286
Sucrose	0.5	284
	1	284
	3	285
Trehalose	0.5	285
	1	283
	3	283
Sorbitol	0.5	282
	1	282
	3	282



Fig. 4. Visual evaluation of PLGA NPs (A); reconstituted sample of PLGA NPs with 3% maltitol (w/v) (B).

Table 3
Osmolality values of the optimized and functionalized NPs formulations in presence or not of the selected cryoprotectant at 3% (w/v) and evaluation of the cake appearance after freeze-drying.

Formulations	Before freeze-drying Osmolality (mOsm/Kg)		After freeze-drying Cake appearance
	Without maltitol	With maltitol	
Lico-A PLGA NPs	295	307	Collapsed in the middle with raised edges. Rough and homogeneous cake, yellow in color and opaque.
	295	306	
Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs	297	312	Thin film in the middle of vial height. Cake homogeneous, slightly porous, yellow in color and opaque.
	297	309	
Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs	298	317	Homogeneous, smooth, yellow in color, and opaque. Collapsed with shrinkage, flat, rough cake.
	298	312	

3.3. Freeze-drying

Glycerol, maltitol, sucrose, trehalose, and sorbitol were evaluated as possible cryoprotectants and were dissolved in PLGA NPs at 0.5, 1, and 3% (w/v). In this phase, the osmolality was measured (Table 2) in order to assess the adequate range which should be similar to lacrimal fluid, around 302–318 mOsm/kg to avoid ocular irritation (Ramos Yacasi et al., 2017).

For the freeze-drying procedure was carried out according to the method described in section 2.5. Subsequently, the obtained cakes were reconstituted and compared in appearance with a fresh sample of blank NPs. The lyophilized pharmaceutical must retain the original product

properties, low residual moisture, good cake appearance and fast reconstitution (Trenkensschuh and Friess, 2021).

Formulations with trehalose and maltitol at 3% (w/v) obtained the shortest reconstitution times. On the other hand, sucrose freeze-dried nanoparticles at 0.5% (w/v) took the longest time to reconstitute. In addition, maltitol samples showed the most similar visual appearance to the fresh samples of PLGA NPs (Fig. 4). Considering the values of osmolality, aspect of the dried cake, and the time and appearance of the reconstitutions, maltitol was chosen as the ideal cryoprotectant at the percentage of 3% (w/v) for studies with Lico-A PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs and Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs.

Once the cryoprotectant and its appropriate percentage were selected, the freeze-drying of the final formulations continued. Table 3 shows the results of the evaluation of Lico-A PLGA NPs and CPP-functionalized NPs. The osmolality values remained within the desired limits for formulations intended for ocular application and slight differences were found in the appearance of the cake after freeze-drying, possibly due to the structural difference from one CPP to another.

An important tool to predict the physical stability of freeze-dried products during storage is DSC analysis (Ataide et al., 2021). The cake obtained by freeze-dried nanoparticles must be stored at a temperature below the thermal transitions of the dried formulation to prevent any collapse, shrinkage or any other destabilization, such as crystallization to be pharmaceutically acceptable (Abdelwahed et al., 2006). Thermal profiles of freeze-dried formulations with maltitol at 3% (w/v) were analyzed by DSC (Fig. 5) to check thermal transitions.

Thermogram of freeze-dried PLGA NPs with 3% maltitol (w/v) (Fig. 5) showed a broad endothermic peak starting at about 94.2 °C with maximum at 111.2 °C, can be likely attributed to evaporation events. Volatilized residual moisture from freeze-dried products usually shows up in thermograms as broad endothermic peaks near the boiling point of water (Jones and Seyler, 1994). Moreover, the thermal analysis of all the freeze-dried formulations with this oligosaccharide-derived sugar alcohol, as expected according to the literature, presented a glass transition at above room temperature (Shirke et al., 2005). The glass transition temperature (T_g) was determined as the maximum inflection point of the discontinuities in the heat flow curves, being 57.2 °C to 66.4 °C with midpoint 62.1 °C for PLGA NPs; 39.6 °C to 46.1 °C with midpoint 43.4 °C for Lico-A PLGA NPs; 44.5 °C to 50.9 °C with midpoint 47.7 °C for Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs and 48.4 °C to 50.8 °C with midpoint 49.1 °C for Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs. Higher T_g values of the formulations compared to the value of the cryoprotectant, could be due to the polymer since the presence of this excipient with high T_g is a way to raise the T_g of the amorphous sugar alcohol solid. In the case of the formulations of PLGA NPs and Lico-A-PLGA-Tet-1 NPs, endothermic peaks can be seen at 130.5 °C and 149.4 °C respectively, which might suggest partial crystallization of the freeze-drying process (Kadoya et al., 2010).

In the same way that the oligosaccharides, maltitol should substitute water molecules surrounding the NPs to maintain the conformation during the freeze-drying, due to its sufficient number of water-substituting hydrogen bonds, decreasing the magnitude of most physical and chemical changes that occur during storage (Kadoya et al., 2010).

3.4. In-situ forming gel formulation

The selection of the correct excipients is important for the purpose to achieve an optimal balance between ocular formulation properties and formulation effect on the ocular surface (Jurišić Dukovski et al., 2020). PF127 was used in the formulation to form an *in-situ* forming gel (ISFG). Regarding the concentration of PF127, systems composed of 20% (w/w) PF127 exhibited mucoadhesive profile marginally higher than those containing 17.5% (da Silva et al. (2021)). This polymer has the characteristic of allowing the formulation to remain liquid under storage conditions, but when it comes into contact with ocular temperature it

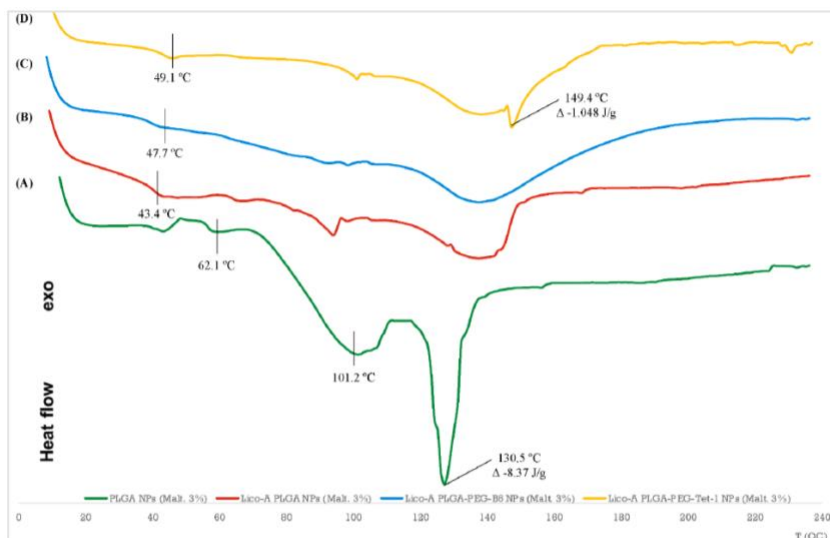


Fig. 5. DSC analysis after freeze-drying in presence of 3 % maltitol (w/v) of (A) PLGA NPs; (B) Lico-A PLGA NPs; (C) Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs and (D) Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs.

Table 4
Composition and characterization of *in-situ* gel formulations.

Formulation	PF127 (w/v)	MC (w/v)	CTAB (w/v)	pH without buffer	pH with buffer	T _{sol-gel} (°C) ^a
ISFG-1 PLGA NPs	20.0	0.0	0.2	6.94	7.39	37 ± 1.0
ISFG-2 PLGA NPs	20.0	0.5	0.2	6.91	7.36	32 ± 1.2
ISFG-3 PLGA NPs	20.0	1.0	0.2	6.97	7.42	22 ± 1.0
ISFG-1 Lico-A PLGA NPs	20.0	0.0	0.2	6.93	7.37	36 ± 0.6
ISFG-2 Lico-A PLGA NPs	20.0	0.5	0.2	6.83	7.38	32 ± 0.6
ISFG-3 Lico-A PLGA NPs	20.0	1.0	0.2	6.95	7.41	21 ± 1.2

^a Mean (±SD) of at least three replicate measurements.

turns into a gel. With this peculiarity, precision was expected in the application of the formulation and that the contact time of the preparation in the precorneal area would be prolonged, reduce the elimination rate, and increasing the bioavailability of the drug (Cardoso et al., 2022). MC was used as a viscosity enhancing agent in different concentrations (that maintained the thermally reversible sol – gel characteristics of the PF127 based formulations) in an attempt not to use a higher concentration of PF127, and to obtain reasonable viscosity for the prepared formulations. An important and critical parameter for thermosensitive gel formulation is the gelation temperature (T_{sol-gel}). Since the average temperature of precorneal mucosa is ~ 35 °C (Tan et al., 2010), the optimal thermosensitive *in-situ* gel should have a T_{sol-gel} above room temperature to ensure that the preparation remains liquid to provide accurate dosing (Krtalić et al., 2018), and the acceptable range of T_{sol-gel} for thermosensitive *in-situ* ocular gel is 30–35 °C to avoid the rapid leakage out of the formulation (Permana et al., 2021). T_{sol-gel} values of the formulations are shown in Table 4. ISFG-2 was selected as

the optimal formulation.

The initial rheological test was performed with PLGA NPs and Lico-A PLGA NPs to select the optimal formulation. Three formulations of *in-situ* forming gel were tested ISFG-1, ISFG-2 and ISFG-3. The results of the viscosity illustrate that the increment of MC concentration increase the consistency of the gel, which corroborates the result obtained in the gelation temperature test. In aqueous systems, PF127 thermosensitive gels are formed by hydrogen bonding, due to the attraction between the poloxamer ether oxygen atom and the protons of water. Thus, by adding the MC amount (compound with hydroxyl groups), the number of hydrogen bonds is expected to increase, leading to higher viscosity (Mansour et al., 2008).

After that, a new rheological test was performed on the optimal formulation (ISFG-2) with PLGA NPs, Lico-A PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs and Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs, with the aim of analyzing the viscosity which depend on temperature and shear rate, so the storage and application temperature of the formulation can be used as factors. In our study, formulations were tested at a controlled shear rate at two temperatures, 20 °C and 35 °C. The ocular temperature is approximately between 32 °C and 34 °C (Khattab et al., 2019), so this temperature corresponds to the application of *in-situ* forming gel on the pre-corneal area thus increasing its contact time with the ocular mucus membrane. The temperature of 20 °C correspond to the storage temperature, just before its application on the ocular surface. The impact of the different temperatures of the test on the consistency of the *in-situ* forming gel was shown in Fig. 6, where it was observed that the viscosity increased with the elevation of temperature. This could be explained, because a higher temperature caused the dehydration of the PEO/PPO/PEO triblock units of PF127 by the breakdown of the hydrogen bonds between PEO units and water. As a result, this dehydration leads to increasing the intermolecular interaction between PEO blocks and the copolymer molecules aggregate into micelles, allowing the formation of a more closely packed and a more viscous gel (El-Kamel, 2002; Kolsure and Rajkapoor, 2012).

The temperature and shear rate significantly affect the viscosity of the formulation. Fig. 6 shows the rheograms where the evolution of the

3. RESULTADOS

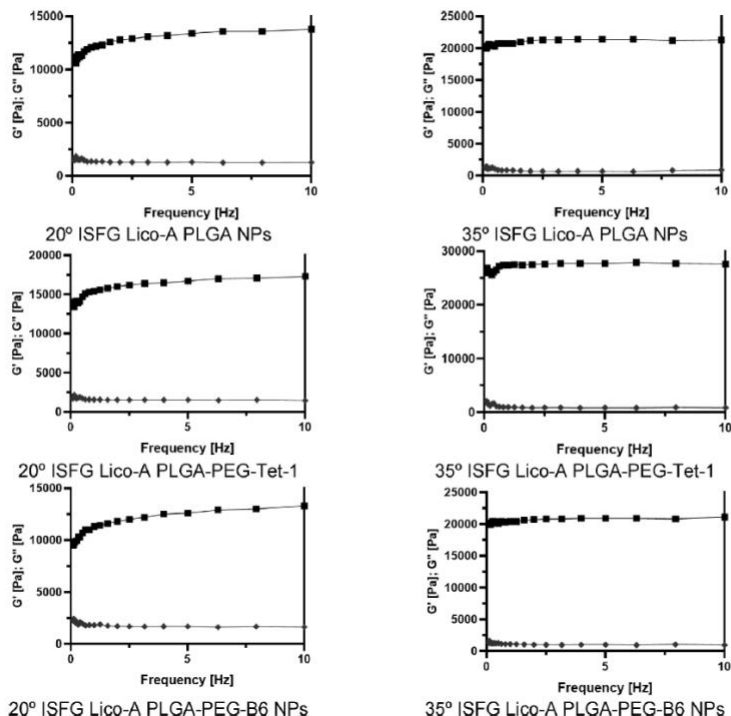


Fig. 6. Frequency-dependent changes in viscoelastic properties (■ storage modulus G' [Pa]; ▼ loss modulus G'' [Pa]) of the optimized in-situ forming gel with Lico-A PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs and Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs at 20 °C and 35 °C.

Table 5
Texture profile analysis of the optimized in-situ forming gel with Lico-A-PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs and Lico-A-PLGA-PEG-Tet-1 NPs.

Temperature	Parameter		ISFG Lico-A PLGA NPs	ISFG Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs	ISFG Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs
20 °C	Hardness	Force (N)	0.055	0.058	0.056
		Gradient (N/sec)	0.001	0.001	0.001
	Firmness	Force (N)	31.714	26.426	26.468
		Separation (mm)	0.165	0.15	0.375
	Mucoadhesiveness	Negative force (N)	-29.328	-26.331	-23.228
		Gradient (g/sec)	5.268	4.167	4.215
Spreadability	Force (N)	2.73	2.983	1.803	
	Separation (mm)	3.738	5.048	3.688	
35 °C	Hardness	Force (N)	29.289	28.815	28.592
		Gradient (N/sec)	9.624	9.476	9.395
	Firmness	Force (N)	98.448	98.153	107.324
		Separation (mm)	0.06	0.045	0.075
	Mucoadhesiveness	Negative force (N)	-81.393	-84.939	-73.931
		Gradient (g/sec)	18.627	18.512	20.299
Spreadability	Force (N)	10.628	10.261	11.871	
	Separation (mm)	9.9	12.15	10.85	

dynamic modules with respect to frequency is observed. It is clear that the results revealing suitable gel stability and a viscoelastic gel behavior. In all the formulations there is no crossover point between the modules, behaving like a weak-gel (de Castro et al., 2022; Kirtalić et al., 2018). The rheograms obtained during tests at two temperatures, 20 °C and 35 °C, show slight changes of the shape of the overall rheogram as the temperature increases. At 35 °C, an increase in the distance between the modules G' and G'' was observed for each formulation, which is the

result of higher shear stress due to the increase in viscosity at this temperature. Regarding the point of view of the ocular application of the *in-situ* gel, it is a beneficial phenomenon to increase the contact of the formulation with the pre-corneal mucosa because the temperature of 35 °C corresponds to the temperature on the ocular surface. After administration, the formulation is expected to form a gel ($G' > G''$) and, in this way, withstands the shearing forces expected in the eye during and between blinking (Cardoso et al., 2022). These results indicated that

