



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estabilització de sistemes polimèrics nanoestructurats de pioglitazona per al tractament de la inflamació ocular: estudis *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*

Ester Miralles Cardiel

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



ESTER MIRALLES CARDIEL

TESI DOCTORAL

2023



ESTABILITZACIÓ DE SISTEMES POLIMÈRICS  
NANOESTRUCTURATS DE PIOGLITAZONA  
PER AL TRACTAMENT DE LA INFLAMACIÓ  
OCULAR: ESTUDIS *IN VITRO*,  
*EX VIVO* I *IN VIVO*

Ester Miralles Cardiel



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**ESTABILITZACIÓ DE SISTEMES POLIMÈRICS  
NANOESTRUCTURATS DE PIOGLITAZONA PER AL  
TRACTAMENT DE LA INFLAMACIÓ OCULAR:  
ESTUDIS *IN VITRO*, *EX VIVO* I *IN VIVO***

Ester Miralles Cardiel

Barcelona, 2023





UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Programa de Doctorat

“Química Analítica i Medi Ambient”

Departament d’Enginyeria Química i Química Analítica

Facultat de Química

**ESTABILITZACIÓ DE SISTEMES POLIMÈRICS NANOESTRUCTURATS  
DE PIOGLITAZONA PER AL TRACTAMENT DE LA INFLAMACIÓ  
OCULAR: ESTUDIS *IN VITRO*, *EX VIVO* I *IN VIVO***

Memòria presentada per **Ester Miralles Cardiel** per optar al grau de doctora per la  
Universitat de Barcelona

**Directores**

**Dra. Ana Cristina Calpena Campmany**

**Dra. Marcelle Silva de Abreu**

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica, i Físicoquímica  
Facultat de Farmàcia i Ciències de l’Alimentació  
Universitat de Barcelona

**Tutora**

**Dra. Cristina Ariño Blasco**

Departament d’Enginyeria Química i Química Analítica  
Facultat de Química  
Universitat de Barcelona

BARCELONA, 2023



## **AGRAÏMENTS**





Primer de tot vull donar les gràcies a les meves directores, la Dra. Ana Calpena i la Dra. Marcelle Silva de Abreu, i al Dr. Isidre Casals els quals van proposar-me la realització d'aquesta tesi doctoral. Ells van creure sempre en les meves possibilitats i gràcies a l'esforç de tots hem aconseguit fer-ho. Sense els seus ànims i la seva dedicació, aquest projecte no hagués estat possible. Gràcies a ells he pogut actualitzar el meu currículum de recerca el qual havia començat fa molts anys, just en acabar els estudis de química.

A la Dra. Christina Kamma-Lorger per la seva disposició a ajudar i als seus coneixements en tècniques òptiques de sincrotró per fer estudis d'estructures biològiques. També vull agrair a tots els altres col·laboradors de les publicacions, la seva contribució.

Al Departament de Química Analítica, a tots els que he conegut durant tots aquests anys des de l'inici dels estudis de llicenciatura, durant el meu primer pas pel Departament i en la nova etapa de Professor Associat; als que hi són, als que no hi són, i als que estaran sempre en la memòria. Especialment a la Dra. M<sup>a</sup> Dolors Prat, la Dra. Mercè Granados i el Dr. Ramon Compañó (en memòria), amb qui em vaig iniciar en el món de la recerca. I també especialment a la Dra. Cristina Ariño que ha estat la tutora d'aquesta tesi, amb qui vaig compartir les estones d'oci als inicis al Departament, que m'ha ajudat moltíssim en tots els tràmits burocràtics i que m'ha donat molt suport durant aquest període.

A la Manoli, per trobar els papers de la suficiència investigadora a l'arxiu de la Facultat de Químiques de la UB i que va possibilitar la realització d'aquesta Tesi.

A tota la meva família, que sempre han confiat en mi, no m'han posat mai cap impediment i sempre m'han deixat prendre les meves pròpies decisions. I especialment a la meva filla Alessia i a la memòria de la meva mare.

Als meus amics de la feina als Centres Científics i Tecnològics (CCiTUB), l'Alberto, l'Olga, la Regina i la Vicky, que han contribuït a fer passatger aquest període de feina pel que suposa tenir i complir amb un treball a temps complet i compaginar-lo amb feines extra de recerca.

I a tots els meus amics que sempre m'han animat a superar reptes com aquest, i que per l'edat que tinc, considero que ja en són força i per això no poso noms.



## ÍNDIX

i. Abreviatures i acrònims	
ii. Resums	
iii. Estructura de la tesi	
1. INTRODUCCIÓ .....	3
1.1. ANATOMIA I FISIOLOGIA DE L'ULL HUMÀ.....	3
1.2. MALALTIES OCULARS INFLAMATÒRIES.....	6
1.3. VIES D'ADMINISTRACIÓ OCULAR.....	9
1.4. FARMACOLOGIA.....	14
1.5. RECEPTORS ACTIVATS PER PROLIFERADORS DE PERSOXISOMES GAMMA (PPAR $\gamma$ ).....	17
1.6. LA PIOGLITAZONA.....	18
1.7. TRANSPORT DE FÀRMACS AMB SISTEMES D'ALLIBERAMENT CONTROLAT.....	22
1.7.1. NANOPARTÍCULES POLIMÈRIQUES.....	28
1.7.1.1. NANOPRECIPITACIÓ O DESPLAÇAMENT DEL DISSOLVENT.....	31
1.7.1.2. NANOPARTÍCULES DE PLGA-PEG.....	32
1.7.2. ESTABILITZACIÓ DE LES NANOPARTÍCULES A LLARG TERMINI.....	37
1.7.3. CARACTERITZACIÓ FÍSICOQUÍMICA DE LES NANOPARTÍCULES.....	42
1.8. AVALUACIÓ BIOFARMACÈUTICA DE LES FORMES DE DOSIFICACIÓ OFTÀLMIQUES.....	47
1.8.1. ESTUDIS D'ALLIBERACIÓ <i>IN VITRO</i> I DE PENETRACIÓ <i>EX VIVO</i> .....	48
1.8.2. ESTUDIS DE BIODISPONIBILITAT DELS FÀRMACS.....	51
1.8.3. ESTUDIS DE TOLERÀNCIA OCULAR <i>IN VIVO</i> .....	52
1.8.3.1. TEST HET-CAM.....	53
1.8.3.2. TEST DE DRAIZE.....	54
1.8.3.3. ASSAIG DE L'EFICÀCIA ANTIINFLAMATÒRIA.....	54
1.8.4. CITOTOXICITAT CEL·LULAR.....	55
1.8.5. ESTUDIS DE LA ULTRAESTRUCTURA DE LA CÒRNIA.....	55
1.8.6. TRANSMITÀNCIA I HISTOLOGIA DE LA CÒRNIA.....	59

2. OBJECTIUS.....	65
3. RESULTATS.....	69
3.1. ARTICLE 1.....	71
3.2. ARTICLE 2.....	89
3.3. ARTICLE 3.....	111
4. DISCUSSIÓ.....	135
5. CONCLUSIONS.....	151
6. BIBLIOGRAFIA.....	155

## i. Abreviatures i acrònims

Abreviatura/ Acrònim	Anglès	Català
BCS	<i>Biopharmaceutics Classification System</i>	Sistema de classificació biofarmacèutica
DLS	<i>Dinamic Light Scattering</i>	Dispersió de la llum dinàmica
DMSO	<i>Dimethylsulfoxide</i>	Dimetilsulfòxid
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>	Calorimetria diferencial d'escombratge
EE	<i>Encapsulation Efficacy</i>	Eficàcia d'encapsulació
EMA	<i>European Medicines Agency</i>	Agència Europea dels Medicaments
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	Administració d'Aliments i Fàrmacs dels Estats Units
FTIR	<i>Fourier Transform Infra Red Spectroscopy</i>	Espectroscòpia Infraroja amb Transformada de Fourier
HET-CAM	<i>Hen Egg Test-Chorioallantoic Membrane</i>	Test d'irritació de mucoses amb membrana corioal-lantoide d'ou de gallina
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	Cromatografia de Líquids d'Alta Resolució
KSC	<i>Keratoconjunctivitis Sicca</i>	Queratoconjuntivitis seca
LC	<i>Liquid Chromatography</i>	Cromatografia de Líquids
LOD	<i>Limit of Detection</i>	Límit de Detecció
LOQ	<i>Limit of Quantitation</i>	Límit de Quantificació
MS	<i>Mass Spectrometry</i>	Espectrometria de Masses
NP	<i>Nanoparticle</i>	Nanopartícula
NS	<i>Nanosystem</i>	Nanosistema
PEG	<i>Polyethylene glycol</i>	Polietilenglicol
PGZ	<i>Pioglitazone</i>	Pioglitazona
PGZ-NPs	<i>Pioglitazone Nanoparticles</i>	Nanopartícules de pioglitazona
PI	<i>Polydispersity Index</i>	Índex de polidispersitat
PLGA	<i>poly(lactic-co-glycolic acid)</i>	Àcid poli(làctic-co-glicòlic)
PPAR	<i>Peroxisomes proliferator-activated receptor</i>	Receptor activat per proliferadors de peroxisomes
PVA	<i>Polyvinyl alcohol</i>	Alcohol polivinílic
RES	<i>Reticuloendotelial System</i>	Sistema reticulo-endotelial
SAXS	<i>Small Angle X-Ray Scattering</i>	Dispersió amb Raigs X a angles baixos
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>	Cromatografia d'Exclusió per Grandària
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>	Microscòpia electrònica d'escombratge
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>	Microscòpia electrònica de transmissió
WAXS	<i>Wide Angle X-Ray Scattering</i>	Dispersió de Raigs X gran angular
XRD	<i>X-Ray Diffraction</i>	Difracció de Raigs X
Z <sub>AV</sub>	<i>Average Particle Size</i>	Grandària Mitjana de Partícula
ZP	<i>Zeta Potential</i>	Potencial Zeta



## ii. Resums

La pioglitazona (PGZ) és un fàrmac que s'utilitza per al tractament de la diabetis tipus 2 ja que incrementa la sensibilitat de les cèl·lules a la insulina plasmàtica. La PGZ actua com a agonista del receptor nuclear PPAR- $\gamma$ , el qual regula l'homeòstasi de la glucosa, el metabolisme dels lípids i la inflamació. És per això que s'investiguen altres possibles funcions de la PGZ, entre elles l'antiinflamatòria.

De fa unes quantes dècades la nanotecnologia també s'utilitza en el camp de la medicina i una de les principals aplicacions és el transport de fàrmacs amb sistemes nanoestructurats. En concret les nanopartícules (NPs) polimèriques presenten una gran versatilitat ja que transporten i alliberen els fàrmacs de forma perllongada. Per fabricar-les s'han de seleccionar polímers biodegradables i no tòxics i poden ser utilitzades en diferents vies d'aplicació. El desenvolupament de NPs ha esdevingut molt important per a l'aplicació ocular ja que les formes tradicionals (col·liris i cremes) s'eliminen ràpidament i això fa que la biodisponibilitat dels fàrmacs tradicionals sigui molt baixa.

Les NPs polimèriques de PGZ amb PLGA-PEG elaborades en aquesta tesi mitjançant la tècnica de la nanoprecipitació presentaven les següents característiques: una grandària aproximada de 250 nm amb un índex de polidispersitat  $< 0.2$ , una càrrega superficial aproximada de  $- 3$  mV i una eficàcia d'encapsulació al voltant del 90 %. Aquestes propietats són adequades per al tractament ocular, ja que és necessària una grandària  $< 10$   $\mu\text{m}$  per evitar molèsties, i la presència de càrrega superficial estabilitza el sistema, evitant la formació d'agregats. L'anàlisi fisicoquímica amb tècniques espectroscòpiques i calorimètriques va confirmar que la PGZ es troba dispersa dins de les NPs. Aquests sistemes col·loïdals s'han d'estabilitzar mitjançant un procés d'assecatge per poder emmagatzemar-los a llarg termini i en condicions ambientals. En aquest treball les NPs es van estabilitzar per la tècnica d'assecatge de l'aerosol (*spray drying*) i es va analitzar l'impacte del procés d'assecat en la integritat de l'estructura de les NPs, la repercussió en els perfils d'alliberament *in vitro* i en la penetració *ex vivo*, la toxicitat i l'efecte en l'activitat farmacològica. L'estudi de penetració de la formulació a través de membranes de diàlisi va proporcionar un alliberament retardat i durador de la PGZ, a diferència de la PGZ lliure que mostrava un lliurament sobtat (*burst effect*). L'anàlisi de la penetració *ex vivo* a través de còrnia i escleròtica de conill va revelar que una concentració suficient

de PGZ es va retenir en el teixit, evitant una excessiva penetració i per tant que la PGZ arribés a nivell sistèmic i fos eliminada fàcilment. La penetració corneal va seguir una funció hiperbòlica tant amb les aplicacions de la formulació inicial com en l'estabilitzada, mentre que la penetració a través de l'escleròtica va seguir un model lineal i més lent amb la fórmula estabilitzada.

El test d'irritació *Hen's Egg Test Chorioallantoic Membrane* (HET-CAM) va determinar que la tolerància de la formulació era òptima. El test de Draize de tolerància ocular *in vivo*, va confirmar que no hi havia signes d'irritació o dany i, respecte a l'eficàcia terapèutica de la formulació, es va demostrar que les NPs de PGZ aplicades en conills disminuïen significativament la inflamació quan s'indueïa la inflamació ocular amb araquidonat sòdic, comparant amb animals control no tractats amb NPs. Els estudis de toxicitat es van realitzar amb línies cel·lulars de retinoblastoma humà Y-79 demostrant que la viabilitat cel·lular es mantenia al 90 % passades 48 h.

En conills tractats amb PGZ-NPs, i en un estudi d'eficàcia en porcs, es va analitzar la ultraestructura de la còrnia mitjançant difracció de raigs-X amb radiació de sincrotró, utilitzant la tècnica SAXS (*Small-angle X-ray Scattering*), la qual va permetre avaluar possibles canvis en la distància interfibril·lar i en el diàmetre fibril·lar del col·lagen.

Es va determinar la presència de PGZ en els diferents teixits oculars (còrnia, escleròtica, cristal·lí, humor aquós i humor vitri) després de 4 h d'una dosi administrada en porcs, així com en conills, després de 10 dies aplicant-los una dosi diària. La determinació es va realitzar mitjançant un mètode de cromatografia de líquids amb detecció per espectrometria de masses, el qual es va desenvolupar i validar en aquesta tesi seguint les guies de validació dels mètodes bioanalítics. La presència de PGZ en tots els teixits indica que pot arribar al segment posterior de l'ull, el qual s'acostuma a tractar amb injeccions intraoculars dels principis actius per la seva inaccessibilitat.

En resum, les NPs desenvolupades poden ampliar l'aplicabilitat de la pioglitazona utilitzant-la per al tractament de la inflamació ocular en qualsevol part del globus ocular.



## **Abstract**

Pioglitazone (PGZ) is a drug used to treat type 2 diabetes by enhancing insulin sensitivity. PGZ acts as agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- $\gamma$ ), a nuclear receptor that regulates glucose homeostasis, lipid metabolism and inflammation. Because of that, PGZ is investigated beyond its primary use and studies are found employing it as anti-inflammatory in the treatment of different diseases.

Classical ocular drug delivery systems (eye drops and ointments) often fail to fight against diseases due to poor ocular bioavailability and low ocular residence time. Drug-loaded nanoparticles (NPs) are the new systems that can greatly improve the delivery and targeting of drugs to specific tissues and organs, therefore, the use of polymeric nanoparticles has reached much interest for ophthalmic drug delivery.

In this work, PGZ-loaded poly(lactic-co-glycolic)acid-polyethylene glycol (PLGA-PEG) NPs were synthesized and stabilized by the spray drying technique. The formulation was characterized physicochemically showing that it was suitable for ocular application and that PGZ was efficiently encapsulated in the polymer matrix. The nanosystem showed *in vitro* prolonged release in comparison with free PGZ and *ex vivo* permeation studies revealed not only a prolonged release but also that PGZ was retained in the cornea and sclera tissues. No toxicity was detected in the retinoblastoma cellular line Y-79. The formulation was tested in animal models with the objective of providing a new formulation safe for ocular treatment: HET-CAM test, Draize test, anti-inflammatory efficacy, corneal transparency, corneal histology and study of the ultrastructure of the cornea with small-angle X-ray scattering (SAXS).

A very sensitive and accurate LC-MS/MS method to determine pioglitazone in ocular tissues was developed and validated according to bioanalytical method guidelines to demonstrate that after the instillation, the drug penetrates through the cornea to the sclera, iris, aqueous and vitreous humours, and remains in the tissues.

In summary, the developed nanocarrier can extend the applicability of PGZ to inflammatory ocular processes.

### iii. Estructura de la memòria

Aquesta memòria es presenta com a compendi d'articles, la qual es divideix en sis apartats principals. La part introductòria (Introducció) consta principalment d'un resum de l'anatomia de l'ull, de les malalties inflamatòries oculars i la importància de la millora dels tractaments oculars amb noves formulacions basades en sistemes nanoestructurats. També s'hi troba la justificació de la selecció del fàrmac estudiat en aquest treball, la pioglitazona, i del polímer escollit per a la síntesi de la nanoformulació. Aquesta part també inclou la descripció dels fonaments de les tècniques i dels mètodes utilitzats en la part experimental realitzada, ja que la descripció detallada de les metodologies és inclosa als articles publicats que s'adjunten. Després de la introducció es presenten els objectius del treball realitzat (Objectius). Seguidament, les publicacions derivades dels estudis realitzats en aquesta tesi, es presenten a l'apartat Resultats, incloent una breu explicació prèvia del contingut de cadascuna de les publicacions.

Els articles inclosos a l'apartat de Resultats són els següents:

- **Publicació #1:** Esther Miralles-Cardiel, Marcelle Silva-Abreu, Ana Cristina Calpena i Isidre Casals. *Development and Validation of an HPLC–MS/MS Method for Pioglitazone from Nanocarriers Quantitation in Ex Vivo and In Vivo Ocular Tissues*. *Pharmaceutics* **2021**, 13, 650. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050650>. Quartil Q1; factor d'impacte 6.29 l'any 2021.
- **Publicació #2:** Marcelle Silva-Abreu, Esther Miralles, Christina S. Kamma-Lorger, Marta Espina, Maria Luisa García i Ana Cristina Calpena. *Stabilization by Nano Spray Dryer of pioglitazone polymeric nanosystems: development, in vivo, ex vivo and synchrotron analysis*. *Pharmaceutics* **2021**, 13, 1751. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111751>. Quartil Q1; factor d'impacte 6.29 l'any 2021.
- **Publicació #3:** Esther Miralles, Christina S. Kamma-Lorger, Òscar Domènech, Lilian Sosa, Isidre Casals, Ana Cristina Calpena i Marcelle Silva-Abreu. *Assessment of Efficacy and Safety Using PPAR- $\gamma$  Agonist-Loaded Nanocarriers for Inflammatory Eye*

*Diseases*. International Journal of Molecular Sciences 2022, 23, 11184.

<https://doi.org/10.3390/ijms231911184>.

Quartil Q1; factor d'impacte 6.208 els anys 2022-2023.

A continuació es fa una discussió global dels resultats obtinguts en els diferents articles (Discussió), i posteriorment es recullen les conclusions generals més importants del treball de recerca realitzat (Conclusions). Per acabar, es recopila la bibliografia emprada i altres fonts consultades (Bibliografia).



## **1. INTRODUCCIÓ**



## **1. INTRODUCCIÓ**

### **1.1. ANATOMIA I FISIOLOGIA DE L'ULL HUMÀ**

L'energia electromagnètica provinent del Sol és utilitzada pel sentit de la vista per percebre la llum en la franja de 400 a 700 nm. A més a més de la percepció de si hi ha llum o no, permet interpretar les reflexions d'aquesta energia radiant sobre el nostre entorn. Així ens permet interpretar la forma, la mida, el color, la distància, la posició i el moviment d'allò que es troba en el camp de visió. El sentit de la vista és el sentit que ens permet interaccionar amb el nostre entorn d'una manera més eficient.

El sentit de la vista consta d'unes sondes complexes, els dos ulls, connectats amb el cervell a través dels nervis òptics. El cervell processa els senyals que li arriben dels ulls a la zona occipital del còrtex, combina aquesta informació amb les dades històriques que poseeix, decideix si cal alguna actuació i coordina l'acció de parts del cos, inclosos els propis ulls, per respondre a l'estímul rebut.

L'ull és una estructura globular que en els humans té un diàmetre i una massa aproximats de 24 mm de 7.5 g respectivament. Des d'una perspectiva lateral, el segment anterior de l'ull és format per la còrnia, l'iris, la pupil·la, el cristal·lí, el cos ciliar i la part anterior de l'escleròtica (Figura 1). El segment posterior inclou l'humor vitri, la retina, la coroide, la part posterior de l'escleròtica i el nervi òptic. La capa per sota de l'escleròtica formada per l'iris, el cos ciliar i la coroide s'anomena úvea, la qual es caracteritza perquè té una alta irrigació sanguínia a la capa del mig. L'humor aquós és un líquid incolor que es troba entre ambdós segments i serveix per nodrir i oxigenar les estructures que no tenen aportació sanguínia com la còrnia i el cristal·lí.

La còrnia és considerada com el teixit més delicat i fràgil i la seva funció principal és la refracció de la llum, deguda a la seva forma esfèrica, al seu índex de refracció i a la seva superfície cònca [1]. Està formada bàsicament per cèl·lules epitelials, col·lagen, proteoglicans, queratinòcits, molècules i cèl·lules endotelials. L'organització de les fibres de col·lagen dins la còrnia i l'absència de sistema vascular, fan que la còrnia sigui

transparent. La transparència és essencial per a la funció visual i si s'hi produeix algun dany, la visió és afectada.

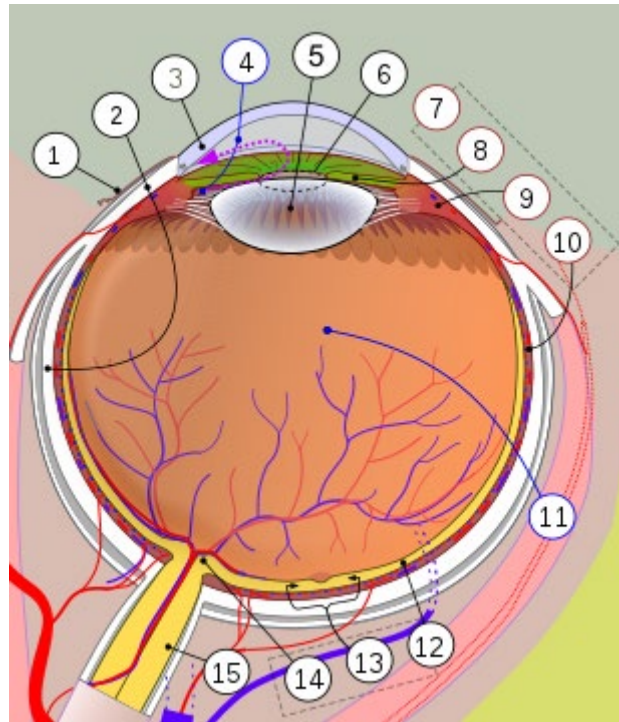


Figura 1. Diagrama simple d'un ull humà (secció horitzontal del dret vist des de dalt)  
1. Conjuntiva, 2. Escleròtica, 3. Còrnia, 4. Humor aquós, 5. Cristal·lí, 6. Pupila, 7. Úvea (amb Iris, 8. Cos ciliar, 9. Coroide), 10. Humor vitri, 11. Retina (amb 13. Màcula retinal i 14. Disc òptic, papil·la òptica → punt cec), 15. Nervi òptic. (Viquipèdia, imatge del domini públic, darrer accés 08/06/2023, <https://ca.wikipedia.org/wiki/Ull>).

Anatòmicament, la còrnia té cinc capes ben diferenciades (Figura 2): l'epiteli, la membrana de Bowman, l'estroma, la membrana de Descemet i l'endoteli, anomenades d'exterior a interior. L'any 2013, però, es va descobrir una sisena capa anomenada capa de Dua [2,3], la qual té un gruix aproximat de 15  $\mu\text{m}$  i està situada entre l'estroma i la membrana de Descemet. Aquesta capa és molt dura, resistent, acel·lular i impermeable a l'aire. L'estroma en humans té un gruix aproximat de 500  $\mu\text{m}$  i comprèn el 90 % del gruix total de la còrnia. L'estroma és constituït bàsicament de làmines de col·lagen, queratinòcits i proteoglicans. Les fibres de col·lagen estan disposades de forma paral·lela



a l'epiteli, tenen un diàmetre uniforme i un espai interfibril·lar regular, propietats que són essencials per al manteniment de la transparència de la còrnia [4].

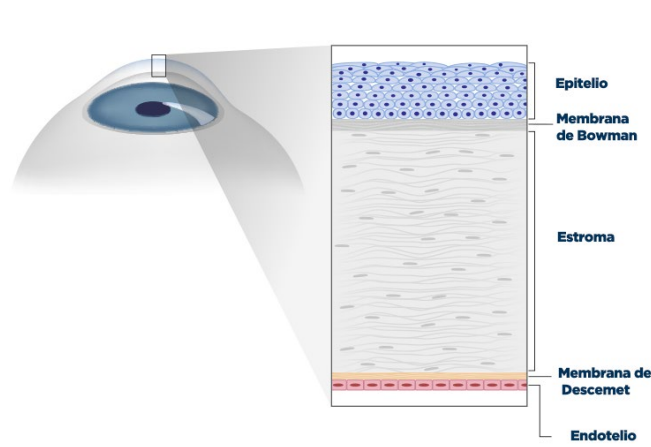


Figura 2. Estructura de la còrnia (<https://tusdudasdesalud.com/vision/anatomia-ojo/cornea-del-ojo/> darrer accés 08/06/2023, imatge del domini públic).

L'epiteli corneal és de naturalesa lipòfila, fet que limita la permeabilitat de les molècules hidròfiles. La còrnia és una barrera no només per a molts microorganismes sinó també per a l'absorció de fàrmacs. La part més interna de la còrnia, l'endoteli, fa de barrera entre la còrnia i l'humor aquós.

L'escleròtica és el que es coneix com "el blanc de l'ull". És una estructura elàstica i forta formada per fibres de col·lagen, que té la funció de mantenir la pressió intraocular. L'escleròtica és molt permeable a molècules hidròfiles.

L'iris està situat darrera de la còrnia i és la part de l'ull que té color. Aquesta membrana té un obertura anular davant del cristal·lí, que és la pupil·la. L'iris ajusta la quantitat de llum que arriba a la retina mitjançant la regulació del diàmetre (l'obertura) del cercle buit que defineix: la pupil·la. El cos ciliar descansa a l'iris i la seva funció principal és produir l'humor aquós. La corioide és la membrana responsable d'oxigenar i nodrir l'iris i els fotoreceptors de la retina. La membrana més interna de l'ull és la retina que és una estructura transparent formada per diferents capes que contenen els fotoreceptors. La retina té un paper fonamental en l'agudesa visual i la visió en color.

L'humor aquós és un fluid transparent localitzat a la cavitat anterior i la cavitat posterior de l'ull, mentre que l'humor vitri és un fluid transparent de consistència gelatinosa localitzat a la part posterior de l'ull. Els humors tenen la funció de nodrir la còrnia i mantenir l'ull en forma de globus. El cristal·lí és un separador en forma de lent biconvexa, elàstica, que permet que la llum arribi enfocada a la retina mercès a uns petits músculs que regulen la seva convexitat (músculs ciliars).

No menys important és l'aparell lacrimal, format per un conjunt d'estructures que es troben a l'òrbita ocular (glàndula lacrimal, canal lacrimal i conducte nasolacrimal) i que s'encarrega de la producció, secreció i eliminació de la llàgrima. És un dels mecanismes de protecció de l'ull que ajuda a eliminar residus, microorganismes i qualsevol cos estrany degut a les propietats antibacterianes de la llàgrima.

L'ull disposa del seu sistema immunitari per a protegir-se d'infeccions i regular els processos de curació després d'eventuals lesions. A l'interior de l'ull no hi ha vasos limfàtics però, com hem dit, la coroide el dota de vascularització, a través de la qual arriben les cèl·lules del sistema immunitari que s'instal·len a l'úvea (macròfags, cèl·lules dendrítiques i mastòcits). La còrnia és exposada constantment al món exterior i és lubricada amb una solució aquosa que facilita l'atac d'un ampli ventall de microorganismes. La seva manca de vascularització i la seva relativa separació immune de la resta del cos dificulten la defensa immune, que hi arriba des de l'úvea. Tot aquest aïllament de l'ull fa que l'administració de fàrmacs per resoldre problemes d'infecció i d'inflamació intraoculars tingui una dificultat especial. Les formes farmacèutiques tòpiques tradicionals com dissolucions, suspensions o cremes tenen poca eficàcia a causa de la seva poca penetració.

## **1.2. MALALTIES OCULARS INFLAMATÒRIES**

Les persones tenen una vista òptima quan tots els elements que configuren l'òrgan de la visió funcionen correctament, però si en falla algun es poden produir problemes típics com la miopia, la hipermetropia, l'astigmatisme, la presbícia o les cataractes, entre altres.

El sentit de la vista i l'estat dels ulls és molt important ja que el 50 % de la informació que rebem del nostre entorn ens arriba a través d'ells.

Les principals malalties inflamatòries que afecten el globus ocular i l'òrbita són reaccions al·lèrgiques, reaccions autoimmunes, uveïtis, escleritis, queratitis, conjuntivitis, i la patologia inflamatòria orbitària. Són malalties que poden afectar exclusivament les estructures de l'ull o bé formar part d'una malaltia sistèmica. Les inflamacions s'han de resoldre aviat perquè poden provocar fins i tot opacitat de la còrnia, amb la consegüent pèrdua de visió.

### **Uveïtis**

La uveïtis és una inflamació de l'ull que afecta qualsevol de les estructures que formen part de l'úvea, però que també pot afectar els teixits que l'envolten com l'escleròtica, la retina o el nervi òptic. L'úvea és molt sensible a processos infecciosos i inflamatoris ja que és el teixit amb més densitat de vasos sanguinis de l'organisme. La infecció de l'úvea pot provocar pèrdues de visió greus ja que està en contacte amb la retina, una de les estructures oculars més delicada, i és una de les principals causes de ceguesa.

Les possibles causes de la uveïtis són una infecció, un dany, o malalties inflamatòries o autoimmunes. Molts cops, però, les uveïtis són de causa desconeguda. Els símptomes són envermelliment, dolor, sensibilitat a la llum, visió borrosa, reducció de la visió o presència de formes fosques flotants al camp de visió. Les uveïtis es classifiquen depenent de la part inflamada:

- Uveïtis anterior: afecta la part més externa, entre la còrnia i l'iris, i és la forma més comuna d'uveïtis. També s'anomena iritis.
- Uveïtis intermèdia: afecta la retina i els vasos sanguinis just darrera del cristal·lí, així com l'humor vitri.
- Uveïtis posterior: afecta les capes internes, ja sigui la retina o la coroide.
- Panuveïtis: afecta totes les estructures intraoculars (càmera anterior, cavitat vítria, retina, coroide, vasos retinians). Són els processos més greus.

