



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## **Estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de formulaciones de pranoprofeno para administración ocular**

Cristina Cañadas Enrich



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y  
CONTROL DE MEDICAMENTOS

ESTUDIOS *IN VITRO*, *EX VIVO* E *IN VIVO* DE FORMULACIONES DE  
PRANOPROFENO PARA ADMINISTRACIÓN OCULAR

CRISTINA CAÑADAS ENRICH  
2018





UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y  
CONTROL DE MEDICAMENTOS

ESTUDIOS *IN VITRO*, *EX VIVO* E *IN VIVO* DE FORMULACIONES DE  
PRANOPROFENO PARA ADMINISTRACIÓN OCULAR

Memoria presentada por Cristina Cañadas Enrich para optar al título de doctora  
por la Universidad de Barcelona

Directora:  
Dra. Guadalupe Abrego Escobar

Director:  
Dr. Antonio de Padua Boix Montañés

Doctoranda:  
Cristina Cañadas Enrich

Tutora:  
Dra. Ana Cristina Calpena Campmany

CRISTINA CAÑADAS ENRICH  
2018



## **AGRADECIMIENTOS**

---



Quisiera dar las gracias a mis directores, la Dra. Guadalupe Abrego Escobar y el Dr. Antonio de Padua Boix Montañés por haber confiado en mí para la realización de este proyecto de investigación. Por haberme brindado una excelente formación científica y por su ayuda y apoyo constantes, a pesar de la distancia y las dificultades con las que nos hemos ido encontrando a lo largo de estos años.

A mi tutora, la Dra. Ana Cristina Calpena Campmany, mi más profundo agradecimiento porque sin ella ni siquiera me hubiera planteado la realización de una tesis doctoral. Por su pragmatismo, su cercanía y por haberme tendido siempre una mano amiga y haberme dedicado su escaso y valioso tiempo.

A mis padres Enrique y M<sup>a</sup> Carmen por la educación que me han ofrecido, por su cariño y apoyo incondicionales y por haberme enseñado a luchar por cumplir mis metas. Por no dejarme caer en ningún momento. Gracias por estar siempre ahí para todo, porque sin ellos no hubiera podido recorrer este camino.

A mi hermano Daniel, por saber sacarme siempre una sonrisa, o una carcajada. Por la complicidad que tenemos y porque, aunque no nos veamos demasiado, siempre estamos y estaremos el uno para el otro.

A todos y cada uno de los compañeros y profesores de la Universidad de Barcelona con los que he tenido la suerte de compartir horas y horas de poyata y escritorio. Por esos momentos de locura tras horas de trabajo en los que estábamos tan cansados que desvariábamos y los lamentos se convertían en risas. Por su ayuda en cualquier aspecto y campo, a nivel profesional y personal.

A mi pareja Roberto por su ayuda profesional a lo largo de este proyecto. Por prestarme su hombro en los malos momentos y por celebrar siempre conmigo los buenos. Por escucharme, entenderme, valorarme y animarme a pesar de todo.

A Rosa María y Miguel, por cuidar de mí, por facilitarme todo lo posible mi día a día y preocuparse por mis avances.

A mis amigos, los de mi pueblo de toda la vida, a los que hice en mis años de licenciatura y a los más nuevos, a todos, por soportar mis ausencias. Por entenderme y no juzgarme. Por apoyarme, interesarse y preocuparse por mí. Por darme ánimos en todo momento y ayudarme en todo lo que ha estado en su mano. Y sobre todo, por



ofrecerme todos esos momentos de desconexión, de disfrute y de cambio de perspectiva. Gracias.

Mil gracias a todos.

## RESUMEN

---



El presente trabajo de investigación versa sobre la caracterización *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de dos sistemas nanoestructurados de liberación sostenida (PF-F1NPs y PF-F2NPs) conteniendo pranoprofeno (PF) como principio activo. Estas formulaciones fueron optimizadas en estudios previos desarrollados por Abrego y colaboradores (a) como una estrategia innovadora para el tratamiento del dolor y los procesos inflamatorios asociados a patologías oculares. Inicialmente se prepararon y caracterizaron morfológica y fisicoquímicamente las formulaciones PF-NPs bajo las condiciones descritas por Abrego y colaboradores. Los resultados obtenidos revelaron que las formulaciones PF-NPs presentaban características apropiadas para su administración ocular. Se llevó a cabo entonces un ensayo *in vitro* de citotoxicidad para las formulaciones PF-NPs, las mismas formulaciones pero sin fármaco (NPs blancas) y para una solución de PF en tampón fosfato (PBS) usando la línea celular Y-79 de retinoblastoma humano. Este análisis evidenció que cuando las células fueron tratadas con concentraciones de 150 µg/mL para la formulación PF-F1NPs y de 200 µg/mL para PF-F2NPs, la viabilidad celular resultó cercana al 20% en comparación con el grupo control transcurridas 48 h de ensayo. Por otra parte, la exposición de las células Y-79 a una concentración superior a 750 µg/mL de las NPs blancas y de la solución de PF en PBS, mostró una viabilidad celular inferior al 50% respecto al grupo control. Los resultados obtenidos podrían atribuirse a que el fármaco en solución es susceptible de degradarse originando metabolitos menos tóxicos para las células, mientras que el fármaco encapsulado en las NPs se encuentra protegido de la degradación y se libera continuamente en su forma estable para interactuar con las células causando mayor toxicidad. Adicionalmente, concentraciones altas de las formulaciones PF-NPs y de las NPs blancas limitan el suministro de oxígeno y nutrientes a las células, lo que interfiere en el metabolismo y la proliferación de las mismas.

Asimismo, en esta investigación se dedicaron esfuerzos significativos a validar una metodología bioanalítica para la cuantificación del PF por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en muestras que hubieran estado en contacto directo con tejidos oculares. Los resultados demostraron que el método escogido es lineal, exacto y preciso para el intervalo de concentraciones ensayadas (6.25 – 100 µg/mL), además de establecerse como selectivo y robusto. Se llevaron a cabo estudios *ex vivo* en córnea y esclera de cerdo para evaluar el perfil de permeación del PF a partir de una solución a saturación del fármaco. El análisis reveló que la cantidad de PF permeada a través de la esclerótica es superior a la observada para la córnea, quedando una mayor cantidad del PF retenido en esta última. Estos resultados podrían deberse a las diferencias anatómicas existentes entre las dos membranas oculares. La idoneidad del

método extractivo escogido fue evaluada a través de la recuperación y cuantificación del PF retenido en las membranas biológicas tras los ensayos *ex vivo* de permeación. Los datos obtenidos revelaron que el método validado es adecuado para tal fin. Además, se desarrolló un ensayo *ex vivo* en córnea de conejo con el propósito de evaluar el perfil de permeación del PF desde las formulaciones PF-NPs en comparación con la formulación comercial de PF (Oftalar<sup>®</sup>) y con una solución de PF en PBS (1.0 mg/mL). El estudio demostró que tanto la cantidad permeada como la cantidad retenida de PF a partir de las formulaciones PF-NPs es superior respecto a la presentada por el Oftalar<sup>®</sup> y la solución de PF en PBS. Estos resultados se encuentran en concordancia con los obtenidos en el ensayo *in vivo* de eficacia antiinflamatoria en el que la formulación PF-F2NPs evidenció la mayor eficacia antiinflamatoria respecto al resto de formulaciones sometidas a ensayo. Finalmente, no se detectó ningún signo de irritación corneal, del iris o de la conjuntiva tras un ensayo *in vivo* de tolerancia ocular para las formulaciones PF-NPs.

a) Abrego G, Alvarado HL, Egea MA, Gonzalez-Mira E, Calpena AC, Garcia ML. Design of Nanosuspensions and Freeze-Dried PLGA Nanoparticles as a Novel Approach for Ophthalmic Delivery of Pranoprofen. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2014;103(10):3153-64.

## ÍNDICE

---



---

Índice general .....	15
Abreviaturas y acrónimos .....	19
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Administración de fármacos por vía ocular.....	23
1.1.1 Anatomofisiología ocular .....	23
1.1.1.1 Córnea .....	27
1.1.1.2 Esclerótica.....	29
1.1.2 Permeación ocular de fármacos .....	31
1.2 Farmacoterapia antiinflamatoria ocular .....	35
1.2.1 Mecanismo del proceso inflamatorio .....	35
1.2.2 Mecanismo de acción de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).....	36
1.2.3 Pranoprofeno .....	38
1.3 Sistemas de liberación controlada de fármacos para administración ocular .....	39
1.3.1 Nanopartículas poliméricas .....	39
1.3.1.1 Métodos de preparación y caracterización de nanopartículas.....	40
1.4 Validación bioanalítica.....	43
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
<b>3. RESULTADOS</b>	
3.1 <i>In vitro</i> , <i>ex vivo</i> and <i>in vivo</i> characterization of PLGA nanoparticles loading pranoprofen for ocular administration (Artículo 1).....	55
3.2 Pranoprofen quantification in <i>ex vivo</i> corneal and scleral permeation samples: Analytical validation (Artículo II).....	69



4. DISCUSIÓN.....	83
5. CONCLUSIONES .....	99
6. REFERENCIAS .....	105

## **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

---



AA:	Ácido araquidónico
AEFI:	Asociación Española de Farmacéuticos de Industria
AEMPS:	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AINEs:	Antiinflamatorios no esteroideos
ANOVA:	Análisis de varianza
BAC:	Cloruro de benzalconio
CCS:	Patrones de calibrado
COX:	Ciclooxigenasa
DLS:	Dispersión dinámica de la luz
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EE:	Eficiencia de encapsulación
EMA:	Agencia Europea de Medicamentos
FBS:	Suero bovino fetal
FDA:	Administración de Alimentos y Medicamentos
HPLC:	Cromatografía líquida de alta eficacia
IP:	Índice de polidispersión
LOX:	Lipooxigenasa
NCs:	Nanocápsulas
NEs:	Nanoesferas
NPs:	Nanopartículas
PBS:	Tampón fosfato salino
PCS:	Espectroscopía de correlación de fotones
PF:	Pranoprofeno
PF-NPs:	Nanopartículas optimizadas conteniendo pranoprofeno
PGs:	Prostaglandinas
PGH <sub>2</sub> :	Prostaglandina H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub> :	Prostaciclina
PIO:	Presión intraocular
PLA:	Ácido poliláctico
PLGA:	Ácido poliláctico-co-glicólico
PVA:	Polivinil alcohol
QELS:	Dispersión de luz cuasi elástica

RE:	Error relativo
RSD:	Desviación estándar relativa
TEM:	Microscopía de transmisión electrónica
TMP:	Tamaño promedio de partícula
T <sub>R</sub> :	Tiempo de retención
ZP:	Potencial Z

## **1. INTRODUCCIÓN**

---



## 1.1 Administración de fármacos por vía ocular

De entre la multitud de vías existentes para la administración de fármacos, la ocular ha resultado ser una en las que la investigación farmacéutica ha invertido más tiempo y esfuerzo de los últimos años (1). Esto se debe en gran medida, a las ventajas que la administración ocular puede ofrecer, como son (2): la posibilidad de conseguir un efecto localizado del fármaco, evitando así procesos de absorción sistémica que conllevarían más efectos adversos; evitar el proceso de primer paso debido al cual el fármaco podría ser inactivado antes de alcanzar su diana terapéutica y; el hecho de que proporciona un método de administración simple e indoloro, lo que incrementa el cumplimiento terapéutico por parte del paciente. Al mismo tiempo, los esfuerzos más significativos se han direccionado a solventar una de las grandes desventajas de esta vía, la baja biodisponibilidad que presentan las formas farmacéuticas clásicas (colirios y ungüentos oftálmicos).

El concepto farmacocinético de biodisponibilidad hace referencia a la fracción de la dosis de fármaco administrada y a la velocidad con la cual ésta, alcanza su diana terapéutica. Partiendo de ello, es incuestionable que la eficacia terapéutica del fármaco dependerá entonces de su biodisponibilidad, la cual estará subrogada a la capacidad que presente el mismo para atravesar en mayor o menor medida las distintas barreras anatomofisiológicas que conforman el globo ocular, lo que a su vez se verá subyugado a las características fisicoquímicas del principio activo y de la forma farmacéutica que lo contiene.

### 1.1.1 Anatomofisiología ocular

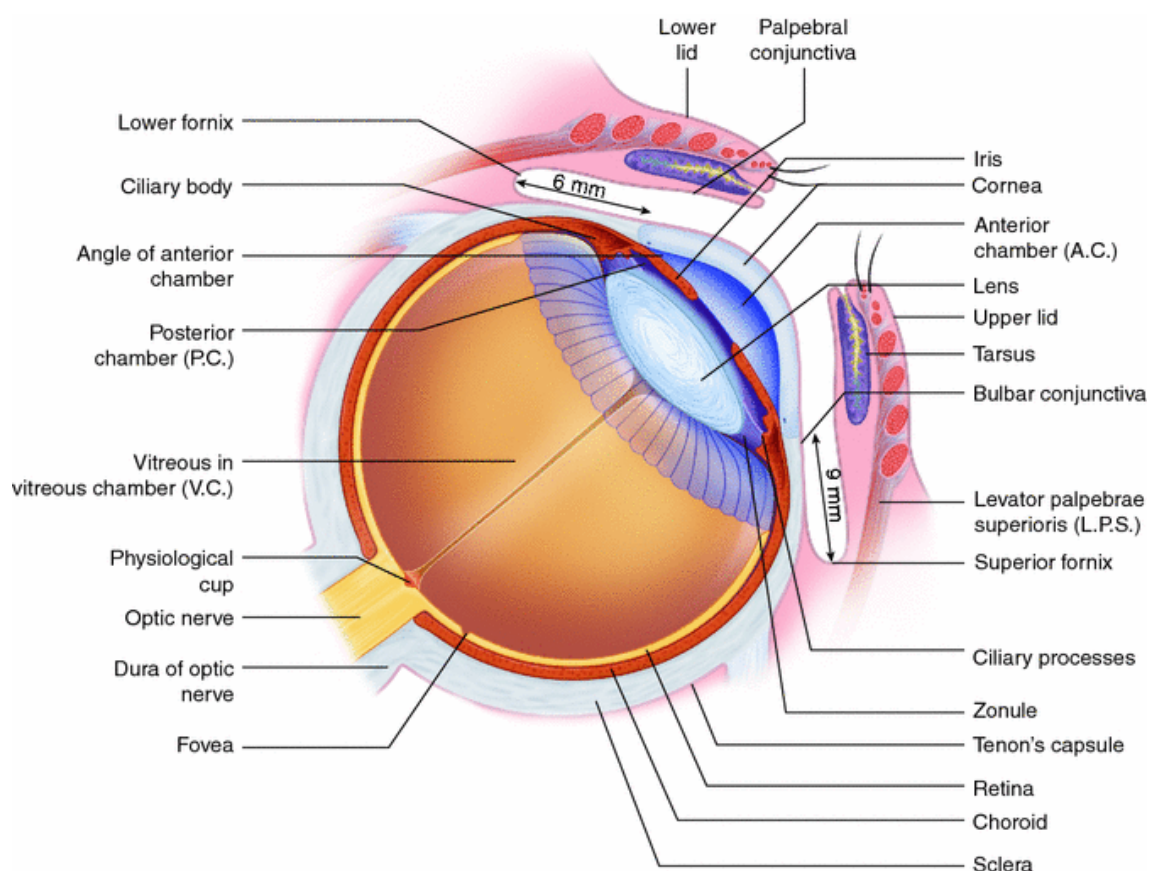
Suele decirse que el ojo es la ventana del cerebro (3), puesto que es el órgano encargado de transformar la energía lumínica ambiental en señales eléctricas que son enviadas al cerebro a través del nervio óptico para dar lugar al complejo sentido de la visión.

Al ojo se le denomina globo ocular (Figura 1.) por su forma esférica de aproximadamente 24 mm de diámetro anteroposterior en el humano adulto. Se trata de un órgano par, situado a ambos lados del plano sagital protegido por tejido adiposo, otros tejidos blandos y las paredes óseas que componen las órbitas oculares, donde además del propio globo ocular se alojan: el nervio óptico, los músculos oculares, la glándula lacrimal y los vasos sanguíneos.

El globo ocular está constituido por tres capas concéntricas que, de exterior a interior se conocen como:



- 1) *Túnica fibrosa o córneo-escleral*. Formada por la córnea y la esclera o esclerótica. Incluye también la conjuntiva, una membrana transparente y delgada que cubre la superficie interna de los párpados y la superficie anterior de la esclera.
- 2) *Túnica vascular o úvea*. Compuesta por el iris (anterior), el cuerpo ciliar (engrosamiento ubicado detrás del iris) y la coroides (posterior).
- 3) *Túnica nerviosa o retina*. Se extiende desde el punto de entrada del nervio óptico hasta la cara posterior del iris.



**Figura 1.** Sección horizontal del globo ocular (4)

Debe tenerse en cuenta que el ojo no se encuentra completamente incluido en la órbita ocular, ya que la córnea y las partes anteriores a su ecuador quedan por fuera de los límites del reborde de dicha órbita lo que hace que presente una vulnerabilidad ligeramente superior en la zona más externa (5). Las porciones del ojo visibles durante la abertura parpebral son: la córnea brillante en la parte central, el iris coloreado situado tras la córnea y una parte de la esclerótica en forma de triángulo blanco que se encuentra rodeando el iris.

La **córnea** es la primera y la más poderosa de las lentes del sistema óptico ocular (6) ya que es la responsable de las dos terceras partes de la potencia refractiva (de enfoque) del ojo. Se trata de un tejido transparente y avascularizado muy sensible, dado que es el tejido con mayor densidad de terminaciones nerviosas del cuerpo humano (7). Cubre aproximadamente el 15% de la superficie ocular y se encuentra rodeada por diferentes fluidos encargados, entre otras funciones, de su nutrición. Las lágrimas humedecen la córnea en su superficie más externa y el humor acuoso nutre este tejido en su cara posterior o endotelial (8). Además de su función como superficie refractiva, la córnea comparte con los párpados la función de escudo protector de las estructuras intraoculares frente al polvo, los gérmenes y otros agentes externos.

La **esclera** o **esclerótica** es un tejido rígido y fibroso que se extiende desde la córnea hasta el nervio óptico. Está formada por proteoglicanos embebidos en una matriz extracelular y fibras de colágeno aplanadas que discurren en varias direcciones, lo que junto a los distintos diámetros que presentan dichas fibras, hace que el tejido sea opaco (blanco) e irregular con un espesor máximo de aproximadamente 1 mm. Al tratarse de un tejido rígido, una de sus funciones principales es la de mantener la forma del ojo conteniendo la presión intraocular y protegiéndolo de posibles agresiones mecánicas.

Entre la esclera y la retina se encuentra la membrana conocida con el nombre de **coroides**. Se trata del segmento posterior de la úvea y está compuesta por diferentes capas de vasos sanguíneos cuya función principal es la de nutrir y suministrar oxígeno a la retina. Además, se encarga de absorber la luz directa impidiendo su reflexión y evitando la distorsión de la visión que en su ausencia se tornaría borrosa. Esto lo consigue gracias a su pigmentación parda, conferida por la presencia de melanina.

El **iris** es la membrana coloreada que se encuentra detrás de la córnea e inmediatamente delante del cristalino, delimitando así la cámara anterior y posterior del ojo. Presenta la forma de un disco con una abertura circular central, la pupila. Situado en el estroma del iris se encuentra el músculo esfínter rodeando la pupila y en la cara posterior del mismo, se encuentra el músculo dilatador de la pupila. Estos músculos serán los encargados de regular la entrada de luz en el ojo mediante la adecuación del tamaño de la pupila. El iris es el responsable de dar color a los ojos y su tonalidad depende de la cantidad de melanina presente en su borde anterior (9).

La base o raíz del iris se inserta sobre el **cuerpo ciliar**. Éste, presenta una estructura en forma de anillo, se encuentra entre la coroides y el iris y se divide a su vez en dos estructuras: el músculo ciliar y los procesos ciliares. El primero, es el encargado de

modificar la forma del cristalino con la finalidad de lograr una correcta acomodación del mismo y el enfoque de la visión desde todas las distancias. Los segundos son unas proyecciones digitiformes cortas que se encaminan hacia el cristalino. Éstas, se encuentran vascularizadas y son las encargadas de la producción del **humor acuoso**, que se trata de un líquido gelatinoso y transparente cuya composición es muy similar a la del plasma pero con supresión de casi todas las proteínas. Es secretado por el cuerpo ciliar no pigmentado en la cámara posterior del globo ocular desde donde sale hacia la cámara anterior pasando a través de la abertura pupilar entre el iris y el cristalino. Posteriormente, abandona la cámara anterior pasando a la red trabecular cercana hacia el conducto de Schlemm, que lleva hacia el sistema venoso. Este líquido se encarga del suministro de nutrientes y de la eliminación de los desechos metabólicos generados en la cámara anterior (córnea, iris y cristalino). Al mismo tiempo, contribuye al mantenimiento de la presión intraocular, la cual debe ser continua y necesariamente regulada para mantener las propiedades ópticas y de refracción (10).

El **cristalino** es una estructura transparente, biconvexa, flexible y avascular que se ubica en el segmento anterior del ojo, tras el humor acuoso y el iris y separando estos, del humor vítreo. Su función es la de desviar los rayos de luz para conseguir formar una imagen nítida sobre la retina con independencia de la distancia a la que se encuentre el objeto que desea verse (acomodación).

La **retina** se considera el órgano sensorial del globo ocular y constituye la capa más interna del ojo, situada entre la coroides y el cuerpo vítreo. Se trata de una estructura anatómicamente compleja formada por diez capas paralelas bien diferenciadas e íntimamente conectadas. Una de sus capas más externas (más cercana a la coroides) es la capa de células foto-receptoras, formada por conos y bastones. Ésta, es la encargada de transformar la energía lumínica que penetra a través de la pupila, pasando por el cristalino, en energía bioeléctrica. En las capas más intermedias se encuentran las células bipolares que transmiten la señal eléctrica hasta las células ganglionares situadas en las capas más internas de la retina y cuyas prolongaciones (axones) forman el nervio óptico.

A nivel macroscópico, en la retina pueden distinguirse estructuras tales como:

- a) *Papila*: Es el punto donde el nervio óptico entra en el globo ocular, atravesando la membrana esclerótica, las coroides y finalmente la retina. Se encuentra en la parte posterior del globo ocular y no presenta foto-receptores, por lo que se le denomina punto ciego.

- b) *Mácula*: Representa el punto más sensible de toda la retina, es decir, la zona de máxima visión. Se encarga de la visión fina, de los detalles.
- c) *Fóvea*: Es el centro de la visión, donde se enfocan los rayos de luz que llegan a la retina. Posee sólo conos y está rodeada de vasos sanguíneos, aunque en su centro no existen para aumentar al máximo la transparencia de la retina en este punto.

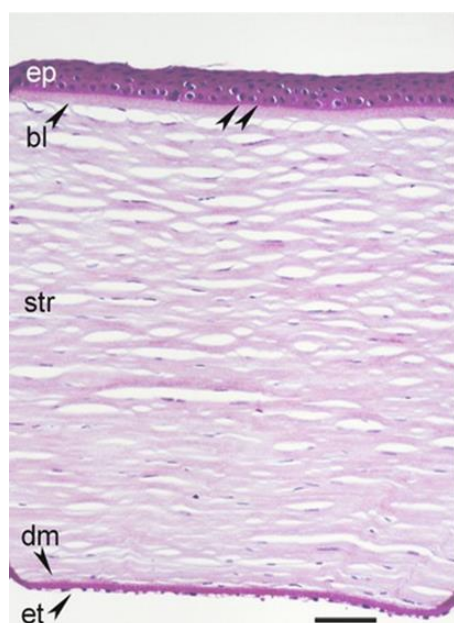
El **cuerpo vítreo** ocupa dos tercios del globo ocular. Está situado entre el cristalino y la retina en la cámara posterior del ojo y no contiene ni nervios ni vasos sanguíneos, por lo que se nutre de las estructuras más próximas (coroides, cuerpo ciliar y retina) (8). El cuerpo vítreo está formado por el que se conoce como **humor vítreo**, un líquido gelatinoso compuesto mayoritariamente por agua además de fibras de colágeno y ácido hialurónico cuya función principal es la de mantener la forma del ojo y contribuir a la obtención de una superficie de la retina uniforme, para que la recepción de imágenes sea nítida.

#### 1.1.1.1 Córnea

El tamaño promedio de la córnea humana es de 11-12 mm horizontalmente, 9-11 mm verticalmente y presenta aproximadamente 0.5 mm de grosor, el cual va aumentando gradualmente en su periferia (11). El radio promedio de curvatura de la superficie anterior de este tejido es de 7.8 mm, el de su superficie posterior es de 6.9 mm y

posee un poder de refracción de alrededor de 43 dioptrías, que supone el 70% del poder de refracción total del ojo (6).

Microscópicamente, la córnea consta de cinco capas: epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio (Figura 2.). Además de estas cinco capas, existen varias poblaciones de células dentro o alrededor de este tejido que incluyen células presentadoras de antígenos epiteliales y estromales, células madre epiteliales, vasos sanguíneos limbales y nervios corneales (12).



**Figura 2.** Capas de la córnea: epitelio (ep), membrana de Bowman (bl), estroma (str), membrana de Descemet (dm) y endotelio (et) (12).

El **epitelio** corneal es un epitelio estratificado compuesto por 5-7 capas de células. Las

capas más externas están formadas por células planas, bien diferenciadas, similares a las células epiteliales más superficiales de la piel pero sin estar queratinizadas y con proyecciones superficiales apicales (microvellosidades) que las anclan a la película lagrimal impidiendo que se sequen. Incluyen pequeñas células ligeras que han llegado recientemente a esa posición y a su vez, células más grandes, oscuras y superficiales que pronto serán desprendidas (13).

Las capas intermedias están formadas por células aladas o "*wing cells*" que están en proceso de diferenciación hacia células superficiales. La capa más interna está compuesta por una única fila de células columnares muy juntas conocidas como células basales que se originan desde células madre o "*stem cells*" situadas en la periferia del epitelio corneal. Cada célula basal se diferencia en dos células aladas que posteriormente se diferenciarán a células superficiales, dando lugar así al recambio celular del epitelio corneal que se desarrolla en el transcurso de 7-10 días (14).

Las células epiteliales forman una capa de espesor uniforme (50  $\mu\text{m}$ ) y de gran regularidad, debido a que están en contacto entre ellas mediante diferentes uniones, las cuales se describen a continuación:

- Uniones estrechas o "*Tight junctions*" que ponen en contacto células vecinas e impiden el paso de moléculas entre ellas.
- Uniones adherentes que ensamblan haces de actina entre células vecinas.
- Uniones "*gap*", que permiten el paso de iones y pequeñas moléculas solubles en agua.
- Desmosomas o uniones en las que la superficie de las células forman extensiones que encajan en indentaciones de células adyacentes.
- Hemidesmosomas, a través de los cuales las células basales se conectan con la membrana basal.

La membrana basal cuenta con aproximadamente 65 nm de espesor, separa el epitelio corneal de la **capa o membrana de Bowman**. Ésta, es una lámina de tejido acelular considerada en ocasiones una capa de estroma superficial modificado de unos 12  $\mu\text{m}$  de espesor, transparente, constituida por fibrillas de colágeno que discurren en su mayoría paralelas a su superficie. Se trata de una capa que no puede regenerarse tras una lesión, aun así, en su ausencia puede formarse un epitelio corneal normal.

La **sustancia propia o estroma** constituye el 90% del espesor corneal. Tiene un grosor aproximado de 500  $\mu\text{m}$  y está formado por fibras de colágeno, matriz

extracelular y queratocitos. El colágeno estromal está altamente organizado formando lamelas en red. Las fibras de colágeno en cada lamela discurren paralelas unas a otras lo que hace que, en una córnea que haya sido extirpada y colocada entre el pulgar y el índice, estas lamelas puedan separarse deslizándose una sobre otra sin ofrecer una resistencia apreciable. La matriz extracelular está fundamentalmente compuesta de colágeno y proteoglicanos cuya función es mantener unidas las fibras de colágeno entre sí. Los fibroblastos (queratocitos), son los encargados de fabricar el colágeno y los proteoglicanos estromales (15). Su forma es plana, de modo que ellos también se ubican paralelos a la superficie y sus extensiones se entrelazan entre sí mediante uniones de tipo “gap”.

En el año 2013 se describió la existencia de la que podría ser una nueva capa de la córnea humana denominada **capa de Dua** (16). Ésta, se encuentra situada entre el estroma y la membrana de Descemet, tiene un grosor de unos 15  $\mu\text{m}$  y resulta muy resistente e impermeable al aire.

La **membrana de Descemet**, también conocida como lámina elástica posterior, es considerada habitualmente como la membrana basal del endotelio y presenta un espesor aproximado de 10  $\mu\text{m}$ . Está compuesta principalmente por colágeno de tipo VIII y el producto de secreción de las células endoteliales.

El **endotelio** corneal, es una capa única de células hexagonales y escamosas que se encuentra adosada a la membrana de Descemet y cuya superficie interna está bañada por el humor acuoso. Presenta unos 5  $\mu\text{m}$  de espesor y su función principal es la de regular el fluido que entra a la córnea desde la cámara anterior. La edad predispone a la pérdida de la densidad endotelial que, en situaciones límite, puede causar la pérdida de transparencia corneal. Esto se debe a que cuando una de las células de esta capa muere, las vecinas rellenan el espacio modificando su tamaño (polimegatismo) y forma (pleomorfismo).

### 1.1.1.2 Esclerótica

La esclera se considera en realidad una esfera incompleta, puesto que termina anteriormente en el foramen anterior que rodea la córnea y posteriormente en el foramen escleral, que rodea el nervio óptico.

Una de las funciones clave de este tejido, además de la de ofrecer protección a las estructuras intraoculares, es la de determinar la forma y tamaño del ojo debido a su escasa distensibilidad (16). Sirve además, de punto de inserción para los músculos extra-oculares (rectos y oblicuos) encargados de la movilidad ocular. Su espesor varía

desde los 0.3 mm inmediatamente detrás de la inserción de los músculos rectos hasta 1 mm cerca del nervio óptico (17). Esta diferencia de grosores explica por qué, cuando hay un traumatismo, la rotura del globo ocular suele suceder en la inserción de los músculos rectos (4). Debe tenerse en consideración que en estos casos, la curación de heridas a nivel escleral es un proceso lento, que puede durar meses o incluso años y en el que puede distinguirse histológicamente la herida por el cambio abrupto en la orientación de las fibras de colágeno presentes en esa zona.

Bioquímicamente, la esclerótica está compuesta por haces de fibras de colágeno, predominantemente de tipo I, que suponen el 75% del peso seco de este tejido (17). Está formada también por fibras de elastina, proteoglicanos, glicoproteínas, fibroblastos y melanocitos en distintas proporciones, lo que hace que anatómicamente puedan distinguirse 3 capas conocidas como: epiesclera, estroma escleral o capa fibrosa y lámina fusca.

La **epiesclera** es la capa más superficial de la esclerótica. Se trata de una fina membrana en la que los haces de fibras de colágeno son delgados y se encuentran dispuestos de forma paralela a la superficie escleral. También están presentes fibroblastos de un tamaño superior a los que pueden encontrarse en otras capas y algunos melanocitos, además de los proteoglicanos y las glicoproteínas. Todo ello hace que se trate de un tejido laxo y elástico cuya función es la de facilitar el deslizamiento del globo ocular con sus estructuras vecinas. Además, la epiesclera sostiene las inserciones de los músculos rectos y la **cápsula de Tenon**; delgada membrana que recubre la esclerótica separándola del resto de las estructuras que se encuentran en el interior de la órbita ocular. Se encuentra bien irrigada, sobretodo en su parte más anterior donde está íntimamente relacionada con el tejido subconjuntival. Estos vasos sanguíneos derivan de las arterias ciliares anteriores y aunque generalmente se perciben de forma discreta, pueden ser prominentes cuando el tejido está inflamado.

En el **estroma escleral** los haces de fibras de colágeno son más cuantiosos, más gruesos que en la epiesclera y su disposición es más errática. Cerca del nervio óptico y de la córnea, la disposición de estos haces suele ser concéntrica y en algunos puntos concretos a lo largo del globo ocular, forman patrones que se repiten en bucle disponiéndose de forma meridional. Aun así y por norma general, dichos haces de fibras discurren de forma paralela a la superficie escleral. Este tipo de estructura es la responsable del color blanco y opaco característico de la esclerótica. También interfiere en la opacidad de este tejido, el contenido de agua del mismo. Éste suele ser

del 70% pero, si disminuye por debajo del 40% o incrementa por encima del 80%, la esclera se torna transparente (17).