3. RESULTADOS

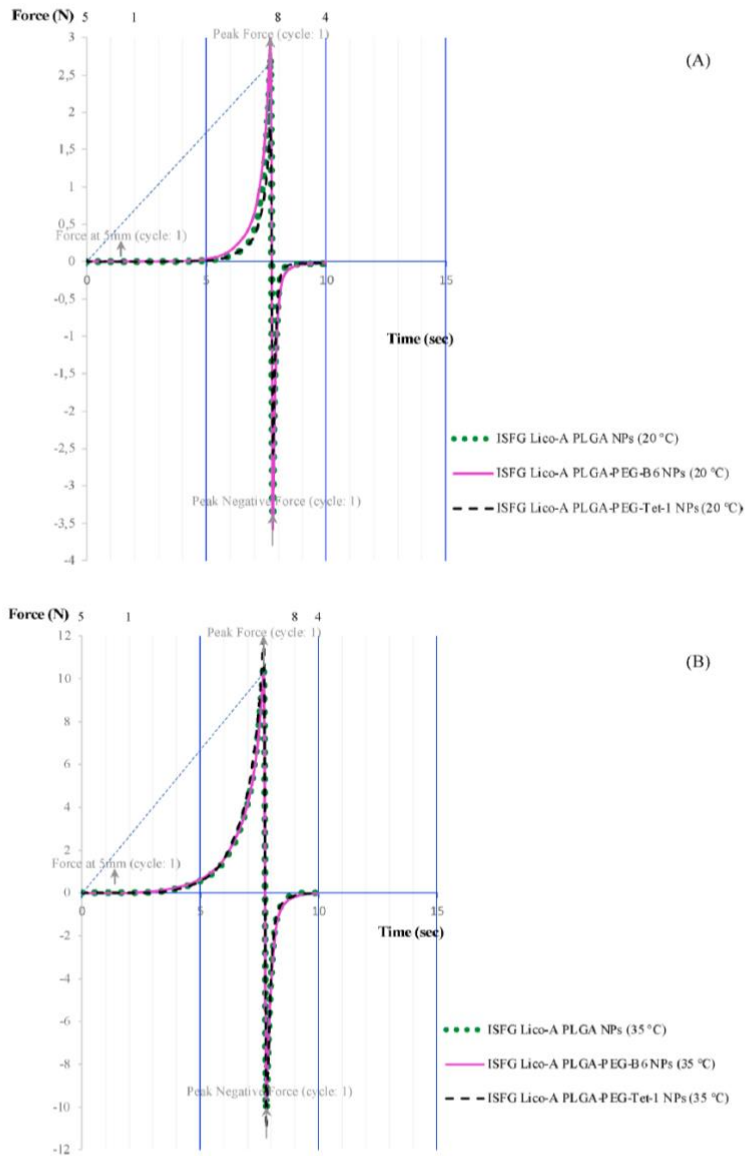


Fig. 7. Spreadability performance of the optimized in-situ forming gel loaded Lico-A PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs and Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs at (A) 20 °C and (B) 35 °C.

the formulations containing CPPs can increase the viscosity as the temperature increases, but the $T_{sol-gel}$ does not occur until 32 °C.

Texture analysis provides instrumental information on some structure properties of products and can predict the characteristics of the formulation *in vivo* (De Souza Ferreira et al., 2017). Results of texture analysis are important for the development of topical dosage forms

because the patient acceptability of the product depends mostly on its application and organoleptic attributes. The analysis of texture parameters, hardness, firmness, mucoadhesiveness and spreadability are directly influenced by the viscosity of the formulations. Textural properties are displayed in Table 5. The measurement of mechanical characteristics such as hardness and firmness for *in-situ* forming gel, could be

3. RESULTADOS

calculated from the plotted of force versus distance, these parameters are very important, and the results presented in Table 5. To facilitate application at the time of use, the formulation must have adequate strength, must be lower enough to ensure the easy administration but not too low to avoid rapid drainage of the formulation from the eye, and not too stiff to prevent patient discomfort (Khattab et al., 2019). Hardness is the force required to attain a given deformation of the gel and is a measure of the easiness of application of the gel at the site of action. Gel strength provides evidence about the firmness of the gelled structure and it is directly proportional to hardness, firmness provides the capability of the gel to resist the mucociliary clearance in the target area (Dawre et al., 2022). Thus, as shown in Table 5, At 20 °C, the temperature during administration, all formulation were in semi-liquid form and showed low values of hardness and firmness, these low values facilitate the correct withdrawal of the product from the container (Said dos Santos et al., 2020). The increase in analysis temperature from 20 °C to 35 °C, was followed by an increase of hardness and firmness of *in-situ* forming gels. These findings are due to the modifications in the internal structure of the poloxamer, exhibiting a stronger polymeric network (El-Kamel, 2002; Kolsure and Raj Kapoor, 2012). For example, in the case of ISFG loaded Lico-A PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs and Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs at 35 °C the hardness was much higher in comparison with the analysis at 20 °C for the same formulations, presenting values from 29.3 N, 28.8 N and 28.6 N respectively, and firmness in the same way for the ISFG loaded NPs. Increasing the temperature from 20 °C to 35 °C led to increasing the hardness and firmness, indicating an adequate gel consistency to keep the formulation with no deformation at the site of action (Jones et al., 1997). The influence of hardness on the retention time of the formulation on the target site has been studied, since the adequate hardness prevents the preparation dilution by mucociliary clearance (De Souza Ferreira et al., 2017).

Formulations that have been designed for topical use in the eye must show adhesion to mucosal surface as this will decrease their clearance time, and thus improve clinical efficacy. Adhesiveness is defined as the work required to overcome the attractive forces between the surface of the sample and the surface of the probe (Pandey et al., 2017). With mucoadhesive studies performed at/near the target ocular temperature (35 °C) the highest value of mucoadhesion was found with ISFG Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs where recorded a negative force of -84.9 N. As we expected the lowest value of work was shown by ISFG loaded NPs at 20 °C. These results showed that as temperature of test was increased, a concomitant increase in mucoadhesion was observed and this is explained by the viscosity impact on this parameter during the analysis. Our studies revealed that ISFG Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs displayed the lowest mucoadhesion/adhesiveness between formulation and the probe; this can be attributed to its relatively different structure. Regarding the adhesion strength, it increased with increasing temperature, due to FP127 organization by $T_{sol-gel}$. As a result, the higher adhesiveness values at 35 °C from *in-situ* forming gel formulations is a desirable result, because it means, they can adhere to the application surface for a sufficiently long time, which may affect the drugs residence time at the application site (Andrews et al., 2009; Pandey et al., 2017). In line with earlier reports indicating good mucoadhesive properties of a formula combination of PF127 and MC (Soliman et al., 2019).

On the other hand, it could be expected that the increases of the temperature would increase in the gel viscosity and thus decrease its spreadability. In this case, a suitable spreadability value, facilitates its spreading to a large surface area of ocular mucosa. At 20 °C we obtained high values of spreadability (less force is required). For instance, ISFG loaded Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs at 35 °C seems to be the better spreadability results, in comparison with the other formulations at the same evaluation temperature. The spreadability plot in Fig. 7 illustrates the test results at storage and application temperatures. All these properties may be useful in expecting the formula behavior in different environmental and biological conditions.

4. Conclusions

In this study, Lico-A PLGA NPs functionalized with CPPs (B6 and Tet-1) were produced by solvent displacement method with adequate average size, polydispersity index, zeta potential and encapsulation efficiency. Results of *in vitro* biological experiments in Caco-2 and RAW 264.7 cell lines, showed a relevant anti-inflammatory activity and non-cytotoxic effect. Furthermore, the stability of the nanoparticles, was improved by freeze-drying and encapsulation in a thermosensitive hydrogel. In this sense, Lico-A PLGA NPs functionalized with CPPs were freeze-dried in the presence of different cryoprotectants, and the redispersibility of NPs in the reconstituted suspension was then evaluated to compare the osmolality, the time and appearance of the reconstitutions and the anti-aggregation effect of the different additives. The appearance of the freeze-dried cakes with 3 % maltitol (w/v) and their reconstituted nanosuspensions, revealed a fast reconstitution time, and full redispersion of NPs with no apparent aggregates. On the other hand, PF127 (20 % w/v) was used to prepare a thermosensitive *in-situ* forming gel with Lico-A PLGA NPs functionalized with CPPs for ocular administration. The formulation was maintained in a flowing semi-liquid state under non-physiological conditions and transformed into a semi-solid state under ocular temperature conditions (35 °C), which is beneficial for ocular administration. The pH, viscosity, texture parameters and gelation temperature results met the requirements for ophthalmic formulations. The gel has characteristics of viscoelasticity, suitable mechanical and mucoadhesive performance which facilitate its uniform distribution over the conjunctiva surface. Unlike eye drops, gels prolong ocular retention time, reducing the frequency of administration and improving patients compliance. For all the above, these appropriately formulated thermosensitive *in-situ* forming gels offer an alternative solution to current challenges in ocular drug delivery. This is of great clinical significance regarding the use of Licochalcone-A for treating ocular inflammations and provide a new pharmaceutical form for nanoparticles functionalized with CPPs.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

R. M. Galindo-Camacho acknowledges the financial support of the Generalitat de Catalunya for the PhD scholarship FI-DGR EMC/2199/2017 (DOGC-7459-2017) and for the scholarship Santander Research/Convocatòria d'estades 2022 per a doctorands de la UB. Author are also thankful to the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness, and the European Regional Development Fund (grants RTI2018-094120-B-I00 and PID2021-122216OB-I00). E. B. Souto wishes to acknowledge the national funds from FCT—Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., in the scope of the project UIDP/04378/2020 and UIDB/04378/2020 of the Research Unit on Applied Molecular Biosciences—UCIBIO and the project LA/P/0140/2020 of the Associate Laboratory Institute for Health and Bioeconomy—i4HB

References

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., Fessi, H., 2006. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 1688–1713.
- Ali, Y., Lehmussaari, K., 2006. Industrial perspective in ocular drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 1258–1268.