### **Escleritis**

L'escleritis és una inflamació crònica, dolorosa i força perillosa de l'escleròtica (capa blanca externa que protegeix l'ull) perquè pot ser destructiva. Pot afectar la part anterior

o la part posterior de l'estructura, i si afecta la part més superficial anomenada epiescleròtica, la inflamació s'anomena epiescleritis, que és menys greu i que poques vegades esdevé escleritis. L'escleritis està associada a malalties autoimmunitàries.

La queratitis és una inflamació de la còrnia la qual s'anomena queratitis superficial si només afecta la part externa (l'epiteli) i que és la més freqüent, o queratitis ulcerativa si afecta les capes més profundes. Aquesta segona és menys habitual però pot ser molt greu ja que si deixa una cicatriu en la còrnia (leucoma), la visió queda compromesa de manera severa. Les causes més freqüents que poden provocar queratitis són la sequedat ocular, virus, bacteris, substàncies tòxiques o les al·lèrgies.

### **Malaltia inflamatòria orbitària**

La malaltia inflamatòria orbitària es una inflamació benigna del teixit que està darrera de l'ull a la zona anomenada òrbita. L'òrbita és l'espai buit del crani on hi ha l'ull i el protegeix, igual que ho fan els músculs i els teixits que l'envolten. Pot ser un procés agut, crònic o recurrent.

La tiroïditis autoimmune (o malaltia de Grave) també presenta aquesta inflamació com a símptoma, entre altres.

### **Conjuntivitis**

La conjuntivitis és una inflamació de la conjuntiva, provocada majoritàriament per virus i bacteris. Algunes al·lèrgies també poden causar-la, així com substàncies químiques o irritants. És una afecció lleu i no sol provocar danys importants.

### **Malalties amb sequedat ocular**

La queratoconjuntivitis seca (*keratoconjunctivitis sicca*, KSC) és una malaltia associada amb la inflamació de la superfície ocular i les glàndules lacrimals. Pot ser causada per una deficiència o una evaporació excessiva de la llàgrima.

El síndrome de Sjögren és un trastorn crònic que esdevé quan el sistema immunitari ataca les glàndules que produeixen humitat als ulls, boca i altres parts del cos.

La resposta inflamatòria és essencial per a la recuperació d'una ferida o lesió. Això no obstant, el procés inflamatori també pot provocar danys als teixits, fomentar l'angiogènesi i, en el cas de lesions oculars, pot resultar en opacitat de la còrnia. Les cirurgies oftàlmiques poden provocar, com a efecte secundari, una inflamació postoperatòria. El tractament convencional de la inflamació és a base d'esteroides (corticoesteroides) mitjançant col·liris si la inflamació afecta la part anterior, però quan afecta a la part posterior pot ser necessari l'ús de corticoesteroides per via oral o mitjançant injeccions al voltant de l'ull o intraoculars [5,6].

### **1.3. VIES D'ADMINISTRACIÓ OCULAR**

Les vies d'administració de les formes farmacèutiques es classifiquen en:

- Externa: pell, mucoses, oïda, orofaringe.
- Interna: entèrica, parenteral, inhalatòria.
- Percutània: a través de la pell.

Quan es pretén l'absorció sistèmica d'un principi actiu, els medicaments s'administren per via parenteral (injecció subcutània, intramuscular, intravenosa, intraespinal, intraarticular) i enteral (injecció directa en el tracte gastrointestinal). Avui dia hi ha comprimits, dragees i càpsules recoberts que traspassen l'estómac sense dissoldre's i és equivalent a la via enteral, així com també l'administració de supositoris. En menor extensió s'empra la via pulmonar (o respiratòria) o nasal, que també formen part de la ruta parenteral. La ruta oftàlmica i vaginal són per a l'administració local, i per tant no sistèmica, dels fàrmacs [7]. L'administració de fàrmacs normalment és sistèmica tot i que ocasionalment, degut a la toxicitat del fàrmac o a la severitat de la malaltia, es pot aplicar directament a l'òrgan afectat.

La via externa o tòpica consisteix en l'aplicació directa del medicament sobre la pell i les mucoses d'orificis naturals amb l'objectiu d'obtenir un efecte local en el lloc d'aplicació. En aquest cas el medicament s'aplica en forma de gels, locions, gotes, cremes, pols i unguents.

Les formes oftàlmiques clàssiques són les següents [8]:

- Gotes o col·liris: són dissolucions estèrils i isotòniques que contenen el fàrmac o només ingredients amb efecte lubricant, o simplement llàgrima.
- Cremes: són preparacions semisòlides homogènies i estèrils.
- Hidrogels: són estructures tridimensionals (polímers hidròfils) inflades per l'aigua, amb l'objectiu d'incrementar el temps de residència dels fàrmacs.
- Emulsions: són un sistema estable format per dos líquids immiscibles, un oli i aigua, estabilitzat per un tensioactiu i sovint un co-tensioactiu. Normalment l'objectiu és millorar la solubilitat de les substàncies.
- Inserts oftàlmics: són fets de polímers flexibles i es col·loquen a la conjuntiva, entre la parpella i l'escleròtica.
- Lents de contacte: alguns fàrmacs es poden incorporar a les lents.
- Injeccions intraoculars: per tractar la part posterior de l'ull.

Les formes innovadores són les dispersions col·loïdals, les quals es detallaran més endavant al punt 1.7 de la memòria: microemulsions, nanoemulsions, nanopartícules, liposomes, niosomes i dendrímers.

Quan hi ha una malaltia que afecta l'ull es fa difícil administrar una medicació per fer-la arribar a la part posterior. El tractament de malalties oculars que involucren el segment posterior es basa a aplicar injeccions intravitreals/intraoculars, subretinals o subconjuntivals, que són tractaments molt invasius i que tenen molt risc, i requereixen anestèsia local i personal especialitzat. Els tractaments no invasius es basen en l'administració de fàrmacs per via tòpica (gotes o cremes) o per via oral. Els tractaments del segment anterior són sempre en forma de via tòpica (Figura 3).

Les gotes, per exemple, s'eliminen ràpidament de la superfície ocular i per tant els fàrmacs presenten poca retenció. Normalment, menys d'un 5 % de la quantitat administrada es reté a la superfície ocular degut a la barrera de l'epiteli corneal i al drenatge nasolacrimonial [9]. Tot i ser tractaments molt més acceptats pels pacients, la poca biodisponibilitat dels fàrmacs fa que sigui difícil que penetrin a la còrnia i a la retina. El flux del líquid lacrimal elimina els fàrmacs cap al conducte en pocs minuts. Es calcula

que el flux és aproximadament  $0.05 \mu\text{l/s}$  [10]. La pel·lícula lacrimal es calcula que es renova cada 2-3 min.

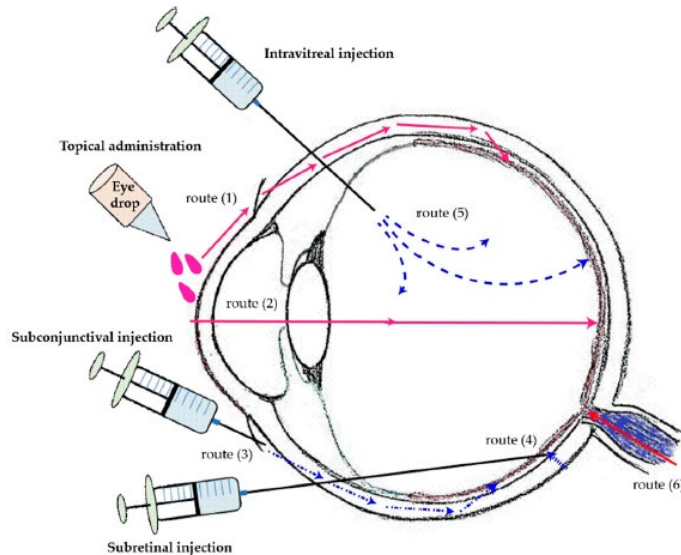


Figura 3. Mètodes i rutes de l'administració ocular: tòpica (1 i 2), injeccions (3, 4, 5), transport des de la circulació sistèmica via medicació oral (6) [9].

Les barreres oculars a l'absorció de fàrmacs per via tòpica de fora a dins són: el drenatge nasolacrimal, la pel·lícula lacrimal, la barrera corneal i la barrera de la conjuntiva i escleròtica. Les barreres del segment anterior són la pel·lícula lacrimal, l'epiteli corneal i l'humor aquós. Les barreres del segment posterior són l'escleròtica, la coroide i l'humor vitri [11].

La capacitat del sac conjuntival és aproximadament de  $25 \mu\text{l}$ , per tant la instil·lació d'un volum superior és perd per sobreiximent. La quantitat de fàrmac que es reté al sac es barreja amb la pel·lícula lacrimal precorneal abans de contactar amb la superfície ocular. S'ha demostrat que encara que s'utilitzi un sistema sòlid de transport la biodisponibilitat ocular només assoleix un 10% cosa que demostra la importància de les barreres a la superfície ocular, i no només la barrera dels teixits (per exemple còrnia, conjuntiva i escleròtica) sinó també de la pel·lícula lacrimal [12].

La pel·lícula lacrimal està constituïda per una capa lipídica externa (0.1  $\mu\text{m}$ ), una capa aquosa intermèdia (8  $\mu\text{m}$ ) i una capa interna de mucus (0.1  $\mu\text{m}$ ). La capa lipídica evita l'evaporació de la llàgrima, la capa aquosa ajuda a escampar la llàgrima per la superfície i la capa mucilaginosa adhereix la llàgrima a la superfície ocular. El volum de llàgrima a l'ull és de 6-8  $\mu\text{L}$ . La llàgrima drena cap al conducte nasolacrimal. El drenatge i la llàgrima són els principals factors que contribueixen a la pèrdua de fàrmac.

La còrnia i la conjuntiva formen la superfície ocular. Les substàncies passen a través de la superfície ocular per un mecanisme transcel·lular o paracel·lular segons si la substància és lipòfila o hidròfila respectivament. Els fàrmacs o substàncies lipòfiles experimenten absorció transcel·lular mentre que les substàncies hidròfiles o molècules grans són transportades a través dels espais paracel·lulars. La conjuntiva afavoreix la ruta paracel·lular perquè és més porosa i els porus són més grans. La majoria dels fàrmacs són lipòfils i molècules petites, per tant la ruta transcorneal proporciona millor absorció. A la conjuntiva li arriba una xarxa de capil·lars i vasos limfàtics per tant en general experimenta millor l'absorció sistèmica.

La ruta d'absorció dels fàrmacs aplicats tòpicament es bàsicament transcorneal. Tot i això, la biodisponibilitat s'estima en menys del 5 % fins i tot per a molècules lipòfiles.

Cadascuna de les capes de la còrnia té diferent polaritat i per tant és una estructura que limita la velocitat de penetració dels fàrmacs. L'epiteli i l'endoteli són lipòfils, l'estroma és hidròfil. La major part del transport és transcel·lular perquè les cèl·lules de l'epiteli estan fortament unides i la grandària del porus és molt petita. El transport transcel·lular està molt influenciat pel caràcter lipòfil de les substàncies, a més lipòfil incrementa la permeabilitat. L'estroma és una estructura molt oberta que permet el pas de molècules fins a 500000 Da. Limita la velocitat de pas de les molècules lipòfiles però deixa passar fàcilment les molècules hidròfiles, i actua com a reservori de molècules degut al seu volum de fluid. L'endoteli està format per una sola capa de cèl·lules hexagonals i posa poca resistència al pas de molècules cap a l'humor aquós. La difusió passiva dependrà majoritàriament del caràcter lipòfil i en menor extensió del pes molecular, la càrrega i el grau d'ionització. L'epiteli de la conjuntiva té les unions cel·lulars més febles i deixa



passar més fàcilment les molècules hidròfiles i més grans. A la conjuntiva, però, la pèrdua de fàrmac és bàsicament per absorció sistèmica.

L'escleròtica està formada per fibres de col·lagen i proteoglicans incrustats en una matriu extracel·lular. La seva permeabilitat és similar a la de l'estroma corneal i inversament proporcional al radi de la molècula. La càrrega també afecta: molècules carregades positivament penetren més lentament perquè interaccionen amb la matriu de proteoglicans amb càrrega negativa.

La combinació de la dificultat de penetrar a través de la còrnia juntament amb la ràpida eliminació dificulten una administració eficient de medicaments, és per això que hi ha molts estudis per trobar sistemes que millorin l'eficiència dels col·liris i altres preparacions farmacèutiques. Una de les opcions és augmentar la concentració de fàrmac però això pot causar irritació o toxicitat, i més presència de fàrmac en circulació sanguínia i per tant més efectes secundaris. En lloc d'augmentar la dosi es pot augmentar la freqüència d'instil·lació, però pot ser un inconvenient per als pacients sobretot per als que no es poden administrar ells mateixos el tractament, igual que pot causar més efectes secundaris perquè la dosi, al cap i a la fi, també seria elevada. La investigació recent està més enfocada a utilitzar col·liris basats en nanopartícules polimèriques per millorar la penetració i el temps de residència del fàrmac.

Considerant tots els inconvenients que té el tractament ocular, la millora de les formulacions oculars tòpiques ha d'anar dirigida a minimitzar la pèrdua de fàrmac i millorar la biodisponibilitat, amb reducció de les instil·lacions.

Les característiques que ha de complir una formulació oftàlmica per via tòpica són les següents [13]:

- Que faciliti un temps considerable de contacte amb la còrnia.
- Que faciliti el transport transcorneal per absorció (transcel·lular i paracel·lular).
- La viscositat ha de ser adequada per millorar el contacte amb la còrnia i per evitar parpelleig, producció de llàgrima excessiva o que no causi visió borrosa.
- Ha de tenir un pH adequat per afavorir la forma molecular que faciliti l'absorció però que no sigui irritant.

- Que no causi efectes adversos.
- Que sigui fàcil d'administrar.
- Que no sigui necessària una freqüència elevada d'administració, per la comoditat del pacient.

Els sistemes col·loïdals de transport de fàrmacs s'han estudiat de fa poques dècades perquè compleixen tots aquests requisits. Aquests sistemes nanomètrics actuen de vectors que atrapen, retenen, transporten i alliberen els fàrmacs a la proximitat o al lloc d'acció [8,13,14].

Cal tenir en compte que la grandària de la partícula a les formulacions destinades al tractament ocular no ha de superar 10 µm per a evitar una sensació de malestar que provoqui més secreció de llàgrima, i per tant un drenatge ràpid de la dosi instil·lada i consegüentment més baixa biodisponibilitat [15]. Així mateix sempre serà més desitjable una menor grandària per tenir més àrea superficial i millor penetració a través de les membranes biològiques.

#### **1.4. FARMACODINÀMIA**

La via d'administració d'un fàrmac afecta directament la seva biodisponibilitat, cosa que en determina tant l'inici com la durada de l'efecte farmacològic. En el disseny d'una forma farmacèutica s'ha de tenir en compte: la ruta d'administració que es desitgi, la dosi, les característiques anatòmiques i fisiològiques del lloc d'administració, com per exemple la permeabilitat de les membranes, les propietats fisicoquímiques del lloc com el pH o la pressió osmòtica dels fluids fisiològics, i la interacció del fàrmac amb el lloc d'administració. Tots aquests aspectes són importants en la fabricació i en l'avaluació biofarmacèutica dels medicaments.

La farmacodinàmica és l'estudi de les accions i efectes dels fàrmacs. L'acció farmacològica és la modificació, ja sigui estímul o inhibició, que produeixi un fàrmac en les funcions cel·lulars de l'organisme. L'efecte farmacològic són els canvis detectables que es produeixen després de l'alteració d'una funció cel·lular.

Els fàrmacs produeixen dos tipus d'accions en l'organisme:

- Accions específiques: fer de mediadors per receptors que actuen per la seva acció sobre dianes a l'organisme, accions executades sobre estructures concretes.
- Accions inespecífiques: no mitjançades per receptors o dianes sinó per les seves característiques fisicoquímiques.

La majoria dels fàrmacs actuen de manera específica, és a dir, el fàrmac actua sobre algun sistema de l'organisme.

Els receptors són estructures macromoleculares de naturalesa proteica, que solen estar associats a lípids o a cadenes d' hidrocarbur, situats en la membrana plasmàtica, en el citosol o en el nucli, als quals s'hi uneixen, de manera selectiva i específica, substàncies endògenes com els neurotransmissors, les hormones o mediadors cel·lulars. Els receptors es denominen segons els mediadors front als quals responen: adrenèrgics (adrenalina), colinèrgics (acetilcolina), estrogènics (estradiol), etc. Com a conseqüència de la unió, es modifica la conformació del receptor i es desencadenen canvis cel·lulars (transducció del senyal) que donen lloc a una acció. Els receptors són els sensors del sistema de comunicacions químiques que coordinen la funció de totes les cèl·lules de l'organisme: reconeixen i responen als senyals químics endògens.

Per tal que el fàrmac es pugui fixar als receptors i generar una acció farmacològica, ha de complir dos requisits fonamentals: afinitat i eficàcia.

- Afinitat: és la capacitat que té un fàrmac d'unir-se amb el receptor específic i formar el complex fàrmac-receptor, la qual és deguda a la formació d'enllaços entre el fàrmac i el seu receptor. El més freqüent és l'enllaç iònic, però pot reforçar-se amb forces de Van der Waals, ponts d'hidrogen o interaccions hidrofòbiques. De forma excepcional es formen enllaços covalents que són més fermes i originen interaccions irreversibles.
- Eficàcia: l'eficàcia d'un fàrmac es defineix com la capacitat que té per, a partir de la seva interacció amb un receptor, modificar diversos processos de transducció de resposta cel·lular i generar una resposta biològica, és a dir, activar el receptor. El fàrmac que té aquesta capacitat es denomina agonista (afinitat + eficàcia). El cas contrari, un fàrmac que s'uneix a un receptor i no és capaç d'activar-lo, es denomina antagonista. Aquests poden bloquejar el receptor i impedir que

l'agonista faci la seva acció (afinitat sense eficàcia). Tant els fàrmacs agonistes com els antagonistes es poden fixar a un mateix receptor i competir o no per l'ocupació.

El procés destinat a produir un medicament que es pugui comercialitzar per a una necessitat clínica específica es pot dividir en tres fases principals:

1. Descobriment del fàrmac, o fase en la que s'escullen les molècules candidates en funció de les seves propietats farmacològiques.
2. Desenvolupament preclínic, o fase en la que es realitzen un gran ventall d'estudis amb animals (per exemple proves de toxicitat, anàlisi farmacocinètica/farmacodinàmica, i formulació).
3. Desenvolupament clínic, o fase en la que es comprova l'eficàcia, els efectes secundaris i els perills potencials que el fàrmac provoca en voluntaris sans i en pacients. Aquesta etapa se subdivideix en tres fases: fase I d'estudis amb persones voluntàries sanes; fase II d'assajos amb pacients a petita escala; fase III d'assajos a gran escala.

El desenvolupament i llançament d'un nou fàrmac al mercat és un procés tediós i llarg, que de mitjana pot trigar de dotze a setze anys i requereix inversions milionàries [16,17]. Els fàrmacs aprovats per les agències reguladores amb perfils segurs i farmacocinètica coneguda, poden ser avaluats ràpidament en estudis clínics de fase II si tenen una nova aplicació confirmada. Això fa que hi hagi un estalvi al voltant del 40 % del cost total del llançament del fàrmac al mercat.

Per tant, una bona estratègia és la reconversió de fàrmacs reconeguts com a segurs, investigant noves aplicacions, nous tractaments, nous mètodes d'administració i noves formulacions.

## 1.5. RECEPTORS ACTIVATS PER PROLIFERADORS DE PEROXISOMES GAMMA (PPAR $\gamma$ )

En aquest estudi es treballa amb un fàrmac capaç d'activar uns receptors nuclears que els bioquímics han denominat PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferators activated receptors gamma*) [18]. Els PPAR, receptors que s'activen amb proliferadors de peroxisomes, són una família de receptors nuclears que actuen com a factors de transcripció fent de mediadors en canvis d'expressió gènica específics després d'estímuls nutricionals. La majoria d'aquests gens codifiquen proteïnes relacionades amb diferents aspectes del metabolisme dels àcids grassos (transport, oxidació, etc.). L'estudi dels PPAR ha demostrat que els àcids grassos no només són elements estructurals de la membrana cel·lular sinó que són lligands que activen els PPAR, modulen l'expressió gènica cel·lular i són molècules importants en diversos sistemes de transducció de senyal.

Els proliferadors de peroxisomes són un grup de compostos que indueixen un augment de la grandària i en el nombre de peroxisomes hepàtics i renals. Els peroxisomes són orgànuls cel·lulars especialitzats en la producció de reaccions oxidatives mitjançant les quals l'oxigen molecular s'utilitza com a substrat per a produir peròxid d'hidrogen. La funció més important dels peroxisomes és la detoxificació de substàncies sanguínies, i l'oxidació d'àcids grassos de cadena llarga que per la seva grandària no es poden oxidar al mitocondri.

La família dels PPAR inclou tres tipus de receptors:  $\alpha$ ,  $\delta$  i  $\gamma$ . Els PPAR tenen una estructura similar però difereixen en la seva distribució tissular així com en l'especificitat dels seus lligands. Els diferents PPAR s'activen quan se'ls uneixen lligands específics. El PPAR $\gamma$  és el principal regulador de la diferenciació d'adipòcits i a més afavoreix la sensibilitat a la insulina. Millora la captació de lípids dels macròfags, així com l'exportació de lípids, i té efectes antiinflamatoris [19].

L'acció principal dels PPAR és el control del metabolisme dels lípids, això no obstant, el seu paper va més enllà, degut a la implicació dels lípids en la senyalització cel·lular o comunicació entre cèl·lules. Els lípids també són mediadors en processos inflamatoris i

per tant els PPAR podrien fer de mediadors en l'activació de les cèl·lules immunològiques [20].

## 1.6. LA PIOGLITAZONA

La pioglitazona (PGZ) és un fàrmac que s'utilitza per al tractament de la diabetis tipus II, la comercialització del qual fou aprovada l'any 1999. El seu mecanisme d'acció es basa a provocar un augment de la sensibilitat de les cèl·lules del cos a la insulina, principalment de les cèl·lules musculars i les cèl·lules que formen el teixit adipós. La insulina és una hormona peptídica, sintetitzada als illots de Langerhans del pàncrees, que ajuda a controlar el nivell de glucosa a la sang (homeòstasi) evitant pujades excessives de la seva concentració que podria arribar a resultar tòxica i regula l'entrada de glucosa a les cèl·lules de l'organisme. La pioglitazona provoca un efecte semblant i la seva administració contribueix a reduir la concentració de glucosa en sang (agent hipogluceçant) [21].

El seu nom sistemàtic és *(RS)*-5-(4-[2-(5-etilpiridin-2-il)etoxi]benzil)tiatzolidina-2,4-diona i pertany a la família de les tiatzolidinediones (TZD). La molècula és un èter aromàtic que conté un carboni asimètric i el compost se sintetitza i s'utilitza en forma de racèmic ja que els estudis han demostrat que no hi ha diferència d'activitat farmacològica entre els estereoisòmers [22]. Aquest fàrmac, com a clorhidrat, s'administra en forma de comprimits.

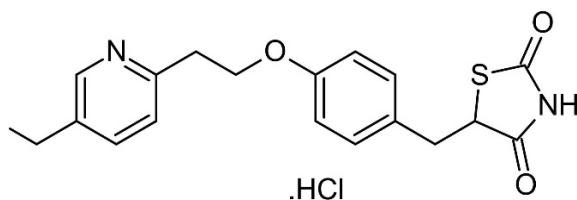


Figura 4. Estructura química de la pioglitazona clorhidrat.

La PGZ en forma de clorhidrat és soluble en dimetilsulfòxid (DMSO), N-dimetilformamida i metanol, és poc soluble en etanol, molt poc soluble en acetona i acetonitril, pràcticament insoluble en aigua i insoluble en èter. És una base feble amb un valor de  $\log P_{\text{Octanol/aigua}}$  de 2.3.

El Sistema de Classificació Biofarmacèutic (*Biopharmaceutical Classification System*, BSC) és un sistema científic per classificar un fàrmac basat en la seva solubilitat en aigua, permeabilitat intestinal, i dissolució, i per tant és una eina per entendre el concepte d'absorció de les substàncies farmacèutiques. El BSC categoritza els fàrmacs en un dels grups següents:

Classe I – solubilitat alta, permeabilitat alta

Classe II – solubilitat baixa, permeabilitat alta

Classe III – solubilitat alta, permeabilitat baixa

Classe IV – solubilitat baixa, permeabilitat baixa

En el BSC la PGZ es troba dins de la Classe II, és a dir, lleugerament soluble i molt permeable [23,24].

L'acció de la pioglitazona rau en la seva unió als receptors nuclears PPAR $\gamma$ , on actua com a agonista dels PPAR $\gamma$ , que tal i com s'ha dit anteriorment són un regulador de gens involucrats en el metabolisme dels lípids. A més, provoca l'activació de diferents gens que promouen i faciliten les accions de la insulina [21].

S'ha descrit que també produeix efectes antiinflamatoris i antiateroscleròtics, indueix diferenciació cel·lular i inhibeix el creixement cel·lular i l'angiogènesi [25].

La pioglitazona té una acció preventiva de la inflamació coronària i l'arteriosclerosi induïda per L-NAME (N-Nitro-L-arginina metilester), que és un inhibidor no selectiu de la sintetasa d'òxid nítric (NO) [26], i suprimeix l'augment de l'ARNm del factor de necrosi tumoral TNF- $\alpha$ , produït per la lesió de la mucosa gàstrica induïda per l'aspirina.

Els PPAR també estan involucrats en la regulació de la resposta inflamatòria [20,27,28] i és per aquest motiu que hi ha estudis on es demostra que la PGZ modula diferents vies de la resposta a la inflamació, fet que ampliaria les aplicacions d'aquest fàrmac que ja està autoritzat [18].

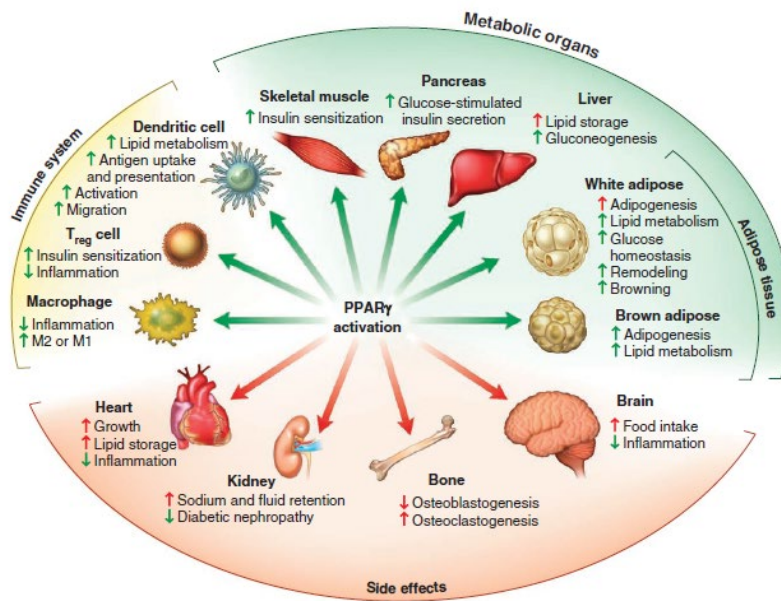


Figura 5. Efectes coneguts de l'activació del PPAR $\gamma$  [29].

Tot aquest ventall de troballes amplia extraordinàriament l'ús de la pioglitazona en medicina clínica per a la resolució d'altres patologies, més enllà de la diabetis, a les quals encara no s'aplica o es fa encara de manera incipient.

La recerca per ampliar l'ús de la PGZ està centrada bàsicament en sistemes de transport (nanopartícules o nanosistemes en general) focalitzats en els teixits i òrgans que es desitgen tractar. Matoba i col·laboradors [30] fan una recopilació d'estudis realitzats amb nanopartícules de PLGA de PGZ on demostren que poden regular la inflamació cardiovascular (arterioesclerosi) en models *in vitro* i *in vivo* amb animals. Més endavant, Tokutome i col·laboradors [31] realitzen un estudi preclínic amb animals on es conclou que PGZ-NPs de PLGA acceleren la recuperació de l'infart mitjançant la regulació de la inflamació del sistema cardiovascular. En resum, l'activació del PPAR- $\gamma$  amb PGZ evita l'arteriosclerosi coronària possiblement degut als seus efectes antiinflamatoris [26].

L'any 2002, Wahli i col·laboradors [32] van descriure la importància del paper dels PPARs en la reparació de ferides i a partir d'allí van sorgir diferents estudis amb la PGZ per demostrar el seu potencial paper en la dermatologia [33]. Sakai i col·laboradors [34] confirmen l'efecte positiu de la PGZ en la cura de l'úlcer de pell, i dona pas a més estudis per al tractament de malalties inflamatòries de la pell ja sigui amb fórmules



clàssiques [35] com amb noves formulacions (nanosistemes) per millorar la biodisponibilitat del fàrmac [36–38]. Yamamoto i col·laboradors també demostren que la PGZ té efecte antiinflamatori en el test de l'edema de pota induït per carraguenina [25].

L'Alzheimer és una malaltia que s'ha demostrat que està relacionada amb un desordre metabòlic associat amb una disfunció de l'acció de la insulina al cervell [39]. Sato i col·laboradors van fer un estudi amb pacients diabètics diagnosticats amb demència d'Alzheimer primerenca, i el tractament amb PGZ va produir millora i estabilització de la malaltia. És per això que s'han fet estudis *in vitro* i *in vivo* amb animals amb PGZ i patologia compatible amb l'Alzheimer per millorar el transport de la PGZ al cervell [40–45].

La línia d'estudi de la pioglitazona que ens ocupa en aquest treball és la de patologies oculars. Per aprofitar propietats de la PGZ com de lligand del PPAR $\gamma$  s'ha estudiat la seva actuació en tractaments de neovascularització de la còrnia després d'una ferida i s'han trobat resultats satisfactoris [46,47]. Es va utilitzar la PGZ per a inhibir la inflamació, disminuir la reacció fibròtica i impedir la neovascularització de la còrnia, des de la fase inicial, després d'una cremada alcalina. Així, la solució oftàlmica d'aquest agonista dels PPAR $\gamma$  pot proporcionar una nova estratègia de tractament amb aplicacions clíniques útils per a la inflamació corneal i la cicatrització de ferides [48]. Un altre estudi *in vitro* va demostrar l'efecte antifibròtic de la pioglitazona, cosa que suggereix que l'activació de PPAR $\gamma$  pot ser un nou enfocament per al tractament de l'opacitat de la còrnia i la formació de cicatrius en el procés de cicatrització de ferides corneals [49].