La **lámina fusca** es la porción de la esclerótica adyacente a la úvea. Se trata de una capa donde los haces de fibras de colágeno se vuelven más pequeños e incrementa el número de fibras elásticas. Presenta una mayor cantidad de melanocitos que las demás capas, lo que le confiere cierta coloración parda. En esta capa existen unos surcos encargados de proporcionar el paso a los vasos sanguíneos y los nervios ciliares.

### 1.1.2 Permeación ocular de fármacos

Las células y los tejidos que forman parte del ojo deben estar estrictamente regulados para garantizar que éste, cumple con su cometido como órgano encargado de la visión. Para tal fin, el globo ocular cuenta con toda una serie de barreras herméticas encargadas de restringir la captación de fluidos y solutos, protegerlo y velar por el mantenimiento de sus funciones vitales (18). Como es de esperar, estas barreras son un impedimento para el acceso de los fármacos a su diana terapéutica y limitan significativamente su biodisponibilidad cuando éste es administrado vía tópica ocular. En realidad, existen multitud de factores que afectan a la biodisponibilidad de los fármacos administrados por esta vía, lo cuales pueden clasificarse en dos grandes grupos (19):

- a) Factores anatomofisiológicos propios de la vía ocular:
  - Parpadeo
  - Drenaje nasolacrimal
  - Anatomía corneal y estado del epitelio corneal
  - Vascularización de la conjuntiva y la esclerótica
  - Pequeña superficie de absorción disponible
  
- b) Factores fisicoquímicos y de formulación del fármaco:
  - Coeficiente de reparto
  - Propiedades fisicoquímicas del fármaco y del excipiente
  - pH y pKa
  - Tiempo de contacto
  - Agentes penetrantes (tensioactivos)
  - Tolerancia



Cuando una forma farmacéutica es instilada en el saco conjuntival se produce un incremento reflejo del parpadeo. Esto, conlleva un aumento en la velocidad de eliminación del fármaco de la superficie ocular, lo que disminuye el tiempo de contacto fármaco-tejido y perjudica su biodisponibilidad.

Por otra parte, el primer fluido con el que contacta el fármaco al ser instilado en el ojo es la **película lagrimal**, la cual está formada por tres capas: la capa más externa es de naturaleza lipídica y su finalidad es la de retrasar la evaporación de la lágrima; la capa intermedia es acuosa y contiene proteínas a las que el fármaco puede unirse disminuyendo así la cantidad efectiva del mismo en contacto con el resto de estructuras oculares; y la capa interna, que está formada por células calciformes del epitelio conjuntival y es rica en glicoproteínas. Asimismo, el volumen de la lágrima en un adulto es de alrededor de 9  $\mu\text{L}$  y la secreción lagrimal basal es de 1.2  $\mu\text{L}/\text{min}$ , mientras que el saco lagrimal tiene una capacidad de almacenamiento de 30  $\mu\text{L}$ . El volumen de una gota de una forma de dosificación convencional es de aproximadamente 50  $\mu\text{L}$ , por lo que después de la instilación del fármaco en el ojo el exceso de volumen es eliminado de la superficie ocular. A continuación, los nervios de la córnea inducen la formación de lágrimas reflejas incrementándose así el drenaje nasolacrimal y por tanto, la eliminación del fármaco del ojo. Además, la lágrima tiene una osmolalidad de alrededor de 310 mOsm/Kg y un pH de 7.3-7.7; con una capacidad amortiguadora muy limitada. En consecuencia, si la forma farmacéutica instilada provoca un desajuste en este pH, se produce una irritación que conlleva también un incremento de la producción de lágrima (19). El mecanismo de respuesta en el ojo es similar cuando se instilan fármacos con una osmolalidad inferior a 266 mOsm/kg o superior a 640 mOsm/kg (20). Por consiguiente, solo una pequeña porción del fármaco (< 5%) es susceptible de alcanzar su diana terapéutica (21).

Los fármacos penetran en el ojo a través de dos principales vías de acceso (Figura 3.):

**a) Vía trans-corneal:**

El epitelio corneal es la capa más externa de la córnea y además, la que ofrece mayor resistencia a la penetración de los fármacos, debido principalmente a la estrecha unión de las células entre sí. Se trata de una capa de naturaleza lipófila que contribuye en un 90% a la impermeabilidad de la córnea a las moléculas hidrófilas (18, 22). Los fármacos pueden atravesarla vía intracelular o vía paracelular (a través de poros), que es la que suelen utilizar los fármacos hidrófilos o los iones pequeños (< 350 MW). Debe tenerse en cuenta además, que los poros del epitelio corneal están cargados negativamente a pH fisiológico, lo que dificulta el paso de moléculas que presenten la

misma carga debido a fenómenos de repulsión (23). Al mismo tiempo, es importante el estado de la córnea del paciente ya que en multitud de patologías oculares el epitelio corneal está dañado, lo que suele conllevar un incremento en la penetración de los fármacos que se apliquen sobre el mismo.

El estroma sin embargo, es de naturaleza hidrófila y a pesar de ser la capa más gruesa de la córnea no ofrece tanta resistencia al paso de los fármacos como el epitelio. Si éstos presentan una lipofilia moderada, pueden difundir a través de él con relativa facilidad.

El endotelio en cambio, es una capa lipófila con uniones intercelulares más laxas que las del epitelio corneal, por lo que no supone un factor limitante del paso de las moléculas hidrófilas que hayan conseguido alcanzarlo. A pesar de ello, sí podría jugar un papel determinante en el paso de los fármacos lipófilos (24).

Se puede decir por tanto, que la capacidad de penetración de un fármaco a través de la córnea dependerá fundamentalmente de su coeficiente de reparto octanol/agua sin obviar su tamaño, su carga y su grado de ionización, que pueden resultar también factores limitantes del proceso.

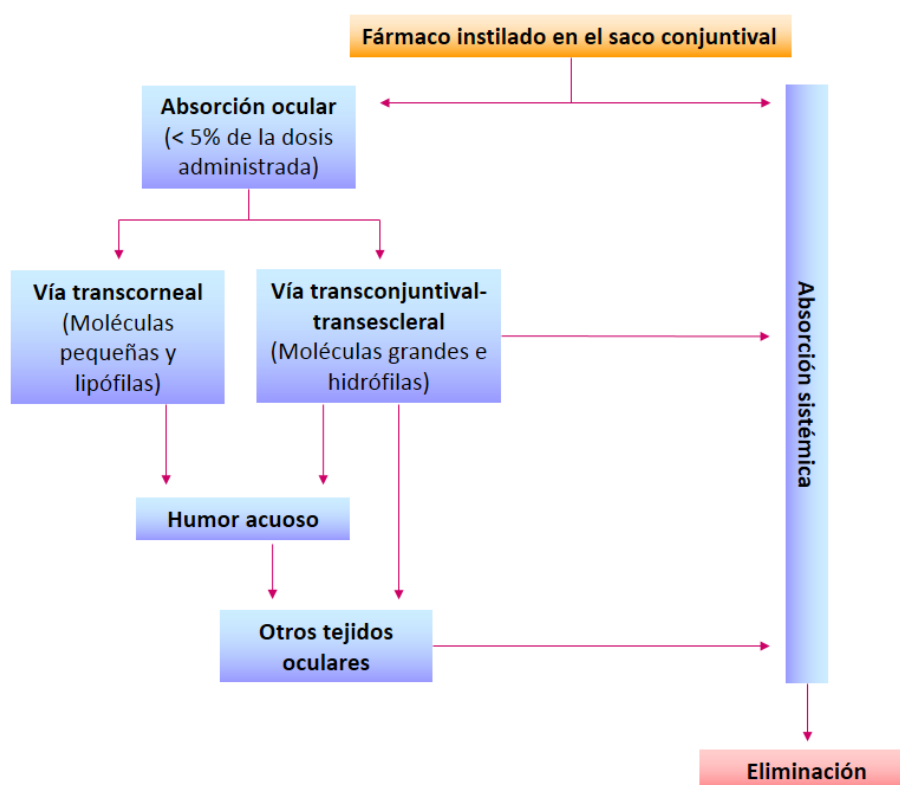
#### **b) Vía trans-conjuntival/trans-escleral**

Tiempo atrás se consideraba la vía trans-corneal como prácticamente la única ruta de acceso del fármaco a las estructuras oculares, asumiendo así la vía trans-conjuntival/trans-escleral como pérdidas del mismo hacia circulación sistémica. En los últimos años, distintos estudios han demostrado que esta ruta puede contribuir significativamente al incremento de los niveles intraoculares del fármaco, incluso cuando éste es administrado de forma tópica ocular (25).

La conjuntiva es una membrana mucosa formada por dos o tres capas de células y tejido conectivo vascularizado subyacente. Se encuentra cubriendo la superficie anterior de la esclerótica (conjuntiva bulbar) y se dobla en el fórnix para formar la conjuntiva parpebral, que recubre la superficie interna de los párpados. Una de sus principales funciones es la de contribuir en el mantenimiento de la película lagrimal mediante la producción de moco. Al igual que la córnea, presenta un epitelio (epitelio conjuntival) con uniones intercelulares estrechas, aun así, éstas resultan más holgadas que las del epitelio corneal y su densidad es 16 veces superior. En consecuencia, la conjuntiva resulta entre 15 y 25 veces más permeable a los fármacos que la córnea (23). Pueden por tanto absorberse por esta vía los fármacos de mayor peso molecular, gracias al mayor tamaño de los poros del epitelio conjuntival

comparado con los del epitelio corneal (26); y los fármacos hidrófilos, que presentan más dificultades para atravesar éste último.

Por otro lado, la esclerótica está formada fundamentalmente por haces de fibras de colágeno y mucopolisacáridos. Su contenido en agua es de aproximadamente el 70% de su peso y se trata de una estructura muy porosa, de manera que el mecanismo de permeación de los fármacos a través de la misma es la difusión pasiva mediante los tortuosos canalículos que forman sus fibras y moléculas. En este sentido, el principal factor limitante en la permeación trans-escleral de un fármaco es su tamaño (radio molecular), en detrimento de sus características de hidro e lipofilia. Es sabido que, cuanto mayor es el radio de la molécula, menor es su capacidad para atravesar este tejido (27). Incluso así, la esclera es capaz de permitir el paso de moléculas cuyo tamaño hace muy difícil la permeación a través de la córnea. Otro factor a tener en cuenta, precisamente por afectar significativamente al paso de fármacos a través de la esclerótica, es el grado de presión intraocular. Éste, afecta al estado de hidratación de la misma y a la organización de los haces de fibras de colágeno que la forman, modificándose así el diámetro de los poros por los que el fármaco puede atravesarla. Se ha demostrado que este diámetro suele disminuir con el incremento de la presión intraocular (28). Todo ello hace que la esclerótica, pueda resultar incluso 10 veces más permeable a algunos fármacos que la córnea (26).



**Figura 3.** Procesos de absorción, distribución y eliminación de los fármacos administrados vía tópica ocular.

## 1.2 Farmacoterapia antiinflamatoria ocular

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. Su finalidad es la de aislar y destruir el agente responsable de la misma y al mismo tiempo, reparar el tejido dañado.

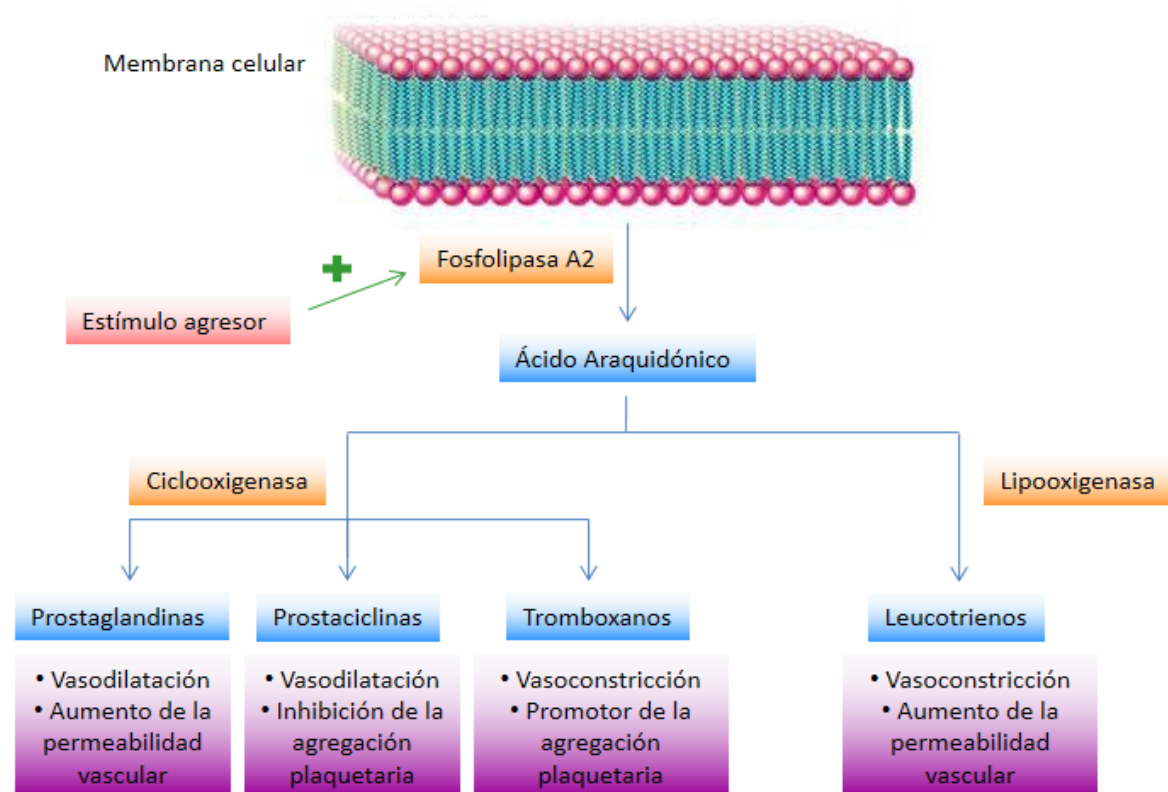
Los aspectos más básicos del proceso inflamatorio son:

- Focalización de la respuesta, que tiende a circunscribir la zona de lucha contra el agente agresor.
- Respuesta inflamatoria inmediata, de urgencia e inespecífica, aunque puede favorecer el desarrollo posterior de una respuesta específica.
- El foco inflamatorio atrae a las células inmunes de los tejidos cercanos y las alteraciones vasculares permiten la llegada, desde la sangre, de moléculas inmunes.

Este proceso de defensa suele implicar daño celular, ya sea por el propio agente agresor o por la respuesta fisiológica que genera. Ésto, resulta especialmente importante cuando se habla de una estructura tan delicada como el globo ocular debido a que la aparición de tejido cicatricial, el daño en estructuras de difícil recuperación o la cronificación del proceso inflamatorio, pueden comprometer la visión del paciente (29).

### 1.2.1 Mecanismo del proceso inflamatorio

Cuando una sustancia extraña como una bacteria, hongo, virus, célula metabólicamente alterada, antígeno, etc. o incluso un traumatismo atenta contra la membrana celular se produce un daño o una desestructuración en los fosfolípidos que la forman, lo que da lugar al incremento del calcio citosólico y la activación de la enzima fosfolipasa  $A_2$ . Esto provoca la liberación del ácido araquidónico (AA) que, en condiciones normales, se encuentra esterificado en la posición 2 de los fosfolípidos que conforman la bicapa lipídica. A partir del AA y por la acción de distintas enzimas como la ciclooxigenasa (COX) o la lipooxigenasa (LOX) se forman los mediadores más importantes del proceso inflamatorio, los eicosanoides. Se conoce que mediante la acción de la COX, se forma la prostaglandina  $H_2$  ( $PGH_2$ ) de la que derivan otras prostaglandinas, la prostaciclina ( $PGI_2$ ) y los tromboxanos. Por otro lado, mediante la acción catalítica de la LOX, se forman los leucotrienos, las lipoxinas y las hepoxilinas (Figura 4.) (30).



### + Activación

**Figura 4.** Mecanismo del proceso inflamatorio a nivel celular.

A nivel ocular, las acciones de las prostaglandinas (PGs) se manifiestan de tres formas. En primer lugar y en términos generales, producen un incremento de la presión intraocular (PIO) debido a la vasodilatación local que causan. En segundo lugar, causan miosis por su acción sobre el músculo liso del iris. Y en tercer lugar, incrementan la concentración de proteínas en el humor acuoso (31). Estos acontecimientos son los responsables del dolor, la hinchazón y la fotosensibilidad que experimentan los pacientes ante la inflamación ocular.

### 1.2.2 Mecanismo de acción de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Durante mucho tiempo los corticoides han sido los fármacos más utilizados en el tratamiento de los procesos inflamatorios que acontecen a nivel ocular, incluyendo la inflamación post-operatoria. Se trata de un tipo de antiinflamatorio cuyo mecanismo de basa en su capacidad para inhibir la acción de la enzima Fosfolipasa A<sub>2</sub> impidiendo la transformación de los fosfolípidos de membrana en AA y evitando así, la síntesis de los mediadores de la inflamación. A pesar de tratarse de fármacos efectivos en el

tratamiento de los síntomas del proceso inflamatorio, se ha descubierto que su uso prolongado es responsable de toda una serie de efectos adversos que incluyen: el incremento de la PIO, la formación de cataratas y la menor resistencia a la aparición de infecciones (32). Debido a ello, el uso de los AINEs se encuentra en alza al considerarse éstos una alternativa segura y eficaz frente al uso de corticoides en el tratamiento de trastornos inflamatorios que acontecen a nivel ocular.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) engloban un grupo químicamente heterogéneo de fármacos que tienen en común el presentar una potente acción inhibidora de la enzima COX. Se trata de una enzima dimérica de la cual existen dos isoformas principales: COX-1 y COX-2. La estructura proteica de ambas enzimas es similar presentando una homología superior al 90% (33). La COX-1 es constitutiva, se expresa en la mayoría de los tejidos, incluidas las plaquetas sanguíneas y está implicada en la homeostasis tisular. Su estructura presenta dos dominios, el que se une a las membranas está constituido por cuatro hélices que forman un canal que permite la entrada del ácido araquidónico de la membrana al lugar con actividad enzimática. En esta región hay dos lugares activos, uno que cataliza la ciclooxygenación que da lugar a la prostaglandina  $E_2$  y otro encargado de la peroxidación que convierte la prostaglandina  $G_2$  en  $PGH_2$ . Para inhibir esta enzima, los AINEs entran en el canal hidrófobo y forman enlaces de hidrógeno con el residuo de arginina de la posición 120, lo que impide el acceso de los ácidos grasos que actúan como sustrato en el dominio catalítico. La COX-2 sin embargo, es inducida por las células inflamatorias al activarse (34). Una de las diferencias más notables entre la COX-1 y la COX-2 es que su sitio de unión para el ácido araquidónico es diferente. La COX-2 presenta un canal más amplio, que le permite el acceso a AINEs de gran tamaño que no penetrarían en el canal de la COX-1.

Todos los AINEs poseen un cociente de inhibición COX-1/COX-2 específico que generalmente se expresa como la concentración del fármaco capaz de inhibir la actividad del enzima al 50%. Según este cociente, estos fármacos pueden clasificarse en tres grandes grupos (35):

- Inhibidores no selectivos de la COX, son los que presentan un cociente bajo
- Inhibidores COX-2 preferenciales, son los que presentan un cociente intermedio
- Inhibidores selectivos de la COX-2, son los que tienen un cociente alto.

En general la inhibición de la COX-1 es instantánea y reversible por competitividad mientras que, la inhibición de la COX-2 es dependiente del tiempo.

Los AINEs más comúnmente utilizados en oftalmología son los derivados del ácido salicílico (Aspirina<sup>®</sup>), del ácido indolacético (Indometacina), del ácido arilacético (Diclofenaco, Ketorolaco, Nepafenaco), del ácido arilpropiónico (Ibuprofeno, Flurbiprofeno, Ketoprofeno, Naproxeno, Pranoprofeno) y del ácido enólico (Piroxicam). Aun así, su uso en oftalmología es bastante limitado debido a que suelen ser poco solubles en agua. Además, se trata de ácidos débiles que se ionizan transformándose en aniones al pH del líquido lagrimal, lo que no favorece su absorción a través de los tejidos oculares. Asimismo no dejan de ser ácidos, lo que los hace inherentemente irritantes a nivel ocular.

### 1.2.3 Pranoprofeno

Químicamente se trata de un fármaco racémico conocido como (2RS)-2-(10H-9-Oxa-1-aza-antraceno-6-il) ácido propiónico, (CAS 52549-17-4) (Figura 5.). Forma parte de los antiinflamatorios derivados del ácido arilpropiónico, tiene un peso molecular de 255.27 g/mol y se presenta como un polvo blanco, fino e inodoro. A pesar de ser libremente soluble en N,N dimetilformamida, soluble en anhídrido acético y también en metanol, es muy poco soluble en agua (36).

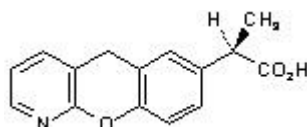


Figura 5. Estructura química del pranoprofeno.

El pranoprofeno (PF) es un AINE que ha sido empleado en multitud de trastornos que cursan con un componente doloroso e inflamatorio, como la artritis reumatoide o la osteoartritis (37), aunque tradicionalmente su uso se ha centrado en el campo de la oftalmología. A pesar de que actualmente no se encuentra comercializado en España, sí lo está en Japón bajo el nombre comercial de Niflan<sup>®</sup> o en Italia, Portugal, Hungría y Emiratos Árabes como Oftalar<sup>®</sup>.

Al tratarse de un fármaco con efecto antiinflamatorio y analgésico (38), resulta eficaz en el tratamiento del dolor post-operatorio en cirugías del segmento anterior del ojo, como la de cataratas o el estrabismo (39-43). No obstante, también es de gran ayuda en el manejo de patologías inflamatorias del segmento posterior, como la uveítis o el edema macular cistoide (44). Además, ha demostrado tener un efecto beneficioso sobre los signos y síntomas del ojo seco y la conjuntivitis crónica de origen no bacteriano (45, 46).

A pesar de que el PF ha demostrado su eficacia como antiinflamatorio y analgésico ocular, su uso farmacéutico ha sido limitado debido a su inadecuado perfil biofarmacéutico, ya que se trata de un principio activo con una semivida plasmática corta, poco soluble en agua e inestable en solución acuosa, particularmente cuando se expone a la luz (47, 48).

### **1.3 Sistemas de liberación controlada de fármacos para administración ocular**

La biodisponibilidad de los fármacos administrados por vía tópica ocular en las formas farmacéuticas clásicas, como los colirios o los ungüentos oftálmicos, se ve comprometida tanto por la naturaleza del principio activo y de la forma farmacéutica, como por las características anatomofisiológicas del ojo. Se ha recurrido a multitud de estrategias con la finalidad de favorecer la biodisponibilidad ocular de los fármacos. En un inicio se pensó que incrementando la cantidad de fármaco en la formulación podrían solucionarse, si no todos, algunos de los impedimentos interpuestos por la vía de administración escogida. Tecnológicamente hablando, esto no resulta siempre posible, además de que puede suponer la aparición de efectos adversos o agravar los que de por sí pueden darse. De ahí, que se haya optado por el uso de otro tipo de formas farmacéuticas, como son los sistemas de liberación controlada de fármacos. Se trata en este caso de sistemas en los que, mediante la intervención de la tecnología farmacéutica, se modifica la interacción del principio activo con el medio que lo rodea para controlar así el momento, la duración y la magnitud de su acción (49).

Si bien es cierto que existe una gran variedad de este tipo de sistemas, los nanoestructurados han sido los más populares de los últimos años. De entre ellos, los más destacados son las nanopartículas, los liposomas y las nanoemulsiones.

#### **1.3.1 Nanopartículas poliméricas**

Las nanopartículas poliméricas (NPs) son sistemas coloidales no tóxicos, biodegradables, con un tamaño de partícula entre 10 y 1000 nm (50). En función de su estructura pueden clasificarse en nanoesferas (NEs) o nanocápsulas (NCs). Las NEs están formadas por una matriz polimérica que puede incluir el fármaco de tres formas distintas: encapsulándolo en su parte más interna, adsorbiéndolo en su superficie o dispersándolo de forma homogénea en la propia red polimérica. A diferencia de éstas, en las NCs el fármaco se encuentra disuelto en su núcleo y recubierto por la matriz polimérica (51).



Se trata de sistemas de especial relevancia en la vehiculización de principios activos debido a la multitud de ventajas que ofrecen, algunas de las cuales son (52):

- Protección del fármaco frente a procesos de degradación, lo que incrementa su estabilidad y su semivida disminuyendo su toxicidad. Esto resulta especialmente importante para aquellos fármacos que son lipófilos o poco solubles en agua al permitirse así su vehiculización. Además, permite reducir la dosis y/o la frecuencia de administración del preparado, incrementando la comodidad de seguimiento de la pauta posológica por parte del paciente.
- Biocompatibilidad y biodegradabilidad de la forma farmacéutica.
- “*Targeting*” o direccionamiento del principio activo hacia su diana terapéutica.
- Capacidad de penetración en microcapilares, compartimentos intracelulares o de atravesar barreras gracias a su tamaño.
- Control de la velocidad de liberación del principio activo.

#### 1.3.1.1 Métodos de preparación y caracterización de nanopartículas

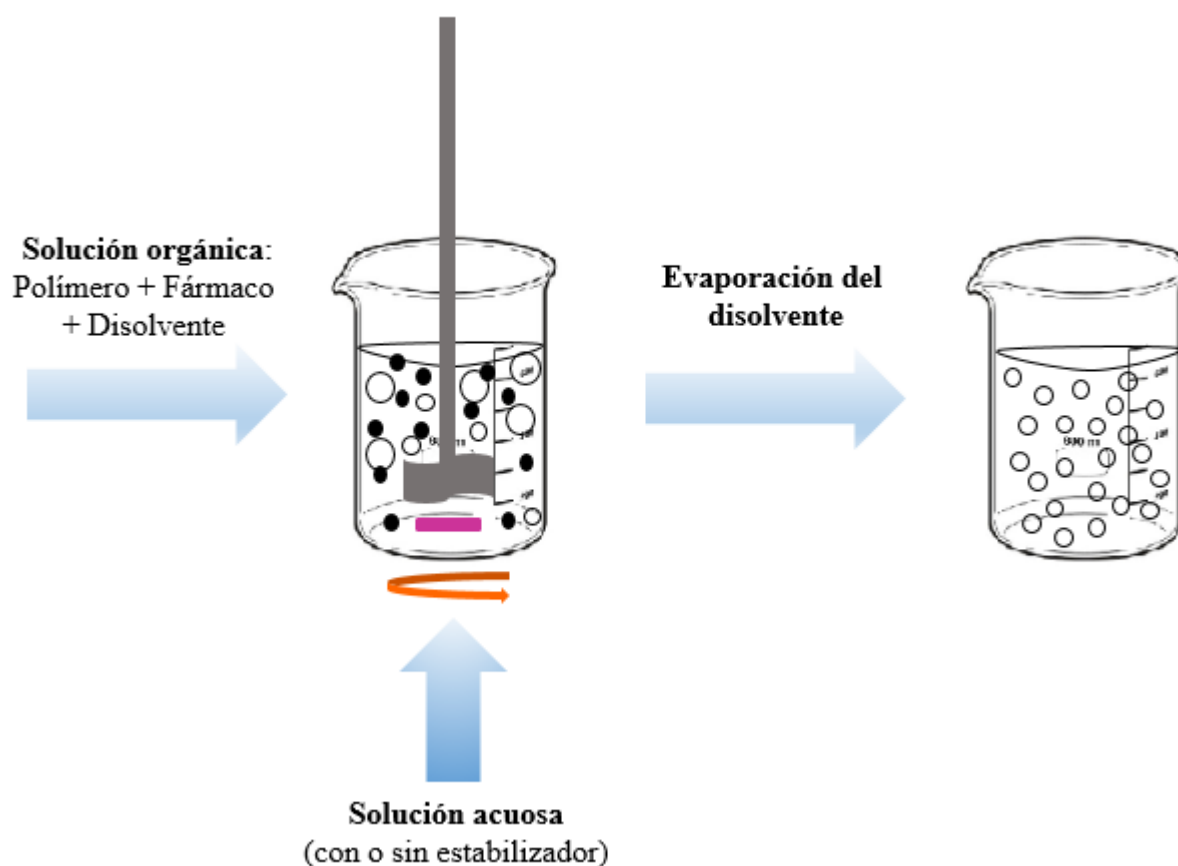
Existen una gran variedad de técnicas para la preparación de las NPs (Tabla 1.). La elección de un método u otro se lleva a cabo en función de factores como el tipo de sistema polimérico que se desea, el área de aplicación, el tamaño de NPs requerido, etc. Lo mismo sucede con la elección del polímero, que además está sujeta al método de preparación. Todo ello, determinará las características fisicoquímicas de la forma farmacéutica, de las cuales dependerá entre otros factores, el perfil de liberación del fármaco. En este sentido, debe tenerse en consideración que los tamaños de partícula expuestos en la Tabla 1. son aproximados, ya que no dependen exclusivamente del polímero escogido, también lo hacen de las condiciones de preparación y del resto de componentes que intervienen en cada método de elaboración.

Los polímeros más empleados en la preparación de NPs son los poliésteres sintéticos y biodegradables como pueden ser el ácido poliláctico (PLA) y el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) (53). Concretamente el PLGA, es ampliamente usado en tecnología farmacéutica, ya que cuenta con la aprobación de la FDA para su uso en humanos. Además, su degradación a monómeros biocompatibles de ácido glicólico y ácido láctico es fácilmente controlable (54). La relación molar entre estos monómeros determinará la resistencia mecánica del polímero, el hinchamiento de la matriz, la hidrólisis, la velocidad de degradación, el peso molecular, el grado de cristalinidad y la temperatura de transición del PLGA. Esto resulta determinante a la hora de establecer el perfil de liberación del fármaco desde la matriz polimérica.

**Tabla 1.** Métodos de preparación de NPs, polímeros que pueden ser utilizados en cada método y tamaño de NP conseguido en función de ello (55).

Método de preparación	Polímero	Tamaño aproximado de las NPs (nm)	
<b>Evaporación del disolvente</b>	POP	200	
	PLGA	60 - 200	
	PLA	200	
	PEG-PLA	200	
	mPEO-PLA	270	
	PEO-mPAE	100 - 150	
	Ps	300	
	Ps-copolímero	300	
<b>Salting-out</b>	PDLLA	100 - 400	
	PEO	280	
	PLGA	100 - 480	
	EUDRAGIT	170 - 500	
	PTMC	180 - 250	
	PEO-PLGA	190	
	PMA	100 - 250	
<b>Nanoprecipitación o desplazamiento del disolvente</b>	PLGA	60 - 560	
	PBCA	270	
	Ester alílico	270	
	PHB	100 - 125	
	Ester dextrano	77	
	PCL diol	17	
	EUDRAGIT L 100-55	120	
	PCL	270 - 925	
	PCA	150	
	PLA	100 - 300	
<b>Diálisis</b>	PBG-PEO	250 - 360	
	PA-CMPEG	195	
	PDLLA-P(NIPAM-MAA)	85 - 340	
	PDLLA	320	
	DexEst	87	
	TosDex	345 - 500	
	PA	50 - 130	
	mPEG-PLGA	43	
	PLAF	347	
	PLA-TPGS	330	
	PCL-PVA	360	
	PLGF	285	
	PLGA	630 - 730	
	PHB	55	
	PMMA	200	
<b>Tecnología de fluido supercrítico:</b>			
	<b>a) RESS</b>	a) PSFTE	50 - 500
		PLLA	30 - 100
<b>b) RESOLV</b>	b) PHDFDA	< 50	

Una de las técnicas más utilizadas por su sencillez, rapidez y reproducibilidad es la **nanoprecipitación o método de preparación por desplazamiento del disolvente** (Figura 6.), desarrollado por Fessi en 1989 (56). En esta técnica el polímero y el fármaco se disuelven conjuntamente en un solvente orgánico de polaridad intermedia y miscible en agua que resulte fácil de evaporar, típicamente la acetona. Esta solución se adiciona gota a gota y bajo agitación magnética sobre una solución acuosa en presencia o ausencia de un estabilizante (polivinil alcohol o poloxamer). Una vez en contacto con el agua, el polímero y el fármaco precipitan instantáneamente autoensamblándose. Posteriormente, el disolvente se elimina a presión reducida. La formación instantánea de las partículas es atribuida a las turbulencias interfaciales generadas entre las fases líquidas durante el desplazamiento del disolvente (57). En esta técnica resulta de vital importancia controlar las condiciones de adición de la fase orgánica a la fase acuosa (velocidad a la que se realiza, velocidad de la agitación, método de adición, etc.) puesto que serán las que determinen las propiedades fisicoquímicas de las NPs resultantes.