- Andreati, T., Killi, C.P., de Souza, A.L.R., Fangueiro, J.F., Fernandes, L., Doktorovova, S., Santos, D.L., Garcia, M.L., Gremiao, M.P.D., Souto, E.B., Silva, A.M., 2014. Surface engineering of silica nanoparticles for oral insulin delivery: Characterization and cell toxicity studies. *Colloids Surface B* 123, 916–923.
- Andrews, G.P., Lavery, T.P., Jones, D.S., 2009. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71, 505–516.
- Ataide, J.A., Geraldes, D.C., Gérios, E.F., Bissaco, F.M., Cefali, L.C., Oliveira-Nascimento, L., Mazzola, P.G., 2021. Freeze-dried chitosan nanoparticles to stabilize and deliver bromelain. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 61, 102225.
- Badran, M.M., Alomrani, A.H., Harira, G.I., Ashour, A.E., Kumar, A., Yassin, A.E., 2019. Novel docetaxel chitosan-coated PLGA/PCL nanoparticles with magnified cytotoxicity and bioavailability. *Biomed. Pharmacother.* 106, 1461–1468.
- Bai, L., Lei, F., Luo, R., Fei, Q., Zheng, Z., He, N., Gui, S., 2022. Development of a Thermosensitive In-Situ Gel Formulations of Vancomycin Hydrochloride: Design, Preparation, In Vitro and In Vivo Evaluation. *J. Pharm. Sci.* 111, 2552–2561.
- Cai, M., Xu, Y.-C., Deng, B., Chen, J.-B., Chen, T.-F., Zeng, K.-F., Chen, S., Deng, S.-H., Tan, Z.-B., Ding, W.-J., Zhang, S.-W., Liu, B., Zhang, J.-Z., 2023. Radix Glycyrrhizae extract and licochalcone exert an anti-inflammatory action by direct suppression of toll like receptor 4. *J. Ethnopharmacol.* 302, 115869.
- Carbone, C., Martins-Gomes, C., Cadedo, C., Silva, A.M., Musumeci, T., Pignatello, R., Puglisi, G., Souto, E.B., 2018. Mediterranean essential oils as precious matrix components and active ingredients of lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 548, 217–226.
- Cardoso, C.O., Ferreira-Nunes, R., Cunha-Filho, M., Grateri, T., Gelfuso, G.M., 2022. In situ gelling microemulsion for topical ocular delivery of moxifloxacin and betamethasone. *J. Mol. Liq.* 360, 119559.
- Cho, J.J., Chae, J.-I., Yoon, G., Kim, K.H., Cho, J.H., Cho, S.-S., Cho, Y.S., Shim, J.-H., 2014. Licochalcone A, a natural chalconoid isolated from *Glycyrrhiza inflata* root, induces apoptosis via Sp1 and Sp3 regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* 45, 667–674.
- Comstock, T.L., DeCory, H.H., 2012. Advances in Corticosteroid Therapy for Ocular Inflammation: Loteprednol Etabonate. *Int. J. Inflamm.* 2012, 789623.
- da Silva, J.B., dos Santos, R.S., da Silva, M.B., Braga, G., Cook, M.T., Brunchi, M.L., 2021. Interaction between mucoadhesive cellulose derivatives and Pluronic F127: Investigation on the micelle structure and mucoadhesive performance. *Mater. Sci. Eng. C* 119, 111643.
- Dawre, S., Waghela, S., Sarangi, G., 2022. Statistically designed vitamin D3 Encapsulated PLGA microspheres dispersed in thermoresponsive in-situ gel for nasal delivery. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 75, 103688.
- de Castro, K.C., Cócó, J.C., dos Santos, E.M., Ataide, J.A., Martinez, R.M., do Nascimento, M.H.M., Prata, J., da Fonte, P.R.M.L., Severino, P., Mazzola, P.G., Baby, A.R., Souto, E.B., de Araujo, D.R., Lopes, A.M., 2022. Pluronic® triblock copolymer-based nanoformulations for cancer therapy: a 10-year overview. *Journal of Controlled Release (revised)*.
- De Souza Ferreira, S.B., Da Silva, J.B., Borghi-Pangoni, F.B., Junqueira, M.V., Brunchi, M.L., 2017. Linear correlation between rheological, mechanical and mucoadhesive properties of poly(carboxiphil) polymer blends for biomedical applications. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 66, 265–275.
- El-Haddad, M.E., Hussien, A.A., Saeed, H.M., Farid, R.M., 2021. Down regulation of inflammatory cytokines by the bioactive resveratrol-loaded chitonosomes in induced ocular inflammation model. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 66, 102787.
- El-Kamel, A.H., 2002. In vitro and in vivo evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate. *Int. J. Pharm.* 241, 47–55.
- Fan, S., Zheng, Y., Liu, X., Fang, W., Chen, X., Liao, W., Jing, X., Lei, M., Tao, E., Ma, Q., Zhang, X., Guo, R., Liu, J., 2018. Curcumin-loaded PLGA-PEG nanoparticles conjugated with B6 peptide for potential use in Alzheimer's disease. *Drug Deliv.* 25, 1091–1102.
- Funakoshi-Tago, M., Nakamura, K., Tsuruya, R., Hatanaka, M., Mashino, T., Sonoda, Y., Kasahara, T., 2010. The fixed structure of Licochalcone A by a β -unsaturated ketone is necessary for anti-inflammatory activity through the inhibition of NF- κ B activation. *Int. Immunopharmacol.* 10, 562–571.
- Galindo, R., Sánchez-López, E., Gómara, M.J., Espina, M., Ertcheto, M., Cano, A., Haro, I., Camins, A., García, M.L., 2022. Development of Peptide Targeted PLGA-PEGylated Nanoparticles Loading Licochalcone-A for Ocular Inflammation. *Pharmaceutics* 14, 285.
- Gause, S., Hsu, K.-H., Shafor, C., Dixon, P., Powell, K.C., Chauhan, A., 2016. Mechanistic modeling of ophthalmic drug delivery to the anterior chamber by eye drops and contact lenses. *Adv. Colloid Interface Sci.* 233, 139–154.
- Gessner, I., Neumörf, I., 2020. Nanoparticles Modified with Cell-Penetrating Peptides: Conjugation Mechanisms, Physicochemical Properties, and Application in Cancer Diagnosis and Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 21.
- Gonzalez-Pizarro, R., Carvajal-Vidal, P., Halbutal Belloua, L., Calpena, A.C., Espina, M., García, M.L., 2019. In-situ forming gels containing fluorometholone-loaded polymeric nanoparticles for ocular inflammatory conditions. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 175, 365–374.
- Guo, W., Liu, B., Yin, Y., Kan, X., Gong, Q., Li, Y., Cao, Y., Wang, J., Xu, D., Ma, H., Fu, S., Liu, J., 2019. Licochalcone A Protects the Blood-Milk Barrier Integrity and Relieves the Inflammatory Response in LPS-Induced Mastitis. *Front. Immunol.* 10.
- Jones, K., Seyler, R., 1994. Differential scanning calorimetry for boiling points and vapor pressure. *NATAS Notes* 26, 61–69.
- Jones, D.S., Woolfson, A.D., Brown, A.F., 1997. Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. *Int. J. Pharm.* 151, 223–233.
- Jurišić Dukovski, B., Juretić, M., Bračko, D., Randjelović, D., Savić, S., Crespo Moral, M., Diebold, Y., Filipović-Grčić, J., Pepić, I., Lovrić, J., 2020. Functional ibuprofen-loaded cationic nanoemulsion: Development and optimization for dry eye disease treatment. *Int. J. Pharm.* 576, 118979.
- Kadowaki, M., Matsuura, T., Imataka, H., Ishida, N., Imamura, K., 2022. Extraordinary high preservation of the dispersion state of Au nanoparticles during freeze-thawing and freeze-drying with gum arabic. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 639, 128392.
- Kadoya, S., Fujii, K., Izutsu, K., Yonemochi, E., Terada, K., Yomota, C., Kawanishi, T., 2010. Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide-derived sugar alcohols. *Int. J. Pharm.* 389, 107–113.
- Khatab, A., Marzok, S., Ibrahim, M., 2019. Development of optimized mucoadhesive thermosensitive pluronic based in situ gel for controlled delivery of Latanoprost: Antiglaucoma efficacy and stability approaches. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 53, 101134.
- Kolsure, P.K., Raj Kapoor, B., 2012. Development of zoledronic acid gel for nasal administration. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 5, 89–94.
- Krtalić, I., Radojević, S., Hafner, A., Grassi, M., Nenadić, M., Cetina-Čizmek, B., Filipović-Grčić, J., Pepić, I., Lovrić, J., 2018. D-Optimal Design in the Development of Rheologically Improved In Situ Forming Ophthalmic Gel. *J. Pharm. Sci.* 107, 1562–1571.
- Kulkarni, S.S., Suryanarayanan, R., Rinella, J.V., Bogner, R.H., 2018. Mechanisms by which crystalline mannitol improves the reconstitution time of high concentration lyophilized protein formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 131, 70–81.
- Liu, X., Xing, Y., Li, M., Zhang, Z., Wang, J., Ri, M., Jin, C., Xu, G., Piao, L., Jin, H., Zuo, H., Ma, J., Jin, X., 2021. Licochalcone A inhibits proliferation and promotes apoptosis of colon cancer cell by targeting programmed cell death-ligand 1 via the NF- κ B and Ras/Raf/MEK pathways. *J. Ethnopharmacol.* 273, 113989.
- Luo, W.-C., O'Reilly Berings, A., Kim, R., Zhang, W., Patel, S.M., Bogner, R.H., Lu, X., 2021. Impact of formulation on the quality and stability of freeze-dried nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 169, 256–267.
- Mahboobian, M.M., Mohammadi, M., Mansouri, Z., 2020. Development of thermosensitive in situ gel nanoemulsions for ocular delivery of acyclovir. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 55, 101400.
- Makadia, H.K., Siegel, S.J., 2011. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carriers. *Polymers* 3, 1377–1397.
- Mansour, M., Mansour, S., Mortada, N.D., Abd Elhady, S.S., 2008. Ocular Poloxamer-Based Ciprofloxacin Hydrochloride In Situ Forming Gels. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 34, 744–752.
- Mathew, A., Fukuda, T., Nagaoka, Y., Hazumura, T., Morimoto, H., Yoshida, Y., Maekawa, T., Venugopal, K., Kumar, D.S., 2012. Curcumin Loaded-PLGA Nanoparticles Conjugated with Tet-1 Peptide for Potential Use in Alzheimer's Disease. *PLoS One* 7, e32616.
- Maulvi, F.A., Shetty, K.H., Desai, D.T., Shah, D.O., Wilcox, M.D.P., 2021. Recent advances in ophthalmic preparations: Ocular barriers, dosage forms and routes of administration. *Int. J. Pharm.* 506, 121105.
- Mazer, R., Yamşog, J.B.G., Woesseldjewe, D., Choinsard, L., Géze, A., 2020. Recent Advances in the Design of Topical Ophthalmic Delivery Systems in the Treatment of Ocular Surface Inflammation and Their Biopharmaceutical Evaluation. *Pharmaceutics* 12.
- Mittal, A., Kakkur, R., 2021. Synthetic methods and biological applications of retrochalcones isolated from the root of *Glycyrrhiza* species: A review. *Results Chem.* 3, 100216.
- Mobaraki, M., Soltani, M., Zare Harofte, S., E. L.Z., Daliri, R., Aghamirsalim, M., Raahemifar, K., 2020. Biodegradable Nanoparticle for Cornea Drug Delivery: Focus Review. *Pharmaceutics* 12.
- Mohd Shahrizan, M.S., Abd Aziz, Z.H., Katas, H., 2022. Fluid gels: A systematic review towards their application in pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 67, 102947.
- Oliveira, N., Cádiz-Gurrea, M.d.L.L., Silva, A.M., Macedo, C., Rodrigues, F., Costa, P., 2022. Development and Optimization of a Topical Formulation with *Castanea sativa* Shells Extract Based on the Concept “Quality by Design”. *Sustainability* 14, 129.
- Pandey, P., Cabot, P.J., Wallwork, B., Panizza, B.J., Parekh, H.S., 2017. Formulation, functional evaluation and ex vivo performance of thermoresponsive soluble gels - A platform for therapeutic delivery to mucosal sinus tissue. *Eur. J. Pharm. Sci.* 96, 499–507.
- Permana, A.D., Utami, R.N., Layadi, P., Himawan, A., Juniarti, N., Anjani, Q.K., Utomo, E., Mardikasari, S.A., Arjuna, A., Donnelly, R.F., 2021. Thermosensitive and mucoadhesive in situ ocular gel for effective local delivery and antifungal activity of itraconazole nanocrystal in the treatment of fungal keratitis. *Int. J. Pharm.* 602, 120623.
- Ramos Yacasi, G.R., Calpena Campmany, A.C., Egea Gras, M.A., Espina García, M., García López, M.L., 2017. Freeze drying optimization of polymeric nanoparticles for ocular flurbiprofen delivery: effect of protectant agents and critical process parameters on long-term stability. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 43, 637–651.
- Said dos Santos, R., Rosseto, H.C., Bassi da Silva, J., Vecchi, C.F., Caetano, W., Brunchi, M.L., 2020. The effect of carbomer 934P and different vegetable oils on physical stability, mechanical and rheological properties of emulsion-based systems containing propolis. *J. Mol. Liq.* 307, 112969.
- Severino, P., Andreati, T., Jager, A., Chaud, M.V., Santana, M.H.A., Silva, A.M., Souto, E. B., 2014. Solid lipid nanoparticles for hydrophilic biotech drugs: Optimization and cell viability studies (Caco-2 & HEPG-2 cell lines). *Eur. J. Med. Chem.* 81, 28–34.
- Shirke, S., Takhstov, P., Ludescher, R.D., 2005. Molecular Mobility in Amorphous Maltose and Maltitol from Phosphorescence of Erythrosin B. *J. Phys. Chem. B* 109, 16119–16126.
- Silva, A.M., Martins-Gomes, C., Fangueiro, J.F., Andreati, T., Souto, E.B., 2019. Comparison of antiproliferative effect of epigallocatechin gallate when loaded into

3. RESULTADOS

- cationic solid lipid nanoparticles against different cell lines. *Pharm. Dev. Technol.* 24, 1243–1249.
- Silva, A.M., Martins-Gomes, C., Souto, E.B., Schäfer, J., Santos, J.A., Bunzel, M., Nunes, F.M., 2020. Thymus zygis subsp. zygis an Endemic Portuguese Plant: Phytochemical Profiling, Antioxidant, Anti-Proliferative and Anti-Inflammatory Activities. *Antioxidants* 9, 482.
- Silva, A.M., Félix, L.M., Teixeira, I., Martins-Gomes, C., Schäfer, J., Souto, E.B., Santos, D. J., Bunzel, M., Nunes, F.M., 2021. Orange thyme: Phytochemical profiling, in vitro bioactivities of extracts and potential health benefits. *Food Chemistry: X* 12, 100171.
- Singla, P., Garg, S., McClements, J., Jamieson, O., Peeters, M., Mahajan, R.K., 2022. Advances in the therapeutic delivery and applications of functionalized Pluronic: A critical review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 299, 102563.
- Soliman, K.A., Ullah, K., Shah, A., Jones, D.S., Singh, T.R.R., 2019. Poloxamer-based in situ gelling thermoresponsive systems for ocular drug delivery applications. *Drug Discov. Today* 24, 1575–1586.
- Sylvester, B., Porfire, A., Achim, M., Rus, L., Tomujá, I., 2018. A step forward towards the development of stable freeze-dried liposomes: a quality by design approach (QbD). *Drug Dev. Ind. Pharm.* 44, 385–397.
- Tan, J.-H., Ng, E.Y.K., Rajendra Acharya, U., Chee, C., 2010. Study of normal ocular thermogram using textural parameters. *Infrared Phys. Technol.* 53, 120–126.
- Trenkenschuh, E., Friess, W., 2021. Freeze-drying of nanoparticles: How to overcome colloidal instability by formulation and process optimization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 165, 345–360.
- Tsai, J.-P., Lee, C.-H., Ying, T.-H., Lin, C.-L., Lin, C.-L., Hsueh, J.-T., Hsieh, Y.-H., 2015. Licochalcone A induces autophagy through PI3K/Akt/mTOR inactivation and autophagy suppression enhances Licochalcone A-induced apoptosis of human cervical cancer cells. *Oncotarget* 6.
- Tun, X., Yasukawa, K., Yamada, K.-I., 2018. Nitric Oxide Is Involved in Activation of Toll-Like Receptor 4 Signaling through Tyrosine Nitration of Src Homology Protein Tyrosine Phosphatase 2 in Murine Dextran Sulfate-Induced Colitis. *Biol. Pharm. Bull.* 41, 1843–1852.
- Wang, Z., Xue, Y., Chen, T., Du, Q., Zhu, Z., Wang, Y., Wu, Y., Zeng, Q., Shen, C., Jiang, C., Yang, Z., Zhu, H., Liu, L., Liu, Q., 2021. Glycyrrhiza acid micelles loaded with licochalcone A for topical delivery: Co-penetration and anti-melanogenic effect. *Eur. J. Pharm. Sci.* 167, 106029.
- Wang, Z., Xue, Y., Zeng, Q., Zhu, Z., Wang, Y., Wu, Y., Shen, C., Zhu, H., Jiang, C., Liu, L., Liu, Q., 2022. Glycyrrhiza acid-Licochalcone A complexes for enhanced bioavailability and anti-melanogenic effect of Licochalcone A: cellular uptake and in vitro experiments. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 68, 103037.
- Yin, T., Yang, L., Liu, Y., Zhou, X., Sun, J., Liu, J., 2015. Sialic acid (SA)-modified selenium nanoparticles coated with a high blood-brain barrier permeability peptide-B6 peptide for potential use in Alzheimer's disease. *Acta Biomater.* 25, 172–183.
- Yun, Y.H., Lee, B.K., Park, K., 2015. Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation. *J. Control Release* 219, 2–7.
- Zhang, J., Zhou, X., Yu, Q., Yang, L., Sun, D., Zhou, Y., Liu, J., 2014. Epigallocatechin 3-gallate (EGCG)-Stabilized Selenium Nanoparticles Coated with Tet-1 Peptide To Reduce Amyloid- β Aggregation and Cytotoxicity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6, 8475–8487.

4. DISCUSIÓN

4.1. DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y FUNCIONALIZACIÓN DE NPs DE LICO-A

Para optimizar la formulación, se prepararon nanopartículas de PLGA conteniendo Lico-A por la técnica de desplazamiento del solvente y se optimizaron mediante el Diseño de Experimentos (DoE), analizando el efecto de las variables independientes (concentración del fármaco, tensioactivo y polímero) sobre las variables dependientes (Z_{av} , PI, Z_{pot} y EE). Los resultados obtenidos se analizaron para observar las tendencias que siguen las formulaciones de NPs elaboradas.

Respecto al Z_{av} , se observó que a bajas concentraciones de Lico-A se obtienen NPs de menor tamaño. Además, concentraciones elevadas de PLGA tienden a aumentar ligeramente los valores de Z_{av} . Este hecho se correlaciona con estudios previos de NPs poliméricas que ponen en relieve la relación directamente proporcional existente entre la concentración de PLGA y el valor de Z_{av} (Sánchez-López, Egea *et al.* 2016). De igual manera, el tamaño de partícula varía con la concentración de Tween[®] 80, observándose valores más bajos de Z_{av} a concentraciones elevadas de tensioactivo. Es importante destacar que, incluso con cantidades bajas de tensioactivo, todas las formulaciones obtenidas mostraron un diámetro de partícula inferior a 170 nm, adecuado para administración ocular sin inducir irritación corneal. Respecto a la homogeneidad de la muestra, concentraciones elevadas de Tween[®] 80 favorecen valores de PI más bajos y, tal como se observó para el caso del Z_{av} , cantidades altas de Lico-A tienden a aumentar el PI. Por lo tanto, se seleccionaron concentraciones medias-bajas de

4. DISCUSIÓN

Lico-A para reducir el PI, siendo también el Z_{pot} altamente negativo a estas concentraciones. Finalmente, respecto al parámetro de EE, el diagrama de Pareto mostró que cantidades bajas de Tween[®] 80 favorecen la EE. Por otra parte, valores bajos de Lico-A tienden a aumentar este parámetro, probablemente debido a que en general es más fácil encapsular pequeñas cantidades de fármaco en estos sistemas.

Después de analizar las tendencias obtenidas, se desarrolló y caracterizó la formulación optimizada que contenía 1 mg/mL de Lico-A, 8 mg/mL de PLGA y 0,4 % de Tween[®] 80. Las características morfométricas de las NPs optimizadas fueron adecuadas para administración ocular ya que presentaron un valor de Z_{av} de 163,81 nm \pm 2,29, con una óptima homogeneidad de la muestra, como pone de relieve el valor de PI inferior a 0,1 (0,075 \pm 0,010), correspondiente a sistemas monodispersos. Estas partículas presentaron carga superficial negativa (valores de Z_{pot} de -24 mV \pm 1,4) y una EE superior al 50 % (56,26 % \pm 0,16) (Liu, Jones *et al.* 2012, Han, Li *et al.* 2023).

Una vez elaborada la formulación optimizada, se realizó el estudio de estabilidad a corto plazo. Las NPs optimizadas de Lico-A PLGA se almacenaron a tres temperaturas diferentes (4, 25 y 38 °C). Las formulaciones se mantuvieron estables a 4 y 25 °C incluso después de 3 meses de almacenamiento. Sin embargo, a 38 °C, las formulaciones fueron inestables, obteniendo variaciones de la luz retrodispersada superiores al 10 % (Folle, Díaz-Garrido *et al.* 2021). Por otra parte, la diferencia de los perfiles de retrodispersión de luz de las formulaciones almacenadas a 4 y 25 °C estuvieron por debajo del 10 %, indicando una

adecuada estabilidad a corto plazo a ambas temperaturas. Sin embargo, se observó una ligera diferencia después de dos meses de almacenamiento a 25 °C, lo que puede indicar un proceso de inestabilidad inicial, mientras que a 4 °C los perfiles eran casi idénticos a los iniciales. Por lo tanto, 4 °C es la temperatura más adecuada para almacenar Lico-A PLGA NPs.