Pel que fa a la malaltia de la síndrome de l'ull sec, un estudi realitzat amb animals conclou que el PPAR- $\gamma$  també hi està involucrat i un tractament amb NPs de PGZ de PLGA incrementa la secreció lacrimal [50]. A la literatura es fa referència a l'estudi de la PGZ per al tractament de la malaltia ocular de la tiroides però no sembla adequat en pacients que pateixen diabetis del tipus II [51,52]. Un estudi fet amb animals tractats amb PGZ per via sistèmica demostra que el fàrmac és efectiu per al tractament de la uveïtis

[53] i això possibilita explorar el tractament local amb NPs de PGZ per a la inflamació ocular [43].

## 1.7. TRANSPORT DE FÀRMACS AMB SISTEMES D'ALLIBERAMENT CONTROLAT

Els fàrmacs han de superar moltes barreres fisiològiques per assolir l'objectiu terapèutic, és a dir, han de circular cap als òrgans i teixits diana, i penetrar a les seves cèl·lules. Tots els fàrmacs tenen una toxicitat potencial la qual pot limitar la seva dosi de seguretat i per tant la seva eficàcia terapèutica. Es poden reduir els efectes adversos potencials d'un fàrmac focalitzant-lo al seu objectiu (òrgan o cèl·lula), i per aconseguir-ho es pot utilitzar un transportador del fàrmac per a millorar la seguretat i l'eficàcia del tractament.

L'any 2003, la the European Science Foundation (ESF) va iniciar un projecte anomenat '*ESF Forward Look on Nanomedicine*' on es va definir formalment la nanomedicina com la ciència i la tecnologia per a la diagnòsi, tractament i prevenció de les malalties i lesions traumàtiques, mitigació del dolor i preservació i millora de la salut humana, utilitzant eines moleculars i el coneixement del cos humà a nivell molecular [54]. Cal destacar que l'escala nanomètrica és l'escala en la que les molècules i els compostos intervenen dins les cèl·lules.

Una definició més recent es troba en una publicació de Patra i col·laboradors [55]: la nanomedicina és la branca de la medicina que utilitza la nanotecnologia per a la prevenció i la cura de malalties utilitzant materials a nanoescala, com les nanopartícules biocompatibles i els nanorobots, per a diferents aplicacions, com la diagnòsi, el transport, les percepcions sensorials o amb finalitats d'actuació en un organisme viu.

En resum, la nanomedicina és un camp de la ciència que utilitza materials a nanoescala per a la diagnòsi i el tractament de malalties [56]. És un camp emergent però a la vegada genera preocupació per la seguretat dels materials involucrats. S'utilitza el terme "nanomedicines" per designar productes nanofarmacèutics, definits per la Fundació Europea de la Ciència, en una de les seves anàlisis d'ampli abast, com a sistemes de lliurament de medicaments o productes farmacèutics biològicament actius que engloben

“sistemes complexos a escala nanomètrica, que consisteixen almenys en dos components, un del qual és el principi actiu”.

Un sistema de transport de fàrmacs i lliurament de fàrmacs (a la bibliografia es coneix com *Drug Delivery System (DDS)*) és una formulació composta, o sistema, que permet la introducció de substàncies en el cos per tal de millorar-ne la seva eficàcia i la seva seguretat, controlant la quantitat de fàrmac, el temps i l'alliberament en el lloc d'acció, traspasant les membranes biològiques per arribar a l'objectiu terapèutic. Això inclou tant l'administració de fàrmacs amb finalitats terapèutiques com l'ús de vectors per facilitar l'aplicació i difusió en el cos humà. Aquests sistemes de transport són els nanotransportadors, fets d'un biomaterial que pot ser d'origen natural (proteïna, polisacàrid, altres biopolímers naturals, etc), metàl·lic o ceràmic, però els dissenyats amb polímers sintètics són els que tenen més aplicacions i els més estudiats.

Els sistemes tradicionals d'administració de vegades poden tenir inconvenients, i en aquest sentit els DDS són més sofisticats, focalitzats a aconseguir un alliberament més controlat, conduint el fàrmac directament al lloc d'acció i mantenir l'eficàcia, evitant així un alliberament sistèmic de la substància o un alliberament sobtat que pogués resultar tòxic.

Els nanosistemes de transport de fàrmacs es poden resumir en les formes indicades a la Figura 6, i que es defineixen a continuació:

- Micel·les (A): són ensamblatges de lípids o macromolècules sintètiques amb caps hidròfils i cues hidròfobes en una dissolució aquosa. Les micel·les encapsulen substàncies terapèutiques hidròfobes.
- Liposomes (B): estan formats per una doble capa lipídica i per tant encapsulen una dissolució hidròfila (nucli aquós) i la substància activa a l'interior que pot ser tant hidròfila com hidròfoba.
- Nanopartícules polimèriques (C): estan formades per macromolècules de polímers que contenen les substàncies terapèutiques al seu interior.

- Dendrímers (D): estan formats per macromolècules de polímers altament ramificades que parteixen d'un nucli central i que incorporen les substàncies terapèutiques dins les cavitats de la seva estructura.
- Nanotubs de carboni (E): estructura cilíndrica laminar d'àtoms de carboni units covalentment que poden transportar un agent terapèutic en l'interior.
- Nanopartícules metàl·liques (F): metalls cristal·lins de grandària nanomètrica que per sí mateixos tenen propietats terapèutiques o finalitats de rastreig.

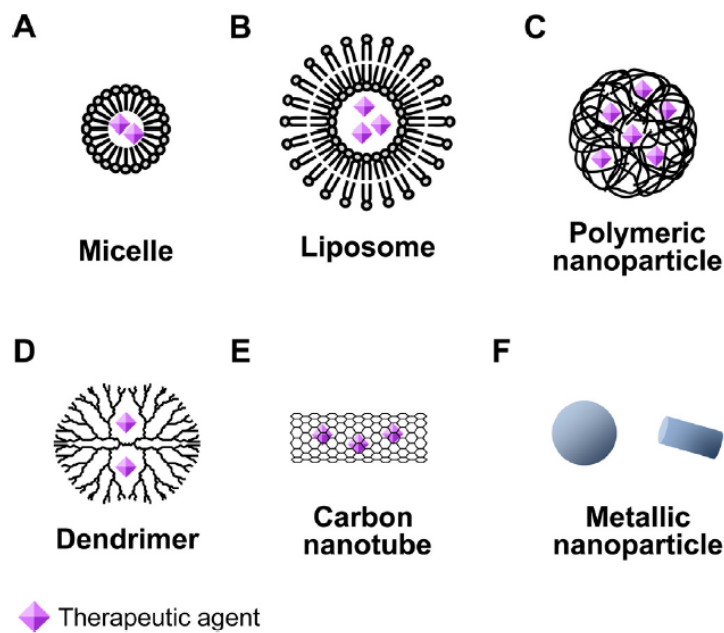


Figura 6. Descripció esquemàtica d'alguns dels sistemes nanotransportadors de fàrmacs [30].

En el cas de les aplicacions en oftalmologia, altres nanosistemes que s'utilitzen, a part dels mencionats anteriorment, són els següents [57,58]:

- Nanosuspensions: són dispersions col·loïdals en les que els fàrmacs hidròfobs es dispersen de manera uniforme en un medi aquós amb l'ajuda de tensioactius.
- Niosomes: són vesícules tensioactives no iòniques de dues capes que poden atrapar fàrmacs hidròfils i lipòfils.
- Cubosomes: l'estructura consisteix en una bicapa lipídica contínua i molt retorçada amb dos canals d'aigua congruents que no es creuen. En comparació amb l'estructura de bicapa simple dels liposomes, els cubosomes tenen una àrea

superficial molt superior i una gran capacitat per encapsular molècules hidròfiles, hidròfobes i amfifíliques.

- Hidrogels: un hidrogel és una xarxa de monòmers tridimensional de cadenes flexibles carregada d'aigua. Les xarxes d'hidrogel s'han estudiat molt com a sistema d'administració de fàrmacs controlat i sostingut perquè la porositat de la matriu es pot adaptar modificant la densitat del reticulat.

Els sistemes nanoestructurats més emprats per a la via tòpica són els liposomes [12], les nanoemulsions [59] i les nanopartícules (polimèriques i lipídiques). Dins de les nanopartícules polimèriques es distingeixen les que són preparades a partir de polímers naturals (biopolímers) [60,61] i de polímers sintètics [14]. Les NPs de biopolímers són fetes bàsicament de proteïnes (fibroïna, col·lagen, gelatina, albúmina) i polisacàrids (quitosan, alginat, cel·lulosa, midó). Aquestes tenen pesos moleculars més elevats i tenen menys eficàcia per encapsular fàrmacs, i s'utilitzen més per transportar substàncies bioactives als teixits i cèl·lules [62]. Els polímers sintètics més emprats en nanomedicina són l'àcid polilàctic (PLA), l'àcid poli-D,L-làctic-co-glicòlic (PLGA) i la poli-ε-caprolactona (PCL) [63] perquè són biodegradables.

De tots aquests sistemes de transport descrits anteriorment, les nanopartícules polimèriques són les més estables i es poden assecar fàcilment per allargar la seva estabilitat, per exemple sotmetent-les als processos de liofilització o d'assecatge de l'aerosol (*spray drying*).

Els polímers emprats en medicina han de tenir una cinètica adequada de biodegradabilitat i han de ser biocompatibles, és a dir, no han d'induir l'atac del sistema immunitari i no han d'introduir elements tòxics ni cancerígens a l'organisme. Els polímers també han de tenir una estructura ben definida i ser capaços d'admetre una quantitat acceptable de fàrmac.

L'avantatge dels polímers sintètics és la seva versatilitat per modificar els seus paràmetres (composició, pes molecular, estructura química) amb la finalitat d'obtenir un material per a l'aplicació prevista. Els polímers biodegradables són els més utilitzats en sutures, i principalment en l'alliberació controlada de fàrmacs.

La biodisponibilitat és la porció de compost bioactiu que és assimilat pel cos i que aconsegueix realitzar la seva acció. Les nanopartícules es poden optimitzar per millorar la biodisponibilitat ja sigui mitjançant un augment de l'absorció millorant la solubilitat, o bé facilitant el pas de les substàncies a través de les membranes biològiques.

Unes altres propietats que han de tenir les nanopartícules polimèriques és que tinguin un procés d'elaboració fàcil, assequible i de fàcil escalatge. Un cop elaborades han de poder assecat-se i esterilitzar-se sense experimentar canvis. La formulació ha de protegir el fàrmac de la degradació i prevenir una alliberació ràpida del fàrmac encapsulat. L'han d'alliberar completament amb el temps o a una taxa adequada per a la seva activitat. També cal considerar que el producte desenvolupat no tingui dissolvents orgànics potencialment tòxics o que estiguin per sota dels límits d'acceptació. Han de ser fàcils d'administrar i assolir una bona biodisponibilitat. Un dels avantatges de les NPs és la possibilitat de reduir la toxicitat que pugui tenir el fàrmac lliure degut a la seva incorporació a la nanoestructura.

Els nanosistemes més emprats en la recerca relacionada amb l'oftalmologia són els liposomes i les NPs polimèriques de chitosan, PLGA i gelatina.

Un indicador de la recerca que s'està realitzant relacionada amb nanosistemes transportadors de fàrmacs per al tractament ocular són les contínues recopilacions que es troben a la bibliografia i que es van actualitzant pràcticament de manera anual. La Taula 1 mostra algunes de les recopilacions publicades les quals proporcionen un excel·lent historial d'informació.

Taula 1. Algunes de les recopilacions bibliogràfiques sobre l'aplicació de la nanomedicina al tractament ocular.

<b>Any</b>	<b>Primers autors</b>	<b>Títols</b>	<b>Referències</b>
1995	Zimmer	<i>Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems</i>	[15]
1998	Le Boursais	<i>Ophthalmic drug delivery Systems. Recent advances</i>	[64]
2001	Kimura	<i>Biodegradable Polymers for Ocular Drug Delivery</i>	[65]
2008	Sahoo	<i>Nanotechnology in ocular drug delivery</i>	[66]

<b>Any</b>	<b>Primers autors</b>	<b>Títols</b>	<b>Referències</b>
2009	Nagarwal	<i>Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery</i>	[67]
2010	Diebold	<i>Applications of nanoparticles in ophthalmology</i>	[54]
2013	Zhou	<i>Nanoparticles in the ocular drug delivery</i>	[68]
2017	Janagam	<i>Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye</i>	[69]
2017	Weng	<i>Nanotechnology-based strategies for treatment of ocular disease</i>	[70]
2018	Bachu	<i>Ocular drug delivery barriers—role of nanocarriers in the treatment of anterior segment ocular diseases</i>	[8,9,11]
	Dubald	<i>Ophthalmic drug delivery systems for antibiotherapy- A review</i>	
	Tsai	<i>Ocular drug delivery: Role of degradable polymeric nanocarriers for ophthalmic application</i>	
2019	Halasz	<i>Advances in biodegradable nano-sized polymer-based ocular drug delivery</i>	[13,14]
	Lynch	<i>Micro/Nanoparticle Delivery Systems for Ocular Diseases</i>	
2020	Begines	<i>Polymeric nanoparticles for drug delivery: Recent developments and future prospects</i>	[7,71,72]
	Ghafoorianfar	<i>Efficiency of nanoparticles for treatment of ocular infections: Systematic literature review</i>	
	Meza-Rios	<i>Therapies Based on Nanoparticles for Eye Drug Delivery</i>	
2021	Swetledge	<i>Distribution of polymeric nanoparticles in the eye: implications in ocular disease therapy</i>	[73–75]
	Zhang	<i>Ten years of knowledge of nano-carrier based drug delivery systems in ophthalmology: Current evidence, challenges, and future prospective</i>	
	Berillo	<i>Stimuli-responsive polymers for transdermal, transmucosal and ocular drug delivery</i>	
2022	Allyn	<i>Considerations for Polymers Used in Ocular Drug Delivery</i>	[76,77]
	Yang	<i>Nanoparticles in ocular applications and their potential toxicity</i>	
2023	Onugwu	<i>Nanotechnology based drug delivery systems for the treatment of anterior segment eye diseases</i>	[58,78]
	Han	<i>Polymer- and lipid-based nanocarriers for ocular drug delivery: Current status and future perspectives</i>	

Com a conseqüència del desenvolupament que s'ha realitzat en el camp de la nanomedicina en els anys recents, actualment hi ha aprovats per la FDA alguns fàrmacs basats en nanosistemes polimèrics per al tractament ocular de les uveïtis, reinitis, síndrome de l'ull sec o glaucoma, entre altres, ja sigui com col·liris, injeccions intravitreals o implants intravitreals [76].

### **1.7.1. NANOPARTÍCULES POLIMÈRIQUES**

Des de fa ja unes quantes dècades, les nanopartícules polimèriques s'estan investigant com a sistemes d'administració de fàrmacs perquè poden transportar-ne una gran varietat i permeten la seva alliberació durant un període relativament llarg [79,80]. Les nanopartícules tenen una grandària submicromètrica (10-1000 nm) i normalment s'empren per a vehicular fàrmacs que per la seva naturalesa lipòfila, són molt poc solubles o insolubles en aigua. Les nanopartícules polimèriques també s'empren per transportar proteïnes, àcids nucleics o virus [55,81,82].

Les NPs polimèriques es poden definir com partícules sòlides col·loïdals que contenen una substància activa i que se sintetitzen per mitjans mecànics o químics. Les nanopartícules englobaran el principi actiu a l'interior d'una estructura o bé l'absorbiran com una esponja o l'adsorbiran a la seva superfície. En termes de grandària el límit baix de les NPs es troba en 5-10 nm i el límit alt en 1000 nm, tot i que amb els mètodes més habituals de síntesi el rang és 100-500 nm. Amb el nom de NPs polimèriques s'hi inclouen tant les nanoesferes com les nanocàpsules. La diferència entre les dues formes és la seva morfologia i arquitectura: les nanoesferes estan formades per una matriu densa polimèrica que fa de suport al material bioactiu, ja sigui adsorbit a la superfície o encapsulat a l'interior, mentre que les nanocàpsules estan formades per un nucli que és una minúscula gota d'un dissolvent apolar, en el qual hi ha dissolt el principi actiu, envoltada per una capa polimèrica (Figura 7).



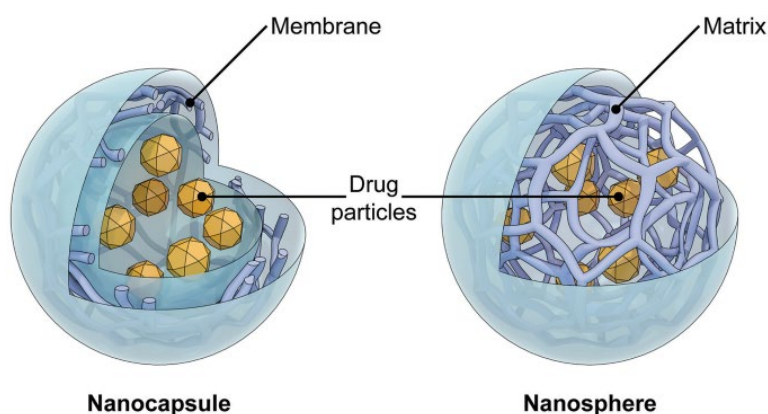


Figura 7. Representació esquemàtica de l'estructura d'una nanocàpsula i una nanosfera [83].

Durant aquestes dues últimes dècades les NPs han anat evolucionant per millorar les seves propietats i la seva funció. Una de les millores ha estat la de recobrir les NPs amb substàncies que en modifiquin alguna característica com la polaritat o la càrrega superficial [84]. Les NPs es poden recobrir amb un polímer hidròfil o fins i tot es poden funcionalitzar amb anticossos o proteïnes, en general lligats al recobriment (Figura 8).

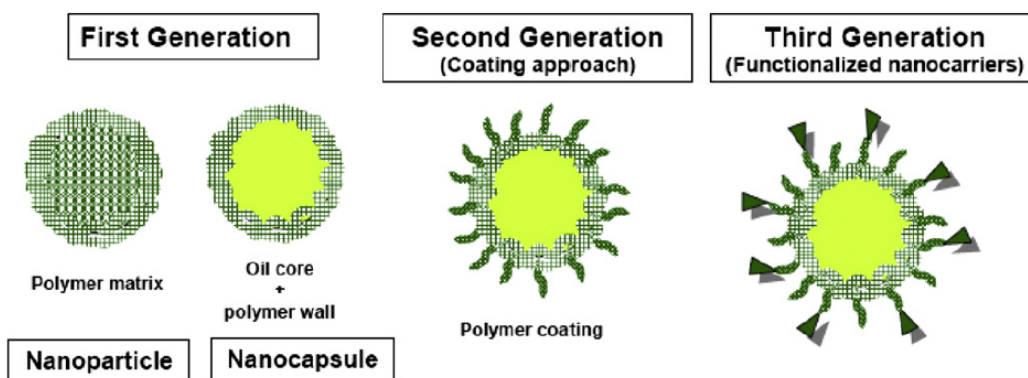


Figura 8. Evolució dels sistemes col·loïdals. Primera generació: matriu polimèrica. Segona generació: augment del caràcter hidròfil mitjançant un recobriment. Tercera generació: funcionalització del nanotransportador [54].

Els mètodes de preparació de NPs polimèriques es classifiquen en dues categories segons si la formulació requereix una reacció de polimerització del monòmer o si es parteix del polímer [85]. Els mètodes de polimerització són més difícils de controlar i

reproduir i sempre necessiten purificació [86]. Pràcticament tota la literatura i les formulacions que han estat acceptades per les autoritats parteixen de polímers preformats per evitar les limitacions dels mètodes de polimerització [76,87].

Els mètodes de formació de NPs a partir del polímer preformat es poden resumir en les següents categories [88]:

- Emulsificació- evaporació del dissolvent. Aquesta tècnica s'utilitza per encapsular substàncies hidròfobes. El polímer i el fàrmac es dissolen en un dissolvent orgànic immiscible en aigua. En el cas del PLGA el dissolvent és cloroform o clorur de metilè. L'emulsió es prepara afegint la dissolució aquosa del tensioactiu a la dissolució del polímer. Les nanogotes sovint s'indueixen per sonicació o homogeneïtzació. El dissolvent s'evapora i les nanopartícules s'obtenen per centrifugació o liofilització. L'inconvenient del mètode és l'ús de dissolvents clorats per la seva toxicitat.
- Tècnica de la doble o múltiple emulsió. Aquesta tècnica és una variant de l'anterior i s'utilitza per encapsular substàncies hidròfiles i proteïnes. El fàrmac i el tensioactiu es dissolen en aigua. La primera emulsió es prepara dispersant la fase aquosa en la fase orgànica que conté el polímer. A continuació es fa una segona emulsió amb una altra fase aquosa que conté l'estabilitzant.
- Emulsió-difusió. Utilitza un dissolvent parcialment soluble en aigua com acetona o carbonat de propilè. El polímer i el fàrmac es dissolen en el dissolvent i s'emulsionen en la fase aquosa que conté l'estabilitzant. L'estabilitzant evita l'agregació de les gotes de l'emulsió perquè s'adsorbeix a la superfície de les gotes. S'afegeix aigua a l'emulsió per afavorir la difusió del dissolvent en l'aigua. La dissolució s'agita i es formen les nanopartícules que es recullen per centrifugació o s'elimina el dissolvent mitjançant diàlisi.
- Nanoprecipitació. El polímer i el fàrmac es dissolen en acetona i s'afegeix lentament sobre una dissolució aquosa que conté l'estabilitzant. L'acetona s'evapora al buit i les nanopartícules romanen en la suspensió aquosa.
- Xoc salí (Salting-out). És un mètode que tampoc utilitza dissolvents clorats. Es forma una emulsió d'aigua en oli que conté el polímer, el dissolvent (normalment acetona), l'estabilitzant, acetat de magnesi trihidrat i el fàrmac. S'afegeix aigua a

la dissolució fins que el volum és suficient per a què es produeixi la difusió de l'acetona en l'aigua cosa que provoca la formació de nanopartícules.

A la bibliografia la nanoprecipitació també s'anomena mètode de desplaçament del dissolvent (*solvent displacement method*) o mètode de deposició a la interfície (*interfacial deposition method*), i és un dels mètodes més utilitzats per la seva simplicitat i reproductibilitat. Aquest mètode va ser desenvolupat per Fessi i col·laboradors [89].

En tots els mètodes hi ha una dissolució orgànica que conté els components de les NPs i que acaba constituint la fase interna, i hi ha una fase aquosa que conté els estabilitzants i és el medi de dispersió de les NPs. Les nanopartícules polimèriques s'obtenen majoritàriament en forma de suspensions col·loïdals però en les dues darreres dècades també s'han utilitzat mètodes amb els quals s'obtenen directament en forma de sòlid a partir de dissolucions que contenen els components utilitzant les tècniques electroesprai i assecatge de l'aerosol [90,91]. Inicialment la tècnica d'assecatge de l'aerosol s'utilitzava per assecatge o deshidratar productes, però més endavant es va aprofitar per dissenyar micro i nanotransportadors de fàrmacs, encapsulant compostos hidròfils o hidròfobs en polímers [92].

#### **1.7.1.1. Nanoprecipitació o desplaçament del dissolvent**

El mètode de síntesi de les nanopartícules que s'ha utilitzat en aquest treball és el de la nanoprecipitació o desplaçament del dissolvent. Aquest mètode implica la interacció de dos medis: un medi orgànic parcialment miscible en aigua i fàcil d'evaporar on s'hi han solubilitzat el polímer i el fàrmac, i un medi aquós que pot contenir un agent estabilitzant (polivinil alcohol, polisorbato, poloxamer, plurònic, etc). L'acetona és el dissolvent del polímer que més s'utilitza en aquest mètode. La dissolució orgànica s'addiciona gota a gota sobre el medi aquós en agitació constant, i en entrar-hi en contacte es produeix la insolubilització del polímer, el qual precipita. Les nanopartícules es formen instantàniament per una ràpida difusió del dissolvent en el medi aquós, provocant la formació d'una suspensió col·loïdal. A continuació, el dissolvent s'elimina a pressió reduïda, fins a l'obtenció de la suspensió. Aquesta suspensió final té un aspecte lletós.

Una variable important en la síntesi de NPs és el tipus d'estabilitzants que s'utilitzen, els quals eviten l'agregació i el trencament de l'estructura. La quantitat d'estabilitzant utilitzada també tindrà influència en les propietats de les NPs. S'han d'emprar compostos que no siguin tòxics i/o que siguin biodegradables. Els estabilitzants són tensioactius o polímers que s'adsorbeixen a la interfície de la NP amb l'aigua, els quals tenen la funció de potenciar la solubilitat i l'estabilitat de la NP insoluble durant l'emmagatzemament. A la bibliografia es troben descrits estabilitzants polimèrics com el PVA [93], o tensioactius no iònics com el Poloxamer 188, el Tween 80, o el polietilenglicol entre altres [94–96]. El PVA, de fet, s'afegeix sovint als col·liris tradicionals per augmentar-ne la viscositat i per tant el temps de residència [8], i s'utilitza en moltes de les síntesis de NPs de PLGA [95,97–100].

### 1.7.1.2. Nanopartícules de PLGA-PEG

L'àcid poli(D,L-làctic-*co*-glicòlic) (PLGA) és un copolímer sintètic format per l'àcid làctic i l'àcid glicòlic (o àcid hidroxiaètic) (Figura 9). El PLGA té propietats complementàries a causa del caràcter cristal·lí i hidròfob de l'àcid làctic i al caràcter amorf i hidròfil de l'àcid glicòlic. El PLGA es degrada mitjançant hidròlisi cel·lular dels enllaços ester, i en resulta la formació dels dos monòmers, l'àcid làctic i l'àcid glicòlic, els quals són metabòlits habituals en les cèl·lules (endògens). Aquests dos compostos a la seva vegada es metabolitzen fàcilment *via* el cicle de Krebs (o cicle de l'àcid tricarbòxilic) i finalment són eliminats del cos com a diòxid de carboni i aigua, causant molt poca toxicitat sistèmica.

Per la seva seguretat, tant per la seva biocompatibilitat com per la seva biodegradabilitat, el PLGA és el polímer més emprat en medicina ja que ha estat aprovat per l'Agència Europea del Medicament (EMA) i la *US Food and Drug Administration* (FDA) per a l'ús en humans. S'utilitza en sutures, empelts, implants, pròtesis, pel·lícules segellants quirúrgiques, i en sistemes de transport de fàrmacs (micro i nanopartícules) [87,101]. És un polímer d'estructura ben definida, fàcil de produir, que s'adapta a molècules o macromolècules (proteïnes o àcids nucleics), hidròfobes o hidròfiles, protegeix els fàrmacs de la degradació i els allibera lentament [102–104].

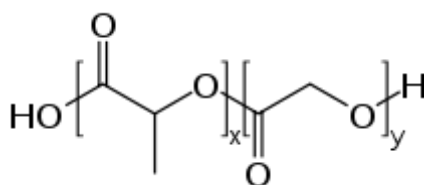


Figura 9. Estructura química del PLGA.  $x$  = nombre d'unitats d'àcid làctic;  $y$  = nombre d'unitats d'àcid glicòlic.

El PLGA se sintetitza mitjançant copolimerització d'obertura d'anell (*ring-opening copolymerization*) de dos monòmers, els dímers cíclics (*1,4-dioxane-2,5-diones*) de l'àcid glicòlic i l'àcid làctic. En la polimerització les unitats monomèriques s'uneixen amb enllaços ester proporcionant un polièster alifàtic lineal. Depenent de la relació d'àcid làctic i glicòlic que s'utilitzen en la polimerització s'obtenen diferents formes de PLGA les quals s'identifiquen amb la relació molar dels monòmers utilitzats (per exemple PLGA 75:25 indica una composició del 75% làctic-25% glicòlic). El caràcter cristal·lí del PLGA varia des de completament amorf a completament cristal·lí depenent de la relació molar i de l'estructura del bloc. Els PLGA tenen una temperatura de transició vítria ( $T_g$ ) en el rang 40-60 °C i es poden dissoldre en diferents dissolvents segons la composició. Els polímers amb elevada proporció d'àcid làctic es dissolen en dissolvents clorats mentre que els materials amb un alt contingut d'àcid glicòlic requereixen l'ús de dissolvents fluorats com l'hexafluoroisopropanol [105].

El PLGA es degrada per hidròlisi de l'enllaç ester en aigua i s'ha comprovat que el temps necessari per a la seva degradació depèn de la relació de monòmers: a més proporció de glicòlic més ràpida és la degradació. La proporció 50:50, però, és una excepció i és la que té hidròlisi més ràpida, però tot i això dependrà de diversos factors com el pes molecular, el pH, la temperatura, o la presència d'estabilitzants, per exemple [55,101,106].

Les cèl·lules endotelials del fetge i els macròfags reconeixen les partícules hidròfobes com a alienes i les elimina ràpidament del corrent sanguini. Així, a través del fetge o del pàncrees són destruïdes i eliminades. Aquesta és una de les majors limitacions de les nanopartícules polimèriques com a transport de fàrmacs: les barreres biològiques. Per evitar aquestes limitacions s'han desenvolupat mètodes de modificació de la superfície

per a produir nanopartícules que no siguin reconegudes pels sistemes de neteja de la sang.

Les NPs de PLGA se sintetitzen principalment pels mètodes de difusió de l'emulsió (*emulsion diffusion*), evaporació de dissolvent (*solvent evaporation*) i nanoprecipitació [87,107]. En alguns casos s'ha utilitzat el mètode de salaó (*salting out*) a més d'algun altre mètode com el que s'anomena "mètode amb l'auxili de microfluídica" (*microfluidics assisted method*) [106,107].

Les NPs de PLGA també es poden preparar mitjançant la tècnica d'assecatge de l'aerosol (*spray drying*) de manera que al final del procés s'obtenen les NPs en forma sòlida directament [108]. Draheim i col·laboradors [109] comparen la nanoprecipitació i la formació de NPs amb la tècnica del *nano spray drying* utilitzant el polímer PLGA i diferents estabilitzants, i arriben a la conclusió que per *nano spray drying* les partícules obtingudes són més grans. A la tècnica d'assecatge de l'aerosol el polímer està dissolt completament en un dissolvent orgànic de manera que el factor que afecta més la grandària de la partícula és el porus de la malla per on es forma l'esprai. Un dels inconvenients de la formació directa de NPs de PLGA per assecatge de l'aerosol és que la majoria de treballs utilitzen dissolvents clorats [108].

A la bibliografia es troben nombroses publicacions que fan servir el PLGA com a nanosistema transportador de fàrmacs [7,69,110]. Les NPs de PLGA també s'empren per transportar macromolècules com proteïnes o àcids nucleics dins de les cèl·lules [98,102,111]. L'entrada de les nanopartícules en les cèl·lules es produeix mitjançant processos d'endocitosi (invaginació membrana citoplasmàtica) [13,102]. El que és difícil de controlar és el transport intracel·lular en els orgànuls. És important destacar que aquest tipus de nanopartícules no són rebutjades pels teixits ja que no les detecten com a estranyes.

El PLGA té l'avantatge que és relativament senzill modificar les propietats de la seva superfície i fer més fàcil la seva invisibilitat al sistema immunològic o facilitar una millor interacció amb els sistemes biològics [84,112,113]. La substància més emprada amb aquesta finalitat és el polietilenglicol (PEG), un polièter de caràcter no iònic i hidròfil [96,114]. El PEG és biocompatible, i se sol utilitzar en la fabricació de NPs, ja sigui com a

additiu o formant part del mateix polímer per tal de modificar-ne les propietats superficials [96,115].