**Figura 6.** Preparación de nanopartículas por el método del desplazamiento del disolvente

En términos generales, se conoce que cuando un principio activo se encuentra formando parte de una matriz polimérica presenta un perfil de liberación bifásico. En éste, inicialmente el fármaco depositado en la superficie de la matriz se libera en función de su solubilidad. Seguidamente, el agua penetra en la matriz polimérica induciendo la degradación del polímero y generando toda una serie de poros a través de los cuales es liberado el fármaco (58). En este sentido, el perfil de liberación del fármaco desde las NPs se ve seriamente influenciado por las características fisicoquímicas de éstas, de ahí, la necesidad de caracterizar fisicoquímicamente estos sistemas nanoestructurados. La Tabla 2. muestra los parámetros de dicha caracterización y algunas de las técnicas que pueden utilizarse para medirlos.

**Tabla 2.** Técnicas más utilizadas para la caracterización de las NPs

Parámetro	Técnica
Tamaño de partícula y caracterización morfológica	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)
	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)
	Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM)
	Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)
	Espectroscopía de Correlación Fotónica (PCS)
Eficiencia de encapsulación	Espectrofotometría ultravioleta
	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)
	Cromatografía líquida de Alta Eficacia (HPLC)
Carga superficial	Electroforesis
	Anemometría laser doopler
Interacción fármaco-polímero	Difractometría de rayos X (XRD)
	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)
Análisis elemental	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (H-NMR)
	Espectrofotometría Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR)

#### 1.4 Validación bioanalítica

Cuando la industria farmacéutica se propone comercializar un nuevo fármaco en España, debe presentar una solicitud de autorización de comercialización a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) o a la Agencia Europea de Medicamentos (EMA). En Estados Unidos, de esto se encarga la *Food and Drug Administration* (FDA). En cualquier caso, dicha autorización se concede cuando el fármaco en cuestión cumple los requisitos de calidad, seguridad y eficacia

establecidos por estos organismos. Aun así, queda sometido a una supervisión constante en cuanto a la aparición de efectos adversos y nuevos usos, pudiéndose revisar el permiso concedido en cualquier momento.

Con el propósito de armonizar las pruebas llevadas a cabo durante la investigación y desarrollo de nuevos fármacos en Europa, Japón y Estados Unidos nació la Conferencia Internacional sobre Armonización de requisitos técnicos para el registro de fármacos y productos farmacéuticos de uso humano (ICH). Se trata de un proyecto de reunión de las autoridades reguladoras de medicamentos de estos países en el que se establecen una serie de normas o directrices en forma de guía (*“Guidelines”*). La finalidad de estas guías es reducir o evitar la necesidad de duplicar pruebas durante la investigación y desarrollo de medicamentos, y recomendar formas de lograr una mayor armonización en la interpretación y aplicación de las directrices técnicas y requisitos para obtener los registros de dichos medicamentos. Las directrices establecidas por las ICH se han establecido como ley en algunos países y son utilizadas como guías por la FDA.

Durante las fases preclínicas del desarrollo de un medicamento, se llevan a cabo toda una serie de ensayos con el propósito de conocer sus características fisicoquímicas, su farmacocinética, su toxicocinética, su biodisponibilidad, la dosis a administrar, etc. Teniendo en cuenta que los resultados de estos estudios se utilizarán en la toma de decisiones críticas que respalden la seguridad y la eficacia del medicamento en cuestión, resulta primordial que los métodos utilizados estén bien caracterizados, sean fiables y reproducibles. Es decir, estén validados.

La FDA define la validación de un método analítico como el proceso mediante el cual se demuestra o confirma que el método empleado es adecuado para su propósito previsto (59). Por otro lado, la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) ofrece una definición más analítica del término. Ésta, define la validación como el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos (60).

En la validación de un método de análisis deben realizarse una colección de ensayos cuantitativos y cualitativos que demuestren la exactitud, precisión, sensibilidad, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango y robustez de la técnica o técnicas utilizadas. De esta manera, se demuestra que los resultados obtenidos son significativos y apropiados para la toma de decisiones.

En el marco del desarrollo de un medicamento del que se espera que se apruebe su comercialización, los ensayos realizados deben cumplir las premisas ofrecidas por las guías ICH Q2 (61). Por otro lado, cuando dichos estudios implican mediciones en tejidos o fluidos biológicos (sangre, sudor, saliva, orina, etc.), pasan a documentarse sus resultados en términos de bioanálisis. En ese caso, debe seguirse la guía sobre validación de métodos bioanalíticos (62) (*“Guideline on bioanalytical method validation”*) aprobada por el Comité de Medicamentos para uso Humano (CHMP) de la EMA en 2011. Este tipo de validaciones son más complejas que las validaciones analíticas convencionales debido a que, de la implicación de muestras biológicas en los ensayos, suelen derivarse interferencias o nuevas lecturas que ratifican la necesidad de que los métodos de detección y cuantificación del analito sean lo suficientemente sensibles y selectivos. Asimismo, debe llevarse a cabo una cantidad superior de análisis y se trabaja con un mayor volumen de muestras que a su vez, requieren de unas condiciones especiales de manejo y conservación las cuales deben cumplirse y documentarse.



## **2. OBJETIVOS**

---





Uno de los sistemas coloidales más estudiados en las últimas décadas son las NPs diseñadas con una matriz de PLGA. Ello se debe a que estos sistemas permiten mejorar el perfil biofarmacéutico del fármaco encapsulado reduciendo su toxicidad e incrementando su biodisponibilidad a través de las diferentes barreras biológicas, lo que conduce a la necesidad de tener un método de análisis validado que permita cuantificar e identificar de manera inequívoca el principio activo capaz de atravesar dichas membranas biológicas y/o de quedar retenido en ellas.

El PF fue el fármaco escogido en esta investigación debido a que posee una alta eficacia analgésica y antiinflamatoria, pero su uso farmacéutico se ha visto limitado por su inadecuado perfil biofarmacéutico. Debido a lo cual, el principal objetivo de este trabajo de investigación ha sido la caracterización *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de NPs poliméricas optimizadas cargadas con PF, como una estrategia innovadora para la prevención y tratamiento del dolor e inflamación de la vía ocular. Asimismo, este trabajo ha tenido como propósito la validación de una metodología bioanalítica que permita cuantificar el PF proveniente de análisis en los que se han visto implicadas diferentes membranas oculares. Como consecuencia, la presente investigación se ha desglosado en los siguientes objetivos:

1. Preparar dos formulaciones previamente optimizadas y diseñadas con una matriz polimérica conteniendo PF (PF-F1NPs y PF-F2NPs) por el método de desplazamiento del disolvente.
2. Caracterizar morfológica y fisicoquímicamente las formulaciones optimizadas.
3. Evaluar *in vitro* la posible citotoxicidad de las NPs optimizadas cargadas con PF.
4. Desarrollar y validar un método bioanalítico de referencia para la cuantificación de PF en muestras provenientes de ensayos *ex vivo* de permeación ocular.
5. Estudiar *ex vivo* el perfil y parámetros de permeación trans-corneal de los sistemas nanoestructurados conteniendo PF.
6. Estudiar *in vivo* la eficacia antiinflamatoria de los sistemas coloidales conteniendo PF.
7. Evaluar *in vivo* la tolerancia ocular de las formulaciones PF-NPs optimizadas.



### **3. RESULTADOS**

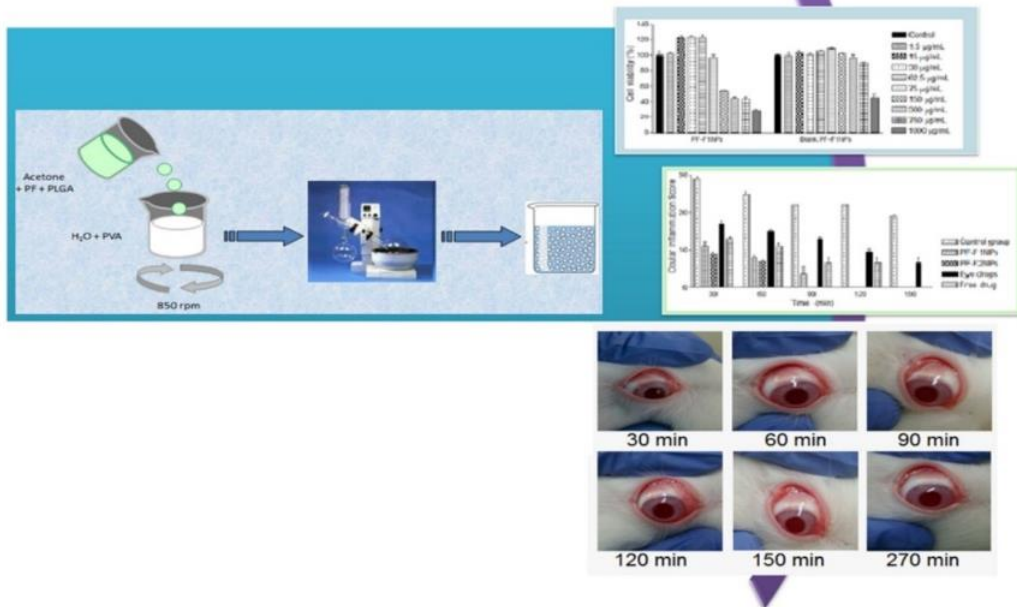
---



*“In vitro, ex vivo and in vivo characterization of PLGA nanoparticles loading pranoprofen for ocular administration”*

Cristina Cañadas, Helen Alvarado, Ana C. Calpena, Amélia M. Silva, Eliana B. Souto, María L. García, Guadalupe Abrego

*International Journal of Pharmaceutics, 511 (2016) 719-727*





### 3.1 *In vitro*, *ex vivo* and *in vivo* characterization of PLGA nanoparticles loading pranoprofen for ocular administration (Artículo I)

#### RESUMEN

En estudios previos al presente trabajo de investigación se prepararon una serie de NPs conteniendo PF como principio activo con distintas concentraciones de PLGA y PVA y a distintos valores de pH utilizando la técnica de desplazamiento del disolvente. Dichas NPs fueron optimizadas mediante un diseño factorial  $2^4$  central compuesto a partir del cual se seleccionaron dos formulaciones (PF-F1NPs y PF-F2NPs) consideradas óptimas para llevar a cabo estudios adicionales. En el presente trabajo, las formulaciones PF-F1NPs y PF-F2NPs fueron preparadas y caracterizadas físicoquímica y morfológicamente a través de la medida de su tamaño medio de partícula (TMP), su índice de polidispersión (IP), su potencial Z (ZP), la eficiencia de encapsulación (EE%) y las imágenes tomadas mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM). Las formulaciones PF-NPs presentaron un TMP de alrededor de 350 nm, adecuado para instilación ocular; su IP resultó inferior a 0.1, evidenciando que se trataba de sistemas monodispersos; las formulaciones PF-F1NPs y PF-F2NPs resultaron cargadas negativamente con valores de -7.41 mV y de -8.5 mV respectivamente, lo que aseguró su estabilidad; su eficiencia de encapsulación fue del 80%.

Una vez preparadas y caracterizadas, las formulaciones PF-NPs se utilizaron para llevar a cabo ensayos *in vitro* de citotoxicidad en la línea celular Y-79 de retinoblastoma humano. En dichos estudios se midió la viabilidad de las células Y-79 tras la aplicación de las formulaciones PF-NPs, las mismas formulaciones pero sin fármaco (NPs blancas) y de una solución de fármaco libre disuelto en tampón fosfato (PBS) a una concentración de 1.5 mg/mL. Los resultados obtenidos en este ensayo evidenciaron que concentraciones de 75 µg/mL para la formulación PF-F1NPs y de 100 µg/mL para la formulación PF-F2NPs no mostraron toxicidad sobre las células Y-79. Sin embargo, concentraciones de 150 µg/mL para la formulación PF-F1NPs y de 200 µg/mL para la formulación PF-F2NPs, evidenciaron una viabilidad celular cercana al 20%. En la concentración más alta ensayada para las NPs blancas, la viabilidad celular se encontró por debajo del 70%. En el caso del fármaco libre la citotoxicidad no se hizo evidente hasta una concentración de 750 µg/mL.

Se estudió el perfil y parámetros de permeación *ex vivo* en córnea de conejo (*New Zealand*) para las formulaciones PF-NPs, la referencia comercial (Oftalar<sup>®</sup>, PF 1 mg/mL) y para una solución de fármaco libre en PBS a la misma concentración. Los



resultados de dicho ensayo demostraron que la formulación PF-F2NPs fue la que alcanzó el estado de equilibrio estacionario en menor tiempo, exhibiendo el  $T_L$  más bajo. Además, fue la formulación que permitió el paso de una mayor cantidad de PF a través de la córnea. Asimismo, las formulaciones PF-NPs fueron las que exhibieron los valores más altos de fármaco retenido en la córnea en comparación con el Oftalar<sup>®</sup> y la solución de PF libre en PBS.

Finalmente, se llevaron a cabo ensayos *in vivo* de tolerancia ocular y eficacia antiinflamatoria. Los resultados de estos estudios evidenciaron que las formulaciones PF-NPs reducen significativamente el edema ocular en comparación con el Oftalar<sup>®</sup> y la solución de fármaco libre en PBS, además de mostrar una tolerancia ocular óptima tras su instilación.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijpharm](http://www.elsevier.com/locate/ijpharm)

## *In vitro*, *ex vivo* and *in vivo* characterization of PLGA nanoparticles loading pranoprofen for ocular administration



Cristina Cañadas<sup>a</sup>, Helen Alvarado<sup>a,b</sup>, Ana C. Calpena<sup>a</sup>, Amélia M. Silva<sup>c,d</sup>,  
Eliana B. Souto<sup>e,f,\*</sup>, Maria L. García<sup>b</sup>, Guadalupe Abrego<sup>g</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Biopharmaceutical and Pharmacokinetic Unit, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Department of Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Department of Biology and Environment, University Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal

<sup>d</sup> Centre for the Research and Technology and Agro-Environmental and Biological Sciences, University Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal

<sup>e</sup> Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Pólo das Ciências da Saúde, Coimbra, Portugal

<sup>f</sup> REQUIMTE/LAQV, Group of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>g</sup> Department of Chemical and Instrumental Analysis, Faculty of Chemistry and Pharmacy, University of El Salvador, Ciudad Universitaria, San Salvador, El Salvador

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 June 2016

Received in revised form 21 July 2016

Accepted 24 July 2016

Available online 30 July 2016

#### Keywords:

Pranoprofen

Nanoparticles

Poly (lactic/glycolic) acid (PLGA)

Anti-inflammatory efficacy

Cytotoxicity cell

Corneal permeation

### ABSTRACT

Pranoprofen (PF) is a NSAID considered as a safe anti-inflammatory treatment for strabismus and/or cataract surgery. The drug has been formulated in poly (lactic/glycolic) acid (PLGA) nanoparticles (PF-F1NPs with cPF 1.5 mg/mL, PF-F2NPs with cPF 1 mg/mL) produced by solvent displacement technique and tested the *in vitro* cytotoxicity, *ex vivo* corneal permeation, *in vivo* ocular tolerance and *in vivo* anti-inflammatory efficacy of PF-F1NPs, PF-F2NPs, in comparison to eye drops conventional dosage form (Oftalar<sup>®</sup>, PF 1 mg/mL) and free drug solution (PF dissolved in PBS, 1.5 mg/mL). The mean particle size of both formulations was around 350 nm, with polydispersity index below 0.1, and a net negative charge of  $-7.41$  mV and  $-8.5$  mV for PF-F1NPs and PF-F2NPs, respectively. Y-79 human retinoblastoma cell line was used to evaluate the cytotoxicity of PF-F1NPs and PF-F2NPs, which were compared to blank NPs and free drug solution (PF dissolved in PBS, 1.5 mg/mL). Concentrations up to  $75$   $\mu$ g/mL exhibited no toxicity to Y-79 cells, whereas at  $150$   $\mu$ g/mL a decrease of about 80% on the cell viability was observed after exposing the cells to PF-F1NPs. When treating the Y-79 cells with concentrations of PF-F2NPs between  $1$   $\mu$ g/mL to  $100$   $\mu$ g/mL, the cell viability was similar to control values after 24 h and 48 h of exposure. An *ex vivo* corneal permeation study was carried out in New Zealand rabbits. A very similar profile has been observed for the permeation of PF through the cornea when administered as eye drops and as free drug solution, which was kept much lower in comparison to PF-NPs formulations. The permeated amount of PF from the PF-F1NPs was slightly smaller than from PF-F2NPs, attributed to the increase of viscosity of the formulations with the increase of cPVA concentration. New Zealand white rabbits were also used to evaluate the irritancy of PF-F1NPs and PF-F2NPs, which demonstrated to be well-tolerated to the eye (*i.e.* the mean total score (MTS) was 0). PF-F2NPs exhibited the highest  $Q_p$  (amounts of PF permeated in the cornea) and significantly reduced the ocular edema compared to the tested formulations. The  $Q_R$  (amounts of PF retained in the cornea) of the PF-F1NPs was greater than that obtained for PF-F2NPs.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Abbreviations:** PF, pranoprofen; NPs, nanoparticles; pranoprofen-loaded nanoparticles, PF-F1NPs and PF-F2NPs; Z-Ave, average particle size; PI, polydispersity index; ZP, zeta potential; EE, encapsulation efficiency; cPF, PF concentration; cPVA, PVA concentration; PLGA, Poly-L-lactic-co glycolic acid; cPLGA, PLGA concentration; SA, arachidonic acid sodium; PBS, phosphate buffer solution; BR, bicarbonate ringer;  $Q_a$ , amounts of drug permeated across cornea;  $Q_R$ , amounts of drug retained in the cornea;  $T_L$ , lag time;  $J$ , steady-state flux.

\* Corresponding author at: Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra (FFUC), Pólo das Ciências da Saúde, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra, Portugal.

E-mail address: [esouto@ff.uc.pt](mailto:esouto@ff.uc.pt) (E.B. Souto).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.055>  
0378-5173/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Over the past few decades, polymeric nanoparticles (NPs) have emerged as one of the most characterized drug delivery systems with the aim to improve drug targeting to tissues and organs and increase drug bioavailability across biological membranes. Among the range of biodegradable polymers, poly(lactic/glycolic) acid (PLGA) has been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for use in humans, and is being widely used for modified-controlled release and site-specific drug targeting (Abrego et al., 2016; Sanchez-Lopez et al., 2016a). PLGA is one of the most successful, biodegradable and biocompatible polymer to produce polymeric nanoparticles. It is hydrolyzed to lactic and glycolic acids. These two metabolites are endogenous monomers easily metabolized by the body with high compatibility with ocular tissues. Besides, this polymer is commonly used to develop smaller particles with narrow polydispersity. These characteristics of the NPs determine their interaction and penetration through the corneal barrier (Ayalasomayajula and Kompella, 2005; Parra et al., 2015; Sabzevari et al., 2013). Thus, many chemically different drugs e.g. anticancers, antidiabetics, hormones, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been successfully formulated in PLGA NPs (Abrego et al., 2015; Araujo et al., 2009a,b; Jose et al., 2014; Sanchez-Lopez et al., 2016b).

The clinical use of Pranoprofen (PF) in ophthalmology is recommended in post-operative pain relief of cataract extraction surgery (Akyol-Salman et al., 2007; Liu et al., 2014). As a NSAID, it shows better safety profile than corticosteroids used for similar purposes. However, its use is limited by its unfavorable biopharmaceutical performance, which reasons the need for developing improved drug delivery systems to enhance its ocular bioavailability. Eye imposes several static, dynamic and metabolic barriers (Sánchez-López et al., 2016), which cannot be overcome by traditional dosage forms. It is known that only up to 5% of drug being administered onto the eye in form of eye-drops reaches the intraocular tissues (Araujo et al., 2009a). Oftalar<sup>®</sup> (1 mg/mL) is the commercially available formulation containing PF which was found to exhibited some degree of cytotoxicity in ocular surface cell lines, attributed to the presence of benzalkonium chloride (BAC) (Ayaki et al., 2012; Qu et al., 2011). We have previously optimized PF-loaded PLGA NPs by a 2<sup>4</sup> central composite factorial design (Abrego et al., 2014), produced by solvent displacement technique (Fessi et al., 1989). The present work reports the results obtained from *in vitro* cytotoxicity, *ex vivo* corneal permeation, *in vivo* ocular tolerance and *in vivo* anti-inflammatory efficacy studies, of two optimized NPs containing 1.5 m/ml and 1.0 m/ml of PF, respectively.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

PF and Oftalar<sup>®</sup> were donated by Alcon Cusi (Barcelona, Spain), PLGA Resomer<sup>®</sup> 753S was purchased from Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany), Polyvinyl alcohol (PVA) with 90% hydrolyzed and Arachidonic acid sodium (SA) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). The Y-79 Human retinoblastoma cell line was purchased from Cell Line Service (CLS, Eppelheim, Germany). Fetal bovine serum (FBS), Alamar Blue and the other reagents for cell culture were obtained from Gibco (Alfagene, Invitrogen, Portugal). The purified water used in all the experiments was obtained from a MilliQ System (home supplied). All the other chemicals and reagents used in the study were of analytical grade.

### 2.2. Preparation and characterization of the NPs

The NPs were obtained using the solvent displacement technique described elsewhere (Fessi et al., 1989). To produce the organic phase, polymer and drug (PLGA (80–100 mg) and PF (0–20 mg)) were firstly dissolved in 5 mL of acetone, which was then was dispersed, under moderate stirring, into 10 mL of PVA (5–25 mg/mL) aqueous solution of adjusted to the desired pH value (2.5–6.5). Upon evaporation of acetone, NPs were obtained and the dispersion was then concentrated to 10 mL using reduced pressure (Buchi B-480 Flawil, Switzerland). The composition of the optimized PF-NPs is shown in Table 1.

#### 2.2.1. Physicochemical characterization

**2.2.1.1. Particle size and zeta potential.** Z-Ave and ZP of the NPs were determined at 25 °C by dynamic light scattering (DLS, i.e. photon correlation spectroscopy (PCS)) with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) using disposable quartz cells (for Z-Ave, mean particle size) and disposable folded capillary zeta cells (for ZP) (Malvern Instruments, Malvern, UK). The ZP of NPs is a measure of the electrical charge at the surface of the particles, and is an indirect measure of their physical stability. ZP was calculated using the Helmholtz-Smoluchowsky equation (Teeranachaiideekul et al., 2008). Before analysis, the samples were previously diluted with MilliQ water (1:20). The obtained values correspond to the mean ± SD of at least three independent measurements of each formulation.

**2.2.1.2. Encapsulation efficiency.** The EE (%), corresponding to the highest percentage of drug formulated in the particles, was obtained indirectly by determining the concentration of the free drug in the dispersion medium. The non-loaded PF was separated from the loaded-PF by filtration/centrifugation technique at 3000 rpm for 30 min, operated at 4 °C and using Ultracel-100K (Amicon<sup>®</sup> Ultra, Milipore Corporation, Billerica, MA) centrifugal filter devices Heraeus, Multifuge 3L-R, centrifuge (Osterode, Germany). The concentration of free drug was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) using a previously validated method. Briefly, the HPLC system consisted of a Waters 1525 pump (Waters, Milford, USA), with a flow rate of 1 mL/min, and a UV-vis 2487 detector (Waters) set at 245 nm. A (Kromasil<sup>®</sup>, 100-5C18, 4.6 × 100 mm) column was used. Methanol: glacial acetic acid 5% (45: 55, V:V) was used as the mobile phase. Each sample was diluted with MilliQ water (1:20) prior to filtration/centrifugation. The EE was determined applying Eq. (1):

$$EE(\%) = \frac{\text{Total Amount of PF} - \text{non loaded PF}}{\text{Total Amount of PF}} \times 100 \quad (1)$$

#### 2.2.2. Morphological characterization

The morphological examination of the PF-NPs formulations was performed using a Transmission Electron Microscopy (TEM). A drop of the NPs dispersion (10 μL) was placed on copper electron microscopy grids and stained with a 2% (w/v) uranyl acetate solution. The sample was washed with ultra-purified water after

**Table 1**  
Composition of the optimized PF-NPs.

PF-NPs	cPF (mg/mL)	cPVA (mg/mL)	cPLGA (mg/mL)	pH
PF-F1NPs	1.5	10.0	9.5	5.5
PF-F2NPs	1.0	5.0	9.0	4.5

cPF, concentration of pranoprofen; cPVA, concentration of polyvinyl alcohol; cPLGA, concentration of poly-L-lactide-co-glycolide.

one minute of exposure, and the excess of fluid was removed with filter paper. TEM analysis was done for the dried sample.

### 2.3. In vitro cytotoxicity assessment

The cytotoxicity of PF-NPs formulations was evaluated using the method described by Fangueiro et al. (Fangueiro et al., 2014). Briefly, PF-NPs were tested in Y-79 Human retinoblastoma cell line which is a non-adherent cell line that grows in suspension forming small aggregates. The Y-79 cells were kept in culture media (RPMI-1640) supplemented with 10% (V/V) fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, and with 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL of streptomycin as antibiotics, at 37 °C under atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. For the experiments, the cells were centrifuged, the culture media was discarded and the cells were suspended in culture media and counted. As this cell line grows in suspension (forming multicellular clusters/aggregates with cells showing regular spherical shape), cells were seeded into poly-L-Lysine 96-well plates, after appropriate dilution to  $1 \times 10^5$  cell (100 µL/well) for adherence. After 24 h of seeding, the culture media was removed and replaced by the testing solutions. The PF-NPs formulations were compared with a free drug solution (PF dissolved in PBS, 1.5 mg/mL). Each formulation was diluted 10, 20, 50, 100, 1000 and 10000 fold with FBS-free culture media (100 µL/well of each concentration, added in quadruplicates). The PF formulations were left in contact with cell (incubation) for 24 h or 48 h. After the incubation period, the test solutions were removed, cells were washed with PBS and cell viability was determined using Alamar Blue (10% V/V; 100 µL/well), the absorbance was measured at 570 nm (reduced form) and 620 nm (oxidized form) using a Multiskan Ex microplate reader (MTX LabSystems, USA). The data were analyzed by calculating the percentage of Alamar Blue reduction (according to the manufacturer's recommendations) and expressed as percentage of control (untreated cell).

### 2.4. Corneal permeation assay

New Zealand rabbits (male, weighing 2.5–3.0 kg) were used for the *ex vivo* corneal permeation experiments. Analyses were carried out under veterinary supervision and according to the Ethics Committee of Animals Experimentation at the University of Barcelona. Ketamine HCl (35 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) were used to anesthetize the animals by intramuscular administration. Sodium pentobarbital (100 mg/kg) administered through marginal ear vein under deep anesthesia was used to euthanize the rabbits. Corneas of 2 mm ring of sclera were immediately excised from the animals and placed in artificial tear solution for further use. Franz diffusion cells were mounted by fixing the corneas (permeation area of 0.64 cm<sup>2</sup>) between the donor and acceptor compartments. Freshly prepared Bicarbonate Ringer's (BR) solution was used to fill the acceptor compartment which was kept under magnetic stirring at 37 °C ± 0.5 °C.

The osmolarity of the PF-NPs formulations was adjusted with glucose to 250–300 mOs/kg using a Fiske osmometer, in order to limit the risk of reflex tearing and reflex blinking caused by the irritation associated with the instillation of hypotonic or hypertonic suspensions. Unsuitable osmotic pressure can stimulate tear secretion and accelerate the outflow of therapeutic substances. Moreover, the pH of the sample was adjusted to 7.0 with 0.1 N NaOH because the tears have limited buffering capacity (Thomas et al., 1997). PF-NPs formulations were compared with commercial eye drops (Oftalar<sup>®</sup>, PF 1 mg/mL) and with the free drug solution (PF dissolved in PBS, 1 mg/mL). A volume of 1 mL of each sample was placed in the donor compartment (covered with Parafilm<sup>®</sup> to

limit the risk of evaporation). At pre-determined time intervals, samples of 300 µL were withdrawn from the acceptor compartment, followed by the refill by an equivalent volume of fresh BR. The amount of PF permeated through the cornea per unit area (%/cm<sup>2</sup>) was measured as described previously in EE, by determining, at each time point, the concentration of drug in the acceptor medium and plotted as function time (min). To assure reproducibility of results, values are reported as the mean ± SD of six replicates.

#### 2.4.1. Amount of PF retained in the cornea

The amount of drug retained in the corneas was determined after carrying out the corneal permeation assays. Briefly, corneas were carefully released from the sclera ring, cleaned using a 0.05% solution of sodium lauryl sulfate and washed with distilled water. They were then weighed and treated, for 30 min in an ultrasound bath, with methanol:water (50:50, V:V). HPLC (as previously describe in section 2.2.1) was also used to determine the amount of PF permeated and retained in the corneas. Median values (minimum – maximum range) of six and three replicates for the amount of PF permeated and retained, respectively, were reported.

#### 2.4.2. Ocular permeation parameters

The ocular permeation parameters were obtained by determining the lag time  $T_L$  (h) and the steady-state flux ( $J$ , [µg/(cm<sup>2</sup>s)]) across cornea. These parameters were calculated by plotting the cumulative PF permeating the cornea versus time, and extracting the x-intercept and slope values of the regression equation, for lag time ( $T_L$ ) and flux ( $J$ ), respectively. Eqs. (2)–(5) were used to determine the steady-state flux ( $J$ , [µg/(cm<sup>2</sup>s)]) of the drug, corneal permeability coefficient  $K_p$  (cm/h), partition coefficient  $P_1$  (cm) and diffusion coefficient  $P_2$  (h<sup>-1</sup>), respectively:

$$J = dQ/Adt \quad (2)$$

$$P_2 = 1/(6 \times T_L) \quad (3)$$

$$P_1 = J/(A \times C_0 \times P_2) \quad (4)$$

$$K_p = P_1 \times P_2 \quad (5)$$

where  $Q$  is the cumulative amount of PF permeated at time  $t$  and  $A$  for the exposed corneal surface (0.64 cm<sup>2</sup>),  $C_0$  is the initial concentration of PF in the donor compartment,  $A$  is the exposed corneal surface. Data analyses was carried out using the GraphPad prism software, applying the non-parametric statistical Friedman test followed by the Dunn's multiple comparison tests. Median values (minimum – maximum range) of three replicates were reported. Values were considered to be significant at  $p < 0.05$ .

#### 2.4.3. Corneal hydration levels

Gravimetric method was used for the determination of the corneal hydration level  $HL$ (%) using Eq. (6). The amount of drug retained in the corneas were determined after carrying out the corneal permeation assays. Briefly, corneas were carefully released from the sclera ring, washed, weighed ( $W_w$ ) and desiccated at 80 °C and reweighed ( $W_d$ ) afterwards. Median values (minimum – maximum range) of three replicates were reported.

$$HL = [1 - (W_d/W_w) \times 100] \quad (6)$$

## 2.5. In vivo ocular tolerance

New Zealand white rabbits (2.5–3.0 kg) were used to assess the irritancy of the PF-NPs formulations applying the methods described by Draize et al. (Draize et al., 1944) and Kay et al. (Kay and Calandra, 1962). The osmolality of the PF-NPs formulations was adjusted to 250–300 mOs/kg, as described previously (section 2.4) in corneal permeation studies, and the pH was adjusted at 7.0. For each formulation, a single instillation of 50  $\mu$ L was applied in one eye, using untreated contra-lateral eye as control. The analyses were carried out 1 h after application of each formulation, and after 1–4 and 7 days of assay. Severity of ocular lesions involving the cornea (opacity), iris (inflammation degree) and conjunctiva (congestion, swelling and discharge) was graded applying an overall scoring system by visual assessment of any changes in cornea  $x_1(n)$ , conjunctiva  $x_2(n)$  and iris  $x_3(n)$ . The mean total score (MTS) is calculated using Eq. (7):

$$MTS = \frac{X_1(n)}{2} + \frac{\sum X_2(n)}{2} - \frac{\sum X_3(n)}{5} \quad (7)$$

where  $n$  is the number of rabbits included in the ocular tolerance assay.