A continuación, se elaboraron dos CPPs mediante síntesis de péptidos en fase sólida para funcionalizar las nanopartículas optimizadas. Se incorporó un resto de Cys en el extremo N-terminal de los péptidos Tet-1 y B6 para realizar un enlace covalente con el copolímero PLGA-PEG-maleimido sintetizado previamente. La caracterización de péptidos se realizó por ESI-MS. El polímero PLGA se activó con NHS y se acopló covalentemente al compuesto maleimido-PEG-NH₂ mediante la formación de un grupo amida en fase líquida. Posteriormente se realizó la conjugación de PLGA-PEG-maleimido con los CPPs Tet-1 y B6 en solución, siendo confirmada por ¹H-NMR.

Del análisis fisicoquímico, se observó que las NPs funcionalizadas con CPPs (Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs y Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs) presentan propiedades fisicoquímicas óptimas para su administración ocular. Cabe destacar que la conjugación del polímero con CPPs permite obtener Lico-A NPs con un Z_{av} más pequeño, probablemente debido a las interacciones del polímero con la carga positiva del péptido que compacta el núcleo de las NPs. Además, esta conjugación aumenta ligeramente el PI, aunque todas las formulaciones se mantienen en el rango de los sistemas unimodales (PI inferior a 0,2). Sin embargo, se puede observar que el tamaño

4. DISCUSIÓN

promedio y el PI de Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs son ligeramente más elevados que los de las Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs, probablemente porque B6 tiene una relación de aminoácidos positivos más alta (4 AA positivos de 9 AA totales) que Tet-1 (2 AA positivos de 12 AA totales). Por lo tanto, la carga positiva más alta de B6 puede favorecer la interacción de PLGA, contribuyendo así a obtener unas NPs más pequeñas y homogéneas que las funcionalizadas con Tet-1. Además, el Z_{pot} de las NPs funcionalizadas mostró una modificación de la carga superficial de negativa a altamente positiva. Esto ha sido descrito previamente por otros autores utilizando CPPs (Silva, Marconato *et al.* 2021). Además, esta carga positiva asegurará una mejor interacción con el tejido epitelial de la córnea que posee carga negativa (Sahoo, Dilnawaz *et al.* 2008, Koo, Moon *et al.* 2012, Martens, Remaut *et al.* 2015, Vedadghavami, Zhang *et al.* 2020). Los valores de EE de Lico-A PLGA NPs y Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs fueron superiores al 50 %, mientras que para las Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs fueron significativamente más bajos. Esto puede deberse a los Z_{av} más pequeños de las Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs que podrían causar valores más bajos de EE (Song, Zhao *et al.* 2008).

La morfología de las nanopartículas de Lico-A PLGA, Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 y Lico-A PLGA-PEG-B6 se observó mediante TEM después de la tinción negativa. En todos los casos, las NPs cargadas con fármaco mostraron una forma esférica y una superficie lisa, características de este tipo de sistemas de administración de fármacos, sin ningún fenómeno de agregación (López-Machado, Díaz *et al.* 2021). Como era de esperar, el tamaño de las NPs medido por TEM, fue similar al tamaño obtenido por PCS (Liu, Chen *et al.* 2019).

El comportamiento biofarmacéutico de las NPs desarrolladas, se analizó mediante diálisis directa, evaluando el perfil de liberación *in vitro* del fármaco de las NPs de Lico-A PLGA, Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 y Lico-A PLGA-PEG-B6. En todas las formulaciones de NPs de Lico-A, se puede observar una liberación rápida inicial correspondiente a un «efecto de estallido» del activo adherido en la superficie de las NPs, seguida de una liberación sostenida del fármaco presente en el interior de la partícula, característico de este tipo de sistemas (Galindo-Camacho, Blanco-Llamero *et al.* 2022).

Además, los perfiles de liberación de todas las formulaciones fueron muy similares, pudiendo liberar Lico-A dentro de las primeras 24 h después de su aplicación. También, esta liberación de nanoportadores biodegradables suele estar gobernada por un proceso de difusión, ya que es mucho más rápido que la degradación de la matriz (Folle, Díaz-Garrido *et al.* 2021). La cinética de liberación se ajustó a una ecuación de hipérbola (Espinoza, Vera-García *et al.* 2020). Aunque todas las formulaciones fueron muy similares, las NPs de Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 mostraron la mayor constante de disociación de equilibrio K_d , lo que significa que la difusión de Lico-A es más lenta que la de las otras formulaciones, indicando así que la formulación que contiene al polímero conjugado con el péptido Tet-1, es capaz de retrasar la liberación del fármaco. Asimismo, en todos los casos, la cantidad máxima de fármaco liberado (B_{max}) estuvo en torno al 100 %, lo que indica que toda la Lico-A encapsulada se libera en 24 h (Sánchez-López, Egea *et al.* 2016).

4. DISCUSIÓN

En los estudios de selección del crioprotector adecuado para la liofilización de las NPs, los ensayos realizados en NPs control (NPs sin fármaco), revelaron que el maltitol a 3 % (p/v) es el más idóneo, conservando la osmolalidad de las nanopartículas (303 mOsm/kg) dentro del rango adecuado, el cual debe ser similar al líquido lagrimal, alrededor de 302 – 318 mOsm/kg para evitar la irritación ocular (Ramos Yacasi, Calpena Campmany *et al.* 2017). Se evaluó, asimismo, el aspecto de los liofilizados y el tiempo y apariencia de las muestras una vez reconstituidas, ya que las nanopartículas sometidas a este proceso, deben conservar las propiedades del producto original, baja humedad residual, buena apariencia del liofilizado y rápida reconstitución (Trenkenschuh and Friess 2021). Una vez seleccionado el crioprotector y su porcentaje adecuado, se continuó con la liofilización de las NPs con fármaco y funcionalizadas con CPPs (Lico-A PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs y Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs). Los valores de osmolalidad se mantuvieron dentro de los límites deseados para formulaciones destinadas a aplicación ocular y se encontraron ligeras diferencias en la apariencia de los productos después de la liofilización, posiblemente debido a la diferencia estructural de un CPP a otro (Tet-1 y B6).

Una herramienta importante para predecir la estabilidad física de los productos liofilizados durante el almacenamiento es el análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) (Ataide, Geraldés *et al.* 2021). Los liofilizados obtenidos deben almacenarse a una temperatura por debajo de las transiciones térmicas de la formulación seca para evitar cualquier colapso, encogimiento o cualquier otra desestabilización, como la cristalización para que sea farmacéuticamente aceptable (Abdelwahed, Degobert *et al.* 2006). Los perfiles térmicos de las

formulaciones liofilizadas con maltitol al 3 % (p/v) se analizaron mediante DSC para verificar las transiciones térmicas. El termograma de PLGA NPs liofilizadas mostró un pico endotérmico amplio que comenzó aproximadamente a 94,2 °C con un máximo a 111,2 °C, pudiéndose atribuir a eventos de evaporación. La humedad residual volatilizada de los productos liofilizados generalmente aparece en los termogramas como picos endotérmicos anchos cerca del punto de ebullición del agua (Jones and Seyler 1994). Además, el análisis térmico de todos los productos liofilizados con el crioprotector seleccionado, como se esperaba según la literatura, mostró una transición vítrea por encima de la temperatura ambiente (Shirke, Takhistov *et al.* 2005). La temperatura de transición vítrea (T_g) se determinó como el punto máximo de inflexión de las discontinuidades en las curvas de flujo de calor. Los valores más altos de T_g de las formulaciones en comparación con el valor del crioprotector, podrían deberse al polímero, ya que la presencia de este excipiente con alta T_g es una forma de elevar la T_g del maltitol (alcohol de azúcar). En el caso de las formulaciones de PLGA NPs y Lico-A-PLGA-Tet-1 NPs, se observaron picos endotérmicos a 130,5 °C y 149,4 °C respectivamente, lo que podría sugerir una cristalización parcial en el proceso de liofilización (Kadoya, Fujii *et al.* 2010).

4. DISCUSIÓN

4.2. SEGURIDAD Y EFICACIA TERAPÉUTICA DE LAS NPs DE LICO-A

El riesgo potencial de **irritación ocular** causado por las formulaciones desarrolladas se evaluó mediante pruebas de tolerancia ocular utilizando métodos *in vitro* e *in vivo*. Se realizó una prueba HET-CAM[®] *in vitro* y se calculó el Índice de Irritación Ocular (OII), evidenciando que ni las NPs de Lico-A PLGA ni las nanopartículas del polímero conjugado con los CPPs (Lico-A PLGA-PEG Tet-1 y Lico-A PLGA-PEG-B6) eran irritantes. Los resultados obtenidos con todas las formulaciones pusieron de relieve una óptima tolerancia ocular ya que presentaron valores de OII en torno a 0 (no irritantes) sin observarse fenómenos de irritación corneal. Sin embargo, dado que los resultados *in vitro* no pueden reproducir fielmente todas las condiciones *in vivo*, se llevó a cabo el test de Draize evaluando la tolerancia ocular del fármaco libre, las nanopartículas de Lico-A y las nanopartículas funcionalizadas con CPPs (Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 y Lico-A PLGA-PEG-B6) para confirmar la clasificación de la prueba HET-CAM[®] (Mohsen 2022). Los resultados de la prueba *in vivo* mostraron una excelente tolerancia ocular para todos los productos evaluados. No se detectaron signos de irritación ocular en ninguna de las formulaciones, clasificándose como sustancias no irritantes. Por tanto, estos resultados concuerdan con los obtenidos por la prueba HET-CAM[®], confirmando su idoneidad para la evaluación de la tolerancia ocular de productos farmacéuticos (López-Machado, Díaz-Garrido *et al.* 2021).

El efecto citotóxico del fármaco libre, las NPs poliméricas de PLGA sin fármaco (PLGA NPs), las NPs cargadas con el fármaco

(Lico-A PLGA NPs) y las NPs cargadas con el fármaco y funcionalizadas con los péptidos (Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs y Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs), se ensayó en células Caco-2. La Lico-A hasta 6,76 $\mu\text{g/mL}$ (20 μM) no es tóxica, ya que no reduce la viabilidad celular (viabilidad celular $\sim 100\%$ del control); sin embargo, el aumento de la concentración de Lico-A a 8,45 $\mu\text{g/mL}$ (25 μM) reduce considerablemente la viabilidad celular (47,2 $\% \pm 1,8$ del control) y la concentración más elevada ensayada reduce la viabilidad celular a $\sim 0\%$. Esto podría deberse al hecho de que la Lico-A, como agente anfifílico, puede interactuar con las membranas celulares. En cuanto al efecto citotóxico de Lico-A contra las células Caco-2, encontramos una IC_{50} de 8,4 $\mu\text{g/mL} \pm 0,9$. Este valor es ligeramente inferior al encontrado en otras líneas celulares, como las células SiHa y HeLa ($\text{IC}_{50} = 42,2 \mu\text{M} \pm 3,5$ y $48,5 \mu\text{M} \pm 4,2$, respectivamente) (Tsai, Lee *et al.* 2015) pero idéntico a las células HN22 ($\text{IC}_{50} = \sim 20 \mu\text{M}$) (Cho, Chae *et al.* 2014). Las NPs sin fármaco (PLGA NPs), ensayadas hasta una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, no redujeron la viabilidad celular, lo que indica el efecto no citotóxico de estas NPs. Los resultados de este estudio también pusieron de manifiesto que la encapsulación de Lico-A en NPs poliméricas reduce su toxicidad, lo cual es evidente por los valores más altos de IC_{50} y también por la mayor concentración que es necesaria para reducir significativamente la viabilidad celular en comparación con el control.

Cuando los CPPs se administran solos, la viabilidad celular es menor que el control; sin embargo, cuando se vinculan a NPs, la toxicidad es menor, aumentando la biocompatibilidad de las nanopartículas. Este fue el caso de las células PC12 expuestas al péptido

4. DISCUSIÓN

B6 que mostraron una disminución del 35 % de viabilidad en comparación con las células no expuestas (viabilidad celular ~ 65 % del control), observándose la misma disminución cuando se expusieron a SA-Se-NPs (nanopartículas de selenio modificadas con ácido siálico). Sin embargo, y tal como demuestran los experimentos llevados a cabo por Yin *et al.* (2015) (Yin, Yang *et al.* 2015), cuando las células se trataron con SA-Se-NPs conjugadas con péptido B6 (B6-SA-Se-NPs), la viabilidad celular solo se redujo en un 10 % con respecto al control. Esto significa que la funcionalización de las NPs con B6 resultó en una menor toxicidad, lo que concuerda con los resultados de nuestro trabajo. En un estudio que utilizó curcumina como molécula liberadora y B6 como CPP, Fan *et al.* (2018) (Fan, Zheng *et al.* 2018) evaluaron la viabilidad de las células HT22 (línea de células neuronales de hipocampo de ratón) expuestas a diferentes concentraciones de curcumina (Cur), NPs de PLGA-PEG cargadas de Cur, NPs de PLGA-PEG-B6 con carga de Cur y NPs de PLGA-PEG-B6. En este caso, los autores no observaron diferencias estadísticas entre todas las muestras, pero las células expuestas a NPs de PLGA-PEG-B6 con Cur mostraron en promedio una mayor viabilidad. Este estudio también indica que las nanopartículas funcionalizadas ya no eran citotóxicas. En otro estudio (Zhang, Zhou *et al.* 2014), las células PC12 (línea celular derivada a partir de un feocromocitoma de la médula suprarrenal de rata) tratadas con nanopartículas de selenio estabilizadas con epigallocatequina-3-galato (EGCG) recubiertas con péptido Tet-1 (Tet-1-EGCG-Se) mostraron una mayor viabilidad que las células expuestas a EGCG-Se (nanopartículas de selenio estabilizadas con EGCG), lo que también demuestra que la unión de CPP a NPs no aumenta la toxicidad celular. Por otro lado,

también se demostró que la conjugación de nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina recubiertas con Tet-1 da como resultado nanopartículas biocompatibles, sin informar de una mayor toxicidad contra las células de glioma GI-1 (Mathew, Fukuda *et al.* 2012).

En nuestro estudio demostramos que la encapsulación de Lico-A reduce la toxicidad inherente del activo, atribuida a la liberación controlada del fármaco obtenida al utilizar nanopartículas. Además, la funcionalización de las NPs con ambos CPPs mejora la biocompatibilidad (reduciendo aún más la toxicidad celular), como lo demuestra el aumento de la IC₅₀. El objetivo de este trabajo fue la entrega de un fármaco antiinflamatorio manteniendo la viabilidad celular. Es así como se demostró que la formulación de Lico-A en NPs poliméricas reduce la toxicidad de Lico-A y mejora su eficacia antiinflamatoria. Además, la conjugación de las NPs con el CPP Tet-1, aumentó la biocompatibilidad.

La **eficacia antiinflamatoria** de las NPs de Lico-A funcionalizadas con los péptidos Tet-1 o B6 se evaluó *in vivo*, en conejos albinos New Zealand, en un modelo de inflamación ocular inducido por ácido araquidónico. Durante los primeros minutos, todas las formulaciones de NPs de Lico-A y Lico-A libre mostraron diferencias estadísticamente significativas frente al grupo control ($p < 0,001$). Esto puede deberse a la potente capacidad antiinflamatoria de Lico-A reportada previamente por otros investigadores y demostrada aquí para aplicaciones oculares (Phan, Kim *et al.* 2021, Phan, Kim *et al.* 2021, Li, Xie *et al.* 2022). Entre todas las preparaciones, la formulación de NPs de Lico-A PLGA-PEG-B6 presentó una actividad antiinflamatoria

4. DISCUSIÓN

significativamente mayor en comparación con las otras formulaciones y el fármaco libre (Lico-A). Esto se correlaciona con la liberación inicial más rápida de Lico-A obtenida *in vitro*, así como con el hecho de que el péptido B6 tiene una carga positiva más elevada que el Tet-1, lo que aumenta las interacciones con las capas oculares negativas y permite que Lico-A mejore la penetración y los efectos terapéuticos (Vedadghavami, Zhang *et al.* 2020). Adicionalmente, las NPs de Lico-A PLGA-PEG-B6 también poseen un tamaño promedio más pequeño, lo cual puede facilitar su internalización celular y sus efectos farmacológicos (Salatin, Maleki Dizaj *et al.* 2015). El fármaco libre mostró, asimismo, una actividad inicial superior en comparación con las NPs de Lico-A PLGA y Lico-A PLGA-PEG-Tet-1, pero después de 90 min no se obtuvieron diferencias significativas entre las formulaciones. Todas las formulaciones evaluadas fueron capaces de reducir la inflamación en comparación con el control de suero salino de manera significativa, incluso después de 210 minutos posteriores a la inducción de la inflamación.