L'adsorció o l'enllaç covalent o la conjugació de PEG sobre les molècules es coneix com a pegilació (*PEGylation*). Inicialment aquest procés es va desenvolupar per al transport de proteïnes i al 1990 la FDA va aprovar la primera substància terapèutica proteïna-PEG. A continuació van iniciar-se els estudis del transport sistèmic de substàncies en NPs-PEG demostrant que també millorava la circulació i al 1995 la FDA aprova el primer producte basat en un nanosistema-PEG. Des d'aleshores la pegilació té un paper molt important en la formulació de nanopartícules.

A la bibliografia està clarament demostrat que l'adsorció o l'enllaç o la conjugació de PEG sobre les nanopartícules incrementa la circulació de les nanopartícules en sang alguns ordres de magnitud [116,117]. Altres avantatges del PEG en l'estructura del polímer, a part de la supressió de l'opsonització, són l'augment de la solubilitat en aigua, la reducció de l'agregació i per tant una millora en l'estabilitat de les NPs [118].

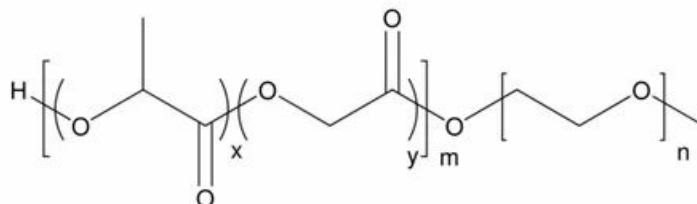


Figura 10. Estructura química del PLGA-PEG enllaçat. m = nombre d'unitats de PLGA; n = nombre d'unitats de PEG.

La grandària del PEG i sobretot la densitat superficial del PEG són paràmetres que cal considerar quan es formulen nanopartícules (Figura 11). Normalment, en el cas de nanopartícules polimèriques que engloben fàrmacs per al transport no sistèmic, és preferible la baixa densitat per no anul·lar la càrrega superficial. Les NPs hidròfobes no carregades experimenten una agregació ràpida quan es troben en medi aquós ja sigui via forces de van der Waals o forces hidròfobes.

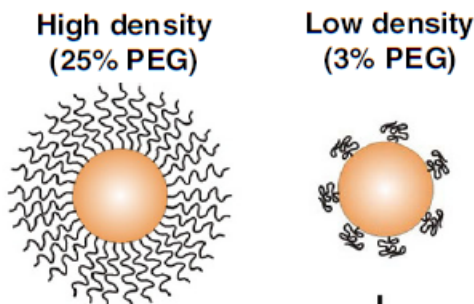


Figura 11. Densitat del PEG a la superfície de la nanopartícula [117].

Es troben bastants estudis on es comparen els nanotransportadors amb o sense PEG i en tots hi ha millores significatives en el transport, la penetració, la biodisponibilitat i l'estabilitat quan la NP conté PEG a la superfície [115,119–123].

Per tot l'exposat, per a la síntesi de NPs seria preferible partir directament del polímer PLGA-PEG, ja que aquest es pot trobar comercialment.

Una publicació de l'any 2013 fa una recerca bibliogràfica extensiva sobre les aplicacions en nanomedicina on encara no es descrivia cap estudi en curs o fàrmacs aprovats per la FDA relatius al tractament ocular [124]. Villasaliu i col·laboradors, l'any 2014, fan una nova recopilació [125] en la que destaquen que hi ha molta recerca sobre el polímer PLGA-PEG i els seus copolímers però no hi ha estudis en curs o fàrmacs aprovats, en canvi sí que n'hi ha en el camp dels liposomes pel fet que les nanopartícules suposen generar una nova entitat molecular mentre que els liposomes no. L'any 2016 hi ha una nova recopilació feta per Bobo i col·laboradors [126] sobre l'estat dels fàrmacs basats en nanopartícules i els aprovats per la FDA, i l'any 2018 Patra completa l'estudi de Bobo [55]. És a la recopilació feta per Allyn l'any 2022 sobre polímers i biopolímers aprovats per la FDA per a l'ús ocular i DDS aprovats per la FDA, on es descriuen dos implants oculars, un de PLGA i un de PLA/PLGA/PEG [76].



## 1.7.2. ESTABILITZACIÓ DE LES NANOPARTÍCULES A LLARG TERMINI

Les nanopartícules són molt sensibles a l'estrès fisicoquímic al que estan sotmeses durant els processos de fabricació i emmagatzemament, cosa que en dificulta les aplicacions farmacèutiques. Les formulacions de fàrmacs basats en nanopartícules polimèriques s'acaben preparant normalment en forma de presentacions sòlides ja que mostren una major estabilitat respecte la suspensió líquida col·loidal, i també proporcionen altres beneficis com la facilitat de manipulació, emmagatzemament i transport.

S'ha d'eliminar l'aigua de la suspensió col·loidal mitjançant un procés d'assecat aplicant calor, ja sigui per conducció, convecció i/o radiació, que són les tècniques bàsiques per vaporitzar l'aigua, o per sublimació. Totes les tècniques tenen l'objectiu de la deshidratació però conceptualment són diferents i introdueixen diferents tipus d'estrès al compost que poden comprometre la seva estabilitat, per això les tècniques requereixen modificacions i/o adaptacions en funció de les propietats del compost.

Un producte deshidratat ha de mantenir les propietats fisicoquímiques del producte original, ha de tenir bon aspecte, s'ha de poder reconstituir ràpidament, la humitat residual ha de ser baixa i ha de ser estable en el temps. Les NPs a més a més, després del procés d'assecat s'han de resuspendre fàcilment, no han de modificar la distribució de la grandària de partícula i han de mantenir l'activitat del fàrmac encapsulat. Per tal d'assolir tots aquests objectius tot el procés s'ha de focalitzar en tres aspectes bàsics que s'han d'optimitzar: la formulació, el procés d'assecat i les condicions d'emmagatzemament.

El mètode d'assecatge més emprat en la indústria farmacèutica és la liofilització seguida de l'assecatge de l'aerosol (*spray drying*), processos que també s'apliquen per deshidratar les suspensions col·loidals de nanopartícules [90,91,127]. En el cas d'una suspensió de nanopartícules, s'obté un pols sec fàcil de manipular i emmagatzemar [128–130]. En el camp dels nanotransportadors també s'ha utilitzat en poca extensió i en petita escala el procés de liofilització de l'esprai (*spray freeze drying*) [131,132]. En el procés de liofilització de l'esprai les suspensions es congelen ràpidament en forma de gotes molt petites quan es fa un esprai en un corrent d'aire molt fred (-120 °C) o nitrogen líquid. A continuació les gotes congelades s'assequen mitjançant un procés de liofilització en el que el gel

sublima i es formen així les partícules seques. L'assecat amb fluid supercrític també s'ha descrit [133,134], el qual és a la vegada el procés de formació de les nanopartícules.

La liofilització consisteix en la dessecació de la dissolució o suspensió per congelació d'aquesta i posterior sublimació del gel a pressió reduïda, sense passar per una fase líquida intermèdia. En el procés de congelació hi ha una separació de fases en el gel i la suspensió. L'elevada concentració de NPs a la fase crioconcentrada pot causar-ne l'agregació o la fusió. La criocristal·lització del gel també pot causar estrès mecànic a les NPs, provocant-ne la desestabilització. Per evitar aquests fenòmens s'afegeixen excipients abans de la liofilització, els quals s'anomenen crioprotectors (protegeixen de l'estrès de la congelació) i lioprotectors (protegeixen de l'estrès d'assecat) [129]. Els compostos que s'hi afegeixen actuen normalment de les dues maneres. Els crioprotectors més comuns són sucres com la trehalosa, la glucosa, la sucrosa o polialcohols com el mannitol, tot i que també s'utilitzen altres polímers com el PEG o el PVA [120,135–137]. Els crioprotectors però, poden afectar la grandària efectiva de les nanopartícules i per tant el seu comportament en l'alliberació del fàrmac [88].

S'haurien de conèixer propietats tals com la temperatura de transició vítria ( $T_g'$  i  $T_g$ ) i la temperatura de col·lapse ( $T_c$ ) de la formulació [129], factors que depenen del polímer, del tensioactiu-estabilitzant-conservant, dels grups químics enllaçats a la superfície de les nanopartícules i de la naturalesa del crioprotector-lioprotector, per tant, previ al procés, convé fer un seguiment per microscòpia (*freeze drying microscopy*) i DSC [99,137]. Holzer i col·laboradors, per exemple, demostren que només les NPs de PLGA sotmeses a la liofilització sense agents crioprotectors mostraven una agregació apreciable macroscòpicament i irreversible [99].

La liofilització permet obtenir productes de molta qualitat però té l'inconvenient que és un procés relativament llarg (dies) i per tant suposa una despesa energètica considerable que repercuteix en els costos d'operació i manteniment [99].

L'assecat pel mètode d'assecatge de l'aerosol es basa en la transformació d'un fluid (dissolucions, emulsions, suspensions, i fins i tot pastes, fangs o substàncies foses) en una pols seca mitjançant un procés d'atomització en un corrent de gas calent que normalment és aire o nitrogen. El procés té tres etapes bàsiques abans de la recol·lecció

del producte sec [138]: atomització del líquid que entra-formació de gotes, evaporació del dissolvent-assecatge de l'esprai en el gas, formació de les partícules seques. Les petites gotes que es generen (escala micromètrica) són sotmeses a una evaporació ràpida del dissolvent i les partícules seques se separen del gas d'assecatge mitjançant un cicló que les diposita a la base de l'aparell (Figura 12). Generalment, el rendiment del procés d'assecatge de l'aerosol a escala de laboratori amb els aparells convencionals no és òptima (20 % - 70 %) degut a la pèrdua de producte per les parets de la cambra d'assecatge i a la poca capacitat del cicló de separar partícules petites ( $< 2 \mu\text{m}$ ) (l'eficàcia del cicló depèn de la massa de la partícula). Per tal de superar aquest inconvenient i estendre l'aplicabilitat a la producció de partícules més complexes, l'any 2009 Büchi va introduir l'aparell Nano Spray Dryer B-90 el qual segueix les generacions prèvies (Mini Spray Dryers B-190, B-191 i B-290). Aquest equip és adequat per a la producció de partícules petites (200 nm -  $5 \mu\text{m}$ ) amb bons rendiments (90 %) fins i tot per quantitats petites (mil·ligrams). Aquest aparell conté una malla que vibra a una freqüència d'ultrasons (60 kHz) i amb la possibilitat de diferents grandàries de forat ( $4.0 \mu\text{m}$ ,  $5.5 \mu\text{m}$  o  $7.0 \mu\text{m}$ ). Mitjançant un senyal elèctric, un element amb propietats piezoelèctriques es contrau i s'expandeix provocant una oscil·lació en la malla del nebulitzador (Figura 13). Quan la malla es contrau es deforma cap al costat del fluid i els forats es carreguen amb fluid; quan la malla s'expandeix, les gotes s'expulsen a través dels forats cap a la cambra d'assecatge, produint gotes ultrafines (aerosol) que es transformen en partícules de grandària petita i reproduïble un cop assecades. A més a més, aquest aparell conté un col·lector electroestàtic en lloc del cicló, que proporciona rendiments superiors al 70 % quan tots els paràmetres del procés estan ben optimitzats. El col·lector electroestàtic és independent de la massa de la partícula i es basa en la generació d'un camp elèctric que provoca la creació d'ions negatius del gas que s'atreuen cap a l'elèctrode col·lector (Figura 14). Aquests ions en el seu trajecte s'enganxen a les partícules suspeses al gas i les carreguen negativament. Les partícules carregades són desviades cap a l'elèctrode col·lector on s'hi enganxen i formen una capa fina de partícules. També utilitza un flux laminar de gas assecant a través de la cambra d'assecatge que resulta en un escalfament suau, uniforme i instantani.

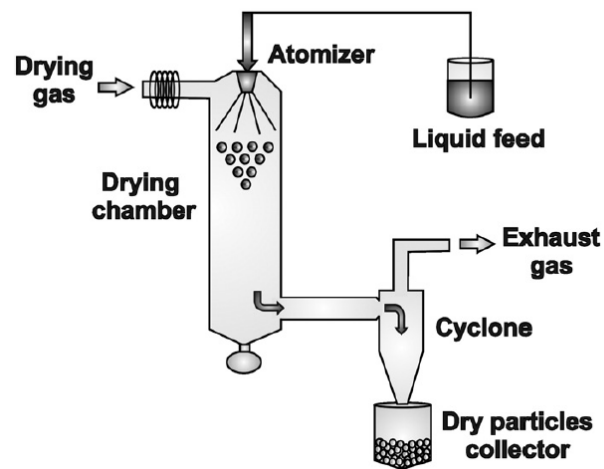


Figura 12. Esquema d'un equip i del procés d'assecatge de l'aerosol convencional [139].

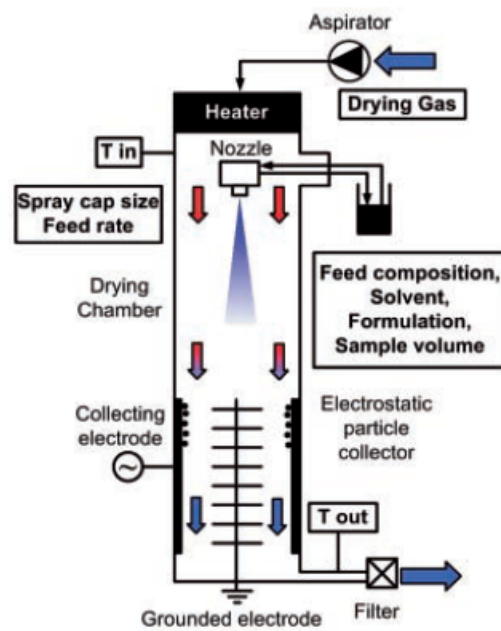


Figura 13. Esquema del Nano Spray Dryer B-90 [140].

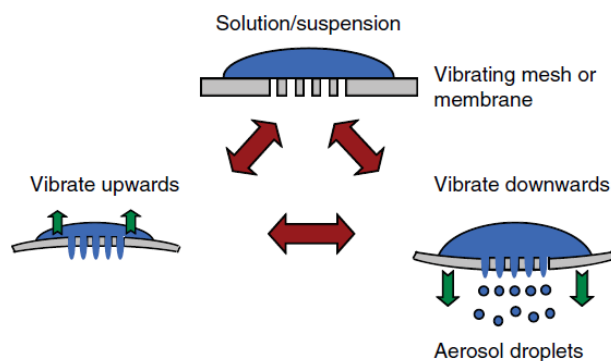


Figura 14. Principi de funcionament de la vibració de la malla al capçal de formació de l'aerosol, accionada piezoelèctricament, en el Nano Spray Dryer B-90 [138].

Normalment s'entén la tècnica d'assecatge de l'aerosol només com un procés de deshidratació, però també s'utilitza per a l'encapsulació directa de compostos hidròfils o hidròfobs en diferents medis de transport sense que hi hagi degradació tèrmica per la rapidesa del procés d'assecatge (dècimes de segon o mil·lisegons) que fa que estiguin exposats molt poc temps a la calor. Per tant, les partícules es poden obtenir directament mitjançant la tècnica d'assecatge de l'aerosol de dissolucions o suspensions que contenen els compostos [108], o bé atomitzant partícules formades amb processos d'emulsificació, dessolvatació o desplaçament del dissolvent que s'han descrit anteriorment [109,141,142]. Normalment, quan les partícules primer s'han format i aquesta tecnologia s'utilitza per eliminar el dissolvent, la grandària de les partícules pràcticament no és afectada quan es tornen a redispersar en medi aquós. Tant el procés de liofilització com el d'assecatge de l'aerosol s'han d'optimitzar per a cada formulació de NPs en particular.

És un procés que es considera suau, poc agressiu i que es pot aplicar a molts tipus de productes, incloses les substàncies sensibles a la temperatura com els productes biològics (proteïnes, virus, etc.), fàrmacs o nutrients [143–145]. També permet treballar en atmosfera inerta, si és necessari. La tècnica és adequada tant en el camp de la recerca com per a la producció a gran escala perquè és un procés ràpid, continu, reproduïble, és en un sol pas i fàcilment escalable. A més a més es produeixen partícules esfèriques i amb una elevada uniformitat. A nivell de laboratori, el Nano Spray Dryer B-90 permet recollir quantitats de substància inferiors als 30 mg, les quals no es podrien obtenir amb l'aparell convencional, i pot partir de quantitats tan petites com 5-20 ml de dissolució. És

un procés ràpid sobretot en comparació amb la liofilització, i que requereix menys despesa energètica perquè treballa a pressió ambient. Aquests aparells de laboratori són molt útils en les etapes de desenvolupament de producte, i sobretot quan s'utilitzen materials molt cars, ja que permeten evaporar volums petits, de 5 ml en amunt.

Tot i tenir molts avantatges també es poden presentar algunes dificultats experimentals. La separació de partícules  $< 2 \mu\text{m}$  no és eficaç si el col·lector és un cicló. El Nano Spray Dryer B-90 té els capçals amb forats més petits i això fa que s'hagin d'evitar dissolucions viscoses o que es formin incrustacions que facin disminuir el rendiment o que contaminin el producte final. La vibració també pot causar un efecte de cisalla en productes sensibles al trencament [139].

### 1.7.3. CARACTERITZACIÓ FÍSICOQUÍMICA DE LES NANOPARTÍCULES

Les nanopartícules s'han de caracteritzar després de la seva síntesi, ja que tant les propietats superficials com les característiques fisicoquímiques estaran associades al seu comportament *in vitro* i *in vivo*. Les propietats generals principals són: grandària, polidispersitat, càrrega superficial, i eficàcia d'encapsulació. Per avaluar aquestes propietats, s'utilitzen una diversitat de tècniques que s'aniran detallant a continuació.

La grandària de les nanopartícules ( $Z_{av}$ ) en una suspensió col·loidal es determina mitjançant mètodes força específics com la dispersió de la llum dinàmica (DLS). Amb aquesta tècnica es determina la distribució de la grandària de manera molt ràpida, i també s'obtenen dades de la polidispersitat, la qual s'utilitza per descriure el grau d'uniformitat en una distribució de grandària de partícules [146,147]. L'índex de polidispersitat (PI) és adimensional i l'escala va de 0 a 1.0. Valors de 0.05 es troben en substàncies prou altament monodisperses mentre que valors de 0.7 indicarien una dispersió molt gran de grandària de partícula. En el camp de les nanopartícules polimèriques valors  $\leq 0.2$  són considerats molt acceptables [148].

La microscòpia electrònica de transmissió (TEM) i la microscòpia electrònica d'escombratge (SEM) proporcionen informació relacionada amb la morfologia de les partícules, així com també respecte a la grandària [95,130,149,150]. La microscòpia TEM

construeix la imatge a través dels electrons que travessen la mostra. La microscòpia SEM la construeix mitjançant els electrons reflectits per la mostra i és per això que produeix imatges tridimensionals molt realistes de la superfície de la mostra analitzada. La tècnica SEM requereix que la mostra analitzada sigui elèctricament conductora i per això s'ha de recobrir d'una capa molt fina de carboni o d'un metall com l'or per donar-li caràcter conductor. També és necessari que no s'alteri l'estructura de la mostra sota l'elevat buit que necessiten les microscòpies TEM i SEM.

En la superfície de les nanopartícules es poden adherir ions per atracció electrostàtica forta (entre ions de diferent signe), atracció electrostàtica feble (Van der Waals) o per afinitat entre molècules i formar més d'una capa d'ions del mateix signe. En aquests casos es forma una pel·lícula iònica a la superfície de la nanopartícula d'un determinat gruix, que depèn de la magnitud de les forces d'atracció pels ions d'un determinat signe, però a una certa distància els ions ja no es queden fixos sobre la partícula i continuen circulant lliures en la solució de la dispersió col·loidal de nanopartícules. El potencial zeta (ZP, potencial  $\zeta$ ) és la diferència de potencial (en volts o mil·livolts) que hi ha entre aquesta última capa d'ions fixos sobre la nanopartícula i una zona de la solució on no hi ha nanopartícules. Com que no es pot disposar d'elèctrodes-sonda tan petits per fer la mesura directament amb un voltímetre, aquesta mesura s'ha de fer indirectament, mesurant propietats físiques que es puguin correlacionar amb aquest potencial.

Per a l'estudi de les nanoemulsions i nanosuspensions es fan servir diferents mètodes experimentals que ens permeten avaluar paràmetres que són d'interès. Amb el mètode d'anemometria (o velocimetria) làser Doppler (LDA / LDV) es pot calcular la mobilitat electroforètica mitjana de les partícules de la suspensió o emulsió i quantificar la càrrega de les partícules. El mètode de dispersió de la llum electroforètica (ELS) i el mètode de la determinació electroacústica són les tècniques més utilitzades per a l'anàlisi del ZP [151]. ELS proporciona una millor resolució i resultats més fiables que altres mètodes. En general es considera que una formulació d'una nanodispersió amb un ZP superior a + 30 o - 30 mV és extremadament estable, però cal considerar que els valors de ZP no són una mesura absoluta de l'estabilitat de les nanopartícules. A ZP de NPs amb valors > +25 mV o < -25 mV ja solen tenir un alt grau d'estabilitat. La repulsió electroestàtica entre partícules de la mateixa polaritat o mateixa càrrega elèctrica evita la formació

d'agregats. Quan els valors del ZP són més baixos les forces de Van der Waals són dominants i esdevé la formació d'agregats. Generalment, valors de ZP elevats, ja siguin (+) o (-) també indiquen més estabilitat de la suspensió en el temps [152,153].

El potencial zeta (ZP), doncs, dona informació sobre la càrrega superficial de les nanopartícules, la qual pot influir tant en l'estabilitat física com en la mucoadhesió de les nanopartícules amb les membranes cel·lulars.

Les nanopartícules de PLGA són negatives degut a la ionització del grup carboxílic terminal (Figura 9). Les nanopartícules de PLGA-PEG amb el PEG enllaçat covalentment tenen menys càrrega superficial neta ja que el PEG s'hi enllaça mitjançant esterificació (Figura 10), i per tant la disminució de la càrrega dependrà del % de PEG enllaçat.

La determinació de l'eficàcia d'encapsulació (EE) definida com la quantitat de fàrmac encapsulada en les NPs respecte la quantitat de fàrmac inicial utilitzat en l'elaboració de les NPs, expressada en %, es pot realitzar a través d'un mètode directe (ruptura de les nanopartícules) o indirecta (determinació del fàrmac no encapsulat en la fase contínua). En els dos casos és necessari aplicar la ultracentrifugació o la filtració per separar les nanopartícules de la fase contínua. Una de les metodologies més habituals i fiables de quantificació del fàrmac és la cromatografia de líquids. La majoria de fàrmacs presenten absorbància en l'espectre UV-Vis, i donat que les concentracions són relativament altes (ordre dels µg/ml) i la matriu no és complexa, la detecció aplicada a la cromatografia de líquids normalment és espectrofotomètrica ja que la majoria de fàrmacs presenten grups cromòfors [121,147,154].

El pes molecular del polímer també condiona la grandària de la partícula, l'eficàcia d'associació del fàrmac al polímer i la velocitat de degradació del polímer, de manera que afectarà en gran mesura l'alliberació del fàrmac en aquests sistemes [113].

Les interaccions del polímer amb el principi actiu i l'estat físic en què es troba el fàrmac encapsulat, es poden determinar mitjançant la calorimetria diferencial d'escombratge (DSC: *Differential Scanning Calorimetry*), l'espectroscòpia infraroja amb transformada de Fourier (FTIR: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) o la difracció de rajos-X (XRD: *X-Ray Diffraction*). Les publicacions referents a la preparació de nanopartícules sempre inclouen aquests tipus de caracterització [154–156].



La DSC mesura els canvis d'entalpia en les mostres deguts a les modificacions que es produeixen en les seves propietats químiques i físiques en funció de la temperatura. Les diferències de flux calorífic tenen lloc quan una mostra absorbeix o allibera calor a causa d'efectes tèrmics com la fusió, la cristallització, transicions polimòrfiques, reaccions químiques, la vaporització o molts altres processos.

La DSC permet avaluar el comportament tèrmic dels components de les nanopartícules després d'ésser sotmesos a les condicions del procés d'elaboració. Consisteix a aplicar una rampa de temperatura amb el temps, normalment de menys a més temperatura. Els pics poden ser endotèrmics com en el cas d'un punt de fusió o un procés de transició vítria, o exotèrmics com un procés de cristallització. En el cas de les NPs normalment es fan rampes d'escalfament. Es comparen els perfils que s'obtenen entre el fàrmac pur, el polímer, l'estabilitzant que s'hi afegeix, i la formulació amb les nanopartícules que contenen el fàrmac encapsulat. La DSC del polímer indica la temperatura de transició vítria,  $T_g$ , que és la temperatura en què els materials amorfs passen d'un estat rígid-vítria a un estat gomós. En les molècules de pes molecular definit, els fàrmacs purs, es determina la temperatura de fusió. El que es fa és comparar els gràfics DSC de les matèries primeres amb els de les formulacions de nanopartícules obtingudes [97].

La difracció de rajos-X estudia l'estructura dels materials sòlids. Una substància cristal·lina i per tant ordenada estructuralment, presenta una empremta característica amb pics aguts (s'anomena espectre de difracció). Si aquesta substància experimenta un canvi en la seva estructura cristal·lina o en la seva composició química, l'empremta variarà perquè s'estan modificant propietats importants que defineixen el seu espectre de difracció. En els polímers amorfs els espectres de difracció no són nítids cosa que implica que no contenen zones ordenades (en forma cristal·lina) i la seva estructura es pot considerar com un embull de regions sense ordenar i per tant no presentaran pics característics però, si existeix un cert grau d'ordenació com en el cas de polímers semicristal·lins, s'obtenen bandes amples. El que es fa és comparar els espectres de les matèries primeres amb els de les formulacions de nanopartícules obtingudes [157].

L'espectroscòpia infraroja (FTIR) s'utilitza per identificar grups funcionals o substàncies químiques. La radiació que s'aplica permet excitar modes vibracionals i rotacionals dels

enllaços entre els àtoms les molècules. Si les substàncies experimenten un canvi en la seva estructura o en la seva composició química, l'empremta de l'espectre varia. El que es fa és comparar els espectres de les matèries primeres amb els de les formulacions de nanopartícules obtingudes [113]. La Taula 2 resumeixen les tècniques de caracterització fisicoquímica de les nanopartícules.

L'estabilitat de les suspensions de nanopartícules es pot seguir amb el temps mesurant de nou els paràmetres que caracteritzen inicialment el sistema (grandària, polidispersitat, ZP i EE) [158] però actualment s'han desenvolupat mètodes més ràpids degut a l'increment de sistemes col·loïdals o suspensions basats en nanopartícules, liposomes, etc., en el desenvolupament farmacèutic.

L'anàlisi directa de l'estabilitat física es pot realitzar amb la tecnologia anomenada "TURBISCAN®" que és patentada i és la primera que permet analitzar mecanismes de desestabilització de medis concentrats sense aplicar dilució o estrès sobre la mostra. És una tècnica òptica que mesura dispersió de la llum (SMLS, *Static Multiple Light Scattering*) [159]. Permet fer mesures en un rang de grandària de partícula de 10 nm a 1 mm, i fins a concentracions molt altes (95 %).

La tecnologia SMLS consisteix a enviar fotons de l'infraroig proper (NIR),  $\lambda=880$  nm, a la mostra. Els fotons, després d'ésser dispersats molts cops per les partícules de la suspensió, són detectats per dos detectors sincrònics: *backscattering* a  $135^\circ$  i transmissió a  $0^\circ$  respecte a la font de radiació. Tant la intensitat de transmissió com de *backscattering* depenen de la grandària de la partícula i de la concentració.

L'aparell fa un escombratge de baix a dalt de la cubeta que conté la mostra. Una variació local de la intensitat de la llum es correspon a una formació de fases. Per exemple, si la suspensió sedimenta, es produirà un increment en la dispersió de la llum a la part baixa i una disminució a la part alta, respecte al perfil inicial. De la mateixa manera, la transmissió serà major a la part alta i menor a la part baixa.

Una variació global de la intensitat de la llum es correspon a una variació de la grandària per fenòmens d'aglomeració o floculació (que no modifiquen les partícules individuals, fenòmens reversibles) o coalescència (que formen partícules de mida més gran, fenòmens irreversibles).

Una suspensió col·loidal homogènia té un perfil de *backscattering* (dispersió constant). Si sedimenta o flota o es formen agregats, aquest perfil es veu modificat. La mostra es col·loca a la cel·la i normalment es fan 3 escombratges (*scans*) en 10 min. Es considera que una variació del  $\pm 10\%$  respecte al perfil inicial és indicatiu d'una desestabilització del sistema.

Les suspensions col·loïdals de nanopartícules normalment s'emmagatzemen en nevera perquè a temperatura ambient es desestabilitzen ràpidament. Refrigerades, l'estabilitat pot durar uns mesos [97,155,160].

Taula 2. Tècniques principals per a la caracterització fisicoquímica de les nanopartícules. Adaptació de [161,162].

Característica fisicoquímica analitzada	Tècnica
Grandària de partícula;	SEM
distribució de la grandària de partícula;	TEM
morfologia (forma, estructura, agregació)	ATM ( <i>Atomic Force Microscopy</i> ) DLS ( <i>Dinamic Light Scattering</i> ) <i>Photon correlation spectroscopy</i>
Pes molecular	SEC ( <i>Size Exclusion Chromatography</i> )
Estructura, química de la superfície, estat físic	FTIR, RMN, DSC
Càrrega superficial (estabilitat)	Mesura del potencial-Z
Estabilitat de la suspensió	TURBISCAN®
Cristal·linitat	Difracció de rajos-X, DSC
Eficàcia d'encapsulació del fàrmac; estudis d'alliberació del fàrmac	Cromatografia de líquids

## 1.8. AVALUACIÓ BIOFARMACÈUTICA DE LES FORMES DE DOSIFICACIÓ OFTÀLMIQUES

El desenvolupament preclínic d'un fàrmac requereix una sèrie d'estudis amb animals. El teixit ocular porcí és un dels més similars al de l'home junt amb el dels primats i el conill a causa de l'absència del *tapetum lucidum*, una capa de teixit situada a la part posterior de l'ull. Aquesta capa sí que és present en animals com la vaca, l'ovella i el

conill. Unes altres similituds entre l'ull humà i el porcí són el pigment de l'epiteli retinal, els fotoreceptors cel·lulars, el gruix de l'escleròtica i el contingut en aigua. L'ull del conill com a model d'experimentació animal és el més senzill i amb més similitud a l'ull humà, per això els conills són importants per a fer estudis *in vivo* i *ex vivo* d'alliberació de fàrmacs en l'ull.

Des del punt de vista de la penetració dels fàrmacs, les estructures anatòmiques involucrades són la còrnia i l'escleròtica, si bé la primera és la que té més interès perquè moltes malalties oculars la comprometen.