## 2.6. Anti-inflammatory efficacy

For the assessment of the anti-inflammatory efficacy of the PF-NPs, firstly the osmolality of the PF-NPs was adjusted to 250–300 mOs/kg (section 2.4), and the pH was to 7.0 (optimum pH value of the ophthalmic formulations should be  $7.2 \pm 0.2$  for the maximum eyes' comfort). The tissue inflammation was induced by instillation of 50  $\mu$ L SA (dissolved in PBS, 0.5% (w/v)) in the right eye of eight groups of six rabbits (including control group) (Spampinato et al., 1991). Commercial eye drops (Oftalar<sup>®</sup>, PF 1 mg/mL) and a free drug solution (1 mg/mL) of PF in PBS were used for comparison studies. Left eye was used as inflammation control while the conjunctival sac of the right eye was used for the placement of 50  $\mu$ L of each formulation or 0.9% (w/v) isotonic saline solution (control group). Inflammation was quantified 30 min after inducing inflammation with SA instillation, and after 60, 90, 120, and 150 min as described elsewhere (Draize et al., 1944). The MTS was determined using Eq. (7). Corneal transparency was not affected by the treatment with SA, therefore it has not been evaluated. The results are shown as the sum of conjunctival and iris scores, expressed as the mean  $\pm$  SD.

## 3. Results and discussion

Because of its simple, fast preparation, NPs have been produced by solvent displacement technique, a method that has been successfully applied to load hydrophilic, lipophilic and thermolabile drugs in PLGA-NPs. Acetone was selected as organic medium because of the low solubility of PF in water. The mean particle size (Z-Ave) of PF-NPs was measured by PCS, which is referred as dynamic light scattering, and quasi-elastic light scattering when it is used to determine rapidly the particle diameter and size distribution (polydispersity index, PI). The movement of particles in water is inversely proportional to their size, which can therefore be identified by analyzing the time dependency of the light intensity fluctuations caused by scattering off the particles when they are illuminated with a laser beam (Yegin and Lamprecht, 2006).

In previous studies, we formulated PF in PLGA NPs as new delivery system suitable for the ocular route (Abrego et al., 2014). The Z-Ave of the optimized PF-F1NPs and PF-F2NPs formulations was found to be 350 nm with PI values below 0.10 which are considered in the range of mono-disperse systems. Both

formulations had a net negative charge with ZP values of –7.41 mV and –8.5 mV for PF-F1NPs and PF-F2NPs, respectively, which was found to be adequate to assure physicochemical stability during shelf life (Abrego et al., 2014). The results obtained revealed a trend towards smaller particle size and lower PI as pH varied from 4.5 to 6.5, while a significant increase of the particle size and PI was observed at pH values lower than  $pK_a$  (4.35). Our previous results also showed a significant influence ( $p < 0.05$ ) of the pH and PVA concentration on the ZP values, which increased with the increase of cPVA at lower pH values. The percentage of incorporated PF in the polymeric matrix was around 80% (Abrego et al., 2014), while the pH of the aqueous phase and concentration of PF showed a significant effect ( $p < 0.05$ ) on the EE. An increase of the pranoprofen concentration at a pH value lower than  $pK_a$  led to higher EE. The size and surface morphology of the optimized PF-NPs formulations were analyzed by TEM. This technique gives information about NPs structure, highlighting the polymer envelope and the inner cavity which are translated by the particles' morphology (Vega et al., 2008). TEM image depicted in Fig. 1 reveals that optimized PF-NPs were of spherical shape with smooth surface, measured within an average diameter of approx. 300 nm without aggregation. The mean particle size obtained with PCS, which translates the hydrodynamic diameter (Song et al., 2008), was around 350 nm.

Y-79 human retinoblastoma cell line was used to evaluate the cytotoxicity of PF-F1NPs and PF-F2NPs, which was compared to blank NPs and free drug solution (PF dissolved in PBS, 1.5 mg/mL). The immortal Y-79 human retinoblastoma cell line grows in culture media, allows repetition of assays, and can also be stored frozen in liquid nitrogen for later use. Y-79 cells were exposed to a series of concentrations of PF-F1NPs and PF-F2NPs, blank NPs and free drug solution (PF dissolved in PBS, 1.5 mg/mL), for 24 or 48 h. Tested drug concentrations were previously set by preliminary studies (Ayaki et al., 2012). The optimized PF formulations were determined in the concentrations range between 1.5  $\mu$ g/mL–1000  $\mu$ g/mL PF for formulation PF\_F1NPs, and 1.0  $\mu$ g/mL–666.7  $\mu$ g/mL PF for PF\_F2NPs formulation. The effect of PF-F1NPs and PF-F2NPs on Y-79 cell viability compared to blank NPs is shown in Fig. 2. Fig. 3 shows the results obtained after treating the cells with the free drug solution. Data are expressed as % of control (untreated cells), see methods for details. Both figures clearly show that cell viability decreased with the increase of the PF concentration.

Concentrations up to 75  $\mu$ g/mL exhibited no toxicity to Y-79 cells (Fig. 2a, b), whereas at 150  $\mu$ g/mL a decrease of about 80% on the cell viability was observed after exposing the cells to PF-F1NPs.

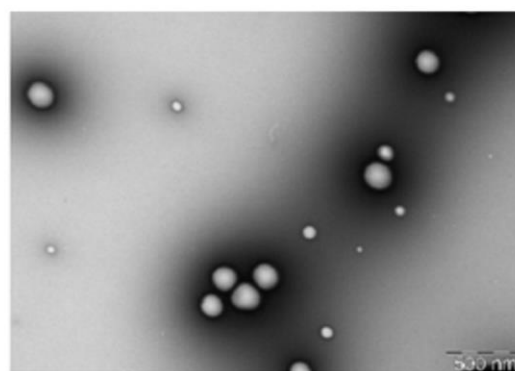
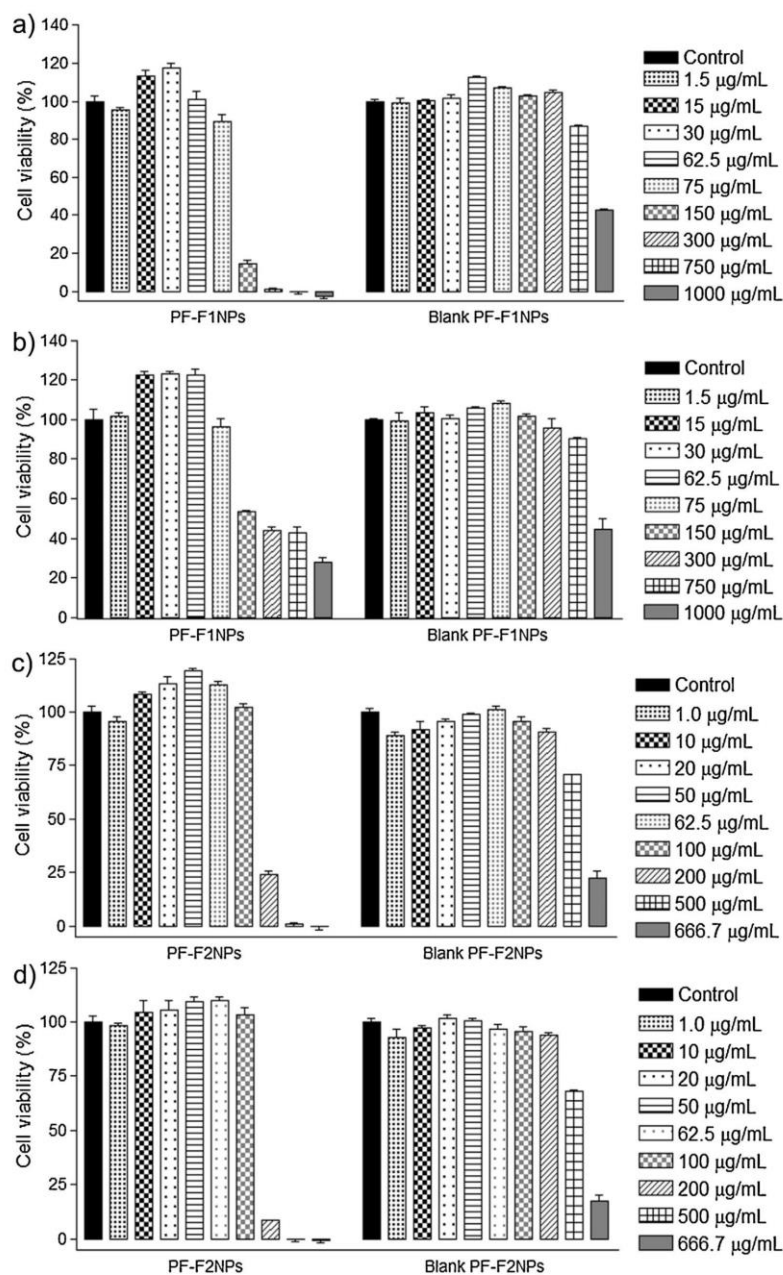


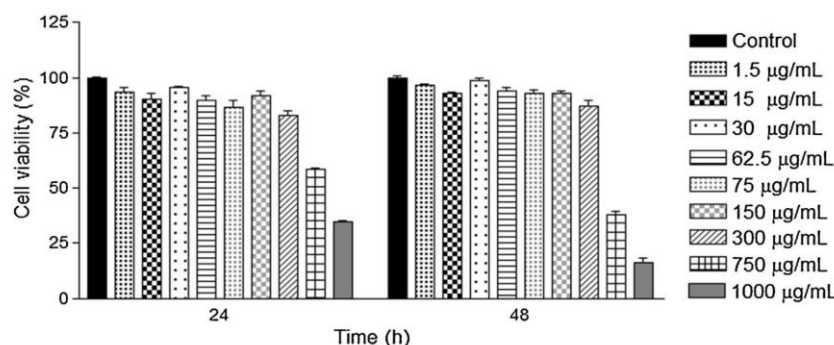
Fig. 1. Transmission Electron Micrograph of the optimized PF-NPs.



**Fig. 2.** Y-79 cell viability, expressed as percentage of untreated cells (control), after exposure to a) PF-F1NPs (left panel) and Blank PF-F1NPs (right panel) for 24 h; b) PF-F1NPs and Blank PF-F1NPs for 48 h; c) PF-F2NPs and Blank PF-F2NPs for 24 h; d) PF-F2NPs and Blank PF-F2NPs for 48 h. Cell viability was assessed by Alamar blue reduction assay. Mean  $\pm$  SD.  $n = 4$ .

Indeed, after 24 h of exposure to 150  $\mu\text{g/mL}$  PF-F1NPs, cell viability was less than 20% in comparison to the control, and about 50% after 48 h of exposure. Concentrations of PF-F1NPs higher than 150  $\mu\text{g/mL}$  showed a toxic effect on Y-79 cells after 24 h of exposure (Fig. 2a, left). On the other hand, the blank formulation

showed no cytotoxicity for concentrations up to 750  $\mu\text{g/mL}$ , as observed in Fig. 2(a, b, right panels), for the 2 time points of exposure. However, a concentration of 1000  $\mu\text{g/mL}$  of this formulation exhibited a reduction on cell viability about 50%, compared to the control.



**Fig. 3.** Y-79 human cell viability after exposure to different dilutions of the free drug solution (PF dissolved in PBS, 1.5 µg/mL) to the different final concentrations of PF (as indicated), for 24 h or 48 h. Cell viability is expressed as % of control (untreated cells), data are the mean  $\pm$  SD.  $n = 4$ .

Regarding the cytotoxicity of PF-F2NPs, when treating the Y-79 cells with concentrations between 1 µg/mL to 100 µg/mL, the cell viability was similar to control values after 24 h and 48 h of exposure (Fig. 2c, d). However, concentrations of 200 µg/mL caused a significant reduction on cell viability, down to values below 25% of control, after 24 h and 48 h of exposure. Blank formulations showed a significant decreased on cell viability at concentrations of 500 µg/mL and above, for which cell viability was close to 70% (Fig. 2c, d).

The obtained results for drug-loaded and drug-free NPs formulations were, in part, attributed to the lower concentration of culture media upon dilutions. Indeed, different concentrations were obtained by diluting the formulations in FBS-free culture media, and to achieve the highest concentrations, dilutions of about 1:1 were needed, meaning that the amount of nutrients decreased.

To determine the effect of free drug on the Y-79 cell viability, freshly prepared PF solutions were tested. Concentrations of PF up to 300 µg/mL present no or almost no toxicity on Y-79 cells, for both incubation periods (Fig. 3). At 750 µg/mL and at 1000 µg/mL of free drug solution, a decrease on Y-79 cell viability was observed in comparison to the control, after 24 h and 48 h of exposure. In these experiments, concentrations up to 300 µg/mL are considered safe as they do not reduce cell viability below 70% of the control (Doktorovova et al., 2014). The lower cytotoxicity observed for the free drug solution in comparison to the NP formulations was attributed to the degradation of the drug undergone in solution, resulting in less toxic metabolites. Drug-loaded in NPs is, on the other hand, protected from the water surroundings and is being continuously released in its stable form which interacts with the cells causing toxicity. Supporting these statements, a recent study reports that concentrated PF solutions from 62.5 µg/mL to 100 µg/mL induced apoptosis and severely decreased cell viability in human corneal endothelial cells, in a dose and time dependent way (Li et al., 2015). In addition, smaller particles have higher surface area which contributes to a faster release of loaded drug, and this also plays an important role in the cellular uptake. The lower cell viability of NPs over the free drug solution can be explained by the greater cellular uptake of the particles. On the other hand, higher NPs concentration (both drug-loaded and drug-free NPs) limits the nutrients supply and oxygen diffusion within the cells, as the ratio particles/cells is very high. These conditions disfavor the metabolism and cells proliferation. The results reported here can then be attributed to nutrients privation and not a direct toxic effect of the particles. Some cytotoxic effects were observed *in vitro* upon exposure to high concentration of NPs, mostly dependent on their composition. These results are in

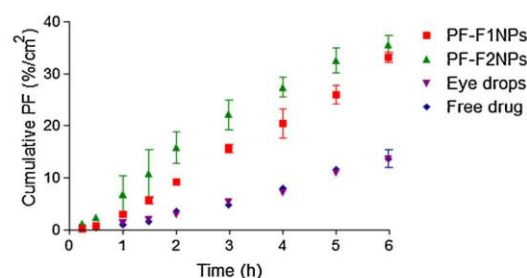
agreement with those reported by Parveen and Sahoo (Parveen and Sahoo, 2011).

In order to determine the permeation profile and the corneal permeation parameters of PF from the PF-F1NPs, PF-F2NPs, eye drops (Oftalar<sup>®</sup>, PF 1 mg/mL) and from free drug solution (PF dissolved in PBS, 1 mg/mL) an *ex vivo* corneal permeation study was carried out in New Zealand rabbits. The accumulative amounts of PF permeated through cornea and the obtained permeation parameters values are given in Fig. 4 and Table 2, respectively.

A very similar profile has been observed for the permeation of PF through the cornea when administered as eye drops and as free drug solution, which was kept much lower in comparison to that obtained with the PF-NPs formulations (Fig. 4). However, the permeated amount of PF from the PF-F1NPs was slightly smaller than from PF-F2NPs, attributed to the increase of viscosity with the increase of cPVA concentration in the dispersions, i.e. from 5 mg/mL (PF-F2NPs) to 10 mg/mL (PF-F1NPs). This increase of viscosity results in a more compact polymer matrix, leading to slower degradation of the polymer and/or slower diffusion of the loaded PF from the NPs (Sahoo et al., 2002). These results are in agreement with those reported in previous studies, related to *in vitro* release assay of PF from PF-NPs (Abrego et al., 2014).

Table 2 shows the permeation parameters of PF which were calculated from the amounts permeated across cornea, and statistically compared using the non-parametric statistical Friedman test followed by the Dunn's multiple comparison tests.

From the statistical analysis of the  $K_p$  parameter obtained from the tested formulations in Table 2, statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between PF-F1NPs and free drug solution, PF-F2NPs and eye drops, PF-F2NPs and free drug solution. The free drug solution and PF-F2NPs showed the lowest and



**Fig. 4.** *Ex vivo* corneal permeation profile of PF from the PF-F1NPs, PF-F2NPs, eye drops and free drug solution, as denoted, along 6 h. Mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ .

**Table 2**  
Permeability coefficient ( $K_p$ ),  $P_1$  and  $P_2$  parameters, lag time ( $T_L$ ) of PF at 6 h for the PF-NPs formulations, eyes drops and free drug solution.

Samples	$K_p \times 10^2$ (cm/h)	$P_1 \times 10^1$ (cm)	$P_2 \times 10^1$ (h <sup>-1</sup> )	$T_L \times 10^1$ (h)
PF-F1NPs	9.42 (9.22–9.65) <sup>d</sup>	2.11 (1.38–2.57) <sup>c,d</sup>	4.82 (3.58–6.97)	3.76 (2.39–4.65)
PF-F2NPs	12.29 (12.26–12.30) <sup>c, d</sup>	1.23 (1.09–1.30) <sup>c</sup>	10.08 (9.49–11.28) <sup>d</sup>	1.66 (1.48–1.76) <sup>d</sup>
Eye drops	3.46 (3.42–3.62) <sup>b</sup>	0.89 (0.77–0.91) <sup>a,b</sup>	3.98 (3.87–4.47)	4.19 (3.73–4.31)
Free drug	3.32 (3.28–3.56) <sup>a,b</sup>	1.00 (0.93–1.07) <sup>a</sup>	3.30 (3.06–3.84) <sup>b</sup>	5.00 (4.34–5.45) <sup>b</sup>

Differences with <sup>a</sup>PF-F1NPs, <sup>b</sup>PF-F2NPs, <sup>c</sup>eye drops and <sup>d</sup>free drug solution. Results are reported as median value (minimum – maximum range)  $n = 6$ .

highest  $K_p$  values, respectively. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between PF-F1NPs and eye drops, PF-F1NPs and free drug solution, PF-F2NPs and eye drops for the  $P_1$  parameter. The PF-F1NPs formulation and eye drops exhibited the highest and lowest  $P_1$  values, respectively. Table 2 also shows statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between PF-F2NPs and free drug solution for  $P_2$  and  $T_L$  parameters. The  $K_p$  values for the assayed formulations are directly related to the  $P_2$  parameter. The vehicle in which a drug is administrated must ensure an optimal release rate. Thus, an equilibrium between drug-vehicle and drug-surface affinity should exist in order to guarantee the maximal thermodynamic activity (Calpena et al., 2011).

The  $T_L$  value obtained for the PF-F2NPs formulation was lower than those obtained for PF-F1NPs formulation, eye drops and free drug solution. Therefore, the PF-F2NPs formulation reached the steady state equilibrium, faster than the other formulations.

As shown in Table 2, the eye drops and free drug solution did not show statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) between them for all the determined permeation parameters.

The amount of drug retained in the cornea and the corneal hydration level was calculated at the end of the corneal permeation assay. Results are reported as the median value (minimum – maximum range) of six replicates for the amount of PF permeated across cornea and three replicates for the retained drug and the corneal hydration level. These results are given in Table 3.

$Q_p$  and  $Q_R$  of PF in the cornea obtained from the PF-NPs formulations were greater than those obtained with the eye drops and free drug solution (Table 3). The results are attributed to the agglomeration of the NPs in the conjunctival sac. The particles form a reservoir from which the loaded drug slowly diffuses out of the polymeric matrix to the pre-corneal area. Some authors have reported that the PLGA NPs internalize the corneal epithelial cells by an endocytic mechanism (Qaddoumi et al., 2003). The  $Q_R$  values of 83.78 and 61.92%/cm<sup>2</sup>/g of PF obtained in the cornea for PF-F1NPs and PF-F2NPs, respectively, were attributed to the presence of PVA in the PF-NPs formulations, which contributes for the retention of the NPs in the eye (Gupta et al., 2010). As the amount of PVA in PF-F1NPs formulation is greater than in PF-F2NPs (Table 1),  $Q_R$  of PF in the cornea for the former is also greater than that obtained for the PF-F2NPs. These results corroborate (Gupta et al., 2010; Win and Feng, 2005). Although the PLGA is a non-mucoadhesive polymer, it has been widely used in drug delivery research due to its biodegradable and non-toxic properties. Besides, this polymer is commonly used to develop smaller

particles with narrow polydispersity. These characteristics of the NPs determine their interaction and penetration through the corneal barrier. Smaller particles have relatively more surface area, which can lead to faster release of the loaded drug, and can also play an important role in the cellular uptake (Anand et al., 2010; Win and Feng, 2005). Moreover, the particle size of formulations intended for ocular instillation is of crucial importance and should not exceed 10  $\mu$ m, larger sizes may cause a scratching feeling of a foreign body in the eye and would, therefore, compromise patient comfort (Fangueiro et al., 2016; Song et al., 2008).

Regarding the corneal hydration analysis, the healthy cornea has a hydration level of 76–80% (Schoenwald and Huang, 1983). During the assay, the cornea was not damaged when treated with PF-NPs, eye drops and free drug solution (Table 3).

New Zealand white rabbits were also used to evaluate the irritancy of PF-F1NPs and PF-F2NPs. The results demonstrated the non-irritant character of the drug-loaded particles, since no reaction was detected within 5 min (score 0) of the assay. These results are in agreement with those obtained by Hen's Egg test Chorioallantonic Membrane (HET-CAM) (Abrego et al., 2014).

The anti-inflammatory efficacy of PF-NPs was also evaluated in New Zealand white rabbits treated by instillation of SA to induce ocular edema, and compared to eye drops and free drug solution (Fig. 5).

As shown in Table 3 and Fig. 5, the PF-F2NPs exhibited the highest  $Q_p$  values of PF in the cornea and significantly reduced the ocular edema compared to the tested formulations. The  $Q_R$  of PF in the cornea of the PF-F1NPs was greater than that obtained for PF-F2NPs (Table 3). However, in the first 90 min, PF-F1NPs showed slower anti-inflammatory activity than PF-F2NPs. The eye drops and free drug solution also exhibited slower anti-inflammatory activity than PF-F2NPs. Indeed, PF-F1NPs, eye drops and free drug solution show  $T_L$  values greater than those obtained for the PF-F2NPs (Table 2), which means that PF-F2NPs reaches the steady state equilibrium faster than PF-F1NPs, eye drops and free drug solution. As a consequence, these latter formulations show slower anti-inflammatory activity than PF-F2NPs. Even though the eye drops and free drug solution show good results of anti-inflammatory efficacy and the  $Q_R$  of PF in the cornea from these formulations were similar to those obtained for the PF-F2NPs formulation (Table 2), both formulations cannot be considered optimal for the treatment of ocular diseases. Indeed, the free drug solution is inherently irritating to the eye, being PF also unstable in aqueous solution (Ahuja et al., 2008). Otherwise, drugs are removed from the surface of the eye, after ocular instillation of conventional dosage form, such as eye drops (Araujo et al., 2009a). The commercial dosage of PF (eye drops) has a combination of benzalkonium chloride (BAC) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), to allow a greater drug permeation through cornea. BAC is involved in the disruption of the corneal epithelium, and can also emulsify the corneal epithelium, leading to increased partitioning of the drug (Rathore and Majumdar, 2006). EDTA also increases the corneal permeability by removing the extracellular calcium ions and increasing tight junction permeability (Furrer et al., 2002). To overcome these physiological interactions with the eye structures,

**Table 3**  
Corneal hydration level (HL), amounts of PF permeated ( $Q_p$ ) and retained ( $Q_R$ ) across cornea from the PF-NPs formulations, eye drops and free drug solution after 6 h.

Samples	HL (%)	$Q_p$ (%/cm <sup>2</sup> )	$Q_R$ (%/cm <sup>2</sup> /g)
PF-F1NPs	76.23 (76.45–78.62)	33.11 (31.38–34.87)	83.78 (72.54–90.02)
PF-F2NPs	77.50 (76.02–77.10)	35.59 (35.00–40.02)	61.92 (57.82–63.25)
Eye drops	80.01 (78.23–80.07)	13.53 (11.12–13.57)	52.55 (51.23–53.62)
Free drug	78.12 (76.67–79.34)	13.62 (11.58–15.46)	50.41 (49.91–50.19)



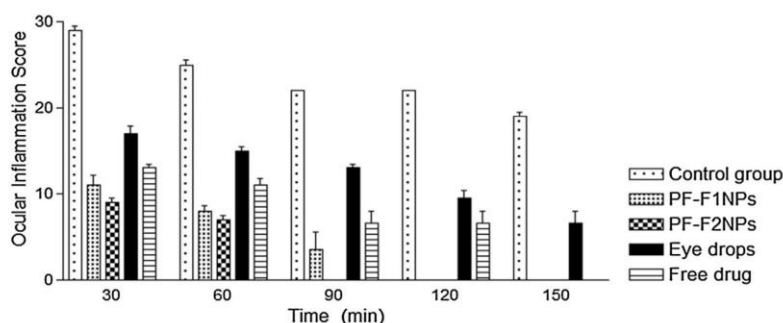


Fig. 5. Anti-inflammatory activity of PF from the PF-F1NPs, PF-F2NPs, eye drops and free drug solution in the ocular inflammation induced by ocular instillation SA solution.  $n = 6$ .

the ocular application of the PF-NPs is superior in the treatment ocular edema than eye drops or free drug solution.

#### 4. Conclusions

The developed PF-F1NPs and PF-F2NPs suspensions showed high encapsulation efficiency (ca. 80%), no aggregation, and average size appropriate for ocular administration (around 350 nm). Relevance of this work relies on the cell cytotoxicity results underlying the lack of toxicity of formulations up to 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of free drug, while the loading of drug in the nanoparticles decreased the cytotoxic concentrations in Y-79 cells. This result is interesting and should be further highlighted taking into account the fact that blank particles were recognized as being not toxic. The cytotoxicity could not be attributed to the nanoparticles, since blank formulations were not toxic at comparable NPs concentrations, but may translate a more efficient drug delivery associated to the higher protection of the drug from degradation. Although eye drops and free drug solution offered suitable corneal permeation and anti-inflammatory efficacy, both formulations cannot be considered adequate for the treatment of ocular diseases, because the free drug solution is inherently irritating to the eye and PF is unstable in aqueous solution. Besides, following the instillation of the commercial eye drops most of the drug is removed, by tear dilution and tear turn over from the surface of the eye owing to the low viscosity of these conventional dosage forms. PF-NPs exhibited the highest  $Q_R$  values of PF in the cornea and significantly reduced the ocular edema compared to the eye drops and free drug solution. Additionally, PF formulated in PLGA NPs showed optimal ocular tolerance from the *in vitro* e *in vivo* ocular irritation tests. Ocular administration of the PF-NPs formulations could be effective and appropriate to improve the biopharmaceutical profile of PF. The permeation studies of PF through the cornea showed that  $K_p$  values of PF in the cornea obtained with PF-NPs formulations are 4-fold higher than those obtained with the eye drops and free drug solution. The  $Q_R$  values of PF in the cornea obtained from the PF-NPs formulations were greater than those obtained with the eye drops and free drug solution. Additionally, the results revealed that  $T_1$  values obtained for PF-NPs are 3-fold lower than those obtained for eye drops and free drug solution. Therefore, the PF-NPs formulation reached the steady state equilibrium faster than the solutions under testing. As a consequence, nanoparticle formulations show faster anti-inflammatory activity than eye drops and free drug solution. Additional advantages of NPs over commercial formulations is the non-use of BAC and EDTA to allow higher corneal permeation. Nanoparticles are expected to prolong the contact of PF with the

cornea and improve corneal retention of the drug, thus enhancing its local anti-inflammatory and analgesic effect. In addition, PF formulated in NPs avoids the inherent irritation of this drug to the eye, as shown the ocular tolerance results.

#### Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the financial support of the Spanish Ministry of Science and Innovation MAT 2011-26994 and MAT 2014-59134R. This work was also financed through the projects M-ERA-NET/0004/2015-PAIRED, UID/AGR/04033/2013, and UID/QUI/50006/2013, receiving financial support from the Portuguese Science and Technology Foundation, Ministry of Science and Education (FCT/MEC) through national funds, and co-financed by FEDER, under the Partnership Agreement PT2020.

#### References

- Abrego, G., Alvarado, H.L., Egea, M.A., Gonzalez-Mira, E., Calpena, A.C., Garcia, M.L., 2014. Design of nanosuspensions and freeze-dried PLGA nanoparticles as a novel approach for ophthalmic delivery of pranoprofen. *J. Pharm. Sci.* 103, 3153–3164.
- Abrego, G., Alvarado, H., Souto, E.B., Guevara, B., Bellows, L.H., Parra, A., Calpena, A., Garcia, M.L., 2015. Biopharmaceutical profile of pranoprofen-loaded PLGA nanoparticles containing hydrogels for ocular administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 95, 261–270.
- Abrego, G., Alvarado, H., Souto, E.B., Guevara, B., Bellows, L.H., Garduno, M.L., Garcia, M.L., Calpena, A.C., 2016. Biopharmaceutical profile of hydrogels containing pranoprofen-loaded PLGA nanoparticles for skin administration: *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* characterization. *Int. J. Pharm.* 501, 350–361.
- Ahuja, M., Dhake, A.S., Sharma, S.K., Majumdar, D.K., 2008. Topical ocular delivery of NSAIDs. *AAPS J.* 10, 229–241.
- Akyol-Salman, I., Lece-Sertoz, D., Baykal, O., 2007. Topical pranoprofen 0.1% is as effective anti-inflammatory and analgesic agent as diclofenac sodium 0.1% after strabismus surgery. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 23, 280–283.
- Anand, P., Nair, H.B., Sung, B., Kunnammakara, A.B., Yadav, V.R., Tekmal, R.R., Aggarwal, B.B., 2010. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity *in vitro* and superior bioavailability *in vivo*. *Biochem. Pharmacol.* 79, 330–338.
- Araujo, J., Gonzalez, E., Egea, M.A., Garcia, M.L., Souto, E.B., 2009a. Nanomedicines for ocular NSAIDs: safety on drug delivery. *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* 5, 394–401.
- Araujo, J., Vega, E., Lopes, C., Egea, M.A., Garcia, M.L., Souto, E.B., 2009b. Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres. *Colloids. Surf. B Biointerfaces* 72, 48–56.
- Ayaki, M., Iwasawa, A., Niwano, Y., 2012. Comparative assessment of the cytotoxicity of six anti-inflammatory eyedrops in four cultured ocular surface cell lines, as determined by cell viability scores. *Clin. Ophthalmol.* 6, 1879–1884.
- Ayalasomayajula, S.P., Kompella, U.B., 2005. Subconjunctivally administered celecoxib-PLGA microparticles sustain retinal drug levels and alleviate diabetes-induced oxidative stress in a rat model. *Eur. J. Pharmacol.* 511, 191–198.
- Calpena, A.C., Clares, B., Fernandez, F., 2011. Technological, biopharmaceutical and pharmacokinetic advances: New formulations of application on the skin and oral mucosa. In: *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences* (Diego Muñoz-Torrero, Ed.), 2011, 175–198. ISBN: 978-81-7895-528-5.