Por lo tanto, estos resultados demostraron que Lico-A podría utilizarse para el tratamiento de la inflamación ocular y que las NPs funcionalizadas con CPPs disminuyeron la inflamación de una manera más prolongada que el fármaco libre. Las NPs de Lico-A PLGA-PEG-B6 constituyen la mejor estrategia para administrar Lico-A en los tejidos oculares, pudiendo reducir la inflamación de manera significativamente efectiva.

Por otra parte, se evaluó también la eficacia terapéutica *in vitro*, en cultivos celulares, analizando la actividad antiinflamatoria en células

RAW 264.7 (una línea celular de macrófagos) estimuladas con lipopolisacáridos (LPS), ya que estas células cuando se exponen a LPS bacterianos tienen la capacidad de liberar óxido nítrico (NO) como resultado de la señalización inflamatoria activada por LPS que culmina con la mejora de la actividad de óxido nítrico sintetasa. Por tanto, la actividad antiinflamatoria del fármaco libre y las NPs obtenidas se evaluó por su capacidad para reducir la cantidad de NO liberado por los macrófagos estimulados por LPS. La actividad de la Lico-A como agente antiinflamatorio ha sido descrita por algunos autores (Funakoshi-Tago, Nakamura *et al.* 2010, Galindo, Sánchez *et al.* 2022, Cai, Xu *et al.* 2023), y de hecho se conoce que reduce la liberación de NO de forma dependiente de la dosis de macrófagos estimulados por LPS. Las células RAW 264.7 expuestas durante 4 h a 5 µg/mL de Lico-A solo liberaron ~ 16 % de NO en comparación con el control (una reducción de NO de ~ 84 % del control), lo que confirma su acción en las vías de señalización de TLR4 (receptor tipo Toll 4) (Tun, Yasukawa *et al.* 2018) y actividad antiinflamatoria. A esta concentración, la Lico-A no fue citotóxica para las células Raw 264.7, ya que el ensayo de viabilidad celular indicó un valor de aproximadamente el 100 %. Las NPs sin fármaco (PLGA NPs) reducen la liberación de NO, probablemente debido a su interferencia lipídica y su posible unión competitiva a TLR4 que reduce la actividad de LPS; sin embargo, esta interferencia necesita mayor evaluación. Lico-A PLGA NPs muestra una mayor actividad antiinflamatoria, en comparación con el fármaco libre, probablemente debido a una mejor cesión de Lico-A a la superficie de las células. La adición de péptidos penetrantes de células a las NPs de Lico-A PLGA mantuvo la actividad antiinflamatoria. Ninguna de las formulaciones fue tóxica para las células RAW 264.7, ya que la viabilidad celular se mantuvo al 100 %.

4. DISCUSIÓN

4.3. INCORPORACIÓN DE LAS NPs DE LICO-A EN GELES DE FORMACIÓN *IN SITU*

En el estudio de geles de formación *in situ* (ISFG), se usó el polímero PF127 que tiene la característica de permitir que la formulación permanezca líquida en condiciones de almacenamiento, pero al entrar en contacto con la temperatura de la mucosa ocular de 35 °C aproximadamente (Tan, Ng *et al.* 2010) se convierte en gel, mejorando la precisión en la aplicación de la formulación y el tiempo de contacto de la misma en la zona precorneal, reduciendo la tasa de eliminación y aumentando la biodisponibilidad del fármaco (Cardoso, Ferreira-Nunes *et al.* 2022). La evaluación de los resultados de las temperaturas de gelificación ($T_{\text{sol-gel}}$) de las formulaciones ensayadas, permitió seleccionar el ISFG-2 (20 % de PF127, 0,5 % de MC y 0,2 % de CTAB), con resultados de $T_{\text{sol-gel}}$ de $32,0\text{ °C} \pm 1,2$ y $32,0\text{ °C} \pm 0,6$ de los geles de PLGA NPs y Lico-A PLGA NPs respectivamente, debido a que el gel termosensible *in situ* óptimo debe tener una $T_{\text{sol-gel}}$ por encima de la temperatura ambiente para garantizar que la preparación permanezca líquida y brinde una dosificación precisa (Krtalić, Radošević *et al.* 2018), siendo el rango aceptable de $T_{\text{sol-gel}}$ de 30 a 35 °C, a fin de evitar la eliminación rápida de la formulación (Permana, Utami *et al.* 2021).

El análisis del comportamiento reológico inicial de las formulaciones ISFG-1 (sin MC), ISFG-2 (fórmula óptima, en adelante ISFG) e ISFG-3 (1 % MC), destacó la relación directamente proporcional del incremento de la concentración de MC con la viscosidad del gel, lo que concuerda con el resultado obtenido en el

ensayo de temperatura de gelificación. En sistemas acuosos, los geles termosensibles de PF127 se forman por puentes de hidrógeno, debido a la atracción entre el átomo de oxígeno del éter de poloxámero y los protones del agua. Por lo tanto, al agregar la cantidad de MC (compuesto con grupos hidroxilo), se espera que aumente el número de enlaces de hidrógeno, lo que lleva a una mayor viscosidad (Mansour, Mansour *et al.* 2008). En el estudio reológico final, los ISFG de PLGA NPs, Lico-A PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs y Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs, se ensayaron a una velocidad de corte controlada a dos temperaturas 20 °C (temperatura de almacenamiento) y 35 °C (temperatura de la superficie ocular). Se observó que la viscosidad aumenta con la elevación de la temperatura. Esto podría explicarse porque una temperatura más alta causa la deshidratación de las unidades tribloque de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO) de PF127 por la ruptura de los enlaces de hidrógeno entre las unidades de PEO y el agua. Como resultado, esta deshidratación conduce a un aumento de la interacción intermolecular entre los bloques de PEO y las moléculas del copolímero que se agregan en micelas, lo que permite la formación de un gel más compacto y viscoso (El-Kamel 2002, Kolsure and Raj Kapoor 2012). Los resultados revelaron una estabilidad adecuada y un comportamiento de gel viscoelástico, además, en todas las formulaciones ensayadas no existe un punto de cruce entre los módulos (G' y G''), comportándose como geles débiles (Krtalić, Radošević *et al.* 2018, Blanco-Llamero, Galindo-Camacho *et al.* 2022, de Castro, Coco *et al.* 2023). A 35 °C se observó un aumento en la distancia entre los módulos G' y G'' para cada formulación, lo cual es resultado de un mayor esfuerzo de corte debido al aumento de la

4. DISCUSIÓN

viscosidad a esta temperatura. Desde el punto de vista de la aplicación ocular del ISFG, este es un fenómeno beneficioso ya que aumentaría el contacto de la formulación con la mucosa precorneal. Después de la administración, se espera que la formulación forme un gel ($G' > G''$), y de esta manera, resista las fuerzas de cizallamiento esperadas en el ojo durante y entre parpadeos (Cardoso, Ferreira-Nunes *et al.* 2022). Los resultados mostraron además, que las formulaciones que contienen los CPPs pueden aumentar la viscosidad a medida que aumenta la temperatura, pero la $T_{\text{sol-gel}}$ no se presenta hasta por encima de los 32 °C.

Finalmente, los resultados del análisis de textura de ISFG de PLGA NPs, Lico-A PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs y Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs son importantes, debido a que de estos parámetros depende la aceptabilidad del producto por parte del paciente al momento de su aplicación y su percepción organoléptica. El análisis de los parámetros de textura, dureza, firmeza, mucoadhesividad y esparcibilidad están directamente influenciados por la viscosidad de las formulaciones. A 20 °C todas las formulaciones se encontraban en forma semilíquida y mostraron valores bajos de dureza y firmeza, estos valores facilitan la correcta extracción del producto del envase (dos Santos, Rosseto *et al.* 2020). El aumento de la temperatura de análisis de 20 a 35 °C fue seguido por un aumento de la dureza y firmeza de los ISFG ensayados. Estos hallazgos se deben a las modificaciones en la estructura interna del poloxámero, exhibiendo una red polimérica más fuerte (Kolsure and Raj Kapoor 2012). Por ejemplo, en el caso de los ISFG de Lico-A PLGA NPs, Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs y Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs a 35 °C, la dureza fue mucho mayor en comparación con el

análisis a 20 °C para las mismas formulaciones, presentando valores de 29,3 N, 28,8 N y 28,6 N respectivamente. Se ha estudiado la influencia de la dureza en el tiempo de retención de la formulación en la superficie ocular, ya que la dureza adecuada impide la dilución de la preparación por aclaramiento mucociliar (Ferreira, Da Silva *et al.* 2017). Los estudios de mucoadhesividad realizados cerca de la temperatura ocular, mostraron que el ISFG de Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs tiene el valor más alto de este parámetro respecto al resto de ISFG ensayados, registrándose una fuerza negativa de -84,9 N. Como era de esperar, el valor más bajo correspondió a los ensayos a 20 °C. A medida que aumentaba la temperatura de prueba, se observó un aumento concomitante en la mucoadhesión y esto se explica por el impacto de la viscosidad en este parámetro durante el análisis. Nuestros estudios revelaron que el ISFG de Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs mostró la mucoadhesión/adhesividad más baja entre la formulación y la sonda de prueba, lo que puede atribuirse a la diferencia estructural química entre los compuestos. En cuanto a la fuerza de adhesión, esta aumentó con el incremento de la temperatura, debido a la organización del FP127 por la $T_{\text{sol-gel}}$. Como resultado, los valores más altos de adhesividad a 35 °C de los ISFG son adecuados, ya que significa que pueden adherirse a la superficie corneal durante un tiempo suficientemente largo, incrementando el tiempo de residencia del fármaco en el sitio de aplicación (Pandey, Cabot *et al.* 2017). Estos resultados concuerdan con informes de experimentos previos, realizados por otros autores (Soliman, Ullah *et al.* 2019), que indican buenas propiedades mucoadhesivas de una combinación de PF127 y MC en la formulación. En esta misma línea,

4. DISCUSIÓN

un valor adecuado de esparcibilidad, facilita la extensión de los ISFG a una gran superficie de mucosa ocular. A 20 °C se obtuvieron valores elevados de esparcibilidad (se requiere menos fuerza). Así, el ISFG de Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs a 35 °C parece tener mejores resultados de esparcibilidad, en comparación con las otras formulaciones a la misma temperatura de evaluación. Todas estas propiedades pueden ser útiles para predecir el comportamiento de la fórmula en diferentes condiciones ambientales y biológicas.

5. CONCLUSIONES

In this work, Lico-A was formulated in PLGA NPs functionalized with CPPs for the treatment of inflammatory ocular conditions. Based on all the results obtained from the different assays carried out with the optimized colloidal systems, and the formulations of the Lico-A-loaded PLGA NPs functionalized with CPPs incorporated into the *in-situ* forming gel, it can be concluded that:

1. The optimization, by a factorial design, of Lico-A-loaded polymeric NPs, prepared by the solvent displacement method, revealed that the best formulations with physicochemical properties suitable for ocular administration contains: 1 mg/mL of Lico-A, 8 mg/mL of PLGA and 0.4 % of Tween[®] 80. These NPs showed a spherical shape with a smooth surface, an average size below 170 nm, a very small particle size distribution, with PI values less than 0.1 corresponding to monodisperse systems, a highly negative Z_{pot} and with EE greater than 50 %.
2. The short-term stability study revealed that the optimized Lico-A polymeric NPs maintain their initial properties at 4 and 25 °C. However, after 2 months of storage at 25 °C, a slight difference was observed in the backscattering profile compared to the initial formulation. Therefore, 4 °C was the most suitable temperature to store Lico-A PLGA NPs.
3. Linear peptides (Tet-1 and B6) were successfully synthesized following the solid-phase methodology. Analytical characterization by high-performance liquid chromatography

5. CONCLUSIONES

and mass spectrometry confirmed that the peptides correspond to the desired peptide sequences.

4. Functionalization of the surface of Lico-A PLGA NPs with CPPs caused a decrease in Z_{av} , being $128.65 \text{ nm} \pm 7.53$ for Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs and $114.24 \text{ nm} \pm 2.42$ for Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs. Moreover, the conjugation with Tet-1 and B6 peptides increased the IP slightly to 0.149 ± 0.016 and 0.122 ± 0.012 , respectively. In addition, Z_{Pot} of the peptide targeted NPs showed a surface charge modification from negative to highly positive. The highest EE value ($53.26 \% \pm 0.62$) was obtained for the drug-loaded PLGA-PEG-Tet-1 NPs.
5. The release profile of Lico-A PLGA NPs and peptide-functionalized NPs showed an initial fast release corresponding to the burst effect of the drug present on the NPs surface, followed by a sustained release of Lico-A retained within the NPs.
6. Osmolality values of freeze-dried functionalized NPs were similar to those obtained before their freeze-drying, being maltitol at 3 % (w/v) the most efficient cryoprotectant evaluated. In addition, the appearance of the freeze-dried cakes with 3 % maltitol (w/v) and their reconstituted nanosuspensions revealed a fast reconstitution time and full redispersion of NPs with no apparent aggregates.

7. The evaluation of the physical state of Lico-A in the polymeric matrix and the possible interactions between drug and polymer of the NPs after freeze-drying using thermal methods (differential scanning calorimetry) suggest that there is no evidence of any chemical interaction or strong bond formation between PLGA and Lico-A.
8. According to the ocular tolerance studies of Lico-A PLGA NPS, Lico-A PLGA-PEG-Tet-1 NPs and Lico-A PLGA-PEG-B6 NPs, evaluated by *in vitro* (HET-CAM®) and *in vivo* (Draize test) assays, the absence of ocular irritation was evidenced, which reveals optimal ocular tolerance of these systems. Likewise, the *in vitro* biological experiments in cell cultures, showed a non-cytotoxic effect of these developed systems.
9. Studies of anti-inflammatory efficacy *in vivo* exposed a decrease in ocular inflammation and the *in vitro* biological experiments in RAW 264.7 cell lines showed a relevant anti-inflammatory activity of free drug, drug-loaded PLGA NPS and drug-loaded peptides functionalized NPs.
10. Gelation temperature assays of poloxamer-based *in-situ* forming gels containing Lico-A PLGA NPs showed that the optimal gel composition, containing 20 % of PF127, 0.5 % of MC and 0.2 % of CTAB, is suitable to transform into a semi-solid state under ocular temperature conditions (35 °C).

5. CONCLUSIONES

11. The pH, viscosity, texture parameters and gelation temperature of the optimal *in-situ* forming gels containing Lico-A PLGA NPs functionalized with B6 and Tet-1 peptides meet the requirements for ophthalmic formulations due to their adequate viscoelasticity, mechanical and mucoadhesive properties suitable to facilitate their uniform distribution on the conjunctiva surface.

12. All the results obtained suggest that the Lico-A PLGA NPs functionalized with B6 and Tet-1 peptides, and the thermosensitive gels developed could be suitable in the treatment of ocular inflammatory processes constituting a new approach in ocular pharmacotherapy.

6. REFERENCIAS

A

Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S. and Fessi, H. (2006). "Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations." Advanced Drug Delivery Reviews **58**(15): 1688-1713.