L'avaluació farmacèutica de les formes de dosificació oftàlmica es pot realitzar mitjançant tècniques *in vitro* i *in vivo*. Les tècniques *in vitro* serveixen per determinar l'alliberació i la penetració del fàrmac, les quals poden ser a través de membranes sintètiques o bé a través de còrnies o escleròtiques d'animals (porc, conill), i muntades en dispositius adequats com la cel·la de difusió anomenada cel·la de Franz, per a preparats líquids o semi-sòlids. Aquests estudis donen informació sobre els efectes que produeixen en la penetració ocular, la naturalesa del fàrmac (lipòfila o hidròfila), la grandària molecular, el grau d'ionització, o els mateixos components de la formulació. Malgrat que proporcionen dades molt útils, són estudis que no poden predir amb fiabilitat la biodisponibilitat *in vivo* dels fàrmacs administrats tòpicament.

Els estudis de biodisponibilitat mitjançant tècniques *in vivo* són més complexos i requereixen la determinació dels nivells de concentració del fàrmac en els teixits oculars, excepte si l'activitat terapèutica es pot mesurar amb objectivitat, com per exemple un efecte en la modificació del diàmetre de la pupil·la o una reducció de la pressió intraocular.

### **1.8.1. ESTUDIS D'ALLIBERACIÓ *IN VITRO* I DE PENETRACIÓ *EX VIVO***

Les cel·les de Franz, des del seu desenvolupament l'any 1975, són un dels principals mètodes per avaluar la penetració transepitelial de molècules-biomolècules (a través de membranes) [163]. Les cel·les, tal com mostra la Figura 14, estan constituïdes per dues càmeres, una de donadora i una de receptora, separades per una membrana d'origen

biològic o sintètic que permet avaluar la difusió d'un compost, com per exemple un fàrmac, d'una cambra a l'altra després de travessar la membrana. En el compartiment superior s'hi addiciona una dissolució o dispersió que conté el principi actiu. La difusió del fàrmac des del producte a avaluar a través de la membrana, es controla mitjançant la recollida seqüencial de mostres del líquid receptor. El líquid que es recull és reemplaçat per dissolució receptora per mantenir un volum constant. Els aparells consten d'un sistema que conté diferents cel·les per poder realitzar a la vegada rèpliques dels experiments i amb diferents condicions a la vegada. La temperatura és controlada i es manté l'agitació constant de la dissolució [164].

Per als estudis d'alliberació (*release*) s'empren membranes de diàlisi i es realitzen a una temperatura constant de 32 °C o 37 °C, segons l'objectiu de l'estudi, si es tracta de membranes externes com la pell o la còrnia, o internes com les mucoses o l'escleròtica, respectivament. Les membranes sintètiques que es fan servir de manera més habitual en els experiments amb cel·les de Franz són de cel·lulosa natural regenerada i amb una porositat mitjana que se sol expressar en unitats de massa molecular (Dalton) en comptes de nanòmetres (nm) de diàmetre mitjà de porus. Els compostos de baix pes molecular difonen a través de la membrana però els d'alt pes molecular queden retinguts. En l'elecció de membrana cal tenir en compte tant la mida de la nanopartícula, que no ha de traspasar-la, com l'afinitat del material de què està feta la membrana per la matèria activa, ja que no hi ha de quedar retinguda.

Els estudis de penetració a través de la còrnia i l'escleròtica d'animals es realitzen a 32 °C i 37 °C respectivament ja que la còrnia és una membrana externa i en canvi l'escleròtica és una membrana més protegida. Els estudis de penetració a través de teixits animals són una aproximació més real al comportament en els organismes vius.

El medi del compartiment receptor ha de permetre solubilitzar el fàrmac i és per això que si el fàrmac presenta poca o gens solubilitat en aigua, en lloc de tampó salí fisiològic (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) que seria el medi ideal d'estudi, s'empren barreges de PBS amb dissolvents que no siguin tòxics i que no impliquin risc per a la salut. En el cas de la PGZ s'empren barreges PBS:DMSO 60:40 v/v degut a la poca solubilitat de la PGZ

en aigua [165]. El DMSO és considerat per la FDA un dissolvent de Classe 3, és a dir, de poca toxicitat i baix risc per la salut, als nivells acceptats en fàrmacs [166].

L'osmolaritat i les concentracions dels ions del PBS són iguals que les del cos humà (dissolució isotònica). Quan s'empren altres dissolvents convindria que la barreja resultant també fos isotònica. En el cas que no sigui així, no és un paràmetre crític en els estudis de penetració *ex vivo*, però sí que convé ajustar la formulació quan s'ha d'aplicar a organismes vius i els dissolvents hi són com a residuals.

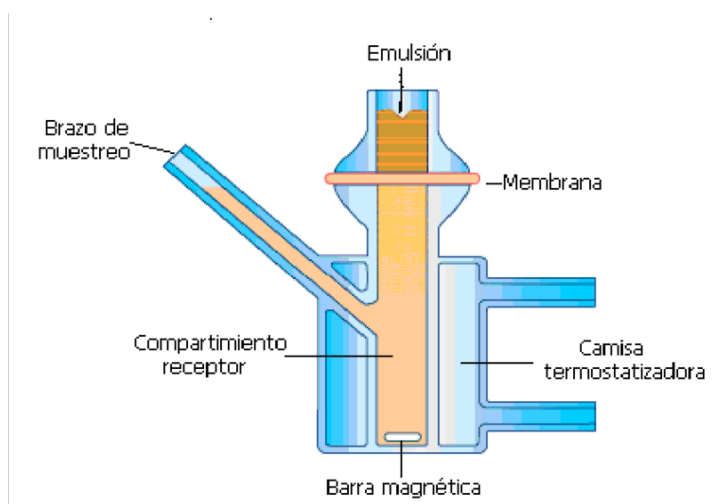


Figura 14. Representació esquemàtica d'una cel·la de Franz [167].

L'alliberació del fàrmac des de la nanopartícula es pot produir mitjançant un mecanisme de difusió o d'erosió-degradació hidrolítica del polímer, o una combinació d'ambdós. La quantificació de l'alliberació es pot determinar *in vitro*, utilitzant la diàlisi amb membranes de difusió, o utilitzant cel·les de difusió de Franz amb membranes artificials o biològiques (a un pH fisiològic i en condicions d'embornal). La cinètica d'alliberació (quantitat de fàrmac alliberat amb el temps) permet entendre els mecanismes involucrats en la cessió de la molècula encapsulada. Si l'alliberació és molt ràpida el mecanisme principal serà majoritàriament el de difusió. També pot passar que hagi quedat fàrmac adherit a la capa superficial de la nanopartícula que es dissol ràpidament en entrar en contacte amb el medi, cosa que provoca inicialment un alliberament sobtat (*burst effect*-*efecto estallido*). La informació que proporcionen els estudis *in vitro* permeten planificar estudis *in vivo* amb animals d'experimentació.

Els paràmetres calculats per comparar els perfils d'alliberació o permeabilitat són els següents:

- Quantitat (o percentatge) de fàrmac que s'ha alliberat: es mesura la concentració en el medi receptor amb el temps. Normalment es pren mostra als 30 min i cada hora i durant un mínim de 24 h.
- Flux en estat estacionari ( $J_{ss}$ ): quantitat de fàrmac que ha traspasat la membrana per unitat de superfície i unitat de temps. Es calcula a partir del quocient entre la quantitat de fàrmac que ha traspasat per unitat d'àrea en l'estat estacionari (asíptota de la corba) i el temps necessari per assolir l'asíptota. Les unitats són  $\text{mg cm}^2\cdot\text{s}$  o  $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{s}$ .

$$J=dQ/A\cdot dt$$

on Q indica la quantitat de fàrmac que ha traspasat (en mg o  $\mu\text{g}$ ), A és l'àrea de difusió (en  $\text{cm}^2$ ), y t és el temps d'exposició (en segons).

- El coeficient de permeabilitat (P): es defineix com la relació entre el flux i la concentració de partida al compartiment donador, les seves unitats són  $\text{cm}/\text{s}$  i es calcula segons la següent equació [168]:

$$P=J/C_0$$

essent  $C_0$  la concentració de fàrmac en el medi donador en ( $\text{mg}/\text{cm}^3$  o  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ).

Donat que la quantitat de fàrmac que traspasa depèn de l'àrea de la membrana utilitzada, la determinació del flux resulta un paràmetre molt útil per caracteritzar els processos de penetració.

### 1.8.2. ESTUDIS DE BIODISPONIBILITAT DE FÀRMACS

Els estudis de biodisponibilitat dels fàrmacs administrats per via oral o parenteral (injeccions) es fan seguint la concentració en fluids biològics (plasma) amb el temps. Els estudis de biodisponibilitat ocular dels fàrmacs malauradament impliquen sacrificar els animals per poder analitzar els teixits i determinar-ne la presència de fàrmac i és per aquest motiu que hi ha molts pocs estudis a la bibliografia. Per tal d'evitar el sacrifici

d'animals es podria fer un seguiment del fàrmac en la llàgrima, però això tampoc seria indicatiu de si el fàrmac ha penetrat a través dels teixits.

Els mateixos animals que s'han utilitzat en estudis d'eficàcia i tolerància, es poden aprofitar per analitzar la concentració del fàrmac en els teixits oculars. La separació de la còrnia, l'escleròtica, el cristal·lí, l'humor aquós i l'humor vitri és relativament senzilla. Aconseguir separar la retina i la coroide, que són membranes molt fines, requereix molta expertesa.

La determinació de substàncies en teixits normalment es fa mitjançant tècniques cromatogràfiques, principalment la cromatografia de líquids, per la seva gran versatilitat. Quan es tracta de determinar concentracions molt baixes en matrius complexes, la detecció escollida sol ser l'espectrometria de masses, ja que la detecció espectrofotomètrica no seria prou sensible i/o selectiva en la majoria dels casos.

Quan la detecció per espectrometria de masses va destinada a un/uns anàlits en concret, s'utilitzen gairebé sempre aparells de baixa resolució (LRMS, *Low Resolution Mass Spectrometry*) com un triple quadrupol treballant en mode MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). En aquest mode d'adquisició el primer quadrupol aïlla l'ió precursor (*parent ion*), el qual es fragmenta en el segon quadrupol, que actua com a cel·la de col·lisió, i el tercer quadrupol separa els ions resultants de la fragmentació. Els dos ions de fragmentació més intensos, anomenats transicions entre la  $m/z$  de l'ió precursor i la  $m/z$  del fragment, s'utilitzen com a quantificador i qualificador del principi actiu que s'ha seleccionat en el primer quadrupol, respectivament. El resultat és un mètode molt sensible i específic ja que redueix dràsticament les interferències.

### 1.8.3. ESTUDIS DE TOLERÀNCIA OCULAR *IN VIVO*

És necessari realitzar estudis de tolerància, toxicitat i efectivitat dels fàrmacs ja sigui *in vitro* o *in vivo* amb animals d'experimentació. Malauradament, de moment, no s'ha trobat cap alternativa que substitueixi aquests estudis al cent per cent.

És molt important fer estudis de tolerància ocular en el cas dels sistemes de transport de fàrmacs per instil·lació ocular i, seguint el concepte de les tres erres (reduir, reciclar,



reutilitzar), és important reduir o substituir els assajos amb animals. Les tècniques de cribatge (*screening*) *in vitro* serveixen com a mètodes preliminars per avaluar la possibilitat de risc en estudis amb animals. Això no obstant, un assaig *in vitro* no pot imitar completament el comportament *in vivo*, per exemple, els mecanismes sistèmics d'inflamació, penetració/permeabilitat, i tolerància, per això sovint s'han de fer assajos amb animals d'experimentació [169,170].

### 1.8.3.1. TEST HET-CAM

La membrana corioal·lantoide (CAM) és un teixit íntegre sense innervació que conté artèries, venes i capil·lars i que tècnicament és fàcil d'estudiar. Aquest teixit respon a danys de tipus inflamatori de manera similar a com respon el teixit conjuntiu de l'ull de conill i per tant la vascularització de la CAM proporciona un model ideal per als estudis d'irritació ocular.

El test HET-CAM (en anglès "*hen's egg test chorioallantoic membrane*" i en català "assaig de la membrana corioal·lantoide d'ou de la gallina") és un mètode alternatiu a l'experimentació animal per avaluar la irritació ocular [171,172]. És un test ràpid, sensible i econòmic. L'assaig amb ous incubats és un cas entre els sistemes *in vitro* i *in vivo* i no presenta conflictes amb les obligacions ètiques i legals.

El test es basa en l'aplicació directa de les substàncies d'estudi sobre la CAM i observar les reaccions que tenen lloc (hemorràgia, coagulació o lisi dels vasos sanguinis) seguides mitjançant un microscopi en temps real. Els efectes irritants esdevenen en els següents 5 min de l'administració de la mostra sobre la mucosa. Els resultats es comparen amb els obtinguts aplicant una dissolució salina no irritant.

La intensitat de la reacció s'avalua semiquantitativament en una escala de 0 (sense reacció) a 3 (reacció forta) i es calcula l'índex d'irritació ocular (OII) d'acord amb l'expressió següent:

$$\text{OII} = (301 - h) \times 5/300 + (301 - l) \times 7/300 + (301 - c) \times 9/300$$

On  $h$  és el temps (en segons) de l'inici de l'hemorràgia,  $l$  del temps de lisi, i  $c$  del temps de coagulació. S'utilitza la classificació següent:  $OII < 0.9$ , lleugerament irritant;  $0.9 < OII \leq 4.9$ , moderadament irritant;  $4.9 < OII \leq 8.9$ , irritant; i  $8.9 < OII \leq 21$ , fortament irritant [173].

### 1.8.3.2. TEST DE DRAIZE *IN VIVO*

L'any 1944, John Draize i col·laboradors, van desenvolupar mètodes per avaluar la seguretat de productes cosmètics abans de comercialitzar-los [174]. L'avaluació de la irritabilitat ocular *in vivo* segons el mètode Draize requereix l'aplicació de la substància d'assaig en la conjuntiva de l'animal d'experimentació, i és per això que aquest assaig es realitza quan el test HET-CAM no ha donat efectes irritants significatius. Les variacions del mètode es basen en el número d'aplicacions de la mostra o el temps d'observació i mode de quantificació, per tal d'adaptar-lo a col·liris, fàrmacs i cosmètics.

De forma general, la puntuació de Draize (*Draize score*) es determina mitjançant l'observació dels canvis en l'estructura ocular que impliquen la còrnia (turbiditat o opacitat), l'iris (grau d'inflamació) i conjuntiva (congestió, inflamació i secreció) [175].

Les lesions oculars es quantifiquen utilitzant la següent equació d'acord amb els paràmetres i la puntuació que es pot trobar detallada a la publicació de Wilhelmus [175]:

$$MTS = \sum X1(n) \times 5 + \sum X2(n) \times 2 + \sum X3(n) \times 5$$

MTS (*Mean TotalScore*, puntuació total) on  $X1(n)$ ,  $X2(n)$ , and  $X3(n)$  són les puntuacions de la còrnia, conjuntiva i iris respectivament i "n" és el nombre de conills inclosos en l'assaig de tolerància ocular.

### 1.8.3.3. ASSAIG D'EFICÀCIA ANTIINFLAMATÒRIA *IN VIVO*

L'eficàcia antiinflamatòria d'una formulació es pot estudiar seguint el mètode descrit per Spampinato i col·laboradors [176]. L'administració tòpica d'àcid araquidònic

reproduueix els signes d'una inflamació ocular aguda. El mètode consisteix a avaluar la prevenció de la inflamació (profilaxis) instil·lant 50 µl de la formulació que es vol estudiar al sac conjuntival de l'ull dret 30 min abans d'induir la inflamació mitjançant instil·lació d'àcid araquidònic. L'ull esquerre s'utilitza com a control. La inflamació ocular s'avalua normalment dels 60 min als 210 min i el resultat (*ocular inflammation score*) es calcula utilitzant el MTS descrit anteriorment a l'apartat 1.8.3.2 [147,150].

#### 1.8.4. CITOTOXICITAT CEL·LULAR

És necessari estudiar també la citotoxicitat dels nous fàrmacs mitjançant tècniques molt sensibles, reproduïbles i aplicables a moltes substàncies. El test AlamarBlue® de viabilitat cel·lular determina quantitativament la viabilitat de línies cel·lulars de mamífers. És un assaig fotomètric de detecció d'activitat metabòlica en cèl·lules [177].

Les cèl·lules viables mantenen un ambient reductor en el seu citoplasma. El mètode es basa en la reducció del compost resazurin (forma oxidada, *7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-10-oxide*) a resorufin (forma reduïda) produïda per enzims presents al mitocondri. El reactiu alamarBlue (resazurin) és blau i no fluorescent. Quan s'incuba amb cèl·lules viables el reactiu es torna vermell i fluorescent, canvi que es pot detectar mitjançant absorbància (570 nm i 600 nm de les formes oxidada i reduïda, respectivament) o fluorescència (excitació a 530-560 nm i emissió a 590 nm de la forma reduïda). Si una substància és citotòxica es produirà una disminució de la forma reduïda.

En el cas dels estudis de toxicitat en cèl·lules oculars s'utilitza sovint la línia cel·lular Y-79 (retinoblastoma: cèl·lules cancerígenes de la retina) la qual és una línia comercial i força assequible ja que és un càncer relativament freqüent [160,165,178]. També es troben estudis de citotoxicitat amb cèl·lules epitelials de la retina ARPE-19 [5,179].

#### 1.8.5. ESTUDIS DE LA ULTRAESTRUCTURA DE LA CÒRNIA

Aproximadament el 70 % del pes sec de la còrnia és col·lagen, i majoritàriament en forma de fibril·les (Figura 15). Aquestes fibril·les estan formades per molècules de col·lagen disposades aproximadament de manera paral·lela entre elles al llarg de l'eix fibril·lar, i que es mantenen juntes degut als enllaços intermoleculars. El col·lagen fibril·lar de la

còrnia es troba majoritàriament a l'estroma, el qual ocupa el 90 % del gruix de la còrnia [180]. Les fibres de col·lagen de l'estroma es troben inserides en una matriu aquosa extrafibril·lar que conté molècules de col·lagen que no formen fibres, proteoglicans, glicoproteïnes, altres proteïnes solubles, sals inorgàniques i queratòcits, que són uns fibroblasts allargats i plans. L'estroma s'organitza en una estructura laminar on les capes (o lamel·les) estan disposades paral·lelament a la superfície del teixit. Les fibril·les dins d'una capa també estan disposades de manera paral·lela entre elles i a la superfície (Figura 16).

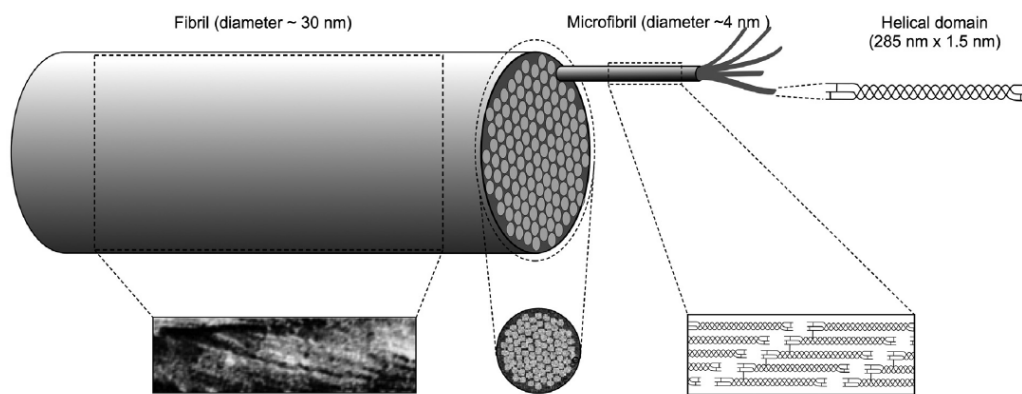


Figura 15. Representació de l'estructura del col·lagen de la còrnia. Tres cadenes d'aminoàcids en conformació hèlix- $\alpha$  formen la molècula de col·lagen triple-hèlix (*Helical domain*). Les molècules de col·lagen s'uneixen en cadenes de cinc per formar les microfibrilles (*Microfibril*), les quals es tornen a unir per formar les fibres de col·lagen (*Fibril*) [181].

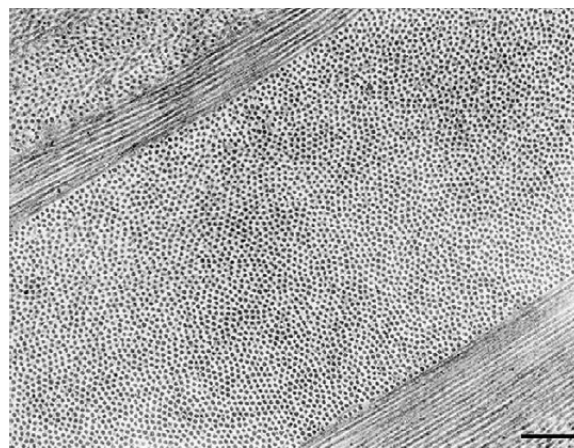


Figura 16. Micrografia de transmissió electrònica de l'estroma corneal on s'observen les fibril·les de col·lagen paral·leles i el petit diàmetre: hi ha quatre lamel·les, dues en secció longitudinal i dues en transversal (escala barra: 300 nm) [180].

Un sincrotró és un tipus d'accelerador de partícules subatòmiques les quals es mantenen en una òrbita tancada. En els sincrotrons coneguts com a anells d'emmagatzemament, es manté un feix de partícules d'un sol tipus circulant indefinidament a una energia fixa i s'utilitzen com a fonts de radiació d'alta energia i ampli espectre, anomenada radiació o llum de sincrotró. Aquesta llum és emesa per les partícules amb càrrega, altament accelerades, quan fan un gir en la seva trajectòria. Energèticament, correspon a la pèrdua d'energia que pateixen en fer un gir. Aquesta radiació s'utilitza per a estudiar materials, fent interaccionar els fotons de diferents longituds d'ona seleccionades amb la mostra i estudiant la interacció fotons-mostra amb diferents instruments, des de la radiació infraroja fins als raigs gamma. L'alta energia d'aquesta radiació permet estudis inabastables amb altres instruments que fan el mateix però amb feixos energètics de molta menys energia, com els espectrofotòmetres, els difractòmetres, els microscopis, etc, amb camps d'aplicació tan diversos com la física, la química, la biologia, la ciència de materials, la medicina, etc.

La difracció de rajos-X no només s'utilitza per a l'estudi de cristalls sinó que pot proporcionar informació molt valuosa sobre teixits fibrosos i fins i tot de dissolucions (difracció cristal·lina versus no cristal·lina). Molts sistemes biològics tenen una ordenació espacial i per tant es poden estudiar mitjançant difracció de rajos-X. Aquest tipus de difracció s'anomena difracció no cristal·lina. El col·lagen, per exemple, forma teixits molt ordenats els quals proporcionen bons patrons de difracció [182].

Quan un feix de rajos-X passa a través d'una estructura fibrosa ordenada com la còrnia, una part de la radiació és dispersada. Les interferències (constructives i destructives) de les ones dispersades produeixen el que s'anomena un patró de difracció de la fibra o un patró de dispersió de rajos-X. Aquest patró de dispersió dona informació sobre l'estructuració de la matèria que s'està observant. En general es parla indiferentment de difracció de rajos-X i dispersió de rajos-X.

Hi ha una gran diversitat de tècniques pensades per a l'estudi de la dispersió de raigs X. La tècnica SAXS (*small-angle X-ray scattering*) serveix per estudiar el col·lagen a nivell fibril·lar a través de les interferències de la radiació dispersada a la còrnia, mentre que WAXS (*wide-angle X-ray scattering*) és útil per a l'estudi de les molècules de col·lagen que

formen les fibril·les. La dispersió SAXS proporciona informació sobre les fibril·les (distància-espai interfibril·lar i diàmetre fibril·lar) i per tant sobre les lamel·les. La dispersió WAXS proporciona informació sobre l'orientació i distribució de les molècules de col·lagen (Figura 17). Meek i col·laboradors detallen com la dispersió de rajos-X de la còrnia s'utilitza per quantificar aquests paràmetres estructurals [180,183].

Aquestes tècniques de dispersió de rajos-X s'han utilitzat per investigar les alteracions en la ultraestructura de la còrnia en algunes malalties i trastorns. Una inflamació normalment s'associa a una pèrdua de la transparència de la còrnia, per això és interessant poder estudiar quines variacions es produeixen a nivell estructural. Hi ha articles dedicats a l'estudi del diàmetre i el gruix de l'espai interfibril·lar i la distància intermolecular en malalties que provoquen una inflamació de la còrnia com la distròfia de Fuch [184], la distròfia macular de la còrnia [185], la distròfia congènita de l'estroma corneal [186], la còrnia amb keratoconus [187,188], o l'augment del globus ocular [189], per interpretar les possibles alteracions del col·lagen. També s'han utilitzat per estudiar lesions en la còrnia [190,191].

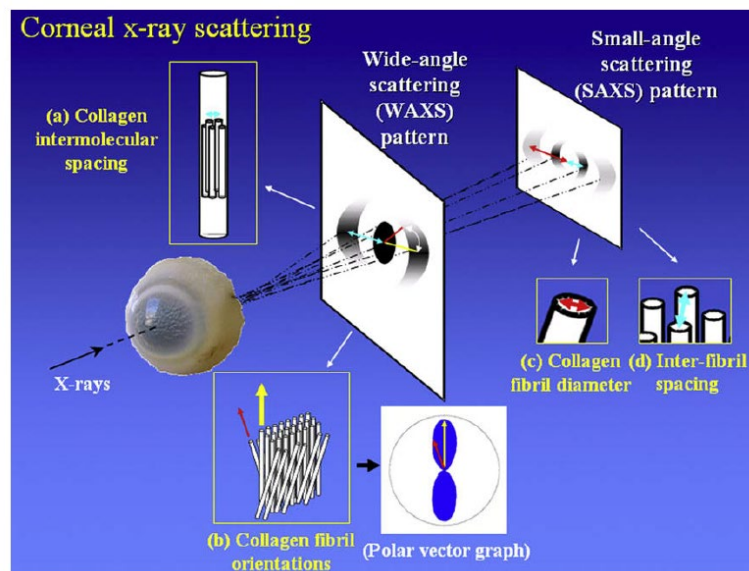


Figura 17. Informació estructural que s'obté amb WAXS i SAXS. (a) La posició radial de la reflexió WAXS es pot emprar per determinar la mitjana de l'espai intermolecular del col·lagen. (b) El perfil d'intensitat azimutal WAXS dona informació de l'orientació del col·lagen. Les reflexions radials del SAXS indiquen el diàmetre de les fibres de col·lagen (c) i de l'espai interfibril·lar (d) [189].

Beecher i col·laboradors [192] utilitzen aquestes tècniques per estudiar si hi ha variacions significatives en el diàmetre fibril·lar del col·lagen i la distància interfibril·lar quan hi ha deficiència d'una de les proteïnes involucrades en el manteniment de la transparència de la còrnia. I també es poden aplicar a l'estudi de l'eficàcia de tractaments o teràpies [193,194].

Hi ha estudis de la còrnia humana en què s'observa l'estructura fibril·lar, tant l'espai interfibril·lar com el diàmetre, en funció de la posició [195,196]. Es demostra que la disposició de les fibril·les no és uniforme en tota la superfície de la còrnia i que és més compacta a la zona prepupil·lar en comparació amb la zona perifèrica i el limbe, mostrant un menor espai interfibril·lar però el diàmetre fibril·lar és constant. Altres estudis en còrnia indiquen que la distància interfibril·lar augmenta lleugerament de la cara anterior a la posterior, mentre que el diàmetre es manté més uniforme [190]. Tota aquesta informació que s'ha anat obtenint mitjançant la difracció de rajos-X és útil per poder comparar i avaluar els efectes dels nous tractaments oculars basats en nanotransportadors en estudis preclínic amb animals.

#### **1.8.6. TRANSMITÀNCIA I HISTOLOGIA DE LA CÒRNIA**

Tal com s'ha dit anteriorment, la còrnia és l'estructura de l'ull que permet el pas de la llum cap a la retina, i per a què funcioni correctament és necessari que tingui una curvatura adequada i que sigui transparent. L'explicació més acceptada de la transparència de la còrnia és que les fibres de col·lagen formen una xarxa regular i la llum dispersada es minimitza a causa d'interferències.

Es pot produir una pèrdua o reducció de la transparència de la còrnia (opacitat corneal) a causa de diferents malalties oculars, a causa de l'aparició de cicatrius quan es cura una ferida o per la presència de zones boiroses després d'un procés de queratectomia fotorefractiva (làser per miopia, hipermetropia, etc).

Tot i que transparència no és el mateix que transmitància [197], aquesta quantifica com a transmitància [181] ja que la còrnia ha de deixar passar la llum incident (Figura 18).

A la Figura 18 s'observa que es transmeten millor les longituds d'ona corresponents als rojos i una mica menys les dels blaus. L'absència total de transmissió per sota dels 300 nm és deguda a que els constituents químics (proteïnes, àcids nucleics) absorbeixen aquesta radiació. La disminució ràpida a partir dels 400 nm s'atribueix a l'increment de la dispersió de la llum a longituds d'ona curtes.

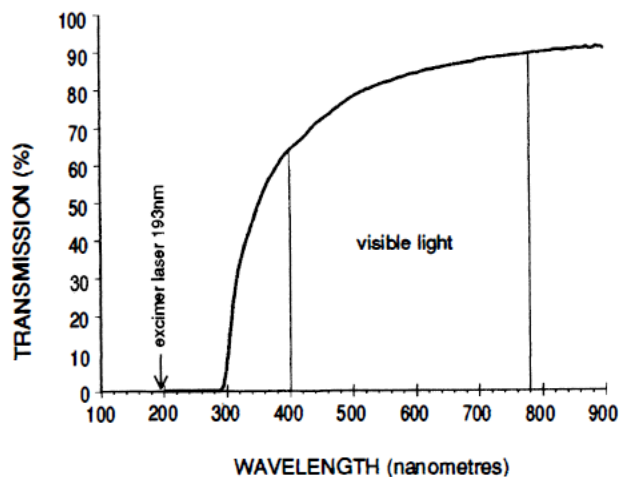


Figura 18. Espectre de transmissió de la radiació a través de la còrnia d'un adult de 61 anys, mesurat per espectrofotometria [198].