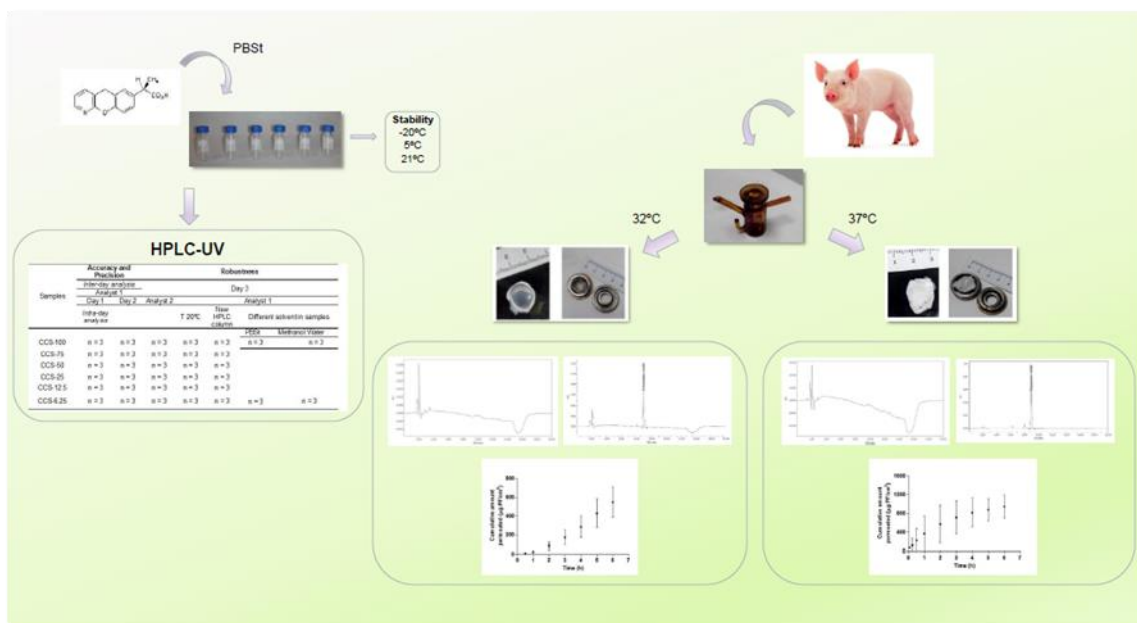
- Doktorovova, S., Souto, E.B., Silva, A.M., 2014. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers—A systematic review of *in vitro* data. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87, 1–18.
- Draize, J., Woodard, G., Calvery, H., 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82, 377–390.
- Fangueiro, J.F., Andreani, T., Egea, M.A., García, M.L., Souto, S.B., Silva, A.M., Souto, E.B., 2014. Design of cationic lipid nanoparticles for ocular delivery: development, characterization and cytotoxicity. *Int. J. Pharm.* 461, 64–73.
- Fangueiro, J.F., Veiga, F., Silva, A.M., Souto, E.B., 2016. Ocular drug Delivery—New strategies for targeting anterior and posterior segments of the eye. *Curr. Pharm. Des.* 22, 1135–1146.
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., Benita, S., 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Colloids Surf.* 55, R1–R4.
- Furrer, P., Mayer, J.M., Gurny, R., 2002. Ocular tolerance of preservatives and alternatives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53, 263–280.
- Gupta, H., Aqil, M., Khar, R.K., Ali, A., Bhatnagar, A., Mittal, G., 2010. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* 6, 324–333.
- Jose, S., Sowmya, S., Cinu, T.A., Aleykutty, N.A., Thomas, S., Souto, E.B., 2014. Surface modified PLGA nanoparticles for brain targeting of Bacoside-A. *Eur. J. Pharm. Sci.* 63, 29–35.
- Kay, J.H., Calandra, J.K., 1962. Interpretation of eye irritation test. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 13, 281–289.
- Li, Y.H., Wen, Q., Fan, T.J., Ge, Y., Yu, M.M., Sun, L.X., Zhao, Y., 2015. Dose dependent cytotoxicity of pranoprofen in cultured human corneal endothelial cells by inducing apoptosis. *Drug Chem. Toxicol.* 38, 16–21.
- Liu, C., Liu, Y., Ye, S., Liu, L., Zhang, W., Wu, M., 2014. Effect of topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs and nuclear hardness on maintenance of mydriasis during phacoemulsification surgery. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 30, 831–836.
- Parra, A., Mallandrich, M., Clares, B., Egea, M.A., Espina, M., García, M.L., Calpena, A.C., 2015. Design and elaboration of freeze-dried PLGA nanoparticles for the transcorneal permeation of carprofen: ocular anti-inflammatory applications. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 136, 935–943.
- Parveen, S., Sahoo, S.K., 2011. Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery. *Eur. J. Pharmacol.* 670, 372–383.
- Qaddoumi, M.G., Gukasyan, H.J., Davda, J., Labhasetwar, V., Kim, K.J., Lee, V.H., 2003. Clathrin and caveolin-1 expression in primary pigmented rabbit conjunctival epithelial cells: role in PLGA nanoparticle endocytosis. *Mol. Vis.* 9, 559–568.
- Qu, M., Wang, Y., Yang, L., Zhou, Q., 2011. Different cellular effects of four anti-inflammatory eye drops on human corneal epithelial cells: independent in active components. *Mol. Vis.* 17, 3147–3155.
- Rathore, M.S., Majumdar, D.K., 2006. Effect of formulation factors on *in vitro* transcorneal permeation of gatifloxacin from aqueous drops. *AAPS PharmSciTech* 7, 57.
- Sánchez-López, E., Espina, M., Doktorovova, S., Souto, E.B., García, M.L., 2016. 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.* in press.
- Sabzevari, A., Adibkia, K., Hashemi, H., Hedayatfar, A., Mohsenzadeh, N., Atyabi, F., Ghahremani, M.H., Dinarvand, R., 2013. Polymeric triamcinolone acetonide nanoparticles as a new alternative in the treatment of uveitis: *in vitro* and *in vivo* studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 84, 63–71.
- Sahoo, S.K., Panyam, J., Prabha, S., Labhasetwar, V., 2002. Residual polyvinyl alcohol associated with poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J. Controlled Release* 82, 105–114.
- Sanchez-Lopez, E., Egea, M.A., Cano, A., Espina, M., Calpena, A.C., Etcheto, M., Camins, A., Souto, E.B., Silva, A.M., García, M.L., 2016a. 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* 145, 241–250.
- Sanchez-Lopez, E., Egea, M.A., Cano, A., Espina, M., Calpena, A.C., Etcheto, M., Camins, A., Souto, E.B., Silva, A.M., García, M.L., 2016b. 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* 145, 241–250.
- Schoenwald, R.D., Huang, H.S., 1983. Corneal penetration behavior of beta-blocking agents I: physicochemical factors. *J. Pharm. Sci.* 72, 1266–1272.
- Song, X., Zhao, Y., Hou, S., Xu, F., Zhao, R., He, J., Cai, Z., Li, Y., Chen, Q., 2008. Dual agents loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 445–453.
- Spampinato, S., Marino, A., Bucolo, C., Canossa, M., Bachetti, T., Mangiafico, S., 1991. Effects of sodium naproxen eye drops on rabbit ocular inflammation induced by sodium arachidonate. *J. Ocul. Pharmacol.* 7, 125–133.
- Teeranachaiideekul, V., Junyaprasert, V.B., Souto, E.B., Muller, R.H., 2008. Development of ascorbyl palmitate nanocrystals applying the nanosuspension technology. *Int. J. Pharm.* 354, 227–234.
- Thomas, M.L., Szeto, V.R., Gan, C.M., Polse, K.A., 1997. Sequential staining: the effects of sodium fluorescein, osmolarity, and pH on human corneal epithelium. *Optom. Vis. Sci.* 74, 207–210.
- Vega, E., Gamisans, F., García, M.L., Chauvet, A., Lacoulonche, F., Egea, M.A., 2008. PLGA nanospheres for the ocular delivery of flurbiprofen: drug release and interactions. *J. Pharm. Sci.* 97, 5306–5317.
- Win, K.Y., Feng, S.S., 2005. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 26, 2713–2722.
- Yegin, B.A., Lamprecht, A., 2006. Lipid nanocapsule size analysis by hydrodynamic chromatography and photon correlation spectroscopy. *Int. J. Pharm.* 320, 165–170.



*“Pranoprofen quantification in ex vivo corneal and scleral permeationsamples:  
Analytical validation”*

C. Cañadas-Enrich, G. Abrego, H.L. Alvarado, A.C. Calpena-Campany, A. Boix-Montañes

*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 160 (2018) 109-118*





### 3.2 Pranoprofen quantification in *ex vivo* corneal and scleral permeation samples: Analytical validation (Artículo II)

#### RESUMEN

El propósito del presente trabajo fue el de validar un método bioanalítico apropiado para la cuantificación de PF por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en muestras obtenidas de ensayos en los que éstas resultaran del contacto directo con distintas membranas oculares. Siguiendo las directrices propuestas por la guía de validación bioanalítica de la EMA, se preparó una serie de soluciones patrón a una concentración conocida de PF en PBS modificado (PBSt), al cual se le había añadido una pequeña porción de tejido ocular porcino (córnea y esclera). Se determinaron entonces parámetros tales como la selectividad, la linealidad, el límite de detección, el límite de cuantificación, la exactitud y la precisión (*inter e intra-día*), la estabilidad y la robustez del método escogido. Los resultados obtenidos evidenciaron que dicho método podía considerarse selectivo y lineal en el rango de concentraciones ensayadas (6.25 - 100 µg/mL). Se obtuvo un límite de detección de  $1.05 \pm 0.70$  µg/mL y un límite de cuantificación de  $3.17 \pm 2.12$  µg/mL. La exactitud expresada como porcentaje del error relativo (*RE%*) se ubicó entre 5.15 y -1.92 % en los ensayos *intra-día* y entre 6.25 y -4.89 % en los experimentos *inter-día*. La precisión, expresada como porcentaje de la desviación estándar relativa (*RSD%*) estuvo entre 4.89 y 0.79 % en los estudios *intra-día* y entre 6.25 y -4.89 % en los ensayos *inter-día*. Los datos correspondientes al *%RE* y al *%RSD* permitieron concluir que se trata de un método exacto y preciso, como consecuencia de encontrarse estos valores por debajo del 15% establecido por la guía de validación bioanalítica propuesta por la EMA. Los resultados de los ensayos de estabilidad evidenciaron que las soluciones patrón pueden permanecer inalteradas durante 7 días a una temperatura de 5 °C. Además, el método demostró ser robusto frente a distintos cambios, en este caso intencionadamente infligidos sobre el procedimiento validado. Adicionalmente, se comprobó la idoneidad del método de cuantificación del fármaco embebido en las membranas biológicas empleadas como membranas de permeación en estudios *ex vivo*. Los resultados de este ensayo exhibieron que el método escogido resulta adecuado y reproducible en un 90%.

Para completar la validación de la metodología bioanalítica, se desarrolló un estudio *ex vivo* de permeación trans-corneal y trans-escleral del PF a partir de una solución a saturación del fármaco utilizando células de difusión vertical de Franz termoreguladas a  $32 \pm 0.5$  °C y  $37 \pm 0.5$  °C para las membranas de permeación córnea y esclera de

cerdo respectivamente. Dicho ensayo permitió conocer el perfil y parámetros de permeación del PF a través de dichas membranas biológicas y los resultados obtenidos permitieron concluir que el PF atraviesa con mayor facilidad la esclerótica que la córnea, evidenciando cantidades permeadas superiores en el caso de la primera. Sin embargo, los datos obtenidos muestran que el fármaco queda más retenido en la córnea que en la esclera. Estos resultados concuerdan con las diferencias anatómicas que presentan los dos tipos de tejidos utilizados como membranas de permeación.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jpba](http://www.elsevier.com/locate/jpba)

## Pranoprofen quantification in *ex vivo* corneal and scleral permeation samples: Analytical validation



C. Cañadas-Enrich<sup>a</sup>, G. Abrego<sup>b</sup>, H.L. Alvarado<sup>a</sup>, A.C. Calpena-Campmany<sup>a</sup>,  
A. Boix-Montañes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Department of Chemical and Instrumental Analysis, Faculty of Chemistry and Pharmacy, University of El Salvador, Ciudad Universitaria, San Salvador, El Salvador

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 June 2018

Received in revised form 9 July 2018

Accepted 12 July 2018

Available online 18 July 2018

#### Keywords:

Pranoprofen

Ocular permeability

HPLC-UV

cornea

Sclera

### ABSTRACT

The investigation of the ocular permeability and/or distribution of pranoprofen (PF), a non-steroidal anti-inflammatory drug, demands for the selective analysis of its transit through specific ocular membranes. Therefore, customised *ex vivo* permeation experiments through external ocular tissues (cornea and sclera) have been validated for this drug in addition to its HPLC-UV quantification following standard bioanalytical guidelines. Chromatographic conditions consist of an isocratic system to elute the drug with a C18 column with UV detection at 245 nm. Precision, expressed as the relative standard deviation (% RSD), ranged between 4.89 and 0.79% (intra-day) and between 9.02 and 2.14% (interday). Accuracy ranged between 5.15 and -1.92% in intra-day experiments and between 6.25 and -4.89% in inter-day experiments. Drug recovery from tissue samples was reproducible around 90% and considered satisfactory to adequately assess drug levels in target tissues. Results indicate that the procedure is valid for the quantitation of PF in those ophthalmic samples in the range of 6.5 µg/mL to 100 µg/mL. As a proof of concept, PF permeation profiles through porcine cornea and sclera with vertical diffusion cells have been generated and analyzed. Pilot experiments demonstrate its applicability to investigate permeation levels of PF from 22.31 µg/cm<sup>2</sup> (about a 20% of the dose) until 500 µg/cm<sup>2</sup> if required. Additionally, real tissue-retention samples were also generated to verify the goodness of this experimental setup.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Ocular inflammation is nowadays a highly prevalent clinical condition generally manifested as a mild conjunctivitis. Rarely can evolve to more dangerous situations, specially related with its chronification or when affects the posterior segment of the eye [1], even resulting in blindness. Its pharmacologic treatment is classically based on the topical drug instillation of corticosteroids, antihistamines or non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) [2] as eye drops. These dosage forms account for 90% of the marketed ophthalmic formulations due to its easy administration and acceptable patient compliance [3]. Nonetheless, the complexity of

the eye anatomy and the limited physicochemical properties of the drugs are challenging reaching the therapeutic target. For example, corticosteroids instillation is often used to reduce ophthalmic inflammatory reactions or postoperative pain. However, its chronic administration may induce certain adverse events such as the elevation of intraocular pressure. In avoidance of these side effects, a number of topical NSAIDs have been assessed as safer and possible more effective alternatives than the topical corticosteroids [4–6]. One of these NSAIDs is pranoprofen (PF), (CAS 52549-17-4,  $\alpha$ -methyl-5H-[1]-benzopyrano [2,3-b]-pyridine-7-acetic acid, Fig. 1). It is an amphoteric compound with carboxyl and pyridinic moieties, with a molecular weight of 255.27 g/mol. Although it is freely soluble in most organic solvents, it has poor aqueous solubility [7,8] as a function of the media pH.

PF eliminates inflammation by inhibiting the expression of cyclooxygenase (COX) enzymes [9]. It is usually indicated in chronic but non-bacterial inflammatory processes affecting the anterior segment of the eye [10,11] and in the treatment of postoperative pain of cataract or strabismus surgery [12]. PF is also useful

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [crcanade7.alumnes@ub.edu](mailto:crcanade7.alumnes@ub.edu) (C. Cañadas-Enrich), [escobar.ues@gmail.com](mailto:escobar.ues@gmail.com) (G. Abrego), [hl.alvarado@ub.edu](mailto:hl.alvarado@ub.edu) (H.L. Alvarado), [anacalpena@ub.edu](mailto:anacalpena@ub.edu) (A.C. Calpena-Campmany), [antoniboix@ub.edu](mailto:antoniboix@ub.edu) (A. Boix-Montañes).

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.015>

0731-7085/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.



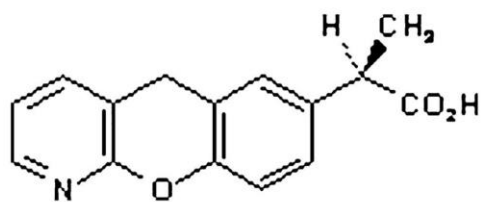


Fig. 1. Chemical structure of Pranoprofen [8].

to control the inflammation and pain in posterior segment such as in posterior chamber intraocular lens implantation, serous chorioretinopathy, uveitis or cystoid macular edema [9,13].

In this sense, the external surface of the eye globe, which includes cornea and sclera, is an interesting target for PF. Cornea is a multilayer avascular transparent structure composed by five hydrophilic and lipophilic layers of different thickness constituting an effective barrier to the absorption of drugs [14] administered in conjunctival *cul-de-sac* [15]. Besides that, sclera, the externally-visible white zone of the eye [16], is commonly more permeable to drugs than cornea [17]. Due to this fact, trans-scleral administration of drugs is considered an interesting noninvasive alternative to target the drug towards the posterior segment of the eye [18].

The evaluation of permeability and/or intraocular distribution of PF demands for the analysis of drug levels in its specific biophases and a prior analytical validation of the experimental procedure to adequately assess drug levels in these target tissues such as cornea in case of cataract surgery or sclera for uveitis. For ethical reasons it is especially interesting to arrange surrogate *ex vivo* studies to investigate the specific ocular distribution of PF, for example, in animal ophthalmic tissues. For these reasons, the main purpose of this work was to develop and validate a high performance liquid chromatography (HPLC) quantification method of PF, following standard bioanalytical guidelines, in permeation and/or retention samples of *ex vivo* diffusional studies using porcine cornea and sclera.

As a corollary, a pivotal determination of the intrinsic penetration of PF through the cornea or sclera from a saturated PF solution in pH 7.4 phosphate buffer solution (PBS) was run to estimate the ranges of quantification and the corresponding permeation parameters.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

The PF active ingredient was kindly supplied by Alcon Cusi Laboratories (Barcelona, Spain). Deionized water (resistivity > 18 MOhm.cm) was obtained from a MilliQ<sup>®</sup> Plus System. Methanol HPLC grade was from Fisher Scientific (Leicestershire, UK). Acetic acid, sodium chloride, disodic and monosodic orthophosphate, analytical grade, were from Panreac (Barcelona, Spain). Glucose, adenosine and glutathione were supplied by Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Any other chemicals and reagents used in this study were also of analytical or HPLC grade (Fisher Scientific, Leicestershire, UK).

### 2.2. Biological material

The pig eye has been adopted as an efficient *ex vivo* surrogate of human eye to carry out the permeation tests due to its better anatomical similarity [19] than the rabbit eye, the species most frequently used for its easier availability.

Table 1  
Composition of an artificial aqueous humor.

Product	Weight (g)
NaCl	6.52
KCl	0.36
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.15
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.16
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.12
NaHCO <sub>3</sub>	2.45
Glucose	0.99
Adenosine	0.13
Reduced glutathione	0.09
MilliQ <sup>®</sup> water	e.q.f. 1000 mL

Ocular specimens were obtained under veterinary supervision from residual individuals of female pigs (cross Landrace x Large White, 25–30 kg), previously used in surgical university practices and according to the Ethics Committee of Animals Experimentation at the University of Barcelona. Pigs were anesthetized with intramuscular administration of ketamine (3 mg/kg), xylazine (2.5 mg/kg) and midazolam (0.17 mg/kg). After surgical experimentation, the animals were sacrificed with an intravenous overdose of sodium thiopental, the eyes were immediately enucleated and corneas and scleras were excised *in situ* and transported to the laboratory immersed in artificial aqueous-humor solution (see Table 1) to be debrided and plain-prepared for the permeation experiments.

Permeation experiments of PF through ocular tissue were performed with vertical Franz-type diffusion cells (Vidra Foc, Barcelona, Spain) with a thermostatically controlled water jacket, an effective diffusional area of 0.64 cm<sup>2</sup> and ca. 4.5 mL of receptor compartment. These experiments generated two types of samples: PF permeated and PF retained in ocular tissue.

### 2.3. Solutions

Phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS) was prepared by dissolving the following chemicals: H<sub>2</sub>NaPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (5.2 g), HNa<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O (58.0 g), NaCl (5.6 g) in 2 L of deionized water. The pH was adjusted as required using a pH-Meter (Crison Instruments S.A., Alella, Spain) and the osmolarity was finally corrected to 300 mOsm/L with a Fiske osmometer 3320 (Advanced Instruments, Norwood, USA). Solution was stored at 5 °C until the moment of use.

Tissue saturated buffered saline pH 7.4 (PBSt) was prepared immersing minced corneal and sclera samples (half-and-half) in fresh PBS (1:100, w/w) during 6 h under continuous swing-shaking. This solution was a surrogate of the receptor blank solution of permeation experiments (see 2.7.1) and it was used to perform all the dilutions of calibrator curve standards.

Saturated PF solution (PFsat). Small aliquots (ca. 5–10 mg) of PF were iteratively added to 50 mL PBS in a glass beaker with magnetic stirring until a true saturation was visually observed. Dispersion stood up for 10 min and was filtered through Nylon 0.45 μm filter (Teknokroma, Barcelona) and stored at 20 °C until its use.

Due to the poor water solubility of PF and the great variety of values published in the literature, a confirmatory test was run to verify the PF solubility in PBS. 30 mg PF was added to 100 mL fresh PBS (pH 7.4) under magnetic stirring during 10 min. Afterwards, the flask was closed, protected from light and stored during 24 h at 20 °C to check the limpidity of the solution. The solution remained limpid, confirming that the solubility in our conditions was higher than 300 μg/mL. This result supported the concentration of the calibration stock solution.

200 µg/mL calibration stock solution. To prepare this solution, 20 mg PF were accurately weighed and dissolved in 100 mL of fresh PBS in a volumetric flask and stored protected from light [20].

Artificial aqueous humor. Based on the physiologic composition of aqueous humor and its properties [21–23], an artificial aqueous humor solution was prepared to immerse the eye samples during its transport to the laboratory. Its composition is detailed in Table 1. Osmolarity was corrected to 300 mOsm/L and the solution was filtered (Nylon 0.45 µm) to be stored at 5 °C.

#### 2.4. Preparation of calibration curve standards (CCS) and quality control standards (QCS)

All calibration solutions were prepared using PBSt as a solvent trying to simulate the real samples obtained in permeation tests.

Calibration curve standards (100, 75, 50, 25, 12.5, 6.25 µg/ml) of PF were prepared daily from the 200 µg/mL stock solution, diluting the corresponding aliquots of 200 µg/mL mother solution with PBSt in 10 mL glass volumetric flasks, and were stored at 5 °C until use.

Quality controls (100 and 6.25 µg/ml) were prepared the first day of the experimental study and stored at 5 °C (1 week maximum) to interleave aliquots in each run: at the beginning, in the middle and at the end of each sequence of samples.

#### 2.5. Chromatographic operating conditions

Chromatographic conditions proposed by Abrego et al. [24] were used to quantify the concentrations of PF by HPLC-UV in permeation samples.

The HPLC system consisted of an e2695 Alliance coupled with an UV-vis 2487 detector (Waters, Milford, MA, USA). The analytical column was a Kromasil® 100-5 C18 (100 mm × 4.6 mm) (SigmaAldrich Spain) and the isocratic mobile phase was methanol-acetic acid 1% (45:55, v/v). Samples prepared were stored at 5 °C in closed vials and injecting 10 µL of each sample. Drug was eluted with a flow rate of 1.0 mL/min at 5 °C and detected around 9 min at a wavelength of 245 nm.

#### 2.6. Analytical method validation

Validation concerned the evaluation of selectivity, linearity, range, accuracy and precision according to the usual rules of the European Medicines Agency [25] and Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria [26]. Determination limits, robustness and stability of solutions were also considered.

Table 2 summarizes the different samples used in this validation procedure.

##### 2.6.1. Selectivity

Specificity – selectivity is the ability to assess unequivocally the analyte in presence of other components which may be expected such as matrix or degradation products.

It was assessed using a set of triplicate samples from cornea or sclera permeation preliminary experiments obtained as described in 2.7.1 section. Samples were as follows: blanks of PBSt and blanks of PBSt spiked with PF at 6.25 µg/mL. Those samples were stored in closed vials and artificially degraded during 6 h at 37 °C prior to HPLC analysis. Additionally two last-time samples of cornea or sclera permeation experiments and two samples of PF extraction from each ocular tissue (cornea or sclera) were analyzed as described in 2.5.

Purity test was applied to PF chromatographic peak calculating the values of purity threshold and purity angle of the software of chromatography.

Resolution between the first peak adjacent to PF was estimated by the following formula:

$$R_S = \frac{1.18 \cdot (t_{Rb} - t_{Ra})}{b_{0.5a} + b_{0.5b}} \quad (t_{Rb} > t_{Ra}) \quad (1)$$

$t_{Ra}$  = migration time from the point of injection to the perpendicular dropped from the maxima of peak-a

$t_{Rb}$  = migration time from the point of injection to the perpendicular dropped from the maxima of peak-b

$b_{0.5a}$  = peak-a width at half-height.

$b_{0.5b}$  = peak-b width at half-height

A suitable selectivity was accepted when chromatographic peaks due to mobile phase or sample baseline do not interfere with active peak, the peak of PF is pure (purity threshold > purity angle) and resolution value between adjacent peaks is bigger than 1.5.

##### 2.6.2. Linearity and range

Linearity is the ability within a defined range to obtain results directly proportional to the concentrations (amount) of the analyte in the sample [25]. The range is the interval defined by the upper and lower concentrations of the tested drug for which it has been proved that the method has a suitable level of accuracy, precision and linearity [27].

Linearity was verified after the evaluation of precision and accuracy (see 2.6.4.) and calculated with different series of CCS at six concentration levels (from CCS6.25 to CCS100) in three replicates/day. Individual slopes between the instrumental signals versus the corresponding drug concentrations were calculated. The least squares regression was calculated based on Eq. (2) reporting the corresponding determination coefficients ( $r^2$ ):

$$y = Sb \cdot x + a \quad (2)$$

where  $x$  is the concentration,  $y$  is the chromatographic area,  $Sb$  is the value of the slope and  $a$  is the  $y$ -intercept. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to compare the ratios of peak area versus nominal concentration at each concentration searching for non-significant ( $p < 0.05$ ) differences. Results were processed using the Prism®, V.5.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

##### 2.6.3. Determination limits

Limits of detection ( $LOD$ ) and quantification ( $LOQ$ ) were calculated based on the standard deviation of the response and the slope of the calibration curve using the following equation:

$$LOD \text{ or } LOQ = K \cdot SD_{Sa} / Sb \quad (3)$$

where  $K$  is a factor related to the level of confidence (3.3 for  $LOD$  and 10 for  $LOQ$ ).  $SD_{Sa}$  is the standard deviation of the intercept ( $a$ ) and  $Sb$  is the slope of the calibration line [26].

##### 2.6.4. Accuracy and precision

2.6.4.1. Accuracy and precision in permeation samples. The six CCS of PF in PBSt from 6.25 to 100 µg/mL ( $n = 3$ ) were used to evaluate the intra-day and inter-day (in two different runs) accuracy and precision of the method.

Accuracy at each concentration was expressed as the mean percentage deviation or relative error ( $RE$ , %) calculated using the Eq. (4):

$$\%RE = [(C_{obs} - C_{nom}) / C_{nom}] \cdot 100 \quad (4)$$

where  $C_{obs}$  is the observed concentration and  $C_{nom}$  is the nominal concentration of each standard solution.

Precision was calculated and expressed as the relative standard deviation ( $RSD$ , %) of each replicate series, using the Eq. (5):

$$\%RSD = (SD / C_{obs}) \cdot 100 \quad (5)$$

**Table 2**  
Samples used in this validation scheme. Conditions and number of replicates are indicated.

Samples	SELECTIVITY				
	Cornea Run 1	Sclera Run 1			
Blank PBSt	n = 3	n = 3			
PBSt spiked at 6.25 µg/mL	n = 3	n = 3			
Last-time permeated	n = 2	n = 2			
Extracted samples	n = 2	n = 2			
ACCURACY AND PRECISION					
Samples	Inter-Run Analyst 1 Run 1 Intra_Run	Analyst 1 Run 2			
CCS-100	n = 3	n = 3			
CCS-75	n = 3	n = 3			
CCS-50	n = 3	n = 3			
CCS-25	n = 3	n = 3			
CCS-12.5	n = 3	n = 3			
CCS-6.25	n = 3	n = 3			
Samples	ROBUSTNESS				
	Different temperature Analyst 1 Run 2	Different analyst Analyst 2 Run 2 T 20 °C	Different column Analyst 1 Run 3 Another batch	Different samples Analyst 1 Run 3 PBSt	Analyst 1 Run 3 methanol : water
CCS-100	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3
CCS-6.25	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3

where *SD* is the standard deviation and  $C_{obs}$  is the nominal concentration.

**2.6.4.2. Recovery from ocular tissue matrices.** The accuracy of the extraction was tested with simulated samples as follows: 5 mL of PF 200 µg/mL and 300 mg tissue (cornea or sclera) accurately weighed were placed in a closed vial during 6 h at 32 °C in the case of cornea and 37 °C in the case of sclera to simulate the conditions of the permeation experiments. After this imbibition step, the biological tissues were taken apart and submitted to drug extraction as described in 2.7.2. This experiment was conducted in triplicate for cornea and sclera.

The residual initial solution for tissue imbibition and the eluates from each extraction procedure were collected in one by each replicate and analyzed as described in 2.5. and 2.7.2. to know the residual drug amount non-bound to tissue.

The concentration of drug retained in tissue (µg/g) was calculated from the respective difference of mass-balance divided by the corresponding weight of tissue. In other words, the differences (mean of expectable values) obtained between the initial amount of PF in the solution (1000 µg) and the final PF amount in the collected solutions after the tissue imbibition were considered to be the value of the respective amount of drug bound to tissue.

Solutions at these predicted concentrations were accurately prepared by dissolving the required weight of PF in PBSt and used as references of a 100% analytical recovery. Recovery (%) was calculated comparing the corresponding experimental result of extraction with this 100% value.

#### 2.6.5. Stability

The stability of PF solutions was evaluated storing in light-protected vials, two levels of calibration solutions (6.25 and 100 µg/mL PF in PBSt) at –20 °C, 5 °C and at room temperature (21 °C) during seven days. The solutions were analyzed at 0, 3 and 7 days post-processing as described in 2.5. This assay was carried out in triplicate and the obtained results were compared by ANOVA

test searching for significant differences ( $p < 0.05$ ) as a function of concentration, storage time ( $S_T$ ) and temperature.

#### 2.6.6. Robustness

This parameter searches for the reliability of an analysis with respect to deliberate variations in method parameters. Three aliquots of CCS6.5 and CCS100 µg/mL solutions were analyzed in the following conditions:

- 1 Injection at 20 °C instead of 5 °C as usually done
- 2 The same samples were analyzed using another batch of the same C18 HPLC column
- 3 A new set of calibration concentrations was prepared by another analyst (analyst 2 and analyzed in a different run at the same conditions described in Section 2.5.

An additional test was run to evaluate the influence of the solvent composition on the chromatographic performance. Aliquots of CCS100 were diluted in PBSt (1:10, v/v,  $n = 3$ ). Otherwise, samples of PF (100 µg/mL) dissolved in methanol:water (50:50, v/v) were also diluted in PBSt (1:10, v/v,  $n = 3$ ). Both series of samples were analyzed in the same run searching for potential variations in the retention time of PF or in chromatographic areas depending on the solvent composition.

The results obtained in these experiments were statistically compared by two-way ANOVA test using the Prism®, V.5.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

#### 2.7. Applicability of the method

##### 2.7.1. Permeation test

After dissection and isolation, the corneal membranes (Fig. 2) were mounted in diffusion cells placing distal and proximal surfaces facing to the donor and receptor compartments respectively. In case of sclera, the episcleral surface and the uveal surface were mounted in the same respective order.