Abrego, G., Alvarado, H., Souto, E. B., Guevara, B., Bellowa, L. H., Parra, A., Calpena, A. and Garcia M. L. (2015). "Biopharmaceutical profile of pranoprofen-loaded PLGA nanoparticles containing hydrogels for ocular administration." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **95**: 261-270.

Ahmadi Hosseini, S. M., Kazem Souri, M., Farhadi, N., Moghaddam, M. and Omidbaigi, R. (2014). "Changes in Glycyrrhizin Content of Iranian licorice (*Glycyrrhiza glabra* L .) Affected by Different Root Diameter and Ecological Conditions." Agricultural Communications **2**(4): 27-33.

Ahmed, I., Gokhale, R. D., Shah, M. V. and Patton T. F. (1987). "Physicochemical determinants of drug diffusion across the conjunctiva, sclera, and cornea." J Pharm Sci **76**(8): 583-586.

Al Khateb, K., Ozhmukhametova, E. K., Mussin, M. N., Seilkhanov, S. K., Rakhypbekov, T. K., Lau, W. M. and Khutoryanskiy, V. V. (2016). "In situ gelling systems based on Pluronic F127/Pluronic F68 formulations for ocular drug delivery." International Journal of Pharmaceutics **502**(1): 70-79.

6. REFERENCIAS

Alagawany, M., Elnesr, S. S., Farag, M. R., Abd El-Hack, M. E., Khafaga, A. F., Taha, A. E., Tiwari, R., Yatoo, M. I., Bhatt, P., Marappan, G. and Dhama, K. (2019). "Use of Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) Herb as a Feed Additive in Poultry: Current Knowledge and Prospects." Animals **9**(8): 536.

Alharbi, W. S. and Hosny, K. M. (2020). "Development and optimization of ocular *in situ* gels loaded with ciprofloxacin cubic liquid crystalline nanoparticles." Journal of Drug Delivery Science and Technology **57**: 101710.

Allam, A., Elsabahy, M., El Badry, M. and Eleraky, N. E. (2021). "Betaxolol-loaded niosomes integrated within pH-sensitive *in situ* forming gel for management of glaucoma." International Journal of Pharmaceutics **598**: 120380.

An, C., Wei, S., Dao, Y., Wang, X., Dong, W., You, X., Tian, C., Zhang, Z. and Dong, S. (2023). "Discovery of endosomal cell-penetrating peptides based on bacterial membrane-targeting sequences." Bioorganic Chemistry **134**: 106424.

Arafa, M. G., Girgis, G. N. S. and El-Dahan, M. S. (2020). "Chitosan-Coated PLGA Nanoparticles for Enhanced Ocular Anti-Inflammatory Efficacy of Atorvastatin Calcium." Int J Nanomedicine **15**: 1335-1347.

Arase, Y., Ikeda, K., Murashima, N., Chayama, K., Tsubota, A., Koida, I., Suzuki, Y., Saitoh, S., Kobayashi, M. and Kumada, H. (1997). "The long term efficacy of glycyrrhizin in chronic hepatitis C patients." Cancer **79**(8): 1494-1500.

Ataide, J. A., Geraldés, D. C., Gérios, E. F., Bissaco, F. M., Cefali, L. C., Oliveira-Nascimento, L. and Mazzola P. G. (2021). "Freeze-dried chitosan nanoparticles to stabilize and deliver bromelain." Journal of Drug Delivery Science and Technology **61**: 102225.

B

Baudouin, C., Brignole, F., Fredj-Reygrobellet, D., Negre, F., Bayle, J. and Gstaad P. (1992). "Transferrin receptor expression by retinal pigment epithelial cells in proliferative vitreoretinopathy." Investigative ophthalmology & visual science **33**(10): 2822-2829.

Benita, S. and Levy, M. Y. (1993). "Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization." J Pharm Sci **82**(11): 1069-1079.

Bisht, D., Rashid, M., Arya, R. K. K., Kumar, D., Chaudhary, S. K., Rana, V. S. and Sethiya N. K. (2022). "Revisiting liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) as anti-inflammatory, antivirals and immunomodulators: Potential pharmacological applications with mechanistic insight." Phytomed Plus **2**(1): 100206.

6. REFERENCIAS

Blackburn, C. C., Swank-Hill, P. and Schnaar, R. L. (1986). "Gangliosides support neural retina cell adhesion." Journal of Biological Chemistry **261**(6): 2873-2881.

Blanco-Llamero, C., Galindo-Camacho, R. M., Fonseca, J., Santini, A., Señoráns, F. J. and Souto, E. B. (2022). "Development of Lipid Nanoparticle Containing Omega-3-Rich Extract of Microalga *Nannochloropsis gaditana*." Foods **11**(23): 3749.

Brautaset, R. L., Nilsson, M., Miller, W. L., Leach, N. E., Tukler, J. H., and Bergmanson, J. P. (2013). "Central and peripheral corneal thinning in keratoconus." Cornea **32**(3): 257-261.

Bruneton, J. (2016). Pharmacognosie - Phytochimie - Plantes Medicinales. (5e édition) Lavoisier Paris.

C

Cai, M., Xu, Y. C., Deng, B., Chen, J. B., Chen, T. F., Zeng, K. F., Chen, S., Deng, S. H., Tan, Z. B., Ding, W. J., Zhang, S. W., Liu, B and Zhang, J. Z (2023). "Radix Glycyrrhizae extract and licochalcone a exert an anti-inflammatory action by direct suppression of toll like receptor 4." Journal of Ethnopharmacology **302**: 115869.

Cardoso, C. O., Ferreira-Nunes, R., Cunha-Filho, M., Gratieri, T. and Gelfuso, G. M. (2022). "*In situ* gelling microemulsion for topical ocular delivery of moxifloxacin and betamethasone." Journal of Molecular Liquids **360**: 119559.

Chakole, C. M., Sahoo, P. K., Pandey, J. and Chauhan, M. K. (2022). "A green chemistry approach towards synthesizing hydrogel for sustained ocular delivery of brinzolamide: *In vitro* and *ex vivo* evaluation." Journal of the Indian Chemical Society **99**(2): 100323.

Chang, H.M. and But, P. P.H. (2014). Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica: (Volume I), World Scientific.

Chen, L., Hu, C., Hood, M., Zhang, X., Zhang, L., Kan, J. and Du, J. (2020). "A Novel Combination of Vitamin C, Curcumin and Glycyrrhizic Acid Potentially Regulates Immune and Inflammatory Response Associated with Coronavirus Infections: A Perspective from System Biology Analysis." Nutrients **12**(4): 1193.

Chen, M., Christensen, S. B., Blom, J., Lemmich, E., Nadelmann, L., Fich, K., Theander, T. G. and Kharazmi, A. (1993). "Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of Leishmania." Antimicrob Agents Chemother **37**(12): 2550-2556.

Chen, S., Kong, J., Wu, S., Luo, C., Shen, J., Zhang, Z., Zou, J. and Feng, L. (2023). "Targeting TBK1 attenuates ocular inflammation in uveitis by antagonizing NF- κ B signaling." Clin Immunol **246**: 109210.

Cheng, Y. H., Chang, Y. F., Ko, Y. C. and Liu, C. J. (2021). "Development of a dual delivery of levofloxacin and prednisolone acetate via PLGA nanoparticles/ thermosensitive chitosan-based hydrogel for postoperative management: An *in-vitro* and *ex-vivo* study." International Journal of Biological Macromolecules **180**: 365-374.

6. REFERENCIAS

Cho, J. J., Chae, J. I., Yoon, G., Kim, K. H., Cho, J. H., Cho, S. S., Cho, Y. S. and Shim, J. H. (2014). "Licochalcone A, a natural chalconoid isolated from *Glycyrrhiza inflata* root, induces apoptosis via Sp1 and Sp1 regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma." Int J Oncol **45**(2): 667-674.

Ciganović, P., Jakimiuk, K., Tomczyk, M. and Zovko Končić, M. (2019). "Glycerolic Licorice Extracts as Active Cosmeceutical Ingredients: Extraction Optimization, Chemical Characterization, and Biological Activity." Antioxidants **8**(10): 445.

Correa, S., Grosskopf, A. K., Lopez Hernandez, H., Chan, D., Yu, A. C., Stapleton, L. M. and Appel, E. A. (2021). "Translational Applications of Hydrogels." Chem Rev **121**(18): 11385-11457.

Cunha-Vaz, J. G. (1997). "The blood-ocular barriers: Past, present, and future." Documenta Ophthalmologica **93**(1-2): 149-157.

D

Dammak, A., Pastrana, C., Martin-Gil, A., Carpena-Torres, C., Peral Cerda, A., Simovart, M., Alarma, P., Huete-Toral, F. and Carracedo, G. (2023). "Oxidative Stress in the Anterior Ocular Diseases: Diagnostic and Treatment." Biomedicines **11**(2): 292.

Daniel, E., Pistilli, M., Kothari, S., Khachatryan, N., Kaçmaz, R. O., Gangaputra, S. S., Sen, H. N., Suhler, E. B., Thorne, J. E., Foster, C. S., Jabs, D. A., Nussenblatt, R. B., Rosenbaum, J. T., Levy-Clarke, G. A., Bhatt., N. P. and Kempen, J. H. (2017). "Risk of Ocular Hypertension in Adults with Noninfectious Uveitis." Ophthalmology **124**(8): 1196-1208.

de Castro, K. C., Coco, J. C., Dos Santos, É. M., Ataide, J. A., Martinez, R. M., do Nascimento, M. H. M., Prata, J., da Fonte, P. R. M. L., Severino, P. and Mazzola P.G. (2023). "Pluronic® triblock copolymer-based nanoformulations for cancer therapy: A 10-year overview." Journal of Controlled Release **353**: 802-822.

Dennis, E. A. and Norris, P. C. (2015). "Eicosanoid storm in infection and inflammation." Nat Rev Immunol **15**(8): 511-523.

Denniston, A. and Murray, P. (2014). Chapter 11–Uveitis, Oxford University Press Oxford.

Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1994). "The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes." J Biol Chem **269**(14): 10444-10450.

dos Santos, R. S., Rosseto, H. C. , da Silva, J. B., Vecchi, C. F., Caetano, W. and Bruschi M. L. (2020). "The effect of carbomer 934P and different vegetable oils on physical stability, mechanical and rheological properties of emulsion-based systems containing propolis." Journal of Molecular Liquids **307**: 112969.

Downie, L. E., Bandlitz, S., Bergmanson, J. P. G., Craig, J. P., Dutta, D., Maldonado-Codina, C., Ngo, W., Siddireddy, J. S. and Wolffsohn, J. S. (2021). "BCLA CLEAR - Anatomy and physiology of the anterior eye." Contact Lens and Anterior Eye **44**(2): 132-156.

6. REFERENCIAS

Dua, H. S., Faraj, L. A., Said, D. G., Gray, T. and Lowe, J. (2013). "Human Corneal Anatomy Redefined: A Novel Pre-Descemet's Layer (Dua's Layer)." Ophthalmology **120**(9): 1778-1785.

E

El-Kamel, A. (2002). "In vitro and in vivo evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate." International journal of pharmaceutics **241**(1): 47-55.

El-Saber Batiha, G., Magdy Beshbishy, A., El-Mleeh, A., Abdel-Daim, M. M. and Prasad Devkota, H. (2020). "Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, and Pharmacological and Toxicological Activities of *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae)." Biomolecules **10**(3).

Elhabal, S. F., Ghaffar, S. A., Hager, R., Elzohairy, N. A., Khalifa, M. M., Mohie, P. M., Gad, R. A., Omar, N. N., Elkomy, M. H., Khasawneh, M. A. and Abdelaal, N. (2023). "Development of thermosensitive hydrogel of Amphotericin-B and Lactoferrin combination-loaded PLGA-PEG-PEI nanoparticles for potential eradication of ocular fungal infections: *In-vitro*, *ex-vivo* and *in-vivo* studies." International Journal of Pharmaceutics: X **5**: 100174.

Elliott, G. and O'Hare, P. (1997). "Intercellular Trafficking and Protein Delivery by a Herpesvirus Structural Protein." Cell **88**(2): 223-233.

Espinoza, L. C., Vera-García, R., Silva-Abreu, M., Domènech, Ò., Badia, J., Rodríguez-Lagunas, M. J., Clares, B. and Calpena, A. C. (2020). "Topical Pioglitazone Nanoformulation for the Treatment of Atopic Dermatitis: Design, Characterization and Efficacy in Hairless Mouse Model." Pharmaceutics **12**(3): 255.

F

Fabiano, A., Bizzarri, R. and Zambito, Y. (2017). "Thermosensitive hydrogel based on chitosan and its derivatives containing medicated nanoparticles for transcorneal administration of 5-fluorouracil." Int J Nanomedicine **12**: 633-643.

Fan, S., Zheng, Y., Liu, X., Fang, W., Chen, X., Liao, W., Jing, X., Lei, M., Tao, E., Ma, Q., Zhang, X., Guo, R. and Liu, J. (2018). "Curcumin-loaded PLGA-PEG nanoparticles conjugated with B6 peptide for potential use in Alzheimer's disease." Drug Delivery **25**(1): 1091-1102.

Fenwick, G. R., Lutomski, J. and Nieman, C. (1990). "Liquorice, *Glycyrrhiza glabra* L.—Composition, uses and analysis." Food Chemistry **38**(2): 119-143.

Ferreira, S. B. D. S., Da Silva, J. B., Borghi-Pangoni, F. B., Junqueira, M. V. and Bruschi, M. L. (2017). "Linear correlation between rheological, mechanical and mucoadhesive properties of polycarbophil polymer blends for biomedical applications." Journal of the mechanical behavior of biomedical materials **68**: 265-275.

6. REFERENCIAS

- Folle, C., Díaz-Garrido, N., Sánchez-López, E., Marqués, A. M., Badia, J., Baldomà, L., Espina, M., Calpena, A. C. and García, M. L. (2021). "Surface-Modified Multifunctional Thymol-Loaded Biodegradable Nanoparticles for Topical Acne Treatment." Pharmaceutics **13**(9): 1501.
- Forrester, J. V. (2010). Pathogenesis of Uveitis in Humans. Encyclopedia of the Eye. D. A. Dartt. Oxford, Academic Press: 273-279.
- Frankel, A. D. and Pabo, C. O. (1988). "Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus." Cell **55**(6): 1189-1193.
- Fresta, M., Panico, A. M., Bucolo, C., Giannavola, C. and Puglisi, G. (1999). "Characterization and *in-vivo* ocular absorption of liposome-encapsulated acyclovir." J Pharm Pharmacol **51**(5): 565-576.
- Friis-Møller, A., Chen, M., Fursted, K., Christensen, S. B. and Kharazmi, A. (2002). "*In vitro* antimycobacterial and antilegionella activity of licochalcone A from Chinese licorice roots." Planta Med **68**(5): 416-419.
- Funakoshi-Tago, M., Nakamura, K., Tsuruya, R., Hatanaka, M., Mashino, T., Sonoda, Y. and Kasahara, T. (2010). "The fixed structure of Licochalcone A by α , β -unsaturated ketone is necessary for anti-inflammatory activity through the inhibition of NF- κ B activation." International Immunopharmacology **10**(5): 562-571.

G

Galindo, R., Sánchez-López, E., Gómara, M. J., Espina, M., Ettcheto, M., Cano, A., Haro, I., Camins, A. and García, M. L. (2022). "Development of Peptide Targeted PLGA-PEGylated Nanoparticles Loading Licochalcone-A for Ocular Inflammation." Pharmaceutics **14**(2): 285.

Galindo-Camacho, R. M., Blanco-Llamero, C., da Ana, R., Fuertes, M. A., Señoráns, F. J., Silva, A. M., García, M. L. and Souto, E. B. (2022). "Therapeutic Approaches for Age-Related Macular Degeneration." International Journal of Molecular Sciences **23**(19): 11769.