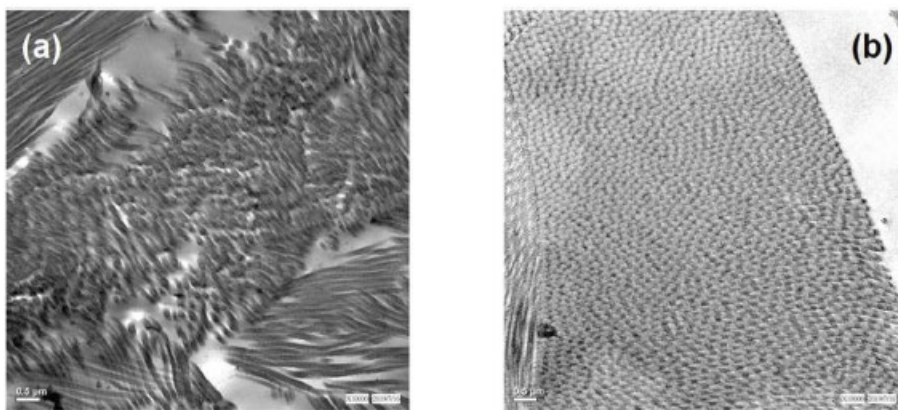


Figura 19. Imatges de seccions transversals d'escleròtica i còrnia adquirides amb un microscopi electrònic de transmissió JEOL JEM-1400. Tant el teixit de l'escleròtica (a) com el de la còrnia (b) consisteixen en fibril·les llargues i paral·leles de col·lagen agrupades en una estructura de capes. Les fibril·les de col·lagen a l'escleròtica són polidisperses i desordenades, mentre que les fibril·les corneals tenen un diàmetre uniforme i són paral·leles a les lamel·les. Barra d'escala = 500 nm [197].



Tseng i col·laboradors (Figura 19) demostren que la transparència de la còrnia i l'opacitat de l'escleròtica provenen de la nanoestructura de les fibril·les de col·lagen: a la còrnia la radiació es propaga com al buit però l'escleròtica dispersa la radiació en totes les direccions, evitant la transmissió de la llum [197].

La morfologia de la còrnia també es pot observar amb microscopi òptic per detectar modificacions en l'estructura [199].



## **2. OBJECTIUS**



## 2. OBJECTIUS

El principal objectiu d'aquesta recerca és el desenvolupament, la caracterització fisicoquímica, l'estudi de l'eficàcia i de la seguretat, i l'estabilització a llarg termini de formulacions de pioglitazona (PGZ) englobada en nanopartícules de PLGA recobertes amb PEG per tal de ser aplicades, localment, per al tractament de la inflamació ocular.

Per tal d'aconseguir els objectius proposats, aquest treball s'ha dividit en diferents etapes, les quals condueixen als següents objectius específics:

- Desenvolupar i validar un mètode de cromatografia de líquids amb detecció per espectrometria de masses per determinar PGZ en teixits oculars, i analitzar la presència de PGZ en els teixits d'animals tractats amb el fàrmac desenvolupat.
- Desenvolupar i optimitzar els sistemes nanoestructurats de la PGZ amb el polímer PLGA-PEG destinats a l'aplicació ocular utilitzant un disseny experimental de tres factors (pH, concentració de polímer i concentració d'estabilitzant) a dos nivells.
- Aplicar la tècnica d'assecatge de l'aerosol per estabilitzar i preservar les nanopartícules de PGZ a llarg termini.
- Caracteritzar fisicoquímicament les nanopartícules abans i després del procés d'estabilització per l'assecatge de l'aerosol.
- Fer estudis de comportament biofarmacèutic *in vitro*, analitzant l'alliberació del fàrmac des de la formulació.
- Estudiar la penetració del fàrmac a través de les membranes biològiques *ex vivo* (còrnia i escleròtica).
- Estudiar la tolerància de les formulacions *in vitro* i *in vivo* i la citotoxicitat *in vitro* amb línies cel·lulars Y-79 de retinoblastoma humà.
- Avaluat *in vivo* l'eficàcia de les formulacions desenvolupades en models animals per a la inflamació ocular.
- Comprovar la integritat corneal mitjançant la tècnica de difracció de rajos-X amb radiació de sincrotró, l'anàlisi histològica i la determinació de la transparència de la còrnia després de l'aplicació de les nanopartícules de PGZ.



### **3. RESULTATS**





### 3. RESULTATS

Els resultats obtinguts en la investigació realitzada han servit per a publicar els articles científics que es detallen a continuació:

#### **Article 1:**

Esther Miralles-Cardiel, Marcelle Silva-Abreu, Ana Cristina Calpena and Isidre Casals.

*Development and Validation of an HPLC–MS/MS Method for Pioglitazone from Nanocarriers Quantitation in Ex Vivo and In Vivo Ocular Tissues.*

Pharmaceutics, **2021**, 13, 650.

Doi: 10.3390/pharmaceutics13050650

En aquest treball es va desenvolupar i es va validar un mètode de cromatografia de líquids amb detecció per espectrometria de masses per determinar PGZ en teixits oculars (còrnia, escleròtica, cristal·lí, humor aquós i humor vitri), i es van analitzar els teixits d'animals als quals se'ls havia instil·lat la formulació. Aquest mètode és necessari per comprovar que, després del tractament ocular amb nanopartícules polimèriques de PGZ, aquest fàrmac es detecta als teixits, demostrant que penetra des de la còrnia i que roman als teixits durant un període prou llarg per possibilitar l'efecte terapèutic.

#### **Article 2:**

Marcelle Silva-Abreu, Esther Miralles, Christina S. Kamma-Lorger, Marta Espina, Maria Luisa García and Ana Cristina Calpena.

*Stabilization by Nano Spray Dryer of pioglitazone polymeric nanosystems: development, in vivo, ex vivo and synchrotron analysis.*

Pharmaceutics, **2021**, 13, 1751.

Doi: 10.3390/pharmaceutics13111751

En aquest treball es va optimitzar la formulació de PGZ encapsulada en nanopartícules del polímer PLGA-PEG i es va sotmetre al procés d'assecatge per la tècnica de l'assecatge de l'aerosol (*spray drying*) per a l'estabilització a llarg termini i facilitar-ne l'emmagatzemament. Es van caracteritzar les formulacions per comprovar que eren adequades per al tractament ocular i que la PGZ s'encapsulava en la matriu polimèrica. Es va avaluar el comportament farmacològic de les formulacions *in vitro* i *ex vivo* mitjançant estudis d'alliberació i penetració del fàrmac. A més a més es va analitzar la PGZ en teixits oculars tractats per verificar la biodisponibilitat i es va avaluar la possible afectació corneal amb difracció de rajos X de radiació de sincrotró, després de la instil·lació de la fórmula durant un període de 10 dies.

### **Article 3:**

Esther Miralles, Christina S. Kamma-Lorger, Òscar Domènech, Lilian Sosa, Isidre Casals, Ana Cristina Calpena and Marcelle Silva-Abreu.

*Assessment of Efficacy and Safety Using PPAR-Agonist-Loaded Nanocarriers for Inflammatory Eye Diseases*. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23,11184.

Doi: 10.3390/ijms231911184

Es va continuar el treball iniciat a l'article anterior amb l'estudi de la seguretat de la formulació desenvolupada, *in vitro* i en models animals, així com la determinació de l'eficàcia per al tractament de la inflamació ocular. La toxicitat cel·lular es va determinar mitjançant un estudi *in vitro* de la viabilitat de cèl·lules de retinoblastoma humà Y-79. Per acabar es van investigar la transparència i la histologia de la còrnia *ex vivo*, i l'afectació i modificació de la ultraestructura de la còrnia mitjançant la difracció de rajos X amb radiació de sincrotró, en un estudi en porcs on s'havia induït la inflamació ocular.

### 3.1. Article 1

## Development and Validation of an HPLC–MS/MS Method for Pioglitazone from Nanocarriers Quantitation in Ex Vivo and In Vivo Ocular Tissues.

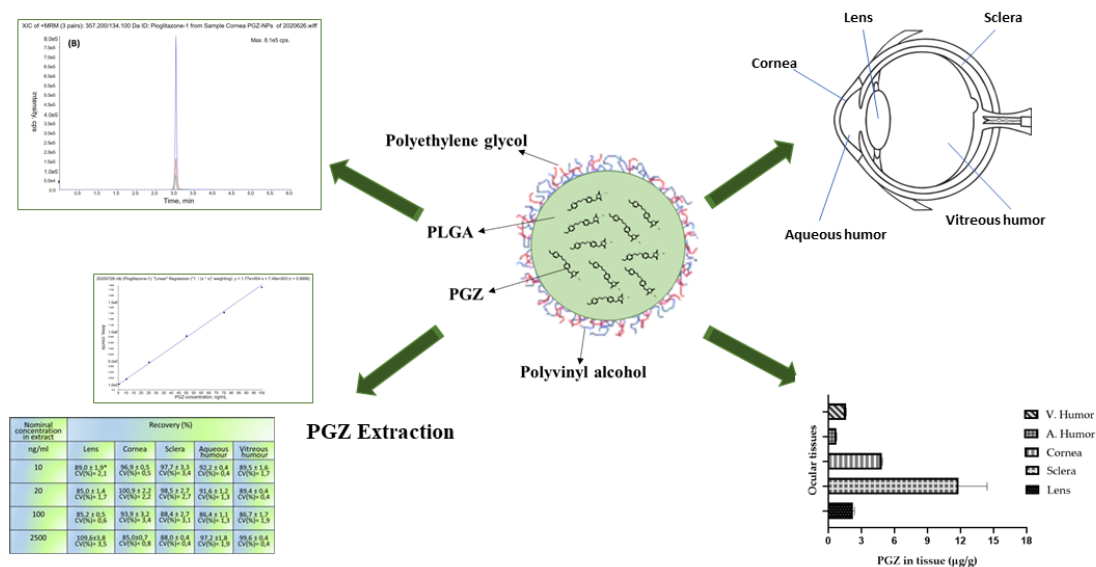
Esther Miralles-Cardiel, Marcelle Silva-Abreu, Ana Cristina Calpena i Isidre Casals.

Pharmaceutics 2021, 13, 650.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050650>

Quartil Q1; factor d'impacte 6.29 l'any 2021.

### Resum gràfic







Article

# Development and Validation of an HPLC–MS/MS Method for Pioglitazone from Nanocarriers Quantitation in Ex Vivo and In Vivo Ocular Tissues <sup>†</sup>

Esther Miralles-Cardiel <sup>1,2,\*</sup>, Marcelle Silva-Abreu <sup>3,4,\*</sup> , Ana Cristina Calpena <sup>3,4</sup> and Isidre Casals <sup>1</sup>

<sup>1</sup> CCI/TUB (Scientific and Technological Centers Universitat de Barcelona), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; isidre.casals@ub.edu

<sup>2</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; anacalpena@ub.edu

<sup>4</sup> Institute of Nanoscience and nanotechnology (IN2UB), Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

\* Correspondence: emiralles@ub.edu (E.M.-C.); silvadeabreu@ub.edu (M.S.-A.); Tel.: +34-93-403-4652 (E.M.-C.); +34-93-402-4578 (M.S.-A.)

<sup>†</sup> This paper is an extended version of paper published in the 1st International Electronic Conference on Pharmaceutics (IECP 2020); Miralles-Cardiel, E.; Silva-Abreu, M.; Calpena, A.C.; Casals, I. Nanoparticles as carrier for improve therapeutic efficacy of pioglitazone in ocular inflammatory disorders: development and validation of a high throughput LC–MS/MS method for quantitation in ocular tissues. (doi:10.3390/IECP2020-08685).



**Citation:** Miralles-Cardiel, E.; Silva-Abreu, M.; Calpena, A.C.; Casals, I. Development and Validation of an HPLC–MS/MS Method for Pioglitazone from Nanocarriers Quantitation in Ex Vivo and In Vivo Ocular Tissues. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 650. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050650>

Academic Editors: Andrea Erxleben and Elisabetta Gavini

Received: 1 April 2021

Accepted: 29 April 2021

Published: 3 May 2021

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



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Pioglitazone (PGZ) is an oral anti-hyperglycemic agent, belongs to the class of thiazolidinediones, and is used for the treatment of diabetes mellitus type 2. In recent years, its anti-inflammatory activity has also been demonstrated in the literature for different diseases, including ocular inflammatory processes. Additionally, this drug belongs to Class II of the Biopharmaceutical Classification System, i.e., slightly soluble and highly permeable. The main objective of this study was to validate a new analytical HPLC–MS/MS method to quantify free-PGZ and PGZ from polymeric NPs to conduct nanoparticle application studies loaded with this active ingredient to transport it within ocular tissues. An accurate, sensitive, selective, reproducible and high throughput HPLC–MS/MS method was validated to quantify PGZ in cornea, sclera, lens, aqueous humor, and vitreous humor. The chromatographic separation was achieved in 10 min on a Kinetex C18 column. Linear response of PGZ was observed over the range of 5–100 ng/mL. The recovery of free-PGZ or PGZ from NPs was in the range of 85–110% in all tissues and levels tested. The intra-day and inter-day precision were <5% and <10%, respectively. The extracts were shown to be stable in various experimental conditions in all matrices studied. The range of concentrations covered by this validation is 80–1600 µg/kg of PGZ in ocular tissues. It is concluded that this method can be applied to quantify PGZ in vivo and ex vivo biodistribution studies related to the ocular administration of free-PGZ and PGZ from nanoparticles.

**Keywords:** pioglitazone (PGZ); polylactic-*co*-glycolic acid-polyethylene glycol (PLGA-PEG); nanoparticles (NPs); ocular tissues; validation; HPLC–MS/MS

## 1. Introduction

Pioglitazone (PGZ) is a hypoglycemic therapeutic drug used in the treatment of type 2 diabetes which increases cell sensitivity to insulin via selective stimulation of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activator receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) [1,2]. Studies have shown that the agonist PPAR $\gamma$  receptor is also involved in inflammatory processes [3,4], and PGZ has been found to be effective as an anti-inflammatory drug in animal models of paw edema [5] or acute myocardial infarction [6]. Moreover, PGZ reduced the inflammation

in atherosclerosis [7,8], in skin inflammation processes [9,10], and ocular diseases such as uveitis [11] or corneal inflammation [12,13].

Other reported properties of PGZ found in the literature range from lung anti-inflammatory and anti-fibrotic [14], corneal anti-fibrotic [15], corneal neovascularization [16] to dry eye disease treatment [17]. In recent years, research has also been conducted with PGZ for the treatment of Alzheimer's disease [18–20].

As a result of the chemical structure, PGZ is slightly soluble in water and highly permeable in membranes [21]. Due to these characteristics, it is very important to find new vehicles that overcome the solubility problems that restrict its bioavailability when the way of administration for the treatment is not in the form of oral tablets [22–25].

Nowadays, drug delivery systems that target different organs and tissues are a new challenge. Polylactic-co-glycolic acid (PLGA) is one of the most studied synthetic polymers due to its biocompatibility and biodegradability [26], and it has also been approved by the US Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicine Agency (EMA) for drug delivery systems in humans [27]. This polymer allows the development of very small particles with narrow polydispersity. Consequently, it has been used to design nanoparticles (NPs) for biomedical applications as carriers of active ingredients in vaccination, cancer therapies, skin diseases, ocular and neurological disorders [28–35]. However, PLGA is a relatively hydrophobic polymer, and once it is in the blood, it is recognized and phagocytosed by macrophages. To avoid this, a modification of its surface using polyethylene glycol (PEG) could be an alternative. PEG is a biocompatible, hydrophilic, nonionic, and approved polymer by the FDA for its use in humans. PEGylation is one of the most used techniques to modify the surface properties of the nanoparticles. In this case, PEGylated NPs take higher polarity and hydrophilicity avoiding aggregation, opsonization and phagocytosis, prolonging systemic circulation time, and facilitating its tissue penetration via interstitial [36].

In ocular therapies, one of the challenges is the effective penetration of the drugs through the eye's tissue barriers (e.g., corneal, sclera and conjunctiva) to reach targets and to sustain them. Normally, when ophthalmic formulations are used, less than 5% of the drug administered is retained on the ocular surface because of the corneal epithelium barrier and nasolacrimal duct drainage, which means that it is necessary to instill frequently. One of the most successful approaches to overcome this inconvenience is the use of colloidal suspensions of NPs as delivery systems [37,38]. These systems have been described in the literature, showing the effectiveness for ocular delivery principally in form of liposomes [39,40] and polymeric NPs [41–43].

In recent years, some studies of our research group have been focused on NPs of PLGA for the treatment of inflammatory disorders, with different therapeutic targets, including the main nanosystems for ocular diseases [33,44–46]. The new formulations improved the biopharmaceutical profile of the drugs. In particular, PGZ-NPs of PLGA-PEG were formulated for eye treatment and also for delivery to the brain [12,47]. These nanosystems were optimized, characterized, and their anti-inflammatory activity, as well as their tolerance, were demonstrated for *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* animal models.

The presented study aimed to develop and to validate an HPLC-MS/MS method following the guidelines of the European Medicines Agency (2019) and the U.S. Food and Drug Administration (2018) for bioanalytical methods validation [48,49] to focus the analysis on the application of free PGZ (solution) and PGZ from NPs in different ocular tissues for future research in the treatment of ocular diseases.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals and Reagents

PGZ was purchased from Capot Chemical (Hangzhou, China) and diblock copolymer PLGA-PEG 5% (50:50) Resomer<sup>®</sup> was obtained from Evonik Corporation (Birmingham, AL, USA). Poly(vinyl alcohol) (PVA) Mw 30,000–70,000 87–90% hydrolyzed, dimethylsulfoxide (DMSO) and formic acid were acquired from Sigma-Aldrich-Merck (Darmstadt, Germany).

Acetone, acetonitrile and methanol high-performance liquid chromatography (HPLC) gradient-grade were purchased from ITW Reagents (Barcelona, Spain). All reagents used were analytical reagents. Ultrapure water (HPLC grade, >18 M $\Omega$ -cm at 25 °C) was obtained using a Milli-Q apparatus from Millipore (Milford, CT, USA).

## 2.2. Chromatographic Conditions

The analysis was carried out using an Agilent 1260 liquid chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A reversed-phase Kinetex C18 column (2.6  $\mu$ m particle size, 50  $\times$  2.1 mm) from Phenomenex (Torrance, CA, USA) was used to perform the chromatographic separation. The gradient between formic acid 0.1% in water (A) and formic acid 0.1% in acetonitrile (B) was the following (t(min), %B): (0, 10), (4, 74), (4.5, 90), (6, 90), (6.1, 10), (10, 10). The column temperature was maintained at 35 °C. The optimization of mobile phase and column selection was based on suitability for the mass detector, effect on the sensitivity of the method and total time required for the analysis. The flow rate was fixed at 0.6 mL/min and the injection volume at 1  $\mu$ L.

The detection of PGZ was achieved using a triple quadrupole mass spectrometer 4000 QTRAP (Sciex, Framingham, MA, USA) equipped with a TurboV ion source operating in positive ion mode with the following settings: capillary voltage +5500 V, nebulizer gas (N<sub>2</sub>) 50 (arbitrary units), curtain gas (N<sub>2</sub>) 25 (arbitrary units), collision gas (N<sub>2</sub>) medium (arbitrary scale), drying gas (N<sub>2</sub>) 30 (arbitrary units) heated to 550 °C, declustering potential (DP) 100 V, entrance potential (EP) 10 V, collision energy (CE) 35 V and collision cell exit potential (CXP) 12 V.

The use of a triple quadrupole mass spectrometer allowed us to work in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The *m/z* transition pairs used for quantitation of PGZ (precursor ion/product ion) were 357.2/134.1 (most sensitive), and 357.2/119.1 for confirmation. The quadrupoles were set at unit resolution. The analytical data were processed with the Analyst software version 1.6.2 (Sciex, Framingham, MA, USA).

## 2.3. Pioglitazone Standards

A stock solution of 1 mg/mL of PGZ was prepared in methanol for subsequent intermediate, spiking, and working standard solutions. The calibration curve was prepared at concentrations of 5, 10, 25, 50, 75 and 100 ng/mL in methanol. Glass vials were used to store the solutions throughout the work.

## 2.4. Biological Material

Ocular specimens were obtained under veterinary supervision from pigs used in surgical University practices at the Faculty of Medicine, according to the Ethics Committee of Animals Experimentation at the University of Barcelona. Pigs (male, weight 30–40 kg) were anesthetized with intramuscular administration of ketamine hydrochloride (3 mg/kg), xylazine (2.5 mg/kg) and midazolam (0.17 mg/kg). Once sedated, the Propofol (3 mg/kg) was administered by the auricular vein, and immediately afterward they were intubated and maintained under anesthesia inhaled with isoflurane. After surgical experimentation, the animals were euthanized (250 mg/kg of sodium pentobarbital was administered through the auricular ear vein under deep anesthesia) and the eyes were immediately extracted and transported to the laboratory in dry ice. Cornea, sclera, lens, aqueous humor and vitreous humor were excised in the laboratory and kept frozen at –20 °C in Eppendorf tubes. The separation between the retina and choroid was dismissed because both expertise and a microscope were needed.

## 2.5. Preparation of Pioglitazone Nanoparticles

PGZ-NPs were obtained by the solvent displacement method described by Fessi et al. [50]. This technique consists of dissolving the polymer and the compound in an organic solvent, being a successful method to deliver the lipophilic drug. This technique is based on two phases: the organic and the aqueous phase. Ten mg of PGZ were solubilized in 0.5 mL

of DMSO and 75 mg of PLGA-PEG were dissolved with 5 mL of acetone. Both organic solutions were mixed followed by sonication in an ultrasonic bath (100 w) for two minutes. This organic phase was added drop by drop, gently mixing, into 10 mL of an aqueous solution of PVA 1.5%. The NPs dispersion was concentrated to 10 mL under reduced pressure (Vacuubrand PC 2001 Vario, Wertheim, Germany). The PGZ-NPs suspensions were stable in the fridge for 6 weeks. Parameters such as size, polydispersity index (PDI) and Zeta Potential (ZP) were evaluated to confirm the stability with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Additionally, the encapsulation efficiency (EE) was determined by the indirect method [47].

#### 2.6. Pioglitazone Solutions for Biological Matrix Spiking

The suspension of PGZ-NPs containing about 1 mg/mL of PGZ (2.5) was diluted in water for spiking into ocular tissues (cornea, sclera, aqueous humor, vitreous humor, lens). The exact amount of PGZ in the suspension NPs was quantified in order to calculate the accuracy and precision of the method when PGZ-NPs were spiked into the tissues. The chromatographic conditions for PGZ quantitation in the NPs were adapted from previous studies: liquid chromatography with reverse phase column C18, eluent acetonitrile-ammonium acetate buffer with ultraviolet detection at 268 nm [9]. Free-PGZ solution (1 mg/mL) was diluted in methanol to prepare spiked samples (2.3).

#### 2.7. Extraction Procedure

Lens, aqueous and vitreous humor were vortex-mixed previously. Sclera and cornea were minced and thoroughly perforated using a needle to help the penetration of the extraction solution. For cornea, sclera, and lens, the taken weight was about 125 mg; for aqueous and vitreous humor, the weight was about 250 mg. The samples were weighed into amber glass vials and were extracted with 2 mL of methanol using an ultrasonic bath for 30 min. The solution was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at room temperature. The resultant supernatants were filtered through nylon filters of 0.22  $\mu\text{m}$  and injected into the HPLC-MS/MS system. The stability of the extracts showed that the supernatants could be collected and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use (three months tested).

#### 2.8. Method Validation

The method was validated according to the bioanalytical method validation guidelines of the EMA and the FDA and considering the acceptance criteria recommended for the following validation parameters: selectivity–specificity, matrix effect, calibration curve (response function), limits of quantification and detection, accuracy, precision, recovery, carry-over, dilution integrity and stability [48,49].

##### 2.8.1. Selectivity and Specificity. Matrix Effect

Blank tissues were analyzed to determine the selectivity and specificity of the method. Any interference from unwanted tissue components at the elution time of PGZ was evaluated.

The matrix effect is defined as an alteration of the analyte response due to interfering components in the sample. The effect of tissue components on the ionization of PGZ was determined by comparison of the response of three replicates of a free-PGZ working solution prepared in methanol and free-PGZ working solutions prepared in the blank extract for each tissue. The PGZ concentration was calculated with the calibration curve. Along with the validation procedure, the matrix effect was also evaluated for accuracy and precision data.

##### 2.8.2. Recovery

Weighed tissues were spiked with free-PGZ and PGZ-NPs at three levels of concentration to achieve the final concentrations in the extract of about 10 (low), 20 (medium) and 100 (high) ng/mL,  $n = 3$  each level. As free-PGZ was spiked from small volumes (10–20  $\mu\text{L}$ ) of standard solutions prepared in methanol, to reduce pipetting errors the aliquot added



was weighed with a minimum precision of 0.1 mg. Samples spiked with the free-PGZ standard solution were extracted after 60 min waiting time at room temperature and those spiked with PGZ-NPs were extracted after 3 h waiting time at room temperature to let them interact with the tissue and better simulate incurred residues. The extracts were kept at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until HPLC-MS/MS analysis.

#### 2.8.3. Dilution Integrity

The sample dilution effect was also evaluated to ensure that PGZ concentrations beyond the upper limit of concentration of the calibration range could be correctly determined after dilution of the extract with methanol. Three replicates of spiked tissues were used to investigate the intra-day precision and accuracy of a 50-fold sample dilution. The ocular tissues were spiked to achieve the final concentration of PGZ in the injected extract of about 50 ng/mL. Both addition of free-PGZ and PGZ-NPs were assayed. This concentration corresponded to about 2000  $\mu\text{g}$  PGZ/kg for aqueous and vitreous humor, and 4000  $\mu\text{g}$  PGZ/kg for lens, sclera and cornea.

#### 2.8.4. Calibration Curve

The calibration curve was prepared using six calibration standards defined in Section 2.3. The chromatographic area of PGZ against the concentration of the calibration standards was plotted to construct the calibration curve. The linearity of the method was evaluated by weighted linear regression analysis, with  $1/x^2$  as the weighting factor, using the least-squares method [51]. The acceptance criteria for the back-calculated standard concentration were  $\pm 15\%$  deviation from the theoretical value. The calibration curve (six standards) was prepared using fresh standards in each assessment.

#### 2.8.5. Accuracy and Precision

The spiked levels of PGZ concentration corresponded to approximately 160, 320 and 1600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for lens, cornea and sclera. For aqueous humor and vitreous humor, the spiked levels of PGZ concentration corresponded to approximately 80, 160 and 800  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The closeness of mean results determined by the method to the spiked concentration of the analyte and the repeatability was evaluated in terms of recovery. Three sets of three different levels of tissues spiked with free-PGZ were prepared and quantified on three separate days to determine the inter-day and intra-day precision and the accuracy of the method. Samples spiked with PGZ-NPs were prepared and quantified for accuracy and intra-day precision ( $n = 3$ ) at the three levels of concentration.

The acceptance criteria for accuracy of the data should be within  $\pm 15\%$  (recovery 85–115%). For the limit of quantitation (LOQ) the accuracy acceptable limit of deviation is  $\pm 20\%$  (recovery 80–120%). The precision around the theoretical value should not cross 15% of the coefficient of variation (CV) and 20% at LOQ [48,49].

#### 2.8.6. Limits of Quantification (LOQ) and Detection (LOD)

The LOQ is defined as the lowest concentration that can be measured with an intra-day and inter-day precision (expressed as the percentage of the coefficient of variation, CV) that must not exceed 20%, and accuracy (expressed as the percentage of the deviation from nominal concentration, bias) that must be within  $\pm 20\%$ . The LOQ was evaluated in three replicates on a single day and three different days for all studied matrices.

The limit of detection (LOD) consists of the lowest concentration whose respective signal can be dependably distinguished from the background level. The LOD was assessed by analyzing successive dilutions of blank extract of tissues with added known amounts of PGZ. See Section 3.2.9 for more details.

#### 2.8.7. Stability Experiments

The obtained extracts from the recovery and precision study were kept at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  till the day of the HPLC-MS/MS analysis because of the availability of the equipment.

The long-term stability evaluation was deduced from the obtained results of accuracy and precision studies (three different days). One of the sets was injected three months after the extraction, the other two sets after 9 and 15 days, respectively.

Extracts of each tissue spiked at approximately the medium level of concentration were injected to determine the stability of pioglitazone in various predetermined conditions. The post-preparative stability of the samples was determined after comparison of the response of immediate injection of the extracted samples to that of the re-injected samples after keeping them in the refrigerated autosampler for 24 h. The post-preparative stability of the drug was assessed, taking into account the time that the samples could remain in queue in the chromatograph and, eventually, any failure of the chromatograph in a 24 h period. Short-term stability was determined after placing the extracts for eight hours on the bench top at room temperature. The period for the short-term stability study was determined based on the possible time spent for a batch sample analysis. The relative stability was calculated by considering the initial area of PGZ as 100%.

### 2.9. Bioavailability Experiment: *In Vivo*

To investigate the ocular bioavailability and disposition of PGZ, pig eyes were treated with topical administration of 0.05 mL of PGZ-NPs suspension of a concentration of about 1 mg/mL of PGZ. After four hours the pig was euthanized. Cornea, lens, sclera, aqueous and vitreous humors were processed according to the validated method.

## 3. Results

### 3.1. Nanoparticle Preparation

The PGZ-NPs were synthesized by displacement technique, showing a particle size around  $200 \pm 2.5$  nm, PDI of  $0.2 \pm 0.03$  and a ZP of  $-15.0 \pm 1.3$  mV. Moreover, the percentage of EE was around  $92.1 \pm 3.2\%$ . These NPs were shown to be stable in the fridge for six weeks.

### 3.2. Method Validation

#### 3.2.1. Selectivity and Specificity

The analysis of blank samples (matrix samples processed without the addition of PGZ) showed no interfering signals in chromatograms of the blank extracts. The retention time for PGZ was about 3 min and there were no interfering matrix components when determining PGZ in any of the tissues of the assay. Typical MRM chromatograms of PGZ found in cornea and PGZ standard (5 ng/mL) are shown in Figures 1 and 2, respectively.

#### 3.2.2. Matrix Effect

Despite HPLC-MS/MS standing out for its high selectivity and specificity, the composition of the matrix is very important and must be taken into account. The matrix composition could be responsible for increasing or decreasing the signal of the ions being studied.

It was assessed that the matrix components of the tissues did not change the PGZ response concerning the analyte in a matrix of methanol as the variation found was less than  $\pm 5\%$  (Table 1). Values shown in Table 1 are the average of three replicates. For all matrices, the results are in accordance with the acceptance criteria: CV not exceeding 15% for precision and bias within  $\pm 15\%$  for accuracy. The external calibration method could, therefore, be used.

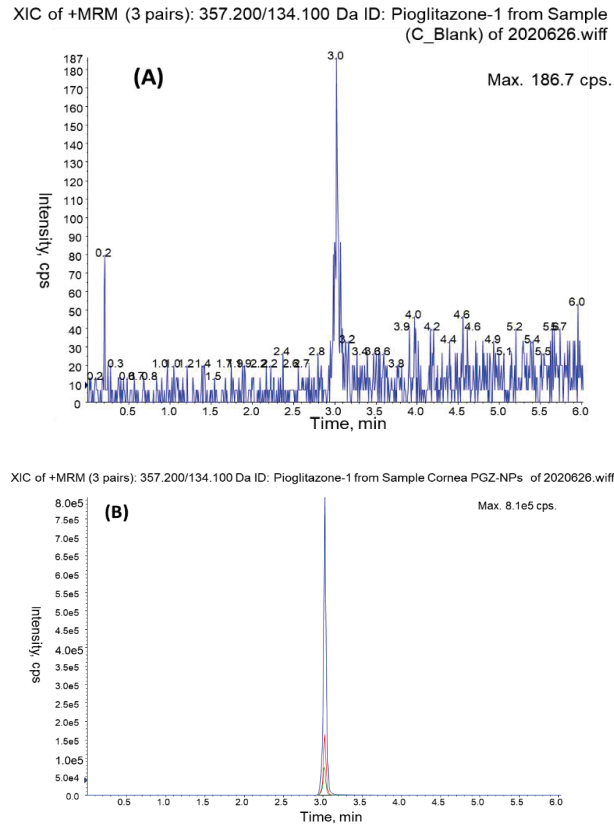


Figure 1. MRM chromatograms of cornea blank extract (A) and a cornea spiked with PGZ-NPs at three levels of concentration: blue (high level), red (medium level), green (LOQ) (B).