Diffusion cells were previously filled with PBS (4.5 mL) and kept at  $32 \pm 0.5$  °C, in the case of cornea, and  $37 \pm 0.5$  °C in the case of

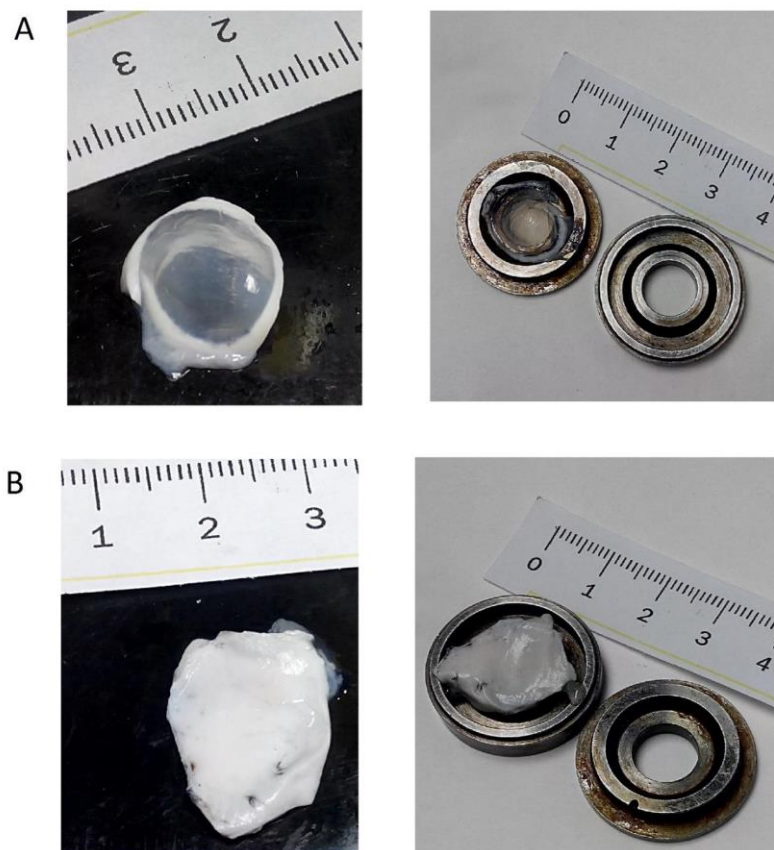


Fig. 2. Pig cornea (A) and sclera (B), isolated and mounted in cell holders.

sclera, to mimic the *in vivo* conditions, and stirred continuously at 200 rpm. 300  $\mu$ L PFsat was placed at the donor compartment and covered with Parafilm<sup>®</sup> to avoid the evaporation. Samples of receptor compartment (300  $\mu$ L) were withdrawn during 6 h at fixed times and replaced with the same volume of PBS after each sampling. The concentrations of PF in the samples were determined by HPLC. The cumulative PF permeated amount ( $\mu$ g) at each time point across the ocular tissue was calculated from PF concentration in the receptor medium and plotted as a function of time (min). This experiment was done in triplicate for both cornea and sclera.

At the end of the permeation test, the amounts of PF remaining in cornea or sclera ( $Q_R$ ) were quantified by drug extraction and HPLC as set out as follows in 2.7.2.

#### 2.7.2. Drug extraction

Immediately after permeation test, tissue specimens were carefully cleaned two times using a 0.05% sodium lauryl sulfate solution, washed with distilled water and carefully dried using filter-paper to ensure that there were no traces of drug in their superficial area. Next, cornea and sclera were thoroughly perforated using a 30 G needle (BD Ultra Fine<sup>™</sup>, Becton Dickinson, Fraga, Spain), immersed in 5 mL methanol:water (50:50, v/v) and sonicated two times for 15 min using an ultrasound bath [7]. All PF extraction fractions from cornea or sclera ( $n = 3$  for each biological membrane) were collected and diluted in PBSt (1:10, v/v) to be analyzed.

#### 2.7.3. Permeation and retention parameters

After the individual plotting of cumulative permeation profiles ( $y$ ) versus time ( $x$ ), the following parameters were calculated:

Lag time  $T_L$  (h) and Steady state flux  $J$  ( $\mu$ g/( $\text{cm}^2\text{s}$ )), were calculated as the respective  $x$ - intercept ( $T_L$ ) and the linear slope of the linear regression between permeated amounts and time ( $J$ ). The following equation was used:

$$J = (1/A) \cdot dQ/dt \quad (6)$$

where  $Q$  stands for the cumulative amount of drug permeated at time  $t$  and  $A$  is the exposed membrane area of the diffusion cell ( $0.64 \text{ cm}^2$ ).

Permeability coefficient  $K_p$  (cm/h) is defined as:

$$K_p = (P \cdot D)/L \quad (7)$$

where  $P$  is the partition coefficient,  $D$  is the diffusion coefficient inside the membrane and  $L$  is the membrane thickness. This value is commonly calculated using two intermediate parameters described as partition ( $P_1$ ) and diffusion ( $P_2$ ) related values [28,29] which are experimentally calculated with the following equations:

$$P_2 = 1/(6 \cdot T_L) \quad (8)$$

$$P_1 = J/(A \cdot C_0 \cdot P_2) \quad (9)$$

where  $T_l$  is the diffusional lag time,  $J$  is the transmembrane flux,  $C_0$  is the initial concentration of drug in the donor compartment and  $A$  is the exposed permeation area. Based on those results, permeability coefficient can be finally calculated as:

$$K_p = P_1 \cdot P_2 \quad (10)$$

Last time (6 h) permeation values ( $\mu\text{g}$ ). This result has additionally been taken as an indicator of the permeation extent.

Retained amount of drug in cornea or sclera ( $Q_R$ ) was calculated as follows:

$$Q_R = X(\mu\text{g})/Y(\text{g}) \quad (11)$$

where  $X$  is the amount of PF extracted from cornea or sclera and  $Y$  is the weight of the  $0.64 \text{ cm}^2$  tissue in each case because the weight of membranes differed significantly for each replicate.

Experimental data were compared with a *t* Student analysis using Prism<sup>®</sup>, v. 5.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Values were considered significant at  $p < 0.05$ .

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Analytical method validation

Guidelines [25,26] propose to use between three to six replicates for each validation test. In our case, tests were repeated in a maximum of three replicates/run to imitate a real routine analysis.

##### 3.1.1. Selectivity

Representative chromatograms are shown in Fig. 3. A set of peaks was detected regularly within the first 2 min in all samples. This fact was evaluated and attributed to the sample injection because it appeared regularly in all tested samples (CCS and permeation samples). The PF peak appeared at 9 min. Additionally, at 8 min, a minor peak was detected that was considered an impurity from ocular membranes because it appeared also in the blank of PBS spiked with PF (Fig. 3B), being more intense in permeation test samples (Fig. 3C) than in CCS samples. PF peak purity was accepted and resolution was in all cases higher than 1.5 because both peaks were particularly slender. The method can be considered acceptably selective for PF [25,26].

##### 3.1.2. Linearity and range

All the values of  $r^2$  were above 0.9996 and no statistical differences were found ( $p < 0.05$ ) after ANOVA test which indicated that the method was linear within the tested concentration range (6.5–100  $\mu\text{g/mL}$ ).

##### 3.1.3. Determination limits

Sample volume of receptor solution in Franz diffusion cells is not freely available to be removed and it was previously specified to be lower than 1/10 of total receptor volume ( $< 450 \mu\text{L}$ ). Accordingly, quantification limit must be known for an adequate estimation of permeation levels [30].

Based on the standard deviation of the response and the slope of the calibration curve, LOQ value was  $3.17 \pm 2.12 \mu\text{g/mL}$  (confidence level of 10) and LOD value was  $1.05 \pm 0.70 \mu\text{g/mL}$  (confidence level 3.3).

##### 3.1.4. Accuracy and precision

**3.1.4.1. Recovery from permeation samples.** Accuracy and precision were calculated from the back-calculated concentrations of each calibration curve (Table 3). Results were applied to permeation samples in PBS and retention samples in methanol:water 50:50, all diluted 1/10 with PBSt.

Accuracy was expressed as the percentage of recovery (% RE). Individual results ranged between 5.15 and -1.92% in intra-day

**Table 3**

Intra-run and inter-run accuracy (% RE) and precision (% RSD). Mean values of PF CCS samples.

Sample	Nominal concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Experimental concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) mean	% RSD	% RE
<b>WITHIN-RUN</b>				
CCS-100	100	99.60	1.76	-0.41
CCS-75	75	74.50	0.78	-0.66
CCS-50	50	50.58	3.32	1.16
CCS-25	25	24.94	1.69	-0.23
CCS-12.5	12.5	12.26	1.53	-1.89
CCS-6.25	6.25	6.54	4.18	4.61
<b>INTER-RUN</b>				
CCS-100	100	102.60	2.82	2.60
CCS-75	75	76.36	6.26	1.81
CCS-50	50	48.41	3.08	-3.19
CCS-25	25	25.85	8.66	3.38
CCS-12.5	12.5	11.92	2.38	-4.67
CCS-6.25	6.25	6.39	8.35	2.21

%RE: relative error; %RSD: relative standard deviation.

experiment and between 6.25 and -4.89% in inter-day experiments. As observed by Horwitz [31], the accuracy percentage is greater as lesser is the drug concentration.

Precision, expressed as the relative standard deviation (% RSD) of the predicted concentrations, ranged between 4.89 and 0.79% (intra-run) and between 9.02 and 2.14% (inter-run).

Both parameters were lower than 15% limit value in EMA guidelines [25] and statistical differences ( $p < 0.05$ ) were not found between CCS replicates at the same concentration level after ANOVA test. Therefore, the method was considered adequately accurate and precise for the entire interval (6.25–100  $\mu\text{g/mL}$ ).

**3.1.4.2. Recovery from ocular matrices.** The amounts of PF extracted from cornea (RC) and sclera (RS) are summarized in Table 4. Based on the OECD guideline [32] and assuming for cornea and sclera the same biological considerations as for skin, the amount of drug recovered should be  $100 \pm 10\%$  of the expected amount. Although not all the individual recoveries have resulted to be higher than the 90% limit value, results can be accepted as reproducible for its low variability.

##### 3.1.5. Stability

After ANOVA test considering storage temperature and time as the variability factors, significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between 6.25  $\mu\text{g/mL}$  samples at seven days kept at room temperature and values at a lower number of days (0 and 3 days). Other differences were not significant, leading to the conclusion that samples could be suitably stored at 5 °C for a week.

##### 3.1.6. Robustness

The ANOVA results show statistical differences in retention times ( $p = 0.038$ ) between samples CCS100 and CCS6.25 prepared with methanol:water (50:50, v/v) and the same samples (CCS100 and CCS6.25) prepared using PBSt. Samples in methanol:water (50:50, v/v) eluted with a slightly advanced time (from 9.23 to 8.94 min, mean values). Significance was achieved due to its low variability. No differences were observed in the chromatographic areas. This method can be considered to be sufficiently robust to carry out the future analysis.

Concerning the other conditions (temperature changes, lot number changes) no significant differences were found.

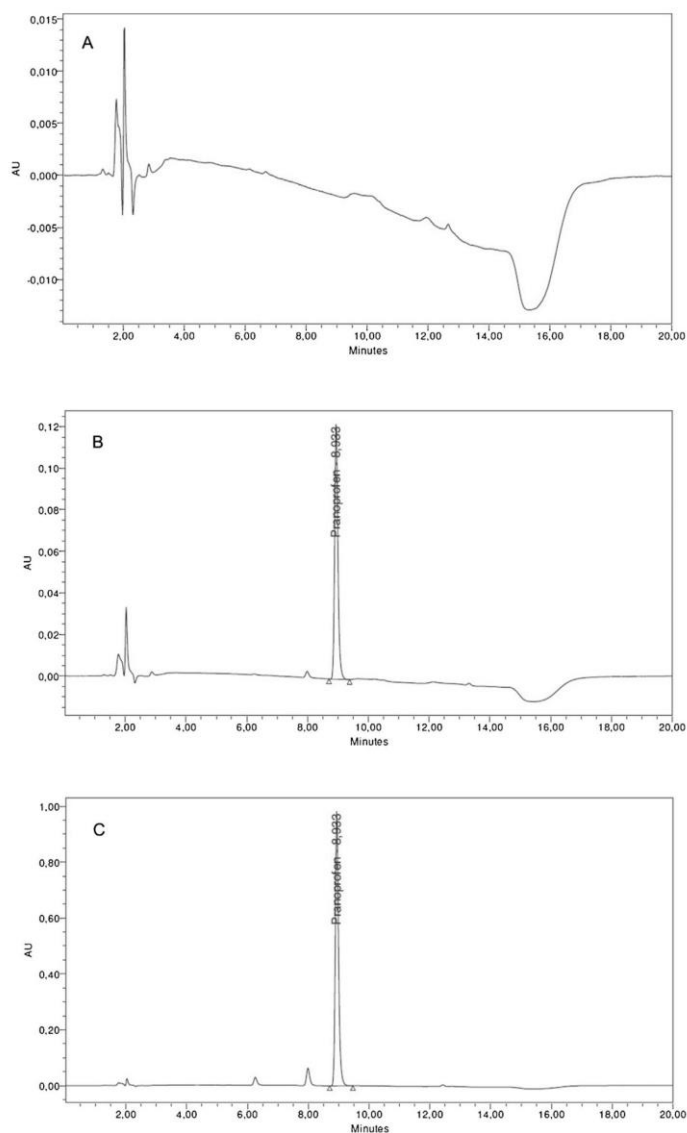


Fig. 3. HPLC chromatograms of: blank sample of sclera (A), blank sample spiked with PF (B), sclera after 2 h of permeation (C).

**Table 4**  
Results of validation of extracted method.

Membrane	Sample	PF amount in solutions ( $\mu\text{g}$ )			PF extracted amount ( $\mu\text{g}$ )		Recovery (%)	Mean	RSD (%)
		Before	After	Differences	Experimental non-extracted	Experimental extracted			
<b>Cornea</b>	RC-1	991.4	844.9	146.4	146.7	127.0	86.6	91.8	5.2
	RC-2		915.4	75.9	72.7	69.6	95.8		
	RC-3		923.6	65.8	68.9	64.0	92.9		
<b>Sclera</b>	RS-1	991.4	915.0	76.3	73.6	61.9	84.1	88.8	4.7
	RS-2		877.9	113.6	111.5	100.5	90.2		
	RS-3		865.0	126.4	124.4	114.6	92.1		

RC: Recovery from cornea; RS: Recovery from sclera.

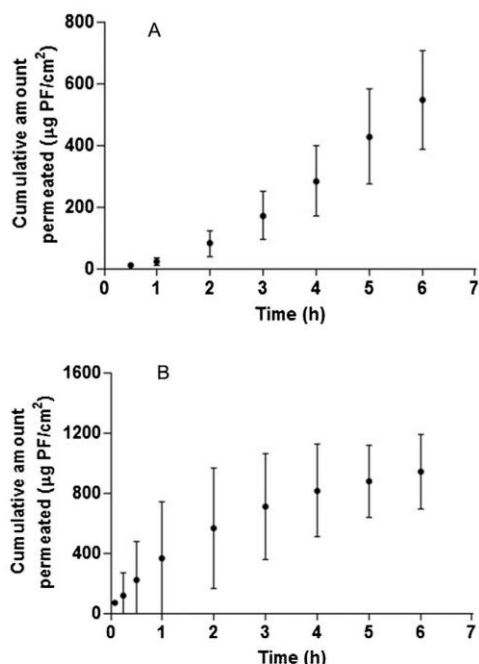


Fig. 4. Ex vivo corneal permeation (A) and scleral permeation (B) profiles of PF along 6 h expressed by mean  $\pm$  SD of three replicates ( $n=3$ ).

### 3.2. Application of the method

#### 3.2.1. Permeation experiments

The obtained values of LOQ (see 3.1.2.) imply that the minimum permeated amount in the diffusion cell (4.5 mL) that can be quantified is about 14.3  $\mu\text{g}$ , equivalent to 22.3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

The compliance of sink conditions [33] in the receptor compartment (receptor volume  $\geq$  three times the saturation volume) has been also included in this validation study as an initial requisite of the permeation test. From the different solubility values of PF found in the literature, a clear pH influence has been observed [34]. Concerning the reported values, the lowest ones are 252.72  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in water [35] and 380  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in water pH 5 [34]. The worst case has been taken in account although we have tested that solubility in our conditions is higher than 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PF. Assuming this value of 253  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the minimum detectable permeation of 14.3  $\mu\text{g}$  represents about a 1.25% of the saturation, confirming this requisite.

What is more, this minimum detectable amount of PF in receptor compartment is about 20% of the total amount of drug placed in donor compartment (75.9  $\mu\text{g}$ ).

Fig. 4 shows the permeation curves of PF through sclera and cornea.

The linear intervals allowed the calculation of permeation flux as the slope. Both permeation profiles may be explained as a function of sink-compliance. Corneal permeation exhibits a typical stationary permeation (linear) after an initial lag time. Conversely, sclera permeation curves are higher and convex, suggesting a decrease in the permeation flux after the second hour. Therefore, last-time concentrations in receptor compartment are 72 and 114  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively, which represent a 28% and a 45% of the PF solubility (assuming 252.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). In the second case, sink conditions are not satisfied, and the permeation slope loses its initial linearity becoming convex due to an inhibition of the concentration gradient.

Table 5

Mean parameters with SEM (standard error of the mean,  $n=3$ ) calculated after permeation study through pig's cornea and sclera.  $J$  is the flux,  $Kp$  is the permeability coefficient,  $P_1$  and  $P_2$  intermediate calculation parameters,  $T_L$  is the lag time. Statistical probabilities  $t$  Student test are indicated in the third line.

	$J$ ( $\mu\text{g}/\text{h}/\text{cm}^2$ )	$kp \times 10^2$ ( $\text{cm}/\text{h}$ )	$P_1 \times 10^2$ ( $\text{cm}$ )	$P_2$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$T_L$ ( $\text{h}$ )
Cornea	211.8 $\pm$ 19.9	0.03 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	1.74 $\pm$ 0.15
Sclera	288.0 $\pm$ 17.3	0.04 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	1.14 $\pm$ 0.22	0.17 $\pm$ 0.03
P	0.0447	0.0515	< 0.0001	0.0089	0.0005

Table 6

Amounts of PF permeated ( $Q_p$ ) and retained ( $Q_R$ ) in cornea and sclera expressed by mean and SEM (standard error of the mean,  $n=3$ ) after 6 h and results of statistical  $t$  Student test ( $p < 0.05$ ).

	$Q_p$ ( $\mu\text{g}$ )	$Q_R$ ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )
Cornea	547.2 $\pm$ 65.84	41.3 $\pm$ 1.4
Sclera	942.1 $\pm$ 101.7	24.5 $\pm$ 0.9
P	0.0311	0.0006

All those considerations demonstrate the validity of those current experimental conditions to investigate the permeation of PF from 22.3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (about a 20% of the dose) up to an hypothetical 100% of the donor dose (<500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Permeation levels below the lower limit are not reliable.

As can be seen in Table 5, the permeation levels of pranoprofen across sclera were significantly higher than in cornea. This fact can be explained by their different anatomical structures. It is commonly said that, although both tissues have similar thicknesses of about 900  $\mu\text{m}$  [36,37], sclera is about ten times more permeable than cornea [38,39]. In general terms, the permeability across sclera depends principally on the molecular radius and it decreases with increasing molecular weight and molecular radius [40,41]. Additionally, some authors suggest that sclera is more permeable to negatively charged molecules [42,43], supporting the high permeation levels of PF at physiological pH. Concerning the permeation rate in steady state, pranoprofen flux ( $J$ ) is faster through sclera than through cornea, where the PF in solution has to permeate through different hydro- and lipophilic layers [44–46] that, progressively, retain the drug until getting over the *estroma*, the proximal side of cornea.

After  $t$  test, statistical differences were observed for all permeation parameters between the cornea and sclera except for  $Kp$ . In fact, this phenomenon was an artefact [47] because  $Kp$  depends mutually on both  $P_1$  and  $P_2$ .  $P_1$  depends on the concentrations ratio of two phases at a boundary [48] and is much higher in cornea due to its higher impermeability. Conversely,  $P_2$  refers to the diffusion and is much higher in sclera (aqueous) than in cornea. As a result,  $P_1$  and  $P_2$  are offset in two membranes, which mask the true existence of statistical differences. Resulting  $Kp$  values of PF in both tissues are similar to those obtained [39] for some beta blockers such as propranolol or timolol.

Besides that, the amount of drug ( $Q_p$ ) that was able to cross the sclera was practically twice as much as cornea. Statistical differences ( $t$ -test,  $p < 0.05$ ) were demonstrated between cornea and sclera in  $Q_p$  and also  $Q_R$ .

#### 3.2.2. Amount of PF retained in ocular tissues

As summarized in Table 6 the pig's cornea retained ( $Q_R$ ) about 40  $\mu\text{g}/\text{g}$  of PF and the sclera retained about half the amount of drug than cornea. This high drug retention in cornea would enhance its prolonged delivery.

No equivalent results of PF retention have been found in the literature. A similar experiment [49] using rabbit cornea and Niflan® (commercial solution of PF 0.1% in Japan) showed about 5  $\mu\text{g}/\text{g}$  of PF retained by the cornea after 90 min applying 50  $\mu\text{L}$  PF solution

0.1% on the ocular membrane. Those results cannot be directly compared with ours for methodological differences concerning mainly the absence of lacrimal drainage, the use of a saturated drug solution in PBS instead of the 0.1% commercial formulation and the longer application time (6 h vs. 1.5 h). In case of other drugs for ophthalmic use, such as fluorquinolones, aqueous humor levels (with similar ionization and partition coefficients:  $-0.35$ ) [50] are commonly investigated reading in conjunction the effect of permeation and penetration. For example, moxifloxacin exhibits [51] a high ocular penetration as a result of the combination of a high lipophilicity that enhances corneal permeation with an acceptable aqueous solubility at physiological pH. Therefore, the calculation of permeation parameters dissociating tissue permeation and tissue retention allows to dissociate the contribution of each effect.

#### 4. Conclusion

A simple and optimal HPLC-UV method has been developed and validated for the quantification of PF in permeation and retention experiments carried out in pig's cornea and sclera. Based on the reported results, the method has been shown to be adequately selective, accurate, precise and robust. In addition, the validity of the experimental setup and the stability of PF solutions have been described.

Results of the applicability experiments confirm that the method can be useful for ocular distribution studies of pranoprofen.

#### Acknowledgement

The authors want to acknowledge Miss Lidia Gómez of the Belvitge Hospital for her assistance and her technical support in the management of the experimental animals.

#### References

- [1] R. Katara, S. Sachdeva, D.K. Majumdar, Aceclofenac oil drops: characterization and evaluation against ocular inflammation, *Pharm. Dev. Technol.* 23 (2018) 240–246.
- [2] A.K. Sharma, A. Arya, P.K. Sahoo, D.K. Majumdar, Overview of biopolymers as carriers of anti-inflammatory agents for treatment of diverse ocular inflammations, *Mater. Sci. Engin. C* 67 (2016) 779–791.
- [3] A. Patel, K. Cholkar, V. Agrahari, A.K. Mitra, Ocular drug delivery systems: an overview, *World J. Pharmacol.* 2 (2013) 47–64.
- [4] C. Jingyao, D. Fei, C. Wei, S. Xuguang, D. Yingping, H. Jing, Z. Mingchang, Y. Wenzhao, L. Zuguo, X. Lixin, Clinical efficacy of 0.1% pranoprofen in treatment of dry eye patients: a multicenter, randomized, controlled clinical trial, *Chin. Med. J.* 127 (2014) 2407–2412.
- [5] S.B. Yahia, R. Kahloun, N. Abroug, I. Kaibi, G. Laadhari, B. Jelliti, M. Khairallah, Comparative effect of topical diclofenac and topical dexamethasone on anterior chamber flare and postoperative pain following rhegmatogenous retinal detachment surgery, *Int. Ophthalmol.* 36 (2016) 623–628.
- [6] C. Cañadas-Enrich, H.L. Alvarado, A.C. Calpena, A.M. Silva, E.B. Souto, M.L. García, G. Abrego, *In vitro*, *ex vivo* and *in vivo* characterization of PLGA nanoparticles loading pranoprofen for ocular administration, *Int. J. Pharm.* 511 (2016) 719–727.
- [7] G. Abrego, H. Alvarado, E.Souto, B. Guevara, L. Halbaut, M.L. García, A.C. Calpena, Biopharmaceutical profile of hydrogels containing pranoprofen loaded PLGA nanoparticles for skin administration: *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* characterization, *Int. J. Pharm.* 501 (2016) 350–361.
- [8] Japanese Pharmacopoeia, Fifteenth edition, The Society of Japanese Pharmacopoeia, Tokyo, 2010, pp. 1018.
- [9] S. Hyun, Y. Hyung, Effect of a topical nonsteroidal anti-inflammatory agent (0.1% pranoprofen) on acute central serous chorioretinopathy, *Graefes Arch. Clin. Exper. Ophthalmol.* 254 (2016) 1489–1496.
- [10] Agencia española de medicamentos y productos sanitarios, SmPC Oftalar® Alcon-Cusi SA, Visited October, 1994.
- [11] R. Notivol, M. Martínez, M. Bergamini, Treatment of chronic nonbacterial conjunctivitis with a cyclo-oxygenase inhibitor or a corticosteroid, *Am. J. Ophthalmol.* 7 (1994) 651–656.
- [12] I. Akyol-Salman, D. Leçe-Sertöz, O. Baykal, Topical pranoprofen 0.1% is as effective anti-inflammatory and analgesic agent as diclofenac sodium 0.1% after strabismus surgery, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 23 (2007) 280–283.
- [13] Z. Jialiang, L. Xiaoxin, D. Dongsheng, Clinical assessment of pranoprofen eyedrops on postoperative inflammation of cataract extraction and non-infection inflammation of the anterior segments of the eye, *Chin. Ophthalm. Res.* 18 (2000) 560–564.
- [14] N.M. Davies, Biopharmaceutical considerations in topical ocular drug delivery, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.* 27 (2000) 558–562.
- [15] J. Barar, A. Aghanejad, M. Fathi, Y. Omid, Advanced drug delivery and targeting technologies for the ocular diseases, *Bioimpacts* 6 (2016) 49–67.
- [16] S. Alkassar, W. Woo, J. Dlay, Chambers, Sclera recognition: on the quality measure and segmentation of degraded images captured under relaxed imaging conditions, *Int. J. Biom. Inform.* 6 (2017) 266–275.
- [17] K.M. Hamalainen, K. Kananen, S. Auriola, K. Kontturi, A. Urtili, Characterization of paracellular and aqueous penetration routes in cornea, conjunctiva and sclera, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38 (1997) 627–634.
- [18] S. Nicoli, G. Ferrari, M. Quarta, C. Macaluso, P. Govoni, D. Dallatana, P. Santi, Porcine sclera as a model of human sclera for *in vitro* transport experiments: histology, SEM, and comparative permeability, *Mol. Vis.* 15 (2009) 259–266.
- [19] J. Ruiz-Ederra, M. García, M. Hernández, H. Urcola, E. Hernández-Barbáchano, J. Araiz, E. Vecino, The pig eye as a novel model of glaucoma, *Exper. Eye Res.* 81 (2005) 561–569.
- [20] K. Kobe, H. Otsu, Y. Kobe, Y. Kakogawa, Method for stabilizing pranoprofen and stable liquid preparation of pranoprofen, United States patent (1999) US005856345A.
- [21] E. Berardinis, O. Tieri, A. Polzella, N. Iuglio, The chemical composition of the human aqueous humour in normal and pathological conditions, *Exper. Eye Res.* 4 (1965) 179–186.
- [22] O.A. Snytnikova, A.A. Khlichkina, L.V. Yanshole, V.V. Yanshole, I.A. Iskakov, E.V. Egorova, D.A. Stepanov, V.P. Novoselov, Y.P. Tsentlovich, Metabolomics of the human aqueous humor, *Metabolomics* 13 (2017), <http://dx.doi.org/10.1007/s11306-016-1144-0>.
- [23] A. Macri, V. Marini, G. Sangalli, C. Fucile, M. Iester, F. Mattioli, An artificial aqueous humor as a standard matrix to assess drug concentration in the anterior chamber by high performance liquid chromatography methods, *Clin. Lab.* 61 (2015) 47–52.
- [24] G. Abrego, H. Alvarado, E.B. Souto, B. Guevara, L. Halbaut, A. Parra, A.C. Calpena, M.L. García, Biopharmaceutical profile of pranoprofen-loaded PLGA nanoparticles containing hydrogels for ocular administration, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 95 (2015) 261–270.
- [25] Guideline on Bioanalytical Method Validation, European Medicines Agency (EMA), London, 2011, 21 July of 2011 [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf).
- [26] Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), Validación de métodos analíticos, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), Barcelona, España, 2001.
- [27] R. Sanz, B. Clares, M. Mallandrich, I. Casals, D. Bellido, A.C. Calpena, Validation of doxepin quantitative determination methods for their application to *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* studies, *Curr. Pharm. Anal.* 11 (2015) 269–277.
- [28] A. Boix, C. Peraire, R. Obach, J. Domenech, Estimation of transdermal permeation parameters in non-stationary diffusion experiments. Application to pre-treatment studies with terpenes, *Pharm. Res.* 22 (1) (2005) 91–102, <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-004-9014-2>.
- [29] R.H. Guy, J. Hadgraft, Physicochemical interpretation of the pharmacokinetics of percutaneous absorption, *J. Pharmacokin. Biopharm.* 11 (1983) 189–203.
- [30] H.L. Alvarado, G. Abrego, M.L. Garduño, B. Clares, M.L. García, A.C. Calpena, Development and validation of a high performance liquid chromatography method for the quantification of ursolic/oleic acids mixture isolated from *Plumeria obtusa*, *J. Chrom B* 983–984 (2015) 111–116.
- [31] W. Horwitz, L.R. Kamps, K.W. Boyer, Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63 (1980) 1344–1354.
- [32] OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Skin Absorption: *In Vitro Method*, 2018 <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppldocs/feddocs/occd/occdtg428-508.pdf>.
- [33] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), 5.17.1. Recommendations on Dissolution Testing, 07/2010:51701 in European Pharmacopoeia V 8.0, 2018.
- [34] American Chemical Society, Scifinder Database, 2007, Visited 2017.
- [35] EPA database Chemistry Dashboard, United States Environmental Protection Agency, Visited 27th February 2017.
- [36] I. Sanchez, R. Martin, F. Ussa, I. Fernandez-Bueno, The parameters of the porcine eyeball, *Graefes Arch. Exper. Ophthalmol.* 249 (2011) 475–482.
- [37] T.W. Olsen, S. Sanderson, X. Feng, W.C. Hubbard, Porcine Sclera, Thickness and surface area, *Inv. Ophthalm. Vis. Sci.* 43 (2002) 2529–2532.
- [38] J. Barar, M. Asadi, S.A. Mortazavi-Tabatabaei, Y. Omid, Ocular drug delivery; Impact of *in vitro* cell culture models, *J. Ophthalm. Vis. Res.* 4 (2009) 238–252.
- [39] I. Ahmed, R. Gokhale, M.V. Shah, T.F. Patton, Physicochemical determinants of drug diffusion across the conjunctiva, sclera and Cornea, *J. Pharm. Sci.* 76 (1987) 583–586.
- [40] Y. Duan, Y.Z. Yang, X.T. Huang, D. Lin, Research on the comparison of the demethylvancomycin's diffusion-deposition characteristics in the ocular solid tissues of sustained subtenon drug delivery with subconjunctival injection, *Drug Del.* 24 (2017) 92–98.
- [41] J. Ambati, C.S. Canakis, J.W. Miller, E.S. Gragoudas, A. Edwards, D.J. Weissgold, I. Kim, F.C. Delori, A.P. Adams, Diffusion of high molecular weight compounds through sclera, *Inv. Ophthalm. Vis. Sci.* 41 (2000) 1181–1185.
- [42] M.A. Grimaudo, E. Tratta, S. Pescina, C. Padula, P. Santi, S. Nicoli, Parameters affecting the transscleral delivery of two positively charged proteins of comparable size, *Int. J. Pharm.* 521 (2017) 214–221.



- [43] S. Pescina, P. Govoni, M. Antopolosky, L. Murtomäki, C. Padula, P. Santi, S. Nicoli, Permeation of proteins, oligonucleotide and dextrans across ocular tissues: Experimental studies and literatura update, *Pharm. Drug Del. Pharm. Technol.* 104 (2015) 2190–2202.
- [44] K. Cholkar, S.P. Patel, A.D. Vadlapudi, A.K. Mitra, Novel strategies for anterior segment ocular drug delivery, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 29 (2013) 106–123.
- [45] D. Ghate, H.F. Edelhauser, Ocular drug delivery, *Exp. Opin. Drug Del.* 3 (2006) 275–287.
- [46] Qi Cheng Chih Liu, Wei Lan, Changlu He, Chunjuan Nie, Tonghua Zhang, Tongying Xu, Jiang, Siling Wang, Octa-arginine modified lipid emulsions as a potential ocular delivery system for disulfiram: A study of the corneal permeation, transcorneal mechanism and anti-cataract effect, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 160 (2017) 305–314.
- [47] A. Boix, R. Obach, C. Peraire, J. Domenech, J. Moreno, Robustness of a diffusional equation data-fitting, *Proceed. Persp. Percutan. Pen.* 5B (1997) 70–72.
- [48] A.M. Barbero, H.F. Frasch, Effect of stratum corneum heterogeneity, anisotropy, asymmetry and follicular pathway on transdermal penetration, *J. Control. Release* 260 (2017) 234–246.
- [49] T. Ogawa, K. Ohara, H. Shimizu, Effects of pretreatment with mydriatics on intraocular penetration of 0.1% pranoprofen, *Jpn. J. Ophthalmol.* 37 (1993) 47–55.
- [50] M.H. Langlois, M. Montagut, J.P. Dubost, J. Grellet, M.C. Saux, Protonation equilibrium and lipophilicity of moxifloxacin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 389–393.
- [51] J.P. McCulley, J.D. Aronowicz, W.E. Shine, Fourth-generation fluoroquinolone penetration into the aqueous humor in humans, *Ophthalmol.* 13 (2006) 955–959.