Gatta Daniela, M. P., Franceschelli, S., Felaco, M. and Speranza, L. (2019). "Biological Effects of Licochalcones." Mini reviews in medicinal chemistry **19**(8): 647-656.

Giannavola, C., Bucolo, C., Maltese, A., Paolino, D., Vandelli, M. A., Puglisi, G., Lee, V. H. and Fresta, M. (2003). "Influence of preparation conditions on acyclovir-loaded poly-d,l-lactic acid nanospheres and effect of PEG coating on ocular drug bioavailability." Pharm Res **20**(4): 584-590.

Gilding, D. K. and Reed, A. M. (1979). "Biodegradable polymers for use in surgery -polyglycolic/poly(actic acid) homo- and copolymers: 1." Polymer **20**(12): 1459-1464.

6. REFERENCIAS

Gongheguo, Z. R. (2000). "Pharmacopoeia of the People's Republic of China (version English ed. 2000)."

González-Cruz, A. O., Hernández-Juárez, J., Ramírez-Cabrera, M. A., Balderas-Rentería, I. and Arredondo-Espinoza, E. (2022). "Peptide-based drug-delivery systems: A new hope for improving cancer therapy." Journal of Drug Delivery Science and Technology **72**: 103362.

Gonzalez-Pizarro, R., Carvajal-Vidal, P., Halbault Bellowa, L., Calpena, A. C., Espina, M. and García, M. L. (2019). "*In-situ* forming gels containing fluorometholone-loaded polymeric nanoparticles for ocular inflammatory conditions." Colloids Surf B Biointerfaces **175**: 365-374.

Gratieri, T., Gelfuso, G. M., de Freitas, O., Rocha, E. M. and Lopez, R. F. (2011). "Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan *in situ* forming gel." Eur J Pharm Biopharm **79**(2): 320-327.

Green, M. and Loewenstein, P. M. (1988). "Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein." Cell **55**(6): 1179-1188.

Grieve, M. (2015). A Modern Herbal: The Complete Ed. Stone Basin Books (UK).

Guidotti, G., Brambilla, L. and Rossi, D. (2017). "Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics." Trends Pharmacol Sci **38**(4): 406-424.

H

Han, H., Li, S., Xu, M., Zhong, Y., Fan, W., Xu, J., Zhou, T., Ji, J., Ye, J. and Yao, K. (2023). "Polymer- and lipid-based nanocarriers for ocular drug delivery: Current status and future perspectives." Advanced Drug Delivery Reviews **196**: 114770.

Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K. and Kinoshita, T. (1998). "Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*." Phytochemistry **48**(1): 125-129.

Harborne, J. B. (2017). The Flavonoids Advances in Research Since 1986, CRC Press (U.S.A).

Harborne, J. B. and Williams, C. A. (2001). "Anthocyanins and other flavonoids." Natural Product Reports **18**(3): 310-333.

Harwansh, R., Patra, K., Pareta, S. K., Singh, J. and Biswas, R. (2011). "Pharmacological studies on *Glycyrrhiza glabra*." Pharmacologyonline **2**: 1032-1038.

Hillaireau, H. and Couvreur, P. (2009). "Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery." Cell Mol Life Sci **66**(17): 2873-2896.

Holland, E. J., Mannis, M. J. and Lee, W. B. (2013). Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear Film. W.B. Saunders (Ed.), London.

6. REFERENCIAS

Hong, J. H., Cao, S. W., Xiang, S. J., Ruan, S. F., An, B. C., Wang, Z. X., Wu, W. F., Chen, H. J., Weng, L. D., Zhang, L., Liu, L., Chen, Y. Y., Shen, Q., Zhu, H. X. and Liu, Q. (2018). "Glycyrrhiza flavonoids and its major component, licochalcone A, inhibit melanogenesis through MAPK/ERK pathway by activating ERK phosphorylation." Journal of Dermatological Science **91**(2): 222-225.

Huang, B., Liu, J., Ju, C., Yang, D., Chen, G., Xu, S., Zeng, Y., Yan, X., Wang, W., Liu, D. and Fu, S. (2017). "Licochalcone A Prevents the Loss of Dopaminergic Neurons by Inhibiting Microglial Activation in Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Parkinson's Disease Models." International Journal of Molecular Sciences **18**(10): 2043.

J

Janagam, D. R., Wu, L. and Lowe, T. L. (2017). "Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye." Advanced Drug Delivery Reviews **122**: 31-64.

Jester, J. V., Murphy, C. J., Winkler, M., Bergmanson, J. P. G., Brown, D., Steinert, R. F. and Mannis, M. J. (2013). "Lessons in Corneal Structure and Mechanics to Guide the Corneal Surgeon." Ophthalmology **120**(9): 1715-1717.

Jia, T., Sun, Z., Lu, Y., Gao, J., Zou, H., Xie, F., Zhang, G., Xu, H., Sun, D. and Yu, Y. (2016). "A dual brain-targeting curcumin-loaded polymersomes ameliorated cognitive dysfunction in intrahippocampal amyloid- β 1-42-injected mice." International journal of nanomedicine **11**: 3765.

Joltikov, K. A. and Lobo-Chan, A. M. (2021). "Epidemiology and Risk Factors in Non-infectious Uveitis: A Systematic Review." Frontiers in Medicine **8**.

Jones, K. and Seyler, R. (1994). "Differential scanning calorimetry for boiling points and vapor pressure." TA Instruments Notes **26**(2): 61-69.

K

Kadoya, S., Fujii, K., Izutsu, K. I., Yonemochi, E., Terada, K., Yomota, C. and Kawanishi, T. (2010). "Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide-derived sugar alcohols." International journal of pharmaceutics **389**(1-2): 107-113.

Kajiyama, K., Demizu, S., Hiraga, Y., Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K., Tamura, Y., Okada, K. and Kinoshita, T. (1992). "Two prenylated retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*." Phytochemistry **31**(9): 3229-3232.

Kesav, N., Palestine, A. G., Kahook, M. Y. and Pantcheva, M. B. (2020). "Current management of uveitis-associated ocular hypertension and glaucoma." Surv Ophthalmol **65**(4): 397-407.

Kolsure, P. K. and Raj Kapoor, B. (2012). "Development of zolmitriptan gel for nasal administration." Asian J Pharm Clin Res **5**: 88-94.

6. REFERENCIAS

Koo, H., Moon, H., Han, H., Na, J. H., Huh, M. S., Park, J. H., Woo, S. J., Park, K. H., Chan Kwon, I., Kim, K. and Kim, H. (2012). "The movement of self-assembled amphiphilic polymeric nanoparticles in the vitreous and retina after intravitreal injection." Biomaterials **33**(12): 3485-3493.

Krtalić, I., Radošević, S., Hafner, A., Grassi, M., Nenadić, M., Cetina-Čižmek, B., Filipović-Grčić, J., Pepić, I. and Lovrić, J. (2018). "D-optimal design in the development of rheologically improved *in situ* forming ophthalmic gel." Journal of pharmaceutical sciences **107**(6): 1562-1571.

Kumar, S., Haglund, B. O. and Himmelstein, K. J. (1994). "*In situ*-forming gels for ophthalmic drug delivery." J Ocul Pharmacol **10**(1): 47-56.

Kumari, A., Yadav, S. K. and Yadav, S. C. (2010). "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems." Colloids Surf B Biointerfaces **75**(1): 1-18.

L

Laniel, A., Marouseau, É., Nguyen, D. T., Froehlich, U., McCartney, C., Boudreault, P. L. and Lavoie, C. (2023). "Characterization of PGua(4), a Guanidinium-Rich Peptoid that Delivers IgGs to the Cytosol via Macropinocytosis." Mol Pharm **20**(3): 1577-1590.

Lauweryns, B., van den Oord, J. J. and Missotten, L. (1993). "The transitional zone between limbus and peripheral cornea. An immunohistochemical study." Investigative ophthalmology & visual science **34**(6): 1991-1999.

Lee, S. Y., Chiu, Y. J., Yang, S. M., Chen, C. M., Huang, C. C., Lee-Chen, G. J., Lin, W. and Chang, K. H. (2018). "Novel synthetic chalcone-coumarin hybrid for A β aggregation reduction, antioxidation, and neuroprotection." CNS Neuroscience & Therapeutics **24**(12): 1286-1298.

Li, M. T., Xie, L., Jiang, H. M., Huang, Q., Tong, R. S., Li, X., Xie, X. and Liu, H. M. (2022). "Role of Licochalcone A in Potential Pharmacological Therapy: A Review." Front Pharmacol **13**: 878776.

Li, P., Yu, C., Zeng, F. S., Fu, X., Yuan, X. J., Wang, Q., Fan, C., Sun, B. L. and Sun, Q. S. (2021). "Licochalcone A Attenuates Chronic Neuropathic Pain in Rats by Inhibiting Microglia Activation and Inflammation." Neurochemical Research **46**(5): 1112-1118.

Li, S., Chen, G., Zhang, C., Wu, M., Wu, S. and Liu, Q. (2014). "Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases." Food Science and Human Wellness **3**(3): 110-116.

Liu, P., Chen, N., Yan, L., Gao, F., Ji, D., Zhang, S., Zhang, L., Li, Y. and Xiao, Y. (2019). "Preparation, characterisation and *in vitro* and *in vivo* evaluation of CD44-targeted chondroitin sulphate-conjugated doxorubicin PLGA nanoparticles." Carbohydrate Polymers **213**: 17-26.

6. REFERENCIAS

Liu, S., Jones, L. and Gu, F. X. (2012). "Nanomaterials for Ocular Drug Delivery." Macromolecular Bioscience **12**(5): 608-620.

López-Machado, A., Díaz, N., Cano, A., Espina, M., Badía, J., Baldomà, L., Calpena, A. C., Biancardi, M., Souto, E. B., García, M. L. and Sánchez-López, E. (2021). "Development of topical eye-drops of lactoferrin-loaded biodegradable nanoparticles for the treatment of anterior segment inflammatory processes." International Journal of Pharmaceutics **609**: 121188.

López-Machado, A., Díaz-Garrido, N., Cano, A., Espina, M., Badía, J., Baldomà, L., Calpena, A. C., Souto, E. B., García, M. L. and Sánchez-López, E. (2021). "Development of Lactoferrin-Loaded Liposomes for the Management of Dry Eye Disease and Ocular Inflammation." Pharmaceutics **13**(10): 1698.

Ludwig, A. (2005). "The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery." Advanced Drug Delivery Reviews **57**(11): 1595-1639.

Luo, P., Liu, D. and Li, J. (2020). "Pharmacological perspective: glycyrrhizin may be an efficacious therapeutic agent for COVID-19." International Journal of Antimicrobial Agents **55**(6): 105995.

M

Mansour, M., Mansour, S., Mortada, N. D. and Abd ElHady, S. S. (2008). "Ocular poloxamer-based ciprofloxacin hydrochloride *in situ* forming gels." Drug development and industrial pharmacy **34**(7): 744-752.

Martens, T. F., Remaut, K., Deschout, H., Engbersen, J. F. J., Hennink, W. E., van Steenberghe, M. J., Demeester, J., De Smedt, S. C. and Braeckmans, K. (2015). "Coating nanocarriers with hyaluronic acid facilitates intravitreal drug delivery for retinal gene therapy." Journal of Controlled Release **202**: 83-92.

Mathew, A., Fukuda, T., Nagaoka, Y., Hasumura, T., Morimoto, H., Yoshida, Y., Maekawa, T., Venugopal, K. and Kumar, D. S. (2012). "Curcumin Loaded-PLGA Nanoparticles Conjugated with Tet-1 Peptide for Potential Use in Alzheimer's Disease." PLOS ONE **7**(3): e32616.

McKee, H. D., Irion, L. C. D., Carley, F. M., Brahma, A. K., Jafarinasab, M. R., Rahmati-Kamel, M., Kanavi, M. R. and Feizi, S. (2014). "Re: Dua *et al.*: Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet layer (Dua's layer)" Ophthalmology **121**(5): e24-e25.

Mo, Z., Ban, J., Zhang, Y., Du, Y., Wen, Y., Huang, X., Xie, Q., Shen, L., Zhang, S., Deng, H., Hou, D., Chen Y. and Lu, Z. (2018). "Nanostructured lipid carriers-based thermosensitive eye drops for enhanced, sustained delivery of dexamethasone." Nanomedicine **13**(11): 1239-1253.

Mohsen, A. M. (2022). "Cationic Polymeric Nanoparticles for Improved Ocular Delivery and Antimycotic Activity of Terconazole." Journal of Pharmaceutical Sciences **111**(2): 458-468.

Mukhopadhyay, M. and Panja, P. (2008). "A novel process for extraction of natural sweetener from licorice (*Glycyrrhiza glabra*) roots." Separation and Purification Technology **63**(3): 539-545.

6. REFERENCIAS

Murck, H. (2020). "Symptomatic Protective Action of Glycyrrhizin (Licorice) in COVID-19 Infection." Front Immunol **11**: 1239.

N

Nagai, N., Minami, M., Deguchi, S., Otake, H., Sasaki, H. and Yamamoto, N. (2020). "An *in situ* Gelling System Based on Methylcellulose and Tranilast Solid Nanoparticles Enhances Ocular Residence Time and Drug Absorption Into the Cornea and Conjunctiva." Front Bioeng Biotechnol **8**: 764.

Nagarwal, R. C., Kant, S., Singh, P. N., Maiti, P. and Pandit, J. K. (2009). "Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery." Journal of Controlled Release **136**(1): 2-13.

Nair, A., Thankachen, R. U., Raj, J. and Gopi, S. (2021). 1 - Inflammation, symptoms, benefits, reaction, and biochemistry. Inflammation and Natural Products. S. Gopi, A. Amalraj, A. Kunnumakkara and S. Thomas, Academic Press: 1-19.

Numazaki, K. (2003). "Glycyrrhizin therapy for viral infections." African Journal of Biotechnology **2**: 392-393.

O

Oloumi, H. and Hassibi, N. (2011). "Study the correlation between some climate parameters and the content of phenolic compounds in roots of *Glycyrrhiza glabra*." Journal of medicinal plant research **5**: 6011.

Olukoga, A. and Donaldson, D. (2000). "Licorice and its health implications." J R Soc Promot Health **120**(2): 83-89.

Orozco, M. F., Vázquez-Hernández, V. and Fenton-Navarro, B. (2019). "Active compounds of medicinal plants, mechanism for antioxidant and beneficial effects." Phyton **88**(1): 1.

P

Pandey, P., Cabot, P. J., Wallwork, B., Panizza, B. J. and Parekh, H. S. (2017). "Formulation, functional evaluation and *ex vivo* performance of thermoresponsive soluble gels-A platform for therapeutic delivery to mucosal sinus tissue." European Journal of Pharmaceutical Sciences **96**: 499-507.

Paradkar, M. U. and Parmar, M. (2017). "Formulation development and evaluation of Natamycin niosomal *in-situ* gel for ophthalmic drug delivery." Journal of Drug Delivery Science and Technology **39**: 113-122.

6. REFERENCIAS

Park, M. K., Ji, J., Haam, K., Han, T. H., Lim, S., Kang, M. J., Lim, S. S. and Ban, H. S. (2021). "Licochalcone A inhibits hypoxia-inducible factor-1 α accumulation by suppressing mitochondrial respiration in hypoxic cancer cells." Biomedicine & Pharmacotherapy **133**: 111082.

Pastorino, G., Cornara, L., Soares, S., Rodrigues, F. and Oliveira, M. B. P. P. (2018). "Liquorice (*Glycyrrhiza glabra*): A phytochemical and pharmacological review." Phytotherapy Research **32**(12): 2323-2339.

Permana, A. D., Utami, R. N., Layadi, P., Himawan, A., Juniarti, N., Anjani, Q. K., Utomo, E., Mardikasari, S. A., Arjuna, A. and Donnelly, R. F. (2021). "Thermosensitive and mucoadhesive *in situ* ocular gel for effective local delivery and antifungal activity of itraconazole nanocrystal in the treatment of fungal keratitis." International journal of pharmaceutics **602**: 120623.