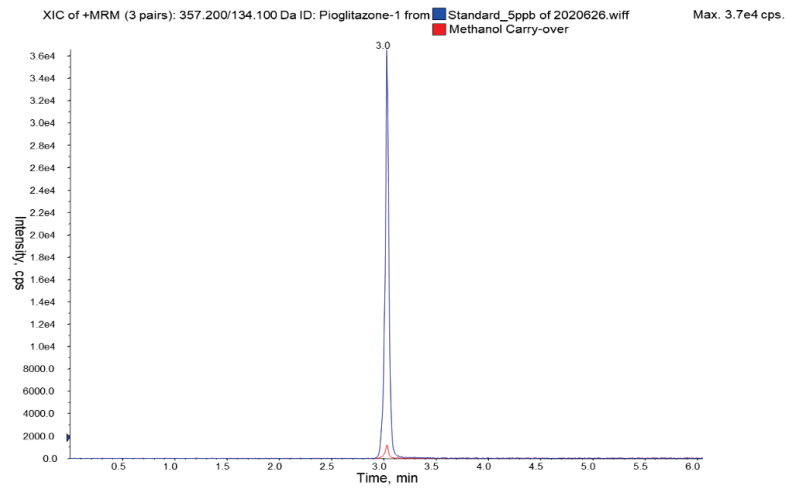


Figure 2. MRM chromatograms of methanol carry over (red) and PGZ standard of 5 ng/mL (blue).

**Table 1.** Matrix effect in the response of PGZ ( $n = 3$ ).

PGZ Matrix Condition	Mean Found (ng/mL)	SD	CV (%)	Variation (%)
Methanol	51.8	0.56	1.07	-
Sclera extract	54.6	1.65	3.02	+5.34
Cornea extract	53.5	1.47	2.75	+3.12
Lens extract	52.2	0.55	1.06	+0.69
Aqueous humor extract	52.5	0.20	0.38	+1.34
Vitreous humor extract	49.0	1.10	2.24	-5.27

### 3.2.3. Recovery

The concentration of the spiked sample extracts was calculated from the PGZ calibration curve (Tables 2–4). Average extraction recoveries for PGZ,  $n = 3$ , were in the range 85–110% (bias -15% to +10%). For all matrices, the results are in accordance with the acceptance criteria: CV not exceeding 15% for precision and bias within  $\pm 15\%$  for accuracy. The method applies to Free-PGZ and PGZ from NPs. Recovery was obtained as  $R (\%) = ([PGZ] \text{ found} / [PGZ] \text{ added}) \times 100$ .

### 3.2.4. Calibration Curve

The calibration curve was linear in the PGZ concentration range of 5–100 ng/mL with a correlation coefficient  $R^2 > 0.99$ . The calibration curve was freshly prepared for each chromatographic run. The accuracy found of back-calculated concentration during the different days of analysis was within 91–108% (accepted  $\pm 15\%$  in terms of bias) [48,49]. Figure 3 shows a calibration curve obtained during validation experiments.

**Table 2.** Absolute recovery (values in mean percentages) of Free-PGZ determined at low, medium and high concentration, and 50-fold diluted sample. Intra-day results ( $n = 3$ ).

Level of Concentration in Extract ng/mL	Recovery (%)				
	Lens	Cornea	Sclera	Aqueous Humor	Vitreous Humor
10	89.0 $\pm$ 1.9 * CV (%) = 2.1	96.9 $\pm$ 0.5 CV (%) = 0.5	97.7 $\pm$ 3.3 CV (%) = 3.4	92.2 $\pm$ 0.4 CV (%) = 0.4	89.5 $\pm$ 1.6 CV (%) = 1.7
20	85.0 $\pm$ 1.4 CV (%) = 1.7	100.9 $\pm$ 2.2 CV (%) = 2.2	98.5 $\pm$ 2.7 CV (%) = 2.7	91.6 $\pm$ 1.2 CV (%) = 1.3	89.4 $\pm$ 0.4 CV (%) = 0.4
100	85.2 $\pm$ 0.5 CV (%) = 0.6	93.9 $\pm$ 3.2 CV (%) = 3.4	88.4 $\pm$ 2.7 CV (%) = 3.1	86.4 $\pm$ 1.1 CV (%) = 1.3	86.7 $\pm$ 1.7 CV (%) = 1.9
2500	109.6 $\pm$ 3.8 CV (%) = 3.5	85.0 $\pm$ 0.7 CV (%) = 0.8	88.0 $\pm$ 0.4 CV (%) = 0.4	97.2 $\pm$ 1.8 CV (%) = 1.9	99.6 $\pm$ 0.4 CV (%) = 0.4

\* Mean  $\pm$  SD.

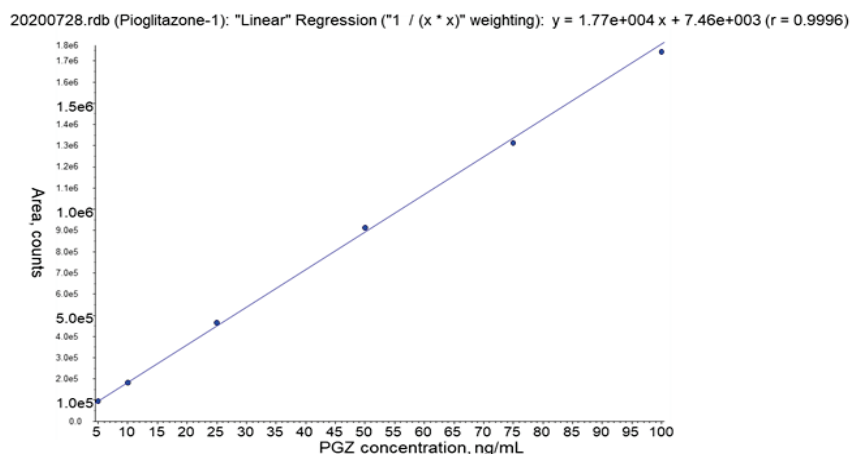
**Table 3.** Absolute recovery (values in mean percentages) of Free-PGZ determined at low, medium and high concentration. Inter-day accuracy and precision data ( $n = 9$ ).

Level Concentration in Extract ng/mL	Recovery (%)				
	Lens	Cornea	Sclera	Aqueous Humor	Vitreous Humor
10	93.1 $\pm$ 4.9 * CV (%) = 5.2	97.8 $\pm$ 1.5 CV (%) = 1.5	89.7 $\pm$ 7.9 CV (%) = 8.8	92.3 $\pm$ 8.4 CV (%) = 9.1	98.3 $\pm$ 6.7 CV (%) = 6.8
20	91.8 $\pm$ 5.3 CV (%) = 5.8	97.4 $\pm$ 3.1 CV (%) = 3.2	89.1 $\pm$ 8.2 CV (%) = 9.2	92.5 $\pm$ 5.7 CV (%) = 6.2	98.5 $\pm$ 6.9 CV (%) = 7.0
100	87.8 $\pm$ 2.2 CV (%) = 2.4	93.0 $\pm$ 6.9 CV (%) = 7.4	85.0 $\pm$ 3.1 CV (%) = 3.6	87.7 $\pm$ 4.8 CV (%) = 5.4	92.3 $\pm$ 4.3 CV (%) = 4.7

\* Mean  $\pm$  SD.

**Table 4.** Intra-day accuracy and precision data ( $n = 3$ ) for tissues spiked with PGZ-NPs: low, medium, high concentration levels, and 50-fold diluted sample.

Tissue	Nominal Concentration in Extract				
	Added (ng/mL)	Found (ng/mL)	SD	CV (%)	Recovery (%)
Lens	8.4	7.2	0.2	2.7	85.9
	17.5	18.9	0.6	3.0	108.0
	87.7	90.2	1.9	2.2	102.8
	2094	2294.6	79.2	3.5	109.6
Cornea	8.4	7.8	0.3	4.0	93.0
	16.8	15.5	0.2	1.1	92.1
	84.2	76.0	1.4	1.8	90.2
	2094	1779.1	13.6	0.8	85.0
Sclera	8.4	7.8	0.3	3.7	92.0
	16.8	16.0	0.4	2.4	94.9
	84.2	74.6	0.9	1.3	88.5
	2094	1842.8	7.6	0.4	88.0
Aqueous Humor	7.4	6.4	0.3	4.2	87.4
	14.8	12.6	0.2	1.3	85.2
	73.8	62.9	0.4	0.7	85.3
	1931	2139.0	40.1	1.9	110.8
Vitreous humor	7.4	7.3	0.4	6.1	99.1
	14.8	14.6	0.3	2.0	98.8
	73.8	70.7	1.8	2.5	95.8
	1937	1925.3	7.2	0.4	99.4



**Figure 3.** Example of PGZ calibration curve (Linear Regression “ $1/x^2$ ” weighting:  $y = 1.77e + 004 + 7.46e + 003$  ( $r = 0.9996$ )).

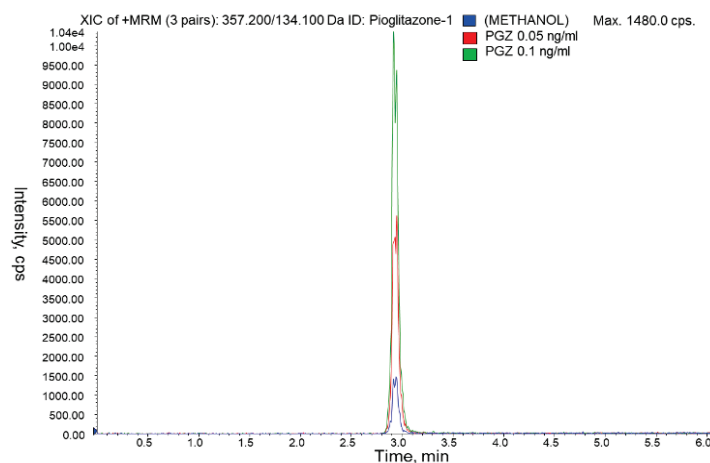
### 3.2.5. Accuracy and Precision

Experimental concentrations of spiked samples should not deviate more than  $\pm 15\%$  from their nominal concentrations. Intra-day and inter-day accuracies (Tables 2–4) given by bias (100-Recovery%) varied between  $-15\%$  for lens and sclera at some added levels to  $+10\%$  for the lens at the 50-fold diluted level, but no bias was observed with concentration. The results shown in Tables 2–4 indicate that the intra-day and inter-day precisions, given as CV (%), did not exceed 5% and 10%, respectively. The acceptance criteria defined by the EMA and FDA were fulfilled at the assessed concentration levels.

### 3.2.6. Dilution Integrity

The dilution integrity of the samples to demonstrate that a sample dilution procedure, when required, will not impact the accuracy and precision of the measured concentration of the analyte, was investigated in all matrices. It was demonstrated that a 50-fold dilution of a spiked sample can be applied when the concentration of the sample is higher than the upper limit of the calibration curve (Tables 1 and 3).

In contrast, if the concentration in the extract of real samples was below the lower limit of the calibration curve, a new calibration curve could be constructed with lower concentration standards. Minor modifications like increasing the injection volume could be assayed to get more intensity because it was found that standards of PGZ of 0.05 ng/mL provided a signal distinguishable from the blank (Figure 4). However, according to international guidelines, if method conditions were modified, the results should be confirmed with a partial validation, comprising at least accuracy and precision determination.



**Figure 4.** MRM chromatograms of blank-methanol (blue) and PGZ standards of 1 ng/mL (green) and 0.05 ng/mL (red).

### 3.2.7. Carry-Over

Carry-over was assessed during method development and validation and it was observed that it was unavoidable. At the beginning of the trial, we had no signal attributable to PGZ in the blank ionograms. When we started injecting solutions containing PGZ, small ion signals of ions attributable to this molecule began to appear in the blanks, and was impossible to remove them even by cleaning the ionization source of the spectrometer. Methanol was injected at the beginning of the sequence, after the standards calibration curve and following the highest levels of spiked samples. Nevertheless, the intensity of the carry-over signal was practically constant during the batch sequence and with low variation from one day to another. No concentration effect, therefore, was observed on the carry-over signal. The carry-over signal in the blank of methanol was found to be between 1% and 4% of the analyte response at the limit of quantitation level (10 ng/mL). The extracts of blank tissues showed the same peak intensity as the blank of methanol. These signal values are in the low range of those accepted in the harmonized guidelines of validation methods because they recommend that carry over should not exceed 20% of the LOQ [48,49]. Figure 2 shows a chromatogram of the carry-over signal and a PGZ standard of 5 ng/mL. Accuracy and precision data confirmed that the presence of the carry-over effect did not affect the results.

### 3.2.8. Stability

Long-term (three months) sample stability at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  was confirmed based on the obtained results for accuracy (bias  $\pm 15\%$ ) and precision ( $\text{CV} < 15\%$ ), which were found to be within the acceptable limits. The data for refrigerated stability of the extracts obtained from in-injector stability (24 h), and short-term stability (8 h) of the extracts at room temperature indicated that the variation of the response of the extracts was less than  $\pm 5\%$  (Figure 5). The accuracy of back-calculated concentrations in the calibration curve was accepted to be  $\pm 15\%$ , therefore, the variation found in the injection of stability of extracts should be accepted.

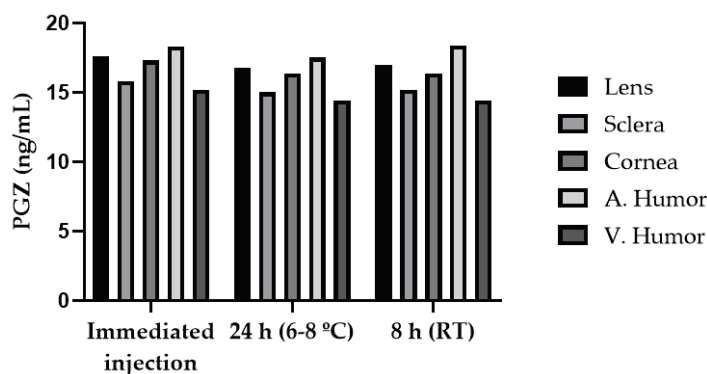


Figure 5. Stability data of PGZ in extracts of the tissues.

### 3.2.9. Limits of Quantification (LOQ) and Detection (LOD)

The LOQ was experimentally accomplished for all tissues and the intra- and inter-day precision and accuracy results are reported in Tables 2–4. The LOQ was established as  $160\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$  for sclera, cornea and lens, and  $80\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$  for aqueous humor and vitreous humor ( $10\text{ ng}/\text{mL}$  in extract).

The LOD is defined as the concentration that provides a good peak visualization with the lowest signal-to-noise ratio (S/N) possible [52]. PGZ solutions of  $0.05\text{ ng}/\text{mL}$  in tissue extracts were injected and the signal was more than twice in height the carry-over signal for all the examined tissues and around three times in the area. Taking as background noise the carry over the peak and the criterion of estimating signals three times higher in area than the background noise, the LOD was established in the range  $0.4\text{--}0.8\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$  of PGZ in tissues (Figure 4).

### 3.3. In Vivo Bioavailability Study

The method proposed herein was used in a pilot study to quantify PGZ in lens, cornea, sclera, aqueous and vitreous humors, after eye's administration in form of PGZ-NPs. The method was sensitive enough to quantify PGZ in the tissues, demonstrating its applicability. The results presented in Figure 6 show that the maximum concentration was found in the sclera followed by the cornea. Aqueous humor was the tissue where the concentration was lowest. According to the validated method, extracts of lens, vitreous humor, cornea and sclera had to be diluted to fall into the curve concentration range. A dilution  $1/20$  was necessary for sclera and cornea extracts, and a dilution of  $1/2$  for vitreous humor and lens extract.

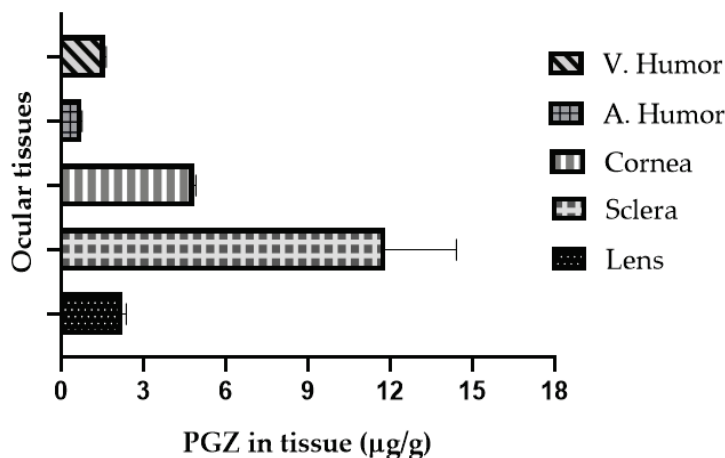


Figure 6. Analysis of samples: PGZ found in tissues after PGZ-NPs ocular administration ( $n = 3$ ).

#### 4. Discussion

PGZ-NPs were successfully produced using the displacement technique; this method provided small particles with good homogeneity and a negative charge of  $-15.0$  mV. This negative value is indicative of the stability of these systems in solution. Moreover, a higher percentage of EE was found (around 92%) for PGZ into the NPs. According to these physicochemical characteristics, these systems could be suitable for the ocular application. Previous studies have evaluated PLGA-NPs as ocular drug carriers, and it was demonstrated that the ocular penetration and permeability of the drugs were improved when they were encapsulated into the polymer [33,43–46]. The sensitivity of HPLC-UV methods did not allow the determination of PGZ in real biological samples with a simple extraction nor probably with preconcentration strategies. Therefore, HPLC-MS was an alternative technique to consider. Previously published data have shown that HPLC-MS has been used for PGZ quantitation in liquid biological samples (urine, plasma, serum) [53,54]. However, this is the first validated method using biological ocular tissues. This method was validated for free-PGZ and PGZ from NPs spiked in ocular tissues, and treated tissues were also analyzed.

The method was validated in the range  $80$ – $1600$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  of PGZ extracted from the tissues with good linearity between  $5$ – $100$   $\text{ng}/\text{mL}$  of PGZ standards. The extraction recovery was satisfactory for free-PGZ and PGZ from NPs with recoveries found in the range of  $85$ – $110\%$ . The reproducibility of the method obtained through the inter-day and intra-day precision was  $\text{CV} < 10\%$  and  $\text{CV} < 5\%$  respectively. Moreover, it was demonstrated that a dilution of the extract, if necessary, made it possible to quantify PGZ with no impact on the accuracy and precision. The LOD and LOQ achieved in cornea, sclera, and lens were on the orders of  $0.8$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  and  $160$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  respectively. LOD and LOQ in eye humors were in the orders of  $0.4$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  and  $80$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  respectively. The sensitivity was slightly improved compared to data found in the literature [54]. All the experimental data agree with the guidelines for bioanalytical method validation [48,49].

Significant levels of PGZ were found in eye tissues after 4 h of PGZ-NPs installation (Figure 6), which means that the formulation permeated and remained in the tissues. Aqueous humor, which is in contact with the cornea, was the tissue where the amount was about one order of magnitude lower with respect to the sclera, although PGZ remained. Vitreous humor, situated behind the sclera, also presented a good level, indicating that the formulation permeated through the sclera. These data are in accordance with a previous study in which PGZ accumulated more in sclera than in the cornea [12], probably due to the hydrophilic characteristics of sclera. This new biodistribution experiment supports previous results, and this validated method covers the needed concentration range for



studying different parts of the eye after treatment with PGZ. The formulation developed perhaps could be useful for the treatment of ocular inflammation with the ability to sustain PGZ in the tissues and to reach the posterior segment.

Taken together, these results indicate that an accurate, sensitive, selective, reproducible, and high-throughput HPLC-MS/MS method was developed and fully validated for the quantitative determination of PGZ from solution and NPs over a wide concentration range in different eye tissues. This method has the advantage of easy sample preparation, thus reducing assay time. The sensitivity and selectivity achieved for the detection of PGZ with respect of HPLC-UV make it suitable for analyzing very low levels of concentration in complex biological matrices. Moreover, HPLC-MS/MS allows the unambiguous identification of PGZ. The method can be easily applied to *in vivo* and *ex vivo* biodistribution studies related to the ocular administration of PGZ-NPs. Moreover, it opens the applicability to other types of biological matrices for preclinical or clinical use.

**Author Contributions:** E.M.-C., M.S.-A. and A.C.C. conceived and designed the experiments; E.M.-C. carried out the experimental part of the publication, analyzed the data and wrote the paper; M.S.-A., A.C.C. and I.C. supervised the whole manuscript and contributed to the writing and analysis of the results. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors would like to acknowledge HPLC/MS scientists Alberto Adeva and Olga Jáuregui of Separative Techniques Unit of the Scientific and Technological Centres of the University of Barcelona (CCiTUB) for help with the HPLC-MS/MS management. Thanks to Lidia Gómez-Segura and Álvaro Gimeno-Sandig of the Bellvitge Hospital of Barcelona for their assistance in the management of the animals used in the experiments. The authors would like to thank the University of Barcelona for the financial support to cover the cost of open access publication.

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

## References

1. Miyazaki, Y.; Mahankali, A.; Matsuda, M.; Glass, L.; Mahankali, S.; Ferrannini, E.; Cusi, K.; Mandarin, L.J.; DeFronzo, R.A. Improved glycemic control and enhanced insulin sensitivity in type 2 diabetic subjects treated with pioglitazone. *Diabetes Care* **2001**, *24*, 710–719. [[CrossRef](#)]
2. Lehrke, M.; Lazar, M.A. The many faces of PPAR $\gamma$ . *Cell* **2005**, *123*, 993–999. [[CrossRef](#)]
3. Bouhrel, M.A.; Derudas, B.; Rigamonti, E.; Diévert, R.; Brozek, J.; Haulon, S.; Zawadzki, C.; Jude, B.; Torpier, G.; Marx, N.; et al. PPAR $\gamma$  activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab.* **2007**, *6*, 137–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Chinetti, G.; Fruchart, J.C.; Staels, B. Peroxisome proliferator-activated receptors: New targets for the pharmacological modulation of macrophage gene expression and function. *Curr. Opin. Lipidol.* **2003**, *14*, 459–468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Yamamoto, A.; Kakuta, H.; Miyachi, H.; Sugimoto, Y. Involvement of the retinoid X receptor ligand in the anti-inflammatory effect induced by peroxisome proliferator-activated receptor agonist *in vivo*. *PPAR Res.* **2011**, *2011*, 840194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Tokutome, M.; Matoba, T.; Nakano, Y.; Okahara, A.; Fujiwara, M.; Koga, J.I.; Nakano, K.; Tsutsui, H.; Egashira, K. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma targeting nanomedicine promotes cardiac healing after acute myocardial infarction by skewing monocyte/macrophage polarization in preclinical animal models. *Cardiovasc. Res.* **2019**, *115*, 419–431. [[CrossRef](#)]
7. Chang, K.; Francis, S.A.; Aikawa, E.; Figueiredo, J.L.; Kohler, R.H.; McCarthy, J.R.; Weissleder, R.; Plutzky, J.; Jaffer, F.A. Pioglitazone suppresses inflammation *in vivo* in murine carotid atherosclerosis: Novel detection by dual-target fluorescence molecular imaging. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 1933–1939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Matoba, T.; Koga, J.I.; Nakano, K.; Egashira, K.; Tsutsui, H. Nanoparticle-mediated drug delivery system for atherosclerotic cardiovascular disease. *J. Cardiol.* **2017**, *70*, 206–211. [[CrossRef](#)]
9. Silva-Abreu, M.; Espinoza, L.C.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Fábrega, M.J.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Human skin permeation studies with PPAR $\gamma$  agonist to improve its permeability and efficacy in inflammatory processes. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Kanemaru, M.; Asai, J.; Jo, J.I.; Arita, T.; Kawai-Ohnishi, M.; Tsutsumi, M.; Wada, M.; Tabata, Y.; Katoh, N. Nanoparticle-mediated local delivery of pioglitazone attenuates bleomycin-induced skin fibrosis. *J. Dermatol. Sci.* **2019**, *93*, 41–49. [[CrossRef](#)]

11. Okunuki, Y.; Usui, Y.; Nakagawa, H.; Tajima, K.; Matsuda, R.; Ueda, S.; Hattori, T.; Kezuka, T.; Goto, H. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist pioglitazone suppresses experimental autoimmune uveitis. *Exp. Eye Res.* **2013**, *116*, 291–297. [[CrossRef](#)]
12. Silva-Abreu, M.; Calpena, A.C.; Espina, M.; Silva, A.M.; Gimeno, A.; Egea, M.A.; García, M.L. Optimization, biopharmaceutical profile and therapeutic efficacy of pioglitazone-loaded PLGA-PEG nanospheres as a novel strategy for ocular inflammatory disorders. *Pharm. Res.* **2018**, *35*, 11. [[CrossRef](#)]
13. Uchiyama, M.; Shimizu, A.; Masuda, Y.; Nagasaka, S.; Fukuda, Y.; Takahashi, H. An ophthalmic solution of a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist prevents corneal inflammation in a rat alkali burn model. *Mol. Vis.* **2013**, *19*, 2135–2150.
14. Aoki, Y.; Maeno, T.; Aoyagi, K.; Ueno, M.; Aoki, F.; Aoki, N.; Nakagawa, J.; Sando, Y.; Shimizu, Y.; Suga, T.; et al. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, suppresses bleomycin-induced acute lung injury and fibrosis. *Respiration* **2009**, *77*, 311–319. [[CrossRef](#)]
15. Pan, H.; Chen, J.; Xu, J.; Chen, M.; Ma, R. Antifibrotic effect by activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in corneal fibroblasts. *Mol. Vis.* **2009**, *15*, 2279–2286. [[PubMed](#)]
16. Zhang, Y.X.; Zhang, M.C. Inhibitory effects of pioglitazone on alkaline burn induced corneal neovascularization in rats. *Int. J. Ophthalmol.* **2007**, *7*, 1202–1205.
17. Laddha, U.D.; Kshirsagar, S.J. Formulation of nanoparticles loaded in situ gel for treatment of dry eye disease: In vitro, ex vivo and in vivo evidences. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2021**, *61*, 102112. [[CrossRef](#)]
18. Silva-Abreu, M.; Gonzalez-Pizarro, R.; Espinoza, L.C.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Thiazolidinedione as an alternative to facilitate oral administration in geriatric patients with Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *129*, 173–180. [[CrossRef](#)]
19. Wong, L.R.; Wong, P.; Ho, P.C.L. Metabolic profiling of female tg2576 mouse brains provides novel evidence supporting intranasal low-dose pioglitazone for long-term treatment at an early stage of alzheimer's disease. *Biomedicines* **2020**, *8*, 589. [[CrossRef](#)]
20. Jojo, G.M.; Kuppusamy, G. Scope of new formulation approaches in the repurposing of pioglitazone for the management of Alzheimer's disease. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2019**, *44*, 337–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Mehta, M. *Biopharmaceutics Classification System (BCS): Development, Implementation, and Growth*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2016; ISBN 978-1-118-47661-1.
22. Silva-Abreu, M.; Calpena, A.C.; Andrés-Benito, P.; Aso, E.; Romero, I.A.; Roig-Carles, D.; Gromnicova, R.; Espina, M.; Ferrer, I.; García, M.L.; et al. PPAR $\gamma$  agonist-loaded PLGA-PEG nanocarriers as a potential treatment for Alzheimer's disease: In vitro and in vivo studies. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 5577–5590. [[CrossRef](#)]
23. Jojo, G.M.; Kuppusamy, G.; De, A.; Karri, V.V.S.N.R. Formulation and optimization of intranasal nanolipid carriers of pioglitazone for the repurposing in Alzheimer's disease using Box-Behnken design. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2019**, *45*, 1061–1072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Sakai, S.; Sato, K.; Tabata, Y.; Kishi, K. Local release of pioglitazone (a peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonist) accelerates proliferation and remodeling phases of wound healing. *Wound Repair Regen.* **2016**, *24*, 57–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Espinoza, L.C.; Silva-Abreu, M.; Calpena, A.C.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Fábrega, M.J.; Garduño-Ramírez, M.L.; Clares, B. Nanoemulsion strategy of pioglitazone for the treatment of skin inflammatory diseases. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2019**, *19*, 115–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Anderson, J.M.; Shive, M.S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *28*, 2–24. [[CrossRef](#)]
27. Danhier, F.; Ansorena, E.; Silva, J.M.; Coco, R.; Le Breton, A.; Pr at, V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J. Control. Release* **2012**, *161*, 505–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Kim, K.T.; Lee, J.Y.; Kim, D.D.; Yoon, I.S.; Cho, H.J. Recent progress in the development of poly(lactic-co-glycolic acid)-based nanostructures for cancer imaging and therapy. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Rezvantalab, S.; Drude, N.L.; Moraveji, M.K.; G uvener, N.; Koons, E.K.; Shi, Y.; Lammers, T.; Kiessling, F. PLGA-based nanoparticles in cancer treatment. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1–19. [[CrossRef](#)]
30. Mir, M.; Ahmed, N.; Rehman, A. Ur Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**, *159*, 217–231. [[CrossRef](#)]
31. Tornesello, A.L.; Tagliamonte, M.; Tornesello, M.L.; Buonaguro, F.M.; Buonaguro, L. Nanoparticles to improve the efficacy of peptide-based cancer vaccines. *Cancers* **2020**, *20*, 1049. [[CrossRef](#)]
32. Guterres, S.S.; Alves, M.P.; Pohlmann, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights* **2007**, *2*, 147–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Gonzalez-Pizarro, R.; Silva-Abreu, M.; Calpena, A.C.; Egea, M.A.; Espina, M.; García, M.L. Development of fluorometholone-loaded PLGA nanoparticles for treatment of inflammatory disorders of anterior and posterior segments of the eye. *Int. J. Pharm.* **2018**, *547*, 338–346. [[CrossRef](#)]
34. Arafa, M.G.; Girgis, G.N.S.; El-Dahan, M.S. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for enhanced ocular anti-inflammatory efficacy of atorvastatin calcium. *Int. J. Nanomed.* **2020**, *15*, 1335–1347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Phm, T.L.; Kim, D.W. Poly(lactic-co-glycolic acid) nanomaterial-based treatment options for pain management: A review. *Nanomedicine* **2020**, *15*, 1897–1913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Suk, J.S.; Xu, Q.; Kim, N.; Hanes, J.; Ensign, L.M. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99*, 28–51. [CrossRef] [PubMed]
37. Bachu, R.D.; Chowdhury, P.; Al-Saedi, Z.H.F.; Karla, P.K.; Boddu, S.H.S. Ocular drug delivery barriers—Role of nanocarriers in the treatment of anterior segment ocular diseases. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 28. [CrossRef] [PubMed]
38. Ghafoorianfar, S.; Ghorani-Azam, A.; Mohajeri, S.A.; Farzin, D. Efficiency of nanoparticles for treatment of ocular infections: Systematic literature review. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *57*, 101765. [CrossRef]
39. Agarwal, R.; Iezhita, I.; Agarwal, P.; Abdul Nasir, N.A.; Razali, N.; Alyautdin, R.; Ismail, N.M. Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: An update. *Drug Deliv.* **2016**, *23*, 1075–1091. [CrossRef]
40. Karn, P.R.; Do Kim, H.; Kang, H.; Sun, B.K.; Jin, S.E.; Hwang, S.J. Supercritical fluid-mediated liposomes containing cyclosporin A for the treatment of dry eye syndrome in a rabbit model: Comparative study with the conventional cyclosporin A emulsion. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 3791–3800. [CrossRef]
41. Luis de Redín, I.; Boiero, C.; Martínez-Ohárriz, M.C.; Agüeros, M.; Ramos, R.; Peñuelas, I.; Allemandi, D.; Llabot, J.M.; Irache, J.M. Human serum albumin nanoparticles for ocular delivery of bevacizumab. *Int. J. Pharm.* **2018**, *541*, 214–223. [CrossRef]
42. Silva, B.; Marto, J.; Braz, B.S.; Delgado, E.; Almeida, A.J.; Gonçalves, L. New nanoparticles for topical ocular delivery of erythropoietin. *Int. J. Pharm.* **2020**, *576*, 119020. [CrossRef]
43. Abrego, G.; Alvarado, H.; Souto, E.B.; Guevara, B.; Bellowa, L.H.; Parra, A.; Calpena, A.; García, M.L. Biopharmaceutical profile of pranopfen-loaded PLGA nanoparticles containing hydrogels for ocular administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *95*, 261–270. [CrossRef] [PubMed]
44. Cañadas, C.; Alvarado, H.; Calpena, A.C.; Silva, A.M.; Souto, E.B.; García, M.L.; Abrego, G. In vitro, ex vivo and in vivo characterization of PLGA nanoparticles loading pranopfen for ocular administration. *Int. J. Pharm.* **2016**, *511*, 719–727. [CrossRef] [PubMed]
45. Parra, A.; Mallandrich, M.; Clares, B.; Egea, M.A.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Biointerfaces Design and elaboration of freeze-dried PLGA nanoparticles for the transcorneal permeation of carprofen: Ocular anti-inflammatory applications. *Colloids Surf. B* **2015**, *136*, 935–943. [CrossRef] [PubMed]
46. Sánchez-López, E.; Esteruelas, G.; Ortiz, A.; Espina, M.; Prat, J.; Muñoz, M.; Cano, A.; Calpena, A.C.; Etcheto, M.; Camins, A.; et al. Article dexibuprofen biodegradable nanoparticles: One step closer towards a better ocular interaction study. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 720. [CrossRef]
47. Silva-Abreu, M.; Espinoza, L.C.; Halbaut, L.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Comparative study of Ex Vivo transmucosal permeation of pioglitazone nanoparticles for the treatment of Alzheimer’s disease. *Polymers* **2018**, *10*, 316. [CrossRef]
48. European Medicines Agency. EMA/CHMP/ICH/172948/2019. ICH Guideline M10 on Bioanalytical Method Validation. 2019. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation> (accessed on 7 January 2021).
49. U.S. Food and Drug Administration. *Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry*; U.S. Food and Drug Administration: Silver Spring, MD, USA, 2018.
50. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P.; Ammouy, N.; Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*. [CrossRef]
51. Almeida, A.M.; Castel-Branco, M.M.; Falcão, A.C. Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, *774*. [CrossRef]
52. ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1). 2005. Available online: <https://www.ich.org> (accessed on 20 January 2021).
53. Sengupta, P.; Chatterjee, B.; Mandal, U.K.; Gorain, B.; Pal, T.K. Development and validation of a high throughput LC–MS/MS method for simultaneous quantitation of pioglitazone and telmisartan in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study. *J. Pharm. Anal.* **2017**, *7*, 381–387. [CrossRef]
54. Satheeshkumar, N.; Shantikumar, S.; Srinivas, R. Pioglitazone: A review of analytical methods. *J. Pharm. Anal.* **2014**, *4*, 295–302. [CrossRef]



### 3.2. Article 2

## Stabilization by Nano Spray Dryer of pioglitazone polymeric nanosystems: development, *in vivo*, *ex vivo* and synchrotron analysis.