## 4. DISCUSIÓN

---



En estudios previos a este trabajo de investigación, se utilizó la técnica de desplazamiento del disolvente descrita por Fessi y colaboradores (56) para preparar un sistema nanoestructurado de liberación controlada de pranoprofeno (PF) a partir de una matriz polimérica. La optimización de dicho sistema polimérico se realizó usando un diseño factorial compuesto  $2^4$  principal (63). A partir de los resultados obtenidos en este análisis, se seleccionaron dos formulaciones (PF-F1NPs y PF-F2NPs) para llevar a cabo estudios adicionales. En esta dirección, el presente trabajo de investigación versa sobre la caracterización *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de las formulaciones PF-NPs optimizadas como una estrategia innovadora para el tratamiento del dolor y los procesos inflamatorios asociados a patologías oculares. Asimismo, en este trabajo se han dedicado esfuerzos significativos a validar una metodología bioanalítica que permita la cuantificación del PF contenido en muestras provenientes de ensayos en los que se han visto directamente implicadas distintas membranas biológicas de la vía ocular.

Para cumplir con los objetivos planteados, se prepararon las formulaciones PF-F1NPs y PF-F2NPs según lo describe Abrego y colaboradores (63) mediante la técnica de desplazamiento del disolvente. Esta técnica fue la escogida por tratarse de un método rápido, reproducible y económico que permite la obtención de partículas de un tamaño homogéneo y adecuado para su instilación ocular con una elevada eficiencia de encapsulación (56, 57). El polímero seleccionado para formar la matriz polimérica de dichas formulaciones fue el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA 75:25; Resomer<sup>®</sup> 753S) por tratarse de un compuesto biodegradable, no tóxico, y de degradación lenta adecuado para la obtención de sistemas nanoestructurados de liberación controlada de fármacos (64). Asimismo, sus características de biodegradabilidad y atoxicidad le han conferido la aprobación para su uso en humanos por parte de la FDA. La acetona fue el solvente escogido como medio orgánico, debido a la baja solubilidad del PF en agua y se seleccionó el polivinil alcohol (PVA) como tensioactivo por sus características de hidrofilia, biocompatibilidad y su capacidad para estabilizar las PF-NPs formuladas por esta técnica. La composición y características de pH de cada formulación se describen en la Tabla 1 del Artículo I.

Las formulaciones PF-NPs se caracterizaron fisicoquímicamente midiendo el tamaño promedio de partícula (TMP), el índice de polidispersión (IP) y el potencial Z (ZP) mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS), también conocida como dispersión de luz cuasi elástica (QELS) o espectroscopía de correlación de fotones (PCS).

El tamaño de partícula es un factor importante a tener en cuenta durante el desarrollo de un sistema nanoestructurado de aplicación tópica ocular puesto que, las partículas de mayor tamaño (800 - 1000 nm) pueden inducir irritación y provocar un incremento en el drenaje nasolacrimal reflejo, lo que conlleva un aumento de la fracción de dosis eliminada de la superficie ocular y disminuye la biodisponibilidad del fármaco aplicado. En cambio, las partículas de menor tamaño (aprox. 100 nm) tienden a penetrar con mayor facilidad las barreras oculares, incrementando la biodisponibilidad del fármaco con el que están cargadas (65-67). En el caso que nos ocupa, ambas formulaciones (PF-F1NPs y PF-F2NPs) presentaron TMPs de aproximadamente 350 nm.

Por otro lado, el IP hace referencia a la distribución de los distintos tamaños de partícula en una suspensión mientras que el ZP, ofrece información sobre la carga eléctrica superficial de dichas partículas, lo que a su vez es una medida indirecta de la estabilidad física de la suspensión (68). Se conoce que valores de ZP elevados, ya sean positivos o negativos, tienden a estabilizar las suspensiones por la repulsión electrostática que se da entre sus partículas, encargada de prevenir su agregación (69). PF-F1NPs y PF-F2NPs exhibieron IPs de 0.1, estableciéndose así como sistemas monodispersos con un tamaño de partícula uniforme. Además, ambas formulaciones presentaron una carga neta negativa con valores de -7.41 mV y -8.50 mV respectivamente. Los resultados obtenidos durante la caracterización fisicoquímica de las formulaciones PF-NPs se encuentran en concordancia con los reportados en los estudios previos realizados por Abrego y colaboradores (63).

Al mismo tiempo, las formulaciones PF-NPs se caracterizaron morfológicamente a través de imágenes tomadas por microscopía de transmisión electrónica (TEM). Dichas imágenes revelaron PF-NPs de forma esférica, sin formación de agregados y con un diámetro promedio de 350 nm (Figura 1, Artículo I), lo que va en concordancia con los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica de las mismas.

La eficiencia de encapsulación de las formulaciones PF-NPs (EE%) se determinó de forma indirecta al cuantificar la concentración de fármaco libre en el medio de dispersión (Ecuación 1., Artículo I), obteniéndose por diferencia que el 80% del PF se encontraba encapsulado.

En el desarrollo de una nueva formulación deben considerarse los beneficios terapéuticos que vayan a obtenerse de su uso y al mismo tiempo, las desventajas e inconvenientes que puedan derivarse de éste. En este sentido, en el presente trabajo de investigación se evaluó ***in vitro* el perfil de toxicidad celular** que presentan las formulaciones PF-NPs y se comparó con el de las NPs blancas (NPs sin fármaco) y

con el de una solución de PF en tampón fosfato (*Phosphate Buffer Solution* o PBS). El ensayo se realizó usando la línea celular Y-79 de retinoblastoma humano siguiendo el método propuesto por Fanguero y colaboradores (70). Se trata de una línea celular no adherente que crece en suspensión formando pequeños agregados multicelulares en forma esférica o de racimo. Se escogió trabajar con esta línea celular por ser inmortal en el medio de cultivo adecuado, ya que puede conservarse por congelación en nitrógeno líquido para la repetición de los ensayos pertinentes o para su uso posterior. La viabilidad celular fue determinada a través del método *Alamar Blue* propuesto por Fanguero (70), en el que para conocer los porcentajes de viabilidad celular respecto al control (células no tratadas) se midió la absorbancia de la forma reducida y la de la forma oxidada del compuesto *Alamar Blue* a 570 nm y 620 nm respectivamente. La viabilidad celular se expresó entonces como porcentaje de reducción de este compuesto. Las concentraciones ensayadas para cada una de las formulaciones fueron preparadas teniendo en consideración los datos expuestos por Ayaki y colaboradores (71).

Las Figura 2 y 3 del Artículo I, muestran los resultados derivados del ensayo *in vitro* de citotoxicidad para las formulaciones PF-NPs, las NPs blancas y la solución de PF en PBS (1.5 mg/mL). Los datos obtenidos muestran que concentraciones iguales o inferiores a 75 µg/mL para la formulación PF-F1NPs y a 100 µg/mL para la formulación PF-F2NPs, no producen toxicidad sobre las células Y-79. Sin embargo, concentraciones de 150 µg/mL para la formulación PF-F1NPs y de 200 µg/mL para la formulación PF-F2NPs, evidenciaron una viabilidad celular cercana al 20%. En el caso de las NPs blancas, en la concentración más alta ensayada para la formulación BlankPF-F1NPs (1000 µg/mL) y para la formulación BlankPF-F2NPs (666.7 µg/mL), la viabilidad celular resultó inferior al 70%. Respecto a la solución de PF en PBS, concentraciones iguales o superiores a 750 µg/mL revelaron una disminución en el porcentaje de viabilidad celular, resultando esta inferior al 70% en comparación con el grupo control en ambos tiempos de incubación. Sin embargo, concentraciones de hasta 300 µg/mL pueden considerarse seguras puesto que no causan una reducción de la viabilidad celular por debajo del 70% con respecto al grupo control (72). La baja toxicidad observada para la solución de PF en PBS respecto a las NPs puede atribuirse a que el fármaco en solución es susceptible de degradarse originando metabolitos menos tóxicos para las células. Por otro lado, los resultados obtenidos para las NPs pueden ser debidos, en parte, a la disminución del medio de cultivo celular tras las diluciones realizadas. Varias muestras de las ensayadas se obtuvieron mediante dilución (1:1) de la muestra problema en un medio de cultivo sin suero

bovino fetal (FBS) para conseguir las concentraciones más altas, lo que limitó el suministro de nutrientes a las células. Además, la propia presencia de las NPs en el medio entorpece el acceso de las células al oxígeno y los nutrientes, lo que se traduce en una disminución de su viabilidad. Al mismo tiempo, que las formulaciones PF-NPs resultaran más tóxicas que las NPs blancas puede atribuirse a la presencia del fármaco, ya que el polímero (PLGA) y el tensioactivo (PVA) no resultan tóxicos a nivel celular (64, 73). En el caso de las formulaciones PF-NPs, el PF encapsulado se encuentra protegido de la degradación que puede experimentar por la presencia de agua en el medio de dispersión, por lo que se libera continuamente desde la matriz polimérica en su forma estable para interactuar así con las células causando toxicidad. En este sentido, un estudio reciente realizado por Li y colaboradores (74) en concordancia con los estudios anteriores desarrollados por Mueller y colaboradores (75), reportó que las soluciones de PF en el rango de concentraciones 62.5 - 100 µg/mL indujeron apoptosis y disminuyeron severamente la viabilidad celular en células endoteliales de la córnea humana de forma dosis-tiempo dependiente. Además, el pequeño tamaño de estos sistemas nanoestructurados favorece su internalización a nivel celular y su gran área superficial permite la liberación rápida pero controlada del fármaco que contienen (76-78). Al estar protegido, el PF se degrada más lentamente que al estar en solución, lo que conlleva que se encuentre durante más tiempo en contacto con las células en su forma activa. Todo ello va en concordancia con los resultados obtenidos por Parveen y colaboradores (79).

Por otro lado, en las fases pre-clínicas del desarrollo de una nueva forma farmacéutica resultan esenciales un conjunto de ensayos que permitan dilucidar su comportamiento, y el del fármaco que contienen, al entrar en contacto con su tejido diana. Para tal fin, se llevaron a cabo una serie de ensayos **ex vivo de permeación** trans-corneal y trans-escleral en distintos modelos animales de experimentación, bajo la supervisión y el consentimiento del Comité Ético de animales de experimentación de la Universidad de Barcelona.

Teniendo en consideración que cuando se pretende la detección y cuantificación de un fármaco en muestras provenientes de estudios en los que se ve implicado el tejido ocular pueden producirse algunas interferencias en las lecturas debido a la presencia de compuestos derivados de estas membranas, resulta imprescindible que el método escogido sea lo suficientemente sensible como para aislar el analito y poderlo identificar y cuantificar de forma inequívoca. Debido a lo cual, en el presente trabajo de investigación se dedicaron esfuerzos significativos dirigidos a validar un método bioanalítico de cuantificación de PF por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

siguiendo la guía propuesta por la EMA (62) y las directrices de la Asociación Española de Farmacéuticos de Industria (AEFI) (60). Con el propósito de que las posibles interferencias derivadas de la presencia del tejido ocular en las muestras quedaran latentes ya en las soluciones patrón, fueran así identificadas y no desvirtuaran las lecturas correspondientes a ensayos posteriores, se preparó una solución de PBS (PBSt) con una pequeña proporción de tejido ocular porcino (córnea y esclera, 1:100, p/p), la cual fue utilizada como solvente para la preparación de los patrones de calibrado (CCS). La composición de todas las soluciones patrón preparadas para llevar a cabo este estudio queda detallada en los apartados 2.3 y 2.4 del Artículo II. Mientras que las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las propuestas en las investigaciones previas de Abrego y colaboradores (80). Brevemente, la validación del método se llevó a cabo en un equipo Waters Co. con un detector UV-Vis 2487, una columna analítica Kromasil® 100-5 C18 (100 mm x 4.6 mm), una fase móvil isocrática metanol:ácido acético 1% (45:55, v/v) con un flujo constante de 1 mL/min y un sistema de inyección de 10 µL de muestra. El pico correspondiente al PF se detectó alrededor de los 9 minutos a una longitud de onda de 245 nm.

Para la **validación del método bioanalítico** se prepararon 6 soluciones patrón de PF en PBSt (CCS = 6.25 – 100 µg/mL, Tabla 2., Artículo II) en tres replicados para evaluar la **exactitud** y **precisión** del método *intra* e *inter*-día. La exactitud fue expresada como porcentaje del error relativo (%RE) y la precisión como porcentaje de la desviación estándar relativa (%RSD) (Tabla 3., Artículo II). El %RE estuvo entre 5.15 y -1.92% en los ensayos *intra*-día y entre 6.25 y -4.89% en los experimentos *inter*-día. En el caso de la precisión, el %RSD se encontró entre 4.89 y 0.79% en las lecturas *intra*-día y entre 9.02 y 2.14% en las correspondientes al análisis *inter*-día. Asimismo, tras un análisis de varianza ANOVA, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre los distintos replicados de las curvas de calibrado preparadas a la misma concentración. Los resultados evidenciaron que el método escogido presentaba una exactitud y precisión adecuadas ya que ambos parámetros mostraron valores por debajo de 15%, límite establecido por la guía de la EMA (62) para considerar que dicho método presenta una exactitud y precisión aceptables.

Las mismas CCS fueron utilizadas para estudiar la **linealidad** de la técnica en tres replicados/día. Tras un análisis de tipo ANOVA no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre los distintos replicados para las mismas concentraciones con lo cual, el método demostró ser lineal en el rango de concentraciones ensayado (6.5 - 100 µg/mL).



Los **límites de detección (LOD)** y **de cuantificación (LOQ)** fueron de  $1.05 \pm 0.70 \mu\text{g/mL}$  y  $3.17 \pm 2.12 \mu\text{g/mL}$  respectivamente.

Paralelamente, se realizó un ensayo con el fin de comprobar que el **método de recuperación** de la cantidad de fármaco embebido en las membranas biológicas tras los ensayos *ex vivo* de permeación del PF a través de la córnea y la esclera era adecuado para tal fin. La metodología utilizada para obtener estos datos queda detallada en la sección 2.6.4.2 del Artículo II y los resultados pueden observarse en la Tabla 4 del mismo artículo. Teniendo en consideración dichos datos, el método de recuperación se estableció como preciso ya que el valor de *%RSD* fue inferior al 15%, tal y como describe la guía de validación de procesos bioanalíticos (62). Por otro lado, se utilizó la guía OECD (81) como referencia para saber si el porcentaje de recuperación ofrecido por la técnica escogida podía considerarse adecuado. En ella, se detalla que la cantidad de fármaco extraído debe suponer un  $100 \pm 10\%$  de la cantidad esperada. A pesar de que no todas las muestras individuales mostraron un porcentaje de recuperación igual o superior al 90%, si estuvieron muy cercanas a dicho valor y se aceptaron como reproducibles debido a su baja variabilidad.

Por otra parte, con la finalidad de asegurar la **estabilidad** de las CCS durante todo el proceso de validación, se dispusieron en viales opacos dos muestras de las curvas de calibrado (CCS6.25 y CCS100) recién preparadas y se sometieron a temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $5^{\circ}\text{C}$  y  $21^{\circ}\text{C}$  (temperatura ambiente) durante 7 días. Dichas muestras se analizaron por HPLC a los 0, 3 y 7 días post-preparación y antes de proceder a las lecturas, se llevó a cabo un examen visual de las mismas con la finalidad de valorar la aparición de signos de inestabilidad como la precipitación, la pérdida de la limpidez, el cambio de color, etc. Ninguno de estos signos se hizo evidente tras los 7 días de preparación para ninguna de las muestras sometidas al ensayo. Los resultados de las lecturas por HPLC se compararon mediante un test ANOVA considerando la temperatura y el tiempo post-preparación como factores de variabilidad. Únicamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) para las muestras CCS6.25 mantenidas a  $21^{\circ}\text{C}$  y las muestras a la misma concentración del resto de días (0 y 3), lo que hizo concluir que éstas pueden almacenarse a  $5^{\circ}\text{C}$  sin que sufran cambios significativos durante al menos una semana.

La **robustez** del método se valoró mediante el sometimiento de dos muestras CCS (6.25 y  $100 \mu\text{g/mL}$ ) a diferentes condiciones: inyección de la muestra en el cromatografo a  $20^{\circ}\text{C}$  en vez de a  $5^{\circ}\text{C}$ ; análisis mediante otro lote de la columna Kromasil<sup>®</sup> C18; y preparación de un nuevo set de CCS por otro analista, aunque

analizando estas muestras en las mismas condiciones cromatográficas que las utilizadas para la validación de la metódica. Tras un análisis de varianza tipo ANOVA, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) debidas a las variaciones aplicadas con respecto a los resultados ofrecidos por el método en proceso de validación.

Además, quiso conocerse la influencia de la composición del disolvente en el rendimiento cromatográfico. Para ello, por un lado se diluyeron las muestras en PBSt (1:10, v/v) y por otro, se diluyeron previamente en metanol:agua (50:50, v/v) y posteriormente en PBSt (1:10, v/v). Tras el análisis ANOVA correspondiente, se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.038$ ) entre las muestras CCS100 y CCS6.25 preparadas en metanol:agua (50:50, v/v) y las muestras preparadas usando como solvente el PBSt. Las primeras, evidenciaron un ligero acortamiento del tiempo de retención ( $T_R$ ) del PF, eluyendo en este caso a los 8.94 min de media. Sin embargo, no se observaron diferencias en las áreas aportadas por los cromatogramas con respecto a las muestras obtenidas por el procedimiento en proceso de validación. Todo ello, evidenció que el método analítico resulta lo suficientemente robusto para llevar a cabo los futuros análisis.

Se valoró la **selectividad** del método mediante el análisis detallado de los cromatogramas obtenidos de: un blanco de PBSt; una solución de PF en PBSt (6.25  $\mu\text{g/mL}$ ); un blanco extraído del compartimento receptor de las células de difusión de Franz antes de la siembra de la solución de PF sobre las membranas de permeación; los dos últimos tiempos del ensayo de permeación trans-corneal y trans-escleral; y dos muestras (córnea y esclera) del ensayo de extracción de la cantidad de PF retenida en los tejidos, todo ello en distintos replicados. La Figura 3. del Artículo II muestra algunos de los cromatogramas obtenidos para dichas muestras. En ellos puede observarse una secuencia de picos durante los 2 primeros minutos identificada como “ruido” provocado por la inyección de la muestra, ya que apareció en todas las muestras ensayadas con la misma intensidad. Se identificó el PF a los 9 minutos aunque, alrededor de los 8 minutos apareció un pequeño pico considerado una impureza de los tejidos oculares, debido a que su intensidad fue siendo cada vez más alta cuanto mayor había sido el contacto de las soluciones con los tejidos. Asimismo, este pico no pudo considerarse debido a productos de degradación del fármaco, porque también se hizo evidente en las soluciones blanco (sin fármaco). Se concluyó que el método de análisis era un método selectivo, puesto que el pico del PF ofreció en todos los casos una resolución superior a 1.5 (60), lo que indicó que se encontraba

lo suficientemente distante respecto a los picos adyacentes como para ser adecuadamente identificado y cuantificado.

Con la intención de completar dicha validación y teniendo en cuenta que algunas investigaciones apuntan a que la vía trans-escleral podría considerarse una vía de ingreso de los fármacos a este tejido, o incluso a zonas más internas del ojo (21, 25, 82, 83), en este trabajo se investigó el perfil y los parámetros de permeación del PF como fármaco no solo a través de la córnea, sino también a través de la esclerótica. Asimismo, y considerando las características anatomofisiológicas oculares de los animales de experimentación más utilizados para llevar a cabo este tipo de ensayos (conejos), se decidió realizar dichos estudios de permeación *ex vivo* en un modelo experimental lo más próximo al humano posible, el cerdo (84, 85).

Inicialmente se obtuvo bajo supervisión veterinaria, el tejido ocular de cerdo cruce *Landrace x Large White* proveniente de especímenes utilizados en prácticas quirúrgicas no oculares. Una vez enucleados, los ojos se mantuvieron en humor acuoso preparado previamente (Tabla 1., Artículo II) y utilizado como medio de transporte hasta el laboratorio de análisis. La córnea y la esclera fueron debidamente debridadas del resto del tejido ocular (Figura 2., Artículo II) y se utilizaron para llevar a cabo el ensayo *ex vivo* de permeación. Brevemente, se llenó el compartimento receptor (4.5 mL) con una solución de PBS 7.4 y se dispusieron los tejidos entre el compartimento dador y el receptor de las células de difusión vertical de Franz termoreguladas a  $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$  y  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  para la córnea y la esclera respectivamente. Se extrajo una primera muestra del compartimento receptor a modo de blanco, se sembró una solución a saturación de PF sobre las membranas biológicas y se fueron extrayendo muestras del compartimento receptor a lo largo de 6 h. Una vez finalizado este estudio, se procedió a la extracción y cuantificación del fármaco retenido en la córnea y la esclera de cerdo.

La Figura 4 del Artículo II muestra los perfiles de permeación del PF a través de la córnea (Fig. 4a) y la esclera (Fig. 4b) de cerdo. Dichos perfiles concuerdan con el cumplimiento, en el caso de la córnea, y el no-cumplimiento en el caso de la esclera, de las condiciones “*sink*” según especifica la Farmacopea Europea vigente (86). Las concentraciones correspondientes al último tiempo de muestreo (6 h post-siembr) fueron de 72  $\mu\text{g/mL}$  y 114  $\mu\text{g/mL}$  para la córnea y la esclera respectivamente, las cuales representan el 28% y el 45% de la solubilidad en agua más baja reportada para el PF (252.7  $\mu\text{g/mL}$ , (87)) de forma que en el caso de la esclera, el gradiente de concentraciones de fármaco entre el compartimento dador y el receptor deja de ser

constante, originándose así el incumplimiento de las condiciones “*sink*” y la forma hiperbólica de dicho perfil.

En el caso de la córnea de cerdo, la curva del ensayo de permeación (Figura 4a, Artículo II) se corresponde con el típico perfil lineal tras cierto período de latencia (0 - 2 h) debido a la dificultad que experimenta el fármaco para atravesarla. La córnea está formada por un conjunto de capas con distintas características de grosor, hidrofilia y lipofilia que le confieren una gran resistencia al paso de los fármacos (18, 22, 88). De ello se deriva que dicho fenómeno dependa primordialmente del coeficiente de reparto octanol/agua del fármaco en cuestión, sin obviar su tamaño y carga (24). Al encontrarse el PF disuelto en PBS, gran parte de sus moléculas están en su forma aniónica. Dado que los poros del epitelio corneal (capa más externa de la córnea) están cargados negativamente, existe una repulsión epitelio-fármaco que dificulta el acceso y el paso del PF a través de éste (23). Por otro lado, una vez superado el epitelio, el fármaco accede al estroma corneal, el cual supone el 90% del espesor de este tejido y es de naturaleza hidrófila (2). Por tratarse de un fármaco mayormente hidrófobo, el PF se ve retenido por esta capa. En referencia al perfil de permeación obtenido en este caso puede extraerse que, una vez que la córnea se encuentra embebida por el fármaco (primeros tiempos de permeación), éste difunde de forma constante hacia el compartimento receptor originándose así la parte lineal de dicho perfil.

Los intervalos lineales de ambos perfiles (córnea y esclera) fueron utilizados para el cálculo de los parámetros de permeación que muestra la Tabla 5. del Artículo II. Del mismo modo, la Tabla 6 de dicho artículo especifica la cantidad de PF permeada ( $Q_P$ ) y la cantidad retenida ( $Q_R$ ) tras el ensayo de extracción, en cada membrana ocular.

A pesar de que córnea y esclera presentan un grosor parecido, de alrededor de 900  $\mu\text{m}$  (84, 89), en términos generales la esclera resulta del orden de hasta diez veces más permeable a los fármacos que la córnea (90, 91). Esto se explica por sus diferencias anatómicas con respecto a ésta. La esclerótica está principalmente compuesta por una red de haces de fibras de colágeno (17), lo que hace que la permeabilidad de los fármacos a través de ella se vea principalmente influenciada por el tamaño de éstos, decreciendo con el incremento del radio y el peso molecular en detrimento de sus características de hidro o lipofobicidad (92, 93). Además, las últimas investigaciones apuntan a que este tejido resulta más permeable a los fármacos que se encuentran cargados negativamente, como sería el caso del PF en solución (94, 95). Todo ello explica por qué el flujo de permeación ( $J$ ,  $\mu\text{g}/\text{h}/\text{cm}^2$ ) del PF es más alto

en la esclera ( $288.0 \pm 17.3$ ) que en la córnea ( $211.8 \pm 19.9$ ) y, el hecho de que en la esclerótica se alcance el estado de equilibrio estacionario antes ( $T_{L(\text{esclera})} = 0.17 \text{ h} \pm 0.03$  vs.  $T_{L(\text{córnea})} = 1.74 \text{ h} \pm 0.15$ ). Tras un análisis estadístico de tipo *t de student*, el único parámetro de permeación para el que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre la córnea y la esclera, fue para el parámetro  $K_p$  (*constante de permeabilidad*). Ello, se consideró debido a la relación de este parámetro con los parámetros  $P_1$  (*coeficiente de reparto*) y  $P_2$  (*coeficiente de difusión*).  $P_1$  depende, en cierto modo, del ratio de concentraciones a ambos lados de la membrana de permeación (96). Debido a la impermeabilidad de la córnea al paso del fármaco, la diferencia de concentraciones a ambos lados de esta membrana es más alta en este caso que en el caso de la esclerótica, lo que hace que este parámetro tenga un valor superior para el tejido corneal. Contrariamente,  $P_2$  está más relacionado con la difusión del fármaco a través del tejido, la cual es muy superior en la esclerótica dando lugar a que el valor de  $P_2$  sea mayor para el tejido escleral. Curiosamente, las diferencias entre estos valores se ven en cierto modo compensadas entre sí, de forma que el valor del parámetro  $K_p$  es similar para los dos tejidos produciendo la ilusión de que no existen diferencias entre ellos.

También se encontraron diferencias estadísticamente significativas (*t de student*,  $p < 0.05$ ) en cuanto a la  $Q_p$  y la  $Q_R$  en córnea y esclera. A través de la esclera permeó aproximadamente el doble de cantidad de PF que a través de la córnea ( $Q_{P(\text{esclera})} = 942.1 \mu\text{g} \pm 101.7$  vs.  $Q_{P(\text{córnea})} = 547.2 \mu\text{g} \pm 65.84$ ) y sin embargo, éste quedó prácticamente el doble de retenido en la córnea ( $41.3 \mu\text{g/g} \pm 1.4$ ) con respecto a la esclerótica ( $24.5 \mu\text{g/g} \pm 0.9$ ). Este hecho puede atribuirse a las diferencias anatómicas comentadas entre ambos tejidos.

Los resultados obtenidos en este ensayo de aplicación de la metodología bioanalítica confirmaron la idoneidad del método validado para desarrollar estudios biofarmacéuticos de cuantificación de PF en muestras que hayan estado en contacto directo con tejido ocular.

Una vez validada la metodología bioanalítica y teniendo en cuenta que la biodisponibilidad de los fármacos administrados por vía ocular no solo depende de las barreras anatomofisiológicas que deben sortear, sino también de las características fisicoquímicas de la forma farmacéutica administrada, se desarrolló un ensayo *ex vivo* de permeación trans-corneal utilizando como membrana de permeación la córnea de conejo de la raza *New Zeland*, para conocer el perfil y parámetros de permeación de

las formulaciones PF-NPs, los de la forma farmacéutica comercial (Oftalar<sup>®</sup>, PF 1mg/mL) y los de una solución de PF en PBS a la misma concentración (1.0 mg/mL).

La Figura 4. del Artículo I, exhibe que los perfiles de permeación obtenidos para el Oftalar<sup>®</sup> y la solución de PF resultaron muy similares entre si, de la misma forma que fueron similares entre si los perfiles de permeación evidenciados por las formulaciones PF-NPs. Sin embargo, el perfil de permeación de la formulación PF-F2NPs exhibe que ésta permitió el paso de una cantidad ligeramente superior de PF con respecto a la formulación PF-F1NPs ( $Q_{P(PF-F1NPs)} = 33.11 \text{ \%/cm}^2$ ,  $Q_{P(PF-F2NPs)} = 35.59 \text{ \%/cm}^2$ ). Asimismo, las cantidades permeadas a través de las formulaciones PF-NPs fueron muy superiores a las obtenidas para la formulación comercial Oftalar<sup>®</sup> ( $13.53 \text{ \%/cm}^2$ ) y la solución de PF ( $13.62 \text{ \%/cm}^2$ ).

Teniendo en consideración que el vehículo en el que se administra un fármaco debe garantizar una tasa de liberación óptima de éste y al mismo tiempo, es necesario que exista un equilibrio vehículo-fármaco-superficie de permeación que asegure una actividad termodinámica máxima (97), se estudiaron los parámetros de permeación  $K_p$ ,  $P_1$  y  $P_2$ , además del tiempo de latencia ( $T_L$ ). Los datos obtenidos en este ensayo de permeación (Tabla 2., Artículo I) fueron tratados estadísticamente a través de un test estadístico no paramétrico de Friedman seguido de un análisis de comparación múltiple de Dunn. Dichos análisis evidenciaron la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) para el parámetro  $K_p$  entre PF-F1NPs y la solución de fármaco, PF-F2NPs y el Oftalar<sup>®</sup> y entre PF-F2NPs y la solución de fármaco libre. La formulación PF-F2NPs presentó la  $K_p$  más alta ( $12.29 \times 10^2 \text{ cm/h}$ ), mientras que la solución libre de fármaco obtuvo la más baja ( $3.32 \times 10^2 \text{ cm/h}$ ) siendo ésta, cercana a la del Oftalar<sup>®</sup> ( $3.46 \times 10^2 \text{ cm/h}$ ). En cuanto al parámetro  $P_1$ , se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre PF-F1NPs y el Oftalar<sup>®</sup>, PF-F1NPs y la solución de fármaco y, PF-F2-NPs y el Oftalar<sup>®</sup>. La formulación PF-F1NPs fue la que obtuvo el  $P_1$  más alto ( $2.11 \times 10^1 \text{ cm}$ ). Además, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en cuanto a los parámetros  $T_L$  y  $P_2$  entre PF-F2NPs y la solución libre de fármaco. De hecho, la formulación PF-F2NPs presentó el valor de  $P_2$  más alto ( $10.08 \times 10^1 \text{ h}^{-1}$ ). Ésta, fue también la que obtuvo el valor de  $T_L$  más bajo ( $1.66 \times 10^1 \text{ h}$ ), de lo que se deduce que fue la que más rápido alcanzó el estado de equilibrio estacionario. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) para ningún parámetro de permeación entre la solución libre de fármaco y el Oftalar<sup>®</sup>.

Una vez finalizado este ensayo de permeación, se determinó la cantidad de fármaco retenido en la córnea ( $Q_R$ , Tabla 3., Artículo I). Los resultados obtenidos pusieron en evidencia que la cantidad de PF retenido en la córnea a partir de las formulaciones PF-NPs ( $Q_{R(PF-F1NPs)} = 83.78 \text{ \%/cm}^2/\text{g}$ ,  $Q_{R(PF-F2NPs)} = 61.92 \text{ \%/cm}^2/\text{g}$ ) fue superior a la de la solución de PF en PBS ( $50.41 \text{ \%/cm}^2/\text{g}$ ) y a la del Oftalar<sup>®</sup> ( $52.55 \text{ \%/cm}^2/\text{g}$ ), lo que podría atribuirse a la capacidad que presentan las células del epitelio corneal para endocitar las PF-NPs (98).