Pescina, S., Ostacolo, C., Gomez-Monterrey, I. M., Sala, M., Bertamino, A., Sonvico, F., Padula, C., Santi, P., Bianchera, A. and Nicoli, S. (2018). "Cell penetrating peptides in ocular drug delivery: State of the art." Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society **284**: 84-102.

Phan, H. T. L., Kim, H. J., Jo, S., Kim, W. K., Namkung, W. and Nam, J. H. (2021). "Anti-Inflammatory Effect of Licochalcone A via Regulation of ORAI1 and K(+) Channels in T-Lymphocytes." Int J Mol Sci **22**(19).

Phan, H. T. L., Kim, H. J., Jo, S., Kim, W. K., Namkung, W. and Nam, J. H. (2021). "Anti-Inflammatory Effect of Licochalcone A via Regulation of ORAI1 and K⁺ Channels in T-Lymphocytes." International Journal of Molecular Sciences **22**(19): 10847.

Pires, P. C., Mascarenhas-Melo, F., Pedrosa, K., Lopes, D., Lopes, J., Macário-Soares, A., Peixoto, D., Giram, P. S., Veiga, F. and Paiva-Santos, A. C. (2023). "Polymer-based biomaterials for pharmaceutical and biomedical applications: A focus on topical drug administration." European Polymer Journal **187**.

Prajapati, B. G., Patel, A. G. and Paliwal, H. (2021). "Fabrication of nanoemulsion-based *in situ* gel using moxifloxacin hydrochloride as model drug for the treatment of conjunctivitis." Food Hydrocolloids for Health **1**: 100045.

Prausnitz, M. R. and Noonan J. S. (1998). "Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: A literature analysis for drug delivery to the eye." Journal of Pharmaceutical Sciences **87**(12): 1479-1488.

Puaratanaarunkon, T. and Asawanonda, P. (2022). "A Randomized, Double Blinded, Split-Face Study of the Efficacy of Using a Broad Spectrum Sunscreen with Anti-Inflammatory Agent to Reduce Post Inflammatory Hyperpigmentation After Picosecond Laser." Clin Cosmet Investig Dermatol **15**: 331-337.

R

Ramezani Dana, H. and Ebrahimi, F. (2023). "Synthesis, properties, and applications of polylactic acid-based polymers." Polymer Engineering & Science **63**(1): 22-43.

Ramos Yacasi, G. R., Calpena Campmany, A. C., Egea Gras, M. A., Espina García, M. and García López, M. L. (2017). "Freeze drying optimization of polymeric nanoparticles for ocular flurbiprofen delivery: effect of protectant agents and critical process parameters on long-term stability." Drug Development and Industrial Pharmacy **43**(4): 637-651.

Rani, K., Devi, N., Saharan, V. and Kharb, P. (2021). "*Glycyrrhiza glabra*: An Insight to Nanomedicine." J Nanosci Nanotechnol **21**(6): 3367-3378.

Rao, J. P. and Geckeler, K. E. (2011). "Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters." Progress in Polymer Science **36**(7): 887-913.

Richard, J. P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B. and Chernomordik, L. V. (2005). "Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors." J Biol Chem **280**(15): 15300-15306.

Ruel-Gariépy, E. and Leroux, J. C. (2004). "*In situ*-forming hydrogels--review of temperature-sensitive systems." Eur J Pharm Biopharm **58**(2): 409-426.

S

Sahoo, S. K., Dilnawaz, F. and Krishnakumar, S. (2008). "Nanotechnology in ocular drug delivery." Drug Discovery Today **13**(3): 144-151.

Saitoh, T. and Shibata, S. (1975). "New type chalcones from licorice root." Tetrahedron Letters **16**(50): 4461-4462.

Sakai, N. and Matile, S. (2003). "Anion-Mediated Transfer of Polyarginine across Liquid and Bilayer Membranes." Journal of the American Chemical Society **125**(47): 14348-14356.

Salatin, S., Maleki Dizaj, S. and Yari Khosroushahi, A. (2015). "Effect of the surface modification, size, and shape on cellular uptake of nanoparticles." Cell Biology International **39**(8): 881-890.

Sánchez-López, E., Egea, M. A., Cano, A., Espina, M., Calpena, A. C., Ettcheto, M., Camins, A., Souto, E. B., Silva, A. M. and García, M. L. (2016). "PEGylated PLGA nanospheres optimized by design of experiments for ocular administration of dexibuprofen—*in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* characterization." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **145**: 241-250.

Sen, H. N., Vitale, S., Gangaputra, S. S., Nussenblatt, R. B., Liesegang, T. L., Levy-Clarke, G. A., Rosenbaum, J. T., Suhler, E. B., Thorne, J. E., Foster, C. S., Jabs, D. A. and Kempen, J. H. (2014). "Periocular Corticosteroid Injections in Uveitis: Effects and Complications." Ophthalmology **121**(11): 2275-2286.

6. REFERENCIAS

Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S. and Eggeling, C. (2017). "The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts." Nature Reviews Molecular Cell Biology **18**(6): 361-374.

Sharma, P. K., Sandal, N. and Chauhan, M. K. (2021). "Evaluation of precorneal residence time of brimonidine tartrate nanoparticles loaded *in situ* gel using gamma scintigraphy." Inorganic and Nano-Metal Chemistry **51**(5): 701-708.

Sharma, V., Katiyar, A. and Agrawal, R. C. (2018). *Glycyrrhiza glabra*: Chemistry and Pharmacological Activity. Sweeteners: Pharmacology, Biotechnology, and Applications. J.-M. Mérillon and K. G. Ramawat. Cham, Springer International Publishing: 87-100.

Shi, N. Q., Qi, X. R., Xiang, B. and Zhang, Y. (2014). "A survey on "Trojan Horse" peptides: opportunities, issues and controlled entry to "Troy"." J Control Release **194**: 53-70.

Shirke, S., Takhistov, P. and Ludescher, R. D. (2005). "Molecular mobility in amorphous maltose and maltitol from phosphorescence of erythrosin B." The Journal of Physical Chemistry B **109**(33): 16119-16126.

Shukr, M. H., Ismail, S., El-Hossary, G. G. and El-Shazly, A. H. (2021). "Design and evaluation of mucoadhesive *in situ* liposomal gel for sustained ocular delivery of travoprost using two steps factorial design." Journal of Drug Delivery Science and Technology **61**: 102333.

Silva, L. M., Marconato, D. G., da Silva, M. P. N., Raposo, N. R. B., Facchini, G. d. F. S., Macedo, G. C., de Sá Teixeira, F., Salvadori, M. C. B. d. S., Pinto, P. d. F., Moraes, J. d., Pittella, F. and Filho, A. A. D. S. (2021). "Licochalcone A-loaded solid lipid nanoparticles improve antischistosomal activity *in vitro* and *in vivo*." Nanomedicine **16**(19): 1641-1655.

Sipos, B., Budai-Szűcs, M., Kókai, D., Orosz, L., Burián, K., Csorba, A., Nagy, Z. Z., Balogh, G. T., Csóka, I. and Katona, G. (2022). "Erythromycin-loaded polymeric micelles: *In situ* gel development, *in vitro* and *ex vivo* ocular investigations." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **180**: 81-90.

Soliman, K. A., Ullah, K., Shah, A., Jones, D. S. and Singh, T. R. (2019). "Poloxamer-based *in situ* gelling thermoresponsive systems for ocular drug delivery applications." Drug Discovery Today **24**(8): 1575-1586.

Song, X., Zhao, Y., Hou, S., Xu, F., Zhao, R., He, J., Cai, Z., Li, Y. and Chen, Q. (2008). "Dual agents loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **69**(2): 445-453.

Souza, J. M., de Carvalho, É. A. A., Candido, A. C. B. B., de Mendonça, R. P., Fernanda da Silva, M., Parreira, R. L. T., Dias, F. G. G., Ambrósio, S. R., Arantes, A. T., da Silva Filho, A. A., Nascimento, A. N., Costa, M. R., Sairre, M. I., Veneziani, R. C. S. and Magalhães, L. G. (2020). "Licochalcone a Exhibits Leishmanicidal Activity *in vitro* and in Experimental Model of Leishmania (Leishmania) Infantum." Frontiers in Veterinary Science **7**.

6. REFERENCIAS

T

Tan, J. H., Ng, E., Acharya, U. R. and Chee, C. (2010). "Study of normal ocular thermogram using textural parameters." Infrared Physics & Technology **53**(2): 120-126.

Tan, P. H., King, W. J., Chen, D., Awad, H. M., Mackett, M., Lechler, R. I., Frank, D., Larkin, P. and George, A. J. (2001). "Transferrin receptor-mediated gene transfer to the corneal endothelium." Transplantation **71**(4): 552-560.

Tang, W. and Eisenbrand, G. (2013). Chinese drugs of plant origin: chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine, Springer Science & Business Media.

Tatke, A., Dudhipala, N., Janga, K. Y., Balguri, S. P., Avula, B., Jablonski, M. M. and Majumdar, S. (2018). "*In Situ* Gel of Triamcinolone Acetonide-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Improved Topical Ocular Delivery: Tear Kinetics and Ocular Disposition Studies." Nanomaterials (Basel) **9**(1).

Taufel, A. (1996). "A. Y. Leung and S. Foster: Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics. Second edition, 649 pages. John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore 1996." Food / Nahrung **40**(5): 289-289.

Trenkenschuh, E. and Friess, W. (2021). "Freeze-drying of nanoparticles: How to overcome colloidal instability by formulation and process optimization." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **165**: 345-360.

Tsai, J. P., Lee, C. H., Ying, T. H., Lin, C. L., Lin, C. L., Hsueh, J. T. and Hsieh, Y. H. (2015). "Licochalcone A induces autophagy through PI3K/Akt/mTOR inactivation and autophagy suppression enhances Licochalcone A-induced apoptosis of human cervical cancer cells." Oncotarget **6**(30): 28851-28866.

Tun, X., Yasukawa, K. and Yamada, K. I. (2018). "Nitric Oxide Is Involved in Activation of Toll-Like Receptor 4 Signaling through Tyrosine Nitration of Src Homology Protein Tyrosine Phosphatase 2 in Murine Dextran Sulfate-Induced Colitis." Biological and Pharmaceutical Bulletin **41**(12): 1843-1852.

V

Vedadghavami, A., Zhang, C. and Bajpayee, A. G. (2020). "Overcoming negatively charged tissue barriers: Drug delivery using cationic peptides and proteins." Nano Today **34**: 100898.

Vivès, E., Brodin, P. and Lebleu, B. (1997). "A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus." J Biol Chem **272**(25): 16010-16017.

6. REFERENCIAS

W

Wadhwa, S., Paliwal, R., Paliwal, R. S. and Vyas, P. S. (2009). "Nanocarriers in Ocular Drug Delivery: An Update Review." Current Pharmaceutical Design **15**(23): 2724-2750.

Wang, X., Gu, Y., He, Y., Sang, L., Dai, Y. and Wang, D. (2021). "Preparation and optimization formulation of zedoary turmeric oil nanoemulsion based thermo-sensitive gel for improved application in ophthalmology." Journal of Drug Delivery Science and Technology **65**: 102682.

Wang, Y. and Wang, C. (2022). "Novel Eye Drop Delivery Systems: Advance on Formulation Design Strategies Targeting Anterior and Posterior Segments of the Eye." Pharmaceutics **14**(6): 1150.

Wang, Z., Xue, Y., Chen, T., Du, Q., Zhu, Z., Wang, Y., Wu, Y., Zeng, Q., Shen, C., Jiang, C., Yang, Z., Zhu, H., Liu, L. and Liu, Q. (2021). "*Glycyrrhiza* acid micelles loaded with licochalcone A for topical delivery: Co-penetration and anti-melanogenic effect." European Journal of Pharmaceutical Sciences **167**: 106029.

Watsky, M. A., Jablonski, M. M. and Edelhauser, H. F. (1988). "Comparison of conjunctival and corneal surface areas in rabbit and human." Curr Eye Res **7**(5): 483-486.

Weber, T. M., Ceilley, R. I., Buerger, A., Kolbe, L., Trookman, N. S., Rizer, R. L. and Schoelermann, A. (2006). "Skin tolerance, efficacy, and quality of life of patients with red facial skin using a skin care regimen containing Licochalcone A." J Cosmet Dermatol **5**(3): 227-232.

Wen, Y., Jia, H., Mo, Z., Zheng, K., Chen, S., Ding, Y., Zhang, Y., Wen, Y., Xie, Q., Qiu, J., Wu, H., Ni, Q., Ban, J., Lu, Z. and Chen, Y. (2021). "Cross-linked thermosensitive nanohydrogels for ocular drug delivery with a prolonged residence time and enhanced bioavailability." Materials Science and Engineering: C **119**: 111445.

Worakul, N. and Robinson, J. R. (1997). "Ocular pharmacokinetics/pharmacodynamics." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **44**(1): 71-83.

Wu, B., Feng, J., Zeng, T., Guo, Q., Zhang, Z., Ding, C., Tian, B. and Sai, S. (2022). "Flurbiprofen loaded thermosensitive nanohydrogel for ophthalmic anti-inflammatory therapy." Journal of Drug Delivery Science and Technology **70**: 103253.

Y

Yang, G., Lee, H. E., Yeon, S. H., Kang, H. C., Cho, Y. Y., Lee, H. S., Zouboulis, C. C., Han, S. H., Lee, J. H. and Lee, J. Y. (2018). "Licochalcone A attenuates acne symptoms mediated by suppression of NLRP3 inflammasome." Phytotherapy Research **32**(12): 2551-2559.

Yang, Z., Zhao, Z. and Panjwani, N. (1996). "Gangliosides of migrating and nonmigrating corneal epithelium in organ and cell culture." Investigative ophthalmology & visual science **37**(4): 501-510.

6. REFERENCIAS

Yin, T., Yang, L., Liu, Y., Zhou, X., Sun J. and Liu, J. (2015). "Sialic acid (SA)-modified selenium nanoparticles coated with a high blood-brain barrier permeability peptide-B6 peptide for potential use in Alzheimer's disease." Acta Biomater **25**: 172-183.

Yoon, G., Jung, Y. D. and Cheon, S. H. (2005). "Cytotoxic Allyl Retrochalcone from the Roots of *Glycyrrhiza inflata*." Chemical and Pharmaceutical Bulletin **53**(6): 694-695.

Yuan, L. W., Jiang, X. M., Xu, Y. L., Huang, M. Y., Chen, Y. C., Yu, W. B., Su, M. X., Ye, Z. H., Chen, X., Wang, Y. and Lu, J. J. (2021). "Licochalcone A inhibits interferon-gamma-induced programmed death-ligand 1 in lung cancer cells." Phytomedicine **80**: 153394

Z

Zhang, J., Zhou, X., Yu, Q., Yang, L., Sun, D., Zhou, Y. and Liu, J. (2014). "Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)-Stabilized Selenium Nanoparticles Coated with Tet-1 Peptide To Reduce Amyloid- β Aggregation and Cytotoxicity." ACS Applied Materials & Interfaces **6**(11): 8475-8487.

Zhang, Q. and Ye, M. (2009). "Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice)." J Chromatogr A **1216**(11): 1954-1969.

Zhang, Y., Zhou, S. Q., Xie, M. M., Jiang, Q. L., Yang, N., Wu, R., Zhou J. and Xu, X. R. (2023). "Licochalcone A alleviates laser-induced choroidal neovascularization by inhibiting the endothelial-mesenchymal transition via PI3K/AKT signaling pathway." Experimental Eye Research **226**: 109335.

Zhou, K., Yang, S. and Li, S. M. (2021). "Naturally occurring prenylated chalcones from plants: structural diversity, distribution, activities and biosynthesis." Natural Product Reports **38**(12): 2236-2260.