Los distintos resultados obtenidos para las formulaciones PF-NPs van en concordancia con su composición y los datos reportados por Abrego y colaboradores (63). PF-F1NPs contiene mayor concentración de PVA, lo que provoca un incremento en la viscosidad, responsable de que se desarrolle una matriz polimérica más compacta que entorpece la liberación del fármaco (99). En consecuencia, el fármaco difunde también más lentamente a través de la córnea desde la formulación PF-F1NPs en comparación con la formulación PF-F2NPs. Asimismo, se ha demostrado que un aumento en la concentración de PVA puede facilitar la retención de NPs a nivel ocular (100, 101), lo que explica por qué la formulación PF-F1NPs presenta una  $Q_R$  superior a la de la formulación PF-F2NPs.

Al desarrollar este tipo de ensayos, es fundamental tener en consideración el estado de hidratación corneal. Ello se debe a que la deshidratación conlleva un daño tisular que puede modificar el acceso y la retención del fármaco en el tejido diana. Por otro lado, el estado de hidratación sirve también como indicativo del daño tisular causado por las formulaciones aplicadas sobre la córnea (102). Schoenwald y colaboradores (103) establecieron que el nivel de hidratación corneal debe encontrarse en torno al 76-80% para considerarla sana. La Tabla 3 del Artículo I revela valores de hidratación corneal superiores al 76.23% para todas las formulaciones, con lo que se puede concluir que la córnea no resultó dañada durante los ensayos *ex vivo* de permeación.

A pesar de que el fármaco de interés en esta investigación ha sido ampliamente utilizado mediante aplicación tópica ocular en el manejo del dolor y la inflamación, además de ser considerado como una alternativa segura y eficaz al uso de otros antiinflamatorios por esta vía (40), es sabido que puede ocasionar efectos secundarios como irritación, congestión conjuntival, picazón y edema parpebral (74). Teniendo en consideración estos datos, en la presente investigación se llevaron a cabo **estudios *in vivo*** en conejos de la raza *New Zealand* con la finalidad de conocer la tolerancia ocular y la eficacia antiinflamatoria de las formulaciones PF-NPs. Previamente a la realización de estos ensayos, se ajustó la osmolalidad de las formulaciones PF-NPs a

250 - 300 mOsm/kg con una solución de glucosa, debido a que una presión osmótica inadecuada puede estimular la secreción de lágrimas acelerando la eliminación de la sustancia terapéutica de la superficie ocular. Asimismo, el pH de dichas formulaciones PF-NPs se ajustó a 7 mediante una solución NaOH 0.1N, con el fin de limitar el parpadeo reflejo y la irritación derivada de la instilación de suspensiones no isotónicas a nivel ocular (20, 104). El ensayo de tolerancia ocular se desarrolló siguiendo el método descrito por Draize y colaboradores (105) y los resultados obtenidos se evaluaron siguiendo la técnica propuesta por Kay y colaboradores (106) en la que se observa el grado de opacidad, inflamación y congestión ocular que puedan manifestarse en la córnea, el iris y la conjuntiva tras la administración de la formulación. Al finalizar este ensayo, no se detectó ningún signo de irritación a nivel de la córnea, el iris o la conjuntiva por lo que, los resultados sugieren que las formulaciones PF-NPs no causan irritación al ser administradas vía ocular. Estos resultados se encuentran en concordancia con los obtenidos en las investigaciones de Abrego y colaboradores en los que se evaluó la irritación mediante un ensayo *in vitro* usando el método HET-CAM (63).

La eficacia antiinflamatoria *in vivo* de las formulaciones PF-NPs ajustadas a una osmolalidad y pH adecuados, fue evaluada en un estudio comparativo con el colirio comercial Oftalar<sup>®</sup> y una solución de PF disuelto en PBS (1.0 mg/mL). Para tal fin, se aplicaron las formulaciones sometidas a ensayo en el ojo derecho de los conejos, seguidamente se indujo la inflamación a través de la aplicación de 50  $\mu$ L de araquidonato sódico (SA) en el mismo ojo (107) y se utilizó el ojo izquierdo como control. Se cuantificó la inflamación ocular transcurridos 30, 60, 90, 120 y 150 minutos de la instilación del SA y los datos obtenidos se interpretaron mediante las técnicas descritas por Draize y Kay (105, 106).

La Figura 5. del Artículo I exhibe que la eficacia antiinflamatoria de las formulaciones PF-NPs resulta superior a la del Oftalar<sup>®</sup> y a la de la solución de fármaco en PBS. Los resultados obtenidos en este análisis pueden ser debidos a que las formulaciones PF-NPs presentan una estabilidad y viscosidad superiores a la del Oftalar<sup>®</sup> y la solución de fármaco libre en PBS. En consecuencia, tienen mayor capacidad de adherencia a la superficie ocular y prolongan el tiempo de contacto del fármaco con la córnea (98). Asimismo, los resultados obtenidos en este ensayo van concordancia con los exhibidos en el ensayo *ex vivo* de permeación trans-corneal (Tabla 2 y 3, Artículo I). En dicho ensayo, la formulación PF-F2NPs obtuvo el menor  $T_L$ , la mayor  $K_p$  y la mayor  $Q_p$ , lo que explica por qué es la formulación con mejor eficacia antiinflamatoria comparada con el resto de formulaciones ensayadas. Que esta presente mejor



eficacia antiinflamatoria que la formulación PF-F1NPs puede ser debido a su composición. La formulación PF-F2NPs contiene menor concentración de PVA en comparación con la formulación PF-F1NPs, con lo que la matriz polimérica que se forma es menos compacta. Como consecuencia, el fármaco difunde más fácilmente hacia el exterior de la misma en comparación a como lo hace desde la formulación PF-F1NPs, lo que queda reflejado en su eficacia antiinflamatoria.

Por otro lado, a pesar de que el Oftalar<sup>®</sup> y la solución de fármaco libre en PBS presentan resultados aceptables de eficacia antiinflamatoria, ninguna de las dos podría considerarse óptima para el tratamiento de enfermedades inflamatorias a nivel ocular. El PF es inherentemente irritante a nivel ocular además de inestable en solución (31) y el Oftalar<sup>®</sup>, contiene una combinación de cloruro de benzalconio (BAC) y ácido etilendiamotetraacético (EDTA) añadidos a la formulación con la finalidad de incrementar la capacidad de penetración del fármaco a través de la córnea (108). El EDTA favorece la permeabilidad a través de la eliminación de los iones de calcio extracelulares y la apertura de las “*tight junctions*” o uniones intercelulares estrechas, que habitualmente dificultan el paso de moléculas a través de la córnea por la vía paracelular (109, 110). El BAC, provoca la deshidratación del tejido desestabilizando así el epitelio corneal. A pesar de ser uno de los conservantes más utilizados en la formulación de los colirios comerciales clásicos, los estudios realizados en la última década han demostrado que el uso continuado de estos colirios puede inducir el síndrome del ojo seco. De hecho, algunas investigaciones apuntan a que puede utilizarse éste como compuesto para inducir la sequedad ocular en modelos animales de experimentación (111, 112).

En su conjunto, los resultados obtenidos en esta investigación permiten concluir que las formulaciones PF-F1NPs y PF-F2NPs pueden ser consideradas como un tratamiento alternativo en los procesos dolorosos e inflamatorios que acontecen a nivel ocular. Sin embargo, resultan necesarios estudios adicionales previos a su administración en humanos.

## **5. CONCLUSIONES**

---



El presente trabajo de investigación fue enfocado a la caracterización *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de dos formulaciones de NPs poliméricas conteniendo pranoprofeno (PF-F1NPs y PF-F2NPs) destinadas al tratamiento del dolor y la inflamación ocular. Asimismo, se dedicaron esfuerzos significativos a la validación de un método bioanalítico para la cuantificación de PF en muestras provenientes de experimentos en los que se vio implicado el tejido ocular. Los resultados obtenidos en esta investigación permiten concluir lo siguiente:

1. Las NPs poliméricas cargadas con PF (PF-F1NPs y PF-F2NPs) fueron preparadas exitosamente por el método de desplazamiento de disolvente.
2. La caracterización fisicoquímica y morfológica de las formulaciones PF-NPs puso de manifiesto que estos sistemas coloidales poseen características apropiadas para la administración ocular exhibiendo un tamaño de partícula de alrededor de 350 nm, una elevada eficiencia de encapsulación (80%), una forma esférica y sin presencia de agregados.
3. El ensayo de citotoxicidad *in vitro* en la línea celular Y-79 de retinoblastoma humano reveló que concentraciones de 150  $\mu\text{g/mL}$  para la formulación PF-F1NPs y de 200  $\mu\text{g/mL}$  para la formulación PF-F2NPs, dieron lugar una viabilidad celular cercana al 20%. La concentración más alta ensayada para las NPs blancas evidenció una viabilidad celular inferior al 70%. En el caso de la solución de PF en PBS (1.5 mg/mL), concentraciones de hasta 300  $\mu\text{g/mL}$  pueden considerarse seguras ya que no redujeron la viabilidad celular por debajo del 70%. Los resultados obtenidos podrían ser atribuidos a que el fármaco en solución es susceptible de degradarse originando metabolitos menos tóxicos para las células, mientras que el PF formulado en las NPs se encuentra protegido de la degradación y se libera continuamente en su forma estable causando mayor toxicidad. Asimismo, concentraciones altas de las formulaciones PF-NPs y de las NPs blancas, limitan el suministro de oxígeno y nutrientes a las células, lo que desfavorece su metabolismo y proliferación.
4. Los resultados obtenidos en la validación del método bioanalítico para la cuantificación de PF por HPLC demostró ser lineal, exacto y preciso para el rango de concentraciones ensayado (6.25 – 100  $\mu\text{g/mL}$ ), además de establecerse como selectivo y robusto para tal fin. Los ensayos *ex vivo* de permeación a través de la córnea y la esclera de cerdo a partir de una solución a saturación de PF revelaron que la cantidad de fármaco permeado a través de la esclerótica es superior con respecto a la observada para la córnea. Por otro

lado, el método extractivo escogido para la recuperación y cuantificación del PF embebido en la córnea y la esclera durante los ensayos *ex vivo* de permeación se estableció como adecuado y reproducible. Asimismo, dicho ensayo reveló que el PF queda retenido en una cantidad superior en la córnea con respecto a la esclera. Los resultados derivados de estos estudios pueden atribuirse a las grandes diferencias anatómicas existentes entre las dos membranas oculares.

5. Los resultados obtenidos en el ensayo de permeación *ex vivo* de PF a través de la córnea de conejo a partir de las formulaciones PF-F1NPs y PF-F2NPs en comparación con el Oftalar<sup>®</sup> y la solución de PF en PBS revelaron que la cantidad de PF permeada a partir de las formulaciones PF-F1NPs y PF-F2NPs fue del orden de tres veces superior respecto al resto de formulaciones evaluadas. De la misma forma, la cantidad de PF retenida en la córnea resultó superior en el caso de las formulaciones PF-NPs comparada con el Oftalar<sup>®</sup> y la solución de PF. Asimismo, las formulaciones PF-F1NPs y PF-F2NPs mostraron los valores de  $K_p$  más altos y de  $T_L$  más bajos en comparación con el Oftalar<sup>®</sup> y la solución de PF en PBS evidenciando así, que las formulaciones nanoestructuradas alcanzaron el estado de equilibrio estacionario antes que el resto de formulaciones sometidas a ensayo.
6. A pesar de que el estudio *in vivo* de eficacia antiinflamatoria realizado reveló buenos resultados de eficacia antiinflamatoria para el Oftalar<sup>®</sup> y la solución de PF en PBS, dichas formulaciones no pueden considerarse óptimas para el tratamiento de procesos inflamatorios oculares. Por un lado, el PF es inestable en solución e inherentemente irritante a nivel ocular y por otro lado, los colirios comerciales como el Oftalar<sup>®</sup> presentan una baja viscosidad que conduce a una rápida eliminación del fármaco de la superficie ocular por drenaje nasolacrimal. Además, la formulación Oftalar<sup>®</sup> contiene en su composición una combinación de BAC y EDTA capaz de provocar una disrupción del epitelio corneal. Los resultados de este estudio también ponen de manifiesto que la eficacia antiinflamatoria evidenciada por la formulación PF-F2NPs es superior respecto a la observada para el resto de formulaciones ensayadas. Este hecho podría explicarse a partir de los resultados obtenidos en el ensayo *ex vivo* de permeación, en los que la formulación PF-F2NPs evidenció la mejor constante de permeabilidad y alcanzó el estado de equilibrio estacionario en el menor tiempo.

7. Las formulaciones PF-NPs se consideraron adecuadas para su instilación ocular al no observarse signos de irritación corneal, del iris o de la conjuntiva tras el ensayo *in vivo* de tolerancia ocular.

Teniendo en consideración todo lo expuesto anteriormente, es posible concluir que el PF diseñado en NPs podría considerarse un tratamiento alternativo en los procesos dolorosos e inflamatorios que acontecen a nivel ocular, debido a que ha demostrado poseer un perfil biofarmacéutico, una tolerancia ocular y una eficacia antiinflamatoria adecuadas para tal fin. Asimismo, el poseer técnicas de detección y cuantificación del PF validadas permitirá la realización de nuevos estudios que resultan necesarios para completar los obtenidos en este trabajo, previa administración de las formulaciones PF-NPs en humanos.



## **6. REFERENCIAS**

---





1. Kumaran KSGA, Karthika K, Padmapreetha J. Comparative review on conventional and advanced ocular drug delivery formulations. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2010;2(4):1-5.
2. Davies NM. Biopharmaceutical Considerations in Topical Ocular Drug Delivery. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2000;27:558-62.
3. Yorio T, Clark AF, Wax MB. *Ocular therapeutics: Eye on New Discoveries*: Elsevier Ltd; 2008. 3-6.
4. Ansari MW, Nadeem A. The Eyeball: Some Basic Concepts. *Atlas of Ocular Anatomy*. Springer International Publishing. 2016. 11-27.
5. Kaufman PL, Alm A. ADLER. *Fisiología del ojo: Aplicación clínica*. 10ª Edición 2004.
6. Cotlier E. *Fisiología del ojo: Aplicación clínica*. Editorial Panamericana. 1980.
7. Andrades MG. Generación de córneas humanas artificiales por ingeniería tisular para su utilización como medicamentos de terapias avanzadas Universidad de Granada 2011.
8. Martín MB, Bueno ST. *Visión normal en Deficiencia visual: aspectos psicoevolutivos y educativos*. Málaga (España). Editorial Aljibe. 1994.
9. Fernández FJA, Lara MC, Fernández MAA, Aguilera AM. *Anatomía y Fisiología del Aparato Ocular: Oftalmología en Atención Primaria*.
10. Adav SS, Wei J, Terence Y, Ang BCH, Yip LWL, Sze SK. Proteomic Analysis of Aqueous Humor from Primary Open Angle Glaucoma Patients on Drug Treatment Revealed Altered Complement Activation Cascade. *Journal of Proteome Research*. 2018;17(7):2499-510.
11. Jirsova K. *The Cornea, Anatomy and Function. Light and Specular Microscopy of the Cornea* 2017. 1-21.
12. Kivelä T, Messmer EM, Rymgajłło-Jankowska B. *Cornea. Eye Pathology: An Illustrated Guide*. Springer Berlin Heidelberg 2015. 79-154.
13. Villa C, Santodomingo J. La córnea. Parte I: Estructura, función y anatomía microscópica. *Gaceta óptica*.
14. Skalicky SE. *The Cornea and Sclera. Ocular and Visual Physiology* 2016. 29-46.
15. Müller LJ, Pels E, Schurmans LRHM, Vrensen GFJM. A new three-dimensional model of the organization of proteoglycans and collagen fibrils in the human corneal stroma. *Experimental Eye Research*. 2004;78(3):493-501.
16. Metlapally R, Wildsoet CF. Scleral Mechanisms Underlying Ocular Growth and Myopia. 2015. 241-48.
17. Maza MSdl, Tauber J, Foster CS. *Structural Considerations of the Sclera. The Sclera*. Springer US. 2012. 1-30.

18. Hornof M, Toropainen E, Urtti A. Cell culture models of the ocular barriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005;60(2):207-25.
19. Baños JE, March M. *Farmacología ocular*. 2nd ed. Edicions de la Universitat Politècnica de Catalunya. 2002.
20. Holly FJ, Lamberts DW. Effect of nonisotonic solutions on tear film osmolality. *Journal of Ophthalmic and Vision Research*. 1981;20(2):236-45.
21. Souto EB, Doktorovova S, Gonzalez-Mira E, Egea MA, Garcia ML. Feasibility of lipid nanoparticles for ocular delivery of anti-inflammatory drugs. *Current Eye Research*. 2010;35(7):537-52.
22. Ghatge D, Edelhauser HF. Ocular drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2006;3(2):275-87.
23. Nettem H, Darko Y, Bamiro OA, Addo RT. Ocular Barriers. *Ocular Drug Delivery: Advances, Challenges and Applications*. Springer International Publishing. 2016. 27-36.
24. Prausnitz MR, Noonan JS. Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: A literature analysis for drug delivery to the eye. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1998;87(12):1479-88.
25. Ahmed I, Patton TF. Importance of the noncorneal absorption route in topical ophthalmic drug delivery. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1985;26(4):584-7.
26. Hämäläinen KM, Kananen K, Auriola S, Kontturi K, Urtti A. Characterization of paracellular and aqueous penetration routes in cornea, conjunctiva, and sclera. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1997;38(3):627-34.
27. Li SK, Hao J. Transscleral passive and iontophoretic transport: theory and analysis. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2018;15(3):283-99.
28. Geroski DH, Edelhauser HF. Transscleral drug delivery for posterior segment disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;52(1):37-48.
29. Katara R, Sachdeva S, Majumdar DK. Aceclofenac oil drops: characterization and evaluation against ocular inflammation. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2018;23(3):240-6.
30. Fernández PL, González AM, Cerro JCL, Hernández IL, Sánchez MÁM, Pérez AP. *Manual de farmacología básica y clínica*. Editorial Panamericana. 2012.
31. Ahuja M, Dhake AS, Sharma SK, Majumdar DK. Topical Ocular Delivery of NSAIDs. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*. 2008;10(2):229.

32. Pleyer U, Ursell PG, Rama P. Intraocular Pressure Effects of Common Topical Steroids for Post-Cataract Inflammation: Are They All the Same? *Ophthalmology and Therapy*. 2013;2(2):55-72.
33. García Meijide JA, Gómez-Reino Carnota JJ. Fisiopatología de la ciclooxygenasa-1 y ciclooxygenasa-2. *Revista Española de Reumatología*. 2000;27(1):33-5.
34. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacología*. 5ª ed. Madrid ELSEVIER. 2003. 797 p.
35. Ortiz-Pereda V, López M, Arroita A, Aguilera L, Azkue J, Torre-Mollinedo F, Isla-Baranda A. Antiinflamatorios no esteroideos y paracetamol en el tratamiento del dolor. *Gaceta Médica de Bilbao*. 2007;104(4):148-55.
36. Japanese pharmacopoeia. Fifteenth edition. Tokyo 2010. 1018 p.
37. Ghosal K, Chakrabarty S, Nanda A. Hydroxypropyl methylcellulose in drug delivery. *Pelagia Research Library*. 2011;2(2):152-68.
38. Choi J-S, Shin S-C. Enhanced Bioavailability by Transdermal Administration of Pranoprofen Gels Containing Octanoic Acid to Rats. 2008. 210-4.
39. Herbort CP, Jauch A, Othenin-Girard P, Tritten J-J, Fsadni M. Diclofenac drops to treat inflammation after cataract surgery. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. 2001;78(4):421-4.
40. Akyol-Salman İ, Leçe-Sertöz D, Baykal O. Topical Pranoprofen 0.1% Is As Effective Anti-Inflammatory and Analgesic Agent as Diclofenac Sodium 0.1% After Strabismus Surgery. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2007;23(3):280-3.
41. McColgin AZ, Heier JS. Control of intraocular inflammation associated with cataract surgery. *Current opinion in ophthalmology*. 2000;11(1):3-6.
42. Tang G-M, Han J-Y, Wang Y-T, Cui Y-Z, Ng SW. One Pranoprofen drug-based metal coordination polymer: Synthesis, structure and properties. *Polyhedron*. 2017;133:336-42.
43. Zhang Y, Du Y, Jiang Y, Zhu X, Lu Y. Effects of Pranoprofen on Aqueous Humor Monocyte Chemoattractant Protein-1 Level and Pain Relief During Second-Eye Cataract Surgery. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9(783).
44. An SH, Kwon YH. Effect of a topical nonsteroidal anti-inflammatory agent (0.1 % pranoprofen) on acute central serous chorioretinopathy. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*. 2016;254(8):1489-96.
45. Liu X, Wang S, Kao AA, Long Q. The effect of topical pranoprofen 0.1% on the clinical evaluation and conjunctival HLA-DR expression in dry eyes. *Cornea*. 2012;31(11):1235-9.

46. Notivol R, Martínez M, Bergamini MVW, Pranoprofen Study G. Treatment of Chronic Nonbacterial Conjunctivitis With a Cyclo-oxygenase Inhibitor or a Corticosteroid. *American Journal of Ophthalmology*. 1994;117(5):651-6.
47. Narashino M, Ichikawa H, Narita S, Yotsukaido AS, Sustained-Release Pranoprofen Preparation 1993. United States Patent 5225206.
48. Kobe K, Otsu H, kobe Y, Kakogawa Y, Method for Stabilizing Pranoprofen and Stable Liquid Preparation of Pranoprofen. United States Patent 1999.
49. Negre JMS. Nuevas aportaciones galénicas a las formas de administración. Formación continuada para farmacéuticos de hospital. 28-65.
50. Kreuter J. Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. II: Comparison of the body distribution of nanoparticles with the body distribution of microspheres (diameter greater than 1 micron), liposomes, and emulsions. *Pharmaceutica acta Helvetiae*. 1983;58(8):217-26.
51. Wang Y, Xu X, Gu Y, Cheng Y, Cao F. Recent advance of nanoparticle-based topical drug delivery to the posterior segment of the eye. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2018;15(7):687-701.
52. Salazar JCP, Jiménez AA, Alonso CM, Serrano FR, Fernández MCV, Mediano JLA, Flores EG, Caro RL, Quesada RO, Ballesterro ARR, Universidad de Granada, Servicio Andaluz de Salud, Universidad de Jaen. Nanopartículas poliméricas que comprenden poli(butilcianoacrilato) o poli(épsilon-caprolactona) para su uso en terapia. España 2015. Patent version ES 2 541 480 A1
53. Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1999;25(4):471-6.
54. Choi S-W, Kim J-H. Design of surface-modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for targeted drug delivery to bone. *Journal of Controlled Release*. 2007;122(1):24-30.
55. Rao JP, Geckeler KE. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*. 2011;36(7):887-913.
56. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989;55:R1-R4.
57. Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*. 2006;2(1):8-21.

58. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*. 2011;3(3):1377-97.
59. Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program. Public Health Service Food and Drug Administration, USA. 2015. 1-32.
60. Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de Industria (AEFI). Barcelona, España 2001. 331 p.
61. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 2005.
62. Guideline on bioanalytical method validation. Committee for Medicinal Products for Human Use of European Medicines Agency. Londres, UK. 2011.
63. Abrego G, Alvarado HL, Egea MA, Gonzalez-Mira E, Calpena AC, Garcia ML. Design of Nanosuspensions and Freeze-Dried PLGA Nanoparticles as a Novel Approach for Ophthalmic Delivery of Pranoprofen. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;103(10):3153-64.
64. Nafee N, Schneider M, Schaefer UF, Lehr C-M. Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;381(2):130-9.
65. Nagarwal RC, Kant S, Singh PN, Maiti P, Pandit JK. Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2009;136(1):2-13.
66. Gonzalez-Pizarro R, Silva-Abreu M, Calpena AC, Egea MA, Espina M, García ML. Development of fluorometholone-loaded PLGA nanoparticles for treatment of inflammatory disorders of anterior and posterior segments of the eye. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;547(1):338-46.
67. Schoenwald RD, Stewart P. Effect of Particle Size on Ophthalmic Bioavailability of Dexamethasone Suspensions in Rabbits. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1980;69(4):391-4.
68. Mayoral JB, Moreno AC, Martín-Martínez ES. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. *Latin-American Journal of Physics Education*. 2014;8(4):1-6.
69. Feng S-S, Huang G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol®) from nanospheres of biodegradable polymers. *Journal of Controlled Release*. 2001;71(1):53-69.
70. Fangueiro JF, Andreani T, Egea MA, Garcia ML, Souto SB, Silva AM, Souto EB. Design of cationic lipid nanoparticles for ocular delivery: Development,

- characterization and cytotoxicity. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;461(1):64-73.
71. Ayaki M, Iwasawa A, Niwano Y. Comparative assessment of the cytotoxicity of six anti-inflammatory eyedrops in four cultured ocular surface cell lines, as determined by cell viability scores. *Clinical ophthalmology*. 2012;6:1879-84.
  72. Doktorovova S, Souto EB, Silva AM. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers - A systematic review of in vitro data. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2014;87(1):1-18.
  73. Kanimozhi K, Khaleel Basha S, Sugantha Kumari V, Kaviyarasu K, Maaza M. In vitro cytocompatibility of chitosan/PVA/methylcellulose - Nanocellulose nanocomposites scaffolds using L929 fibroblast cells. *Applied Surface Science*. 2018;449:574-83.
  74. Li YH, Wen Q, Fan TJ, Ge Y, Yu MM, Sun LX, et al. Dose dependent cytotoxicity of pranoprofen in cultured human corneal endothelial cells by inducing apoptosis. *Drug and chemical toxicology*. 2015;38(1):16-21.
  75. Mueller H, Kassack MU, Wiese M. Comparison of the Usefulness of the MTT, ATP, and Calcein Assays to Predict the Potency of Cytotoxic Agents in Various Human Cancer Cell Lines. *Journal of Biomolecular Screening*. 2004;9(6):506-15.
  76. Calvo P, Alonso MJ, Vila-Jato JL, Robinson JR. Improved ocular bioavailability of indomethacin by novel ocular drug carriers. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 1996;48(11):1147-52.
  77. Yoncheva K, Vandervoort J, Ludwig A. Influence of process parameters of high-pressure emulsification method on the properties of pilocarpine-loaded nanoparticles. *Journal of microencapsulation*. 2003;20(4):449-58.
  78. Anand P, Nair HB, Sung B, Kunnumakkara AB, Yadav VR, Tekmal RR, Aggarwal BB. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. *Biochemical pharmacology*. 2010;79(3):330-8.
  79. Parveen S, Sahoo SK. Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery. *European Journal of Pharmacology*. 2011;670(2-3):372-83.
  80. Abrego G, Alvarado H, Souto EB, Guevara B, Bellowa LH, Parra A, Calpena AC, García ML. Biopharmaceutical profile of pranoprofen-loaded PLGA nanoparticles containing hydrogels for ocular administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015;95:261-70.
  81. OECD. Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method 2004.

82. Kompella UB, Kadam RS, Lee VH. Recent advances in ophthalmic drug delivery. *Therapeutic delivery*. 2010;1(3):435-56.
83. Weinreb RN. Enhancement of scleral macromolecular permeability with prostaglandins. *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 2001;99:319-43.
84. Olsen TW, Sanderson S, Feng X, Hubbard WC. Porcine Sclera: Thickness and Surface Area. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2002;48(8):2529-32.
85. Nicoli S, Ferrari G, Quarta M, Macaluso C, Govoni P, Dallatana D, Santi P. Porcine sclera as a model of human sclera for in vitro transport experiments: histology, SEM, and comparative permeability. *Molecular Vision*. 2009;15:259-66.
86. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM); Recommendations on Dissolution Testing European Pharmacopoeia V 80. 2018.
87. Chemistry Dashboard In: database EPA, editor. United States. Visited 10th September 2018.
88. Juretić M, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J, Hafner A, Lovrić J, Pepić I. Biopharmaceutical evaluation of surface active ophthalmic excipients using in vitro and ex vivo corneal models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;120:133-41.
89. Sánchez I, Martín R, Ussa F, Fernández-Bueno I. The parameters of the porcine eyeball. 2011. 475-82.
90. Barar J, Asadi M, Mortazavi-Tabatabaei SA, Omid Y. Ocular Drug Delivery; Impact of in vitro Cell Culture Models. *Journal of ophthalmic & vision research*. 2009;4(4):238-52.
91. Ahmed I, Gokhale RD, Shah MV, Patton TF. Physicochemical determinants of drug diffusion across the conjunctiva, sclera, and cornea. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1987;76(8):583-6.
92. Duan Y-Q, Yang Y-Z, Huang X-T, Lin D. Research on the comparison of the demethylvancomycin's diffusion–deposition characteristics in the ocular solid tissues of sustained subtenon drug delivery with subconjunctival injection. *Drug Delivery*. 2017;24(1):92-8.
93. Ambati J, Canakis CS, Miller JW, Gragoudas ES, Edwards A, Weissgold DJ, Kim I, Delori FC, Adamis AP. Diffusion of high molecular weight compounds through sclera. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2000;41(5):1181-5.
94. Grimaudo MA, Tratta E, Pescina S, Padula C, Santi P, Nicoli S. Parameters affecting the transscleral delivery of two positively charged proteins of comparable size. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;521(1-2):214-21.



95. Pescina S, Govoni P, Antopolsky M, Murtomaki L, Padula C, Santi P, Nicoli S. Permeation of proteins, oligonucleotide and dextrans across ocular tissues: experimental studies and a literature update. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;104(7):2190-202.
96. Barbero AM, Frasc HF. Effect of stratum corneum heterogeneity, anisotropy, asymmetry and follicular pathway on transdermal penetration. *Journal of controlled release*. 2017;260:234-46.
97. Calpena AC, Clares B, Fernández F. Technological, biopharmaceutical and pharmacokinetic advances: New formulations of application on the skin and oral mucosa. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. 2011:175-98.
98. Qaddoumi MG, Ueda H, Yang J, Davda J, Labhasetwar V, Lee VHL. The Characteristics and Mechanisms of Uptake of PLGA Nanoparticles in Rabbit Conjunctival Epithelial Cell Layers. *Pharmaceutical Research*. 2004;21(4):641-8.
99. Sahoo SK, Panyam J, Prabha S, Labhasetwar V. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *Journal of controlled release*. 2002;82(1):105-14.
100. Gupta H, Aqil M, Khar RK, Ali A, Bhatnagar A, Mittal G. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomedicine*. 2010;6(2):324-33.
101. Win KY, Feng SS. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*. 2005;26(15):2713-22.
102. El-Sousi S, Nácher A, Mura C, Catalán-Latorre A, Merino V, Merino-Sanjuán M, Díez-Sales O. Hydroxypropylmethylcellulose films for the ophthalmic delivery of diclofenac sodium. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012;65(2):193-200.
103. Schoenwald RD, Huang HS. Corneal penetration behavior of beta-blocking agents I: Physiochemical factors. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1983;72(11):1266-72.
104. Thomas M, Szeto V, Gan C, Polse K. Sequential staining: The effects of sodium fluorescein, osmolarity, and pH on human corneal epithelium. *International Contact Lens Clinic*. 1997;24(5):179-80.
105. Draize J, Woodard G, Calvery H. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1944;82:377-90.
106. Kay J.H, Calandra J.K, Interpretation of eye irritation test. *Journal of Cosmetic Science*. 1962;13:281-9.

107. Spampinato S, Marino A, Bucolo C, Canossa M, Bachetti T, Mangiafico S. Effects of sodium naproxen eye drops on rabbit ocular inflammation induced by sodium arachidonate. *Journal of ocular pharmacology*. 1991;7(2):125-33.
108. Rathore MS, Majumdar DK. Effect of formulation factors on in vitro transcorneal permeation of gatifloxacin from aqueous drops. *Journal of The American Association of Pharmaceutical Scientists*. 2006;7(3):57.
109. Tong Y-C, Chang S-F, Liu C-Y, Kao WWY, Huang CH, Liaw J. Eye drop delivery of nano-polymeric micelle formulated genes with cornea-specific promoters. *The Journal of Gene Medicine*. 2007;9(11):956-66.
110. Furrer P, Mayer JM, Gurny R. Ocular tolerance of preservatives and alternatives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2002;53(3):263-80.
111. Lin Z, Liu X, Zhou T, Wang Y, Bai L, He H, Liu Z. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride. *Molecular Vision*. 2011;17:257-64.
112. Xiong C, Chen D, Liu J, Liu B, Li N, Zhou Y, Liang X, Ma P, Ye C, Ge J, Wang Z. A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2008;49(5):1850-6.