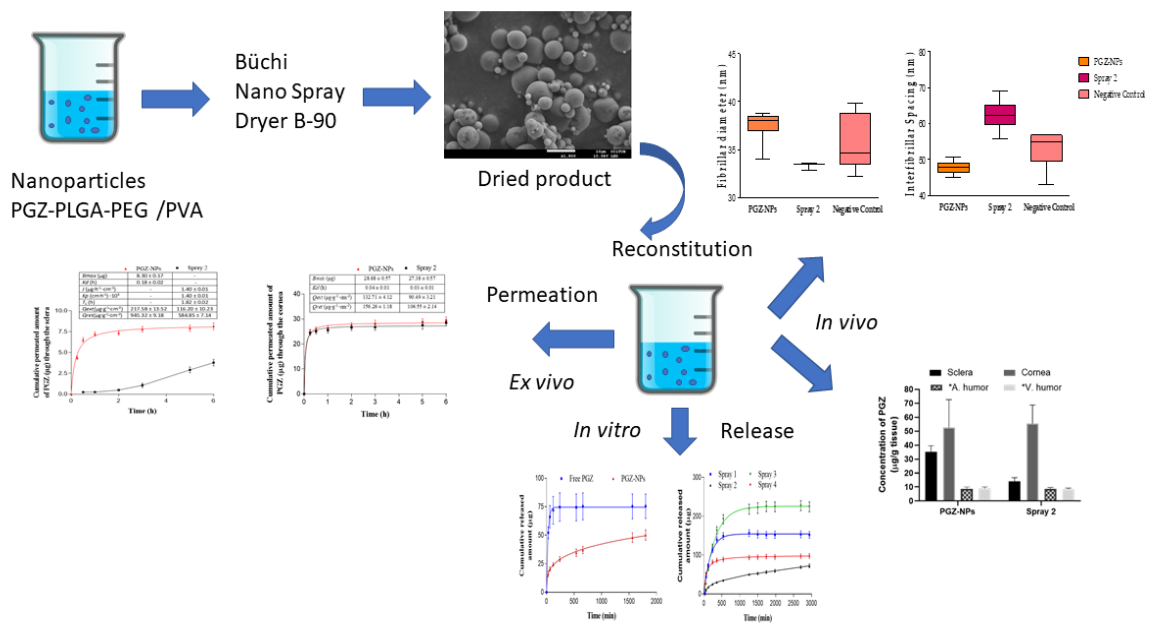
Marcelle Silva-Abreu, Esther Miralles, Christina S. Kamma-Lorger, Marta Espina, Maria Luisa García i Ana Cristina Calpena.

Pharmaceutics 2021, 13, 1751.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111751>

Quartil Q1; factor d'impacte 6.29 l'any 2021.

### Resum gràfic







Article

# Stabilization by Nano Spray Dryer of Pioglitazone Polymeric Nanosystems: Development, In Vivo, Ex Vivo and Synchrotron Analysis

Marcelle Silva-Abreu <sup>1,2,\*</sup>, Esther Miralles <sup>3,†</sup>, Christina S. Kamma-Lorger <sup>4</sup>, Marta Espina <sup>1,2</sup>,  
María Luisa García <sup>1,2</sup> and Ana Cristina Calpena <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; m.espina@ub.edu (M.E.); marisagarcia@ub.edu (M.L.G.); anacalpena@ub.edu (A.C.C.)

<sup>2</sup> Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

<sup>3</sup> CCI TUB (Scientific and Technological Centers), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; emiralles@ub.edu

<sup>4</sup> BioSAXS ANSTO Australian Synchrotron, Clayton, VIC 3168, Australia; ckamma@ansto.gov.au

\* Correspondence: silvadeabreu@ub.edu; Tel.: +34-93-402-4578

† These authors have contributed equally to this paper.

**Abstract:** Pioglitazone-loaded PLGA-PEG nanoparticles (NPs) were stabilized by the spray drying technique as an alternative to the treatment of ocular inflammatory disorders. Pioglitazone-NPs were developed and characterized physicochemically. Interaction studies, biopharmaceutical behavior, *ex vivo* corneal and scleral permeation, and *in vivo* bioavailability evaluations were conducted. Fibrillar diameter and interfibrillar corneal spacing of collagen was analyzed by synchrotron X-ray scattering techniques and stability studies at 4 °C and was carried out before and after the spray drying process. NPs showed physicochemical characteristics suitable for ocular administration. The release was sustained up to 46 h after drying; *ex vivo* corneal and scleral permeation profiles of pioglitazone-NPs before and after drying demonstrated higher retention and permeation through cornea than sclera. These results were correlated with an *in vivo* bioavailability study. Small-angle X-ray scattering (SAXS) analysis did not show a significant difference in the organization of the corneal collagen after the treatment with pioglitazone-NPs before and after the drying process, regarding the negative control. The stabilization process by Nano Spray Dryer B-90 was shown to be useful in preserving the activity of pioglitazone inside the NPs, maintaining their physicochemical characteristics, *in vivo* bioavailability, and non-damage to corneal collagen function after SAXS analysis was observed.

**Keywords:** PLGA-PEG; pioglitazone; nanoparticles; spray drying; cornea; synchrotron; SAXS



**Citation:** Silva-Abreu, M.; Miralles, E.; Kamma-Lorger, C.S.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C.

Stabilization by Nano Spray Dryer of Pioglitazone Polymeric Nanosystems: Development, In Vivo, Ex Vivo and Synchrotron Analysis. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1751. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111751>

Academic Editor: Anna Rita Bilia

Received: 19 September 2021

Accepted: 13 October 2021

Published: 20 October 2021

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



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

During the last decades many synthetic and natural polymers have been studied in nanomedicine as drug delivery systems [1–3], and today their use is well established. Polymeric nanoparticles (NPs) are systems that improve drug delivery in tissues and organs by modifying drug release behavior and sustainability, thus increasing the drug bioavailability across biological membranes [4].

Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is a synthetic polymer with biocompatibility and resorbability properties, and it is approved by the US Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicine Agency (EMA) for use in humans [5]. PLGA can be manufactured in different ratio proportions and molecular weights to encapsulate hydrophobic and hydrophilic molecules. Moreover, it is useful as a carrier for micro and macromolecules. Because of these advantages, PLGA has been chosen for numerous systems in biomedical applications, including cancer diagnosis and treatment, vaccination, inflammation treatment, or neurodegenerative and cardiovascular diseases [6–12]. However, PLGA-NPs are

easily recognized by the reticuloendothelial system (RES), and consequently, it aids their fast elimination from the bloodstream. An alternative to avoid this is to coat these systems with antibodies, chitosan, poloxamer, or polyethylene glycol (PEG). This can increase their half-life in the bloodstream [13,14] and help their transport through membranes [15]. In addition, PEG is useful to stabilize NPs in aqueous media, avoiding aggregation and increasing their solubility [16–18].

Drying, by converting suspensions or liquids into dried products, is a technique commonly used for improving the stability of pharmaceutical and biotherapeutic products [19–23]. A drying process to remove the water is highly recommended to maintain NPs' respective physicochemical properties, efficacy, and long-term stability and to avoid instability that is caused by aqueous media [24].

Techniques such as spray drying [25–27] and freeze-drying (lyophilization) [28–30] have been described in the literature for the conversion of colloidal suspensions into dried products. The spray drying process was considered as a dehydration method, but at the same time, it has increasingly attracted research interest for the design of pharmaceutical carriers encapsulating drugs [31,32]. Its use has been demonstrated in the food [33], chemical, and pharmaceutical industries, being one of the candidate methods to offer an alternative to lyophilization in the future [19,34–37]. The advantages of this technique over conventional freeze-drying are the shorter process cycle time, scalability, affordability, reproducibility, and the fact that it works at atmospheric pressure. Moreover, the production cost is typically lower compared to other drying technologies [32].

Significant efforts have been made over the last few decades to develop new drug delivery systems that improve ocular drug administration. The use of colloidal delivery systems, such as NPs, is considered as a strategy that can enhance the ocular bioavailability of topically administered drugs, reducing administration frequency, sustaining the release, and promoting drug targeting to specific sites [38–45].

In recent years, studies of pioglitazone (PGZ) as a potential therapeutic have gone far beyond its primary use as an antidiabetic drug. This drug is an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) which is a ligand-activated nuclear transcription factor that modulates the expression of genes involved in the physiological functions, including glucose homeostasis, lipid metabolism, and inflammatory processes. Additionally, PGZ has been reported to have different therapeutic activities, including its regulatory role on inflammatory markers, such as IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . In addition, its use in autoimmune diseases, rheumatoid arthritis, cardiovascular diseases, skin inflammatory diseases, Alzheimer's [46–50], and for the treatment of ocular disorders [51–53] suggest that this drug could be an effective candidate for the treatment of different inflammatory ocular conditions [51].

Previous studies have shown that PGZ was encapsulated into PLGA-PEG-NPs, suggesting its suitability as a pharmaceutical formulation that overcomes the poor solubility of PGZ in an aqueous phase [54] and targets specific tissues [46,55,56]. Moreover, this system showed good corneal and scleral permeation and sustained release, indicating these systems could be useful for drug delivery [52]. However, in order to preserve and increase the long-term stability of PGZ-NPs for future use as a drug medicine, the water must be removed and these systems transformed into a dry powder.

The purpose of this study was to optimize and stabilize the PGZ-NPs of PLGA-PEG by the spray drying technique, improving its physicochemical characteristics, biopharmaceutical behavior, and long-term stability. Moreover, release profile, *in vivo* and *ex vivo* ocular permeation studies were conducted. In addition, corneal analysis by synchrotron X-ray scattering was performed for future use of these systems in an ocular inflammatory animal model.



## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

Diblock copolymer PLGA-PEG 5% (50:50) Resomer® was obtained from Evonik Corporation (Birmingham, AL, USA). The PGZ was obtained from Capot Chemical (Hangzhou, China). Acetone, dimethylsulfoxide (DMSO) and polyvinyl alcohol Mw 30,000–70,000 Da, 87–90% hydrolyzed (PVA) were purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Transcutol® P pharma quality was kindly supplied by Gattefossé España S.A. (Barcelona, Spain). Milli-Q water (Millipore Sigma, Burlington, MA, USA) was used for all the experiments and the reagents were of analytical grade.

### 2.2. Experimental Strategy

- i. Develop and select the most suitable PGZ-PLGA-PEG NP colloidal system based on physicochemical properties.
- ii. Dry the selected nanosystem with spray dryer Büchi Nano B-90 under different conditions and select the most suitable formulation in terms of physicochemical properties, *in vitro* release, and *ex vivo* corneal and scleral permeation in comparison to the colloidal system without drying.
- iii. Bioavailability study of PGZ from the NPs in rabbit eyes with both selected formulations: suspension freshly prepared (Table 1—formulation 8) and reconstituted suspension after drying (Table 2—Spray 2).
- iv. Small-angle X-ray scattering (SAXS) analysis in the corneal tissue.

**Table 1.** PGZ-NPs developed by a factorial design 2<sup>3</sup>.

Formulation	PLGA-PEG (mg/mL)	pH	PVA (%)	Size (nm)	PI	ZP (mV)	EE (%)
1	8.0	3.5	2.0	223.90 ± 1.60	0.09 ± 0.00	−2.47 ± 0.08	39.45 ± 2.12
2	9.0	3.5	2.0	231.91 ± 0.77	0.08 ± 0.01	−3.30 ± 0.30	48.95 ± 1.34
3	8.0	4.5	2.0	242.32 ± 2.85	0.16 ± 0.03	−2.54 ± 0.43	79.23 ± 3.21
4	8.0	3.5	2.5	251.42 ± 0.66	0.20 ± 0.00	−3.28 ± 0.38	35.74 ± 2.42
5	9.0	4.5	2.0	234.51 ± 0.90	0.17 ± 0.01	−3.42 ± 0.22	72.83 ± 1.32
6	9.0	3.5	2.5	302.81 ± 1.94	0.23 ± 0.02	−3.82 ± 0.25	49.64 ± 2.21
7	8.0	4.5	2.5	242.52 ± 3.51	0.16 ± 0.01	−2.76 ± 0.50	70.01 ± 3.23
8	9.0	4.5	2.5	247.22 ± 2.77	0.17 ± 0.03	−3.34 ± 0.42	90.12 ± 1.15

Data are represented as mean ± SD (*n* = 3).

**Table 2.** Four different spray drying conditions of PGZ-NPs after resuspension in water.

Formulation	Size (nm)	PI	ZP (mV)	EE (%)
Spray 1	366.61 ± 13.48	0.39 ± 0.01	−6.93 ± 1.04	90.05 ± 1.14
Spray 2	271.31 ± 2.78	0.24 ± 0.00	−7.57 ± 1.53	89.13 ± 2.21
Spray 3	328.02 ± 1.34	0.29 ± 0.03	−6.48 ± 0.31	90.10 ± 1.54
Spray 4	276.64 ± 1.75	0.23 ± 0.00	−9.87 ± 0.48	88.92 ± 1.21

### 2.3. Development and Preparation of PGZ-NPs

The experimental strategy used in this work for the preparation of PGZ-NPs by the solvent displacement technique was a factorial design, which consists of simultaneously modifying the different variables within the experimental domain. Thus, the number of experiments in a complete factorial design is equal to the number of possible combinations between the levels (*n*) of each variable (*X*): *n*<sup>*x*</sup>. A screening factorial design 2<sup>3</sup> was planned to develop the PGZ-NPs and to analyze the effect of independent variables (pH, PLGA-PEG and PVA concentrations) together and in combination with the dependent variables (average particle size (*Z*<sub>av</sub>), polydispersity index (PI), zeta potential (ZP), and encapsulation efficiency (EE)). According to the composite design matrix generated by Statgraphics Centurion 18 software (Statgraphics Technologies Inc., The Plains, VA, USA), a total of 8 experiments are summarized in Table 1.

PGZ-NPs were prepared using the nanoprecipitation technique firstly described by Fessi et al., 1989 [57]. Previously the PGZ (1 mg/mL) was solubilized in 0.5 mL of DMSO, then mixed with the PLGA-PEG dissolved in 5 mL of acetone. This organic phase was added dropwise under stirring (700 rpm) into 10 mL of an aqueous solution of PVA adjusted to the desired pH. Then, acetone was evaporated under reduced pressure in a rotary evaporator Büchi B-480 (Büchi, Fawil, Switzerland). The PGZ-NP suspensions were stored until spray drying.

#### 2.4. Spray Drying of PGZ-NPs

Nano Spray Dryer B-90 (Büchi Labortechnik AG, Fawil, Switzerland) was used to improve the long-term stability of the PGZ-NPs. This instrument carries out the spray drying process using vibrating mesh technology to generate the droplets [58] and the dried particles are collected by an electrostatic accumulator (collector). This technology minimizes product loss and provides high yields up to 90% [31,59].

Four different dry particles were prepared from selected PGZ-NP formulations. The instrument conditions tested were spray nozzle (5.5 and 7.0  $\mu\text{m}$ ) and outlet temperatures around 25 and 30 °C. The set up for Spray 1 was 5.5  $\mu\text{m}$  and 25 °C; 7.0  $\mu\text{m}$  and 25 °C for Spray 2; 5.5  $\mu\text{m}$  and 30 °C for Spray 3; and 7.0  $\mu\text{m}$  and 30 °C for the Spray 4 formulation. The air flow rate was set to 140–150 L/min and the spray rate was fixed at 75% for all conditions. The PGZ-NP solution was sprayed, and particles were collected dried from the electrostatic particle chamber using a powder scraper. After that, samples were maintained in a desiccator until further analysis.

#### 2.5. Physicochemical Characterization

The  $Z_{\text{av}}$  and PI measurements of PGZ-NPs were performed by Dynamic Light Scattering (DLS) using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) at 25 °C using disposable quartz cells, with prior dilution in Milli-Q water (1:20 *v/v*) to determine hydrodynamic radii of particles in water. ZP was determined by electrophoresis laser-Doppler using the same instrument with prior dilution in Milli-Q water (1:10 *v/v*). All the experiments were carried out in triplicate.

To determine the EE percentage of PGZ in NPs, an indirect method was used of dilution of 1:10 (*v/v*) in water and filtration/centrifugation at 14,000 rpm for 20 min. The amount of non-entrapped PGZ found in the supernatant was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a previous validated analytical method [46] and calculated according to the following Equation (1):

$$EE (\%) = \frac{\text{Total amount of PGZ} - \text{Free PGZ}}{\text{Total amount of PGZ}} \times 100 \quad (1)$$

#### 2.6. Water Content

Water content was determined using a selective electrochemical sensor of phosphorus pentoxide ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) by means of thermo-coulometric analysis with the Berghof easyH<sub>2</sub>O analyzer (DKSH, Zurich, Switzerland). Basically, after instrument calibration, 10 mg of dried sample was heated to 150 °C in a closed chamber for 10 min, the evaporated water was conveyed to the sensor in a stream of carrier gas, and the free surface water, capillary water, and bonded water were calculated through Faraday's first law of electrolysis. The moisture is attracted to the  $\text{P}_2\text{O}_5$  coating, which is very hygroscopic and migrates to the electrodes (platinum wires) where it is electrolyzed. Oxygen is formed at the positive electrode and hydrogen at the negative electrode. The electrolysis current, according to Faraday's law, is directly proportional to the amount of water [60].

#### 2.7. Microscopy Analysis (TEM and SEM)

PGZ-NP dispersions were analyzed before and after the spray drying process by transmission electronic microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM), respectively. TEM analysis was carried out by negative stain technique. Samples were placed on the

grid surface after a dilution in water (1:4 *v/v*) mounted on a grid and negative stained with a 2% (*v/v*) uranyl acetate solution. After 6 h at room temperature, the samples were examined by TEM on a JEOL JEM-1010 (JEOL USA, Peabody, MA, USA).

After the spray drying process, the PGZ-NPs were analyzed by SEM. For that purpose, a small quantity of PGZ-NPs was coated with carbon as a conductor agent, and the structure was examined using a JEOL J-7100F (JEOL USA, Peabody, MA, USA).

#### 2.8. Interactions Studies: DSC, X-ray Spectroscopy, and FTIR

To determine the physical state of the PGZ-NPs and their interactions with any compound of the formulation, studies by Differential Scanning Calorimetry (DSC), X-ray spectroscopy, and Fourier Transform Infrared (FTIR) were performed before and after the spray drying process.

DSC analysis was performed using a DSC 823e System (Mettler Toledo, Barcelona, Spain). The temperature was calibrated by the melting transition point of indium (purity  $\geq 99.95\%$ ; Fluka, Switzerland) prior to sample analysis. The DSC measurements used a heating ramp from 30 to 240 °C at 10 °C/min in a nitrogen atmosphere. Data were evaluated using the Mettler STARe V 9.01 dB software (Mettler Toledo, Barcelona, Spain).

To determine the state—crystalline or amorphous—of the samples, X-ray spectral measurements were performed using Siemens D500 system (Karlsruher, Germany). X-ray powder diffractograms were recorded using a Cu K $\alpha$ 2 radiation (45 kV, 40 mA,  $\lambda = 1.544 \text{ \AA}$ ) in the range ( $2\theta$ ) from 2° to 60° with a step size of 0.026° and the measuring time was 200 s per step.

FTIR spectra were achieved using a Thermo Scientific Nicolet iZ10 with an ATR diamond and DTGS detector (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). The scanning range used was 500–4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 2.9. Release Profile of PGZ-NPs

Drug release studies of PGZ from the NPs before and after the spray drying process were performed using the Franz diffusion cell technique, which is based on the direct dispersion of the colloidal suspension in the dialysis medium accomplishing sink conditions. A dialysis membrane (MWCO 12,000–14,000 Da Dialysis Tubing Visking, Medicell International Ltd., London, UK) was used and hydrated for 24 h before being mounted in the Franz diffusion cell. The temperature of the medium and speed of the paddle were adjusted to  $37 \pm 0.5 \text{ °C}$  and 100 rpm, respectively. The PGZ-NP formulations were compared with respect to the free drug at the same concentration. The free drug was dissolved in DMSO and phosphate buffer solution (PBS) at pH 7.4 (60:40 *v/v*). This solution 60:40 *v/v* was also the release media (RM). A volume of 300  $\mu\text{L}$  of PGZ-NPs or free drug was placed in the donor compartment, and the receptor compartment was filled with RM. At predetermined time intervals, 300  $\mu\text{L}$  was withdrawn from the receptor compartment and replaced with an equivalent volume of RM. The concentration of PGZ released was measured by liquid chromatography [46]. Values are reported as the mean  $\pm$  SD of six replicates. The content of PGZ in the RM at each time point was evaluated and data were adjusted to the most common kinetic models. Akaike's information criterion (AIC) and determination coefficient ( $r^2$ ) were determined for each model [61].

#### 2.10. Corneal and Scleral Permeation Studies

In order to continue with the following experiments, based on the physicochemical characterization and biopharmaceutical studies of the PGZ-NPs (Section 3), the Spray 2 formulation after the drying process was selected (see Table 1).

Franz diffusion cells were used in order to study permeation through corneal and scleral tissue. The ocular tissue was obtained from male New Zealand rabbits weighing (2.5–3 kg,  $n = 3$ ) under veterinary supervision, and according to the Ethics Committee of Animal Experimentation from the University of Barcelona (CEEA-UB). The rabbits were anesthetized with an intramuscular administration of ketamine HCl (3 mg/kg) and xylazine

(2.5 mg/kg). Once sedated, they were euthanized by an overdose of sodium pentobarbital (100 mg/kg), administered through a marginal ear vein under deep anesthesia. The ocular tissues (cornea and sclera) were excised and immediately transported to the laboratory in artificial tear solution. The tissues were placed in Franz diffusion cells between the donor and receptor compartment with a permeation area of 0.64 cm<sup>2</sup>. The receptor compartment was filled with freshly prepared solution Transcutol/water (60/40 *v/v*). A sample volume of 0.2 mL from PGZ-NPs and the Spray 2 was added in the donor compartment. The drug release from the receptor compartment was studied for 6 h by removing 0.2 mL of sample and replacing it with fresh solution of Transcutol/water. This compartment was kept at 32 ± 0.5 and 37 ± 0.5 °C for corneal and scleral permeation, respectively. The cumulative PGZ amount permeated was calculated, at each time point, from concentration of PGZ in the receiving medium and plotted as function time (hour). HPLC was used to analyze the samples [46].

#### 2.11. Ocular Permeation Parameters

After a 6 h *ex vivo* experiment, the cornea and sclera were cleaned using a 0.05% solution of sodium lauryl sulfate and washed with distilled water, then weighed and the PGZ extracted with methanol under sonication for 30 min using an ultrasound bath. PGZ levels were quantified by HPLC and expressed as (µg·g<sup>-1</sup>·cm<sup>-2</sup>) of cornea or sclera extracted ( $Q_{ext}$ ) and retained ( $Q_{ret}$ ) through the tissues. The permeated ( $Q_t$ ) amount was expressed as µg·cm<sup>-2</sup>. In addition, the permeability coefficient ( $Kp$ ) (cm·h<sup>-1</sup>), latency period ( $T_L$ ), and steady-state flux ( $J$ ) for the scleral tissue were calculated by plotting the cumulative PGZ permeating versus time, determining x-intercept by linear regression analysis.

#### 2.12. *In Vivo* Study

*In vivo* study was carried out in order to investigate ocular bioavailability and disposition of PGZ from NPs before and after the spray drying process. New Zealand rabbits weighing (2.5–3 kg,  $n = 3$ ) were used in accordance with the Ethics Committee of Animal Experimentation from the University of Barcelona (CEEA-UB). Rabbits were euthanized after 10 d of topical administration with PGZ-NPs and the Spray 2 formulation (0.05 mL/eye/day). The ocular tissues were isolated from the eyes and kept at –80 °C until quantification by liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) [62]. The values are described as the average ± SD ( $n = 3$ /group).

#### 2.13. Small-Angle X-ray Scattering (SAXS) Data Collection and Analysis

After the *in vivo* study, corneal tissue from rabbits treated with saline solution 0.09% (negative control), PGZ-NPs freshly prepared, and the Spray 2 formulation, were dissected and maintained in a formaldehyde 4% solution until the analysis by SAXS on beamline BL11-NCD-SWEET at the ALBA Synchrotron Light Source (Barcelona, Spain). A thin strip of tissue, measuring approximately ~1 mm wide, was dissected from the center of each cornea from the anterior to posterior direction covering from limbus-to-limbus. The cuts were wrapped in plastic membrane in order to prevent dehydration during data collection. The samples were mounted in a Perspex-Mylar holder and positioned perpendicular to the beam and on motorized stages that permitted performing automated raster scans. Each pattern was generated from an X-ray beam with an energy of 12.4 keV and a sample to detector distance of 7 m. AgBh (with a standard periodicity of 58.38 Å) was used in order to perform spatial calibration of data using PyFAI (Grenoble, France). SAXS patterns were obtained at 25 µm intervals in a vertical direction throughout the thickness of the cornea center, scanning from epithelium to endothelium, with an exposure time of 4 s. A total of 35 data points were collected from each cornea, and for each group, two corneas were examined. The analysis of the images was carried out using the SAXS4COLL software (Available online: <https://bio.tools/saxs4coll> Accessed date: 12 February 2021).

N/A version, Cardiff, UK) [63] which was developed for the analysis of fibrous collagen-based tissues.

#### 2.14. Stability Studies

Long-term stability of PGZ-NPs and the Spray 2 formulation (once reconstituted) was carried out for 6 months at 4 °C. Turbiscan Formulation Lab® was used to analyze the backscattering profile of the samples.

#### 2.15. Statistical Analysis of Synchrotron Data

Data were analyzed using the GraphPad Prism version 8 software package (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Differences between treatment groups and the control were statistically evaluated using ANOVA. The average of fibrillar diameter and interfibrillar spacing of collagen was calculated out of the 35 points that were collected from each cornea in the different groups. Differences were considered as statistically significant when the *p*-value was less than 0.05. All the data are presented as the average  $\pm$ SD.

### 3. Results

#### 3.1. Development and Characterization

The PGZ-NPs were developed from a factorial design 2<sup>3</sup> (Figure 1) and prepared using a solvent displacement technique [57]. Eight formulations were developed and their physicochemical parameters with respect to size, PI, ZP and % EE were determined to select the most suitable formulation according to those parameters and to be dried by spray drying technology (Table 1). The mean particle size ranged from 223.90  $\pm$  1.60 to 302.81  $\pm$  1.94 nm, PD values were below 0.23, ZP were around -3.5 mV, and EE values ranged from 35.74 to 90.12%. The formulation number 8 of PGZ-NPs was selected based on its physicochemical characteristics, mainly the percentage of EE, which was significantly higher in comparison to other formulations.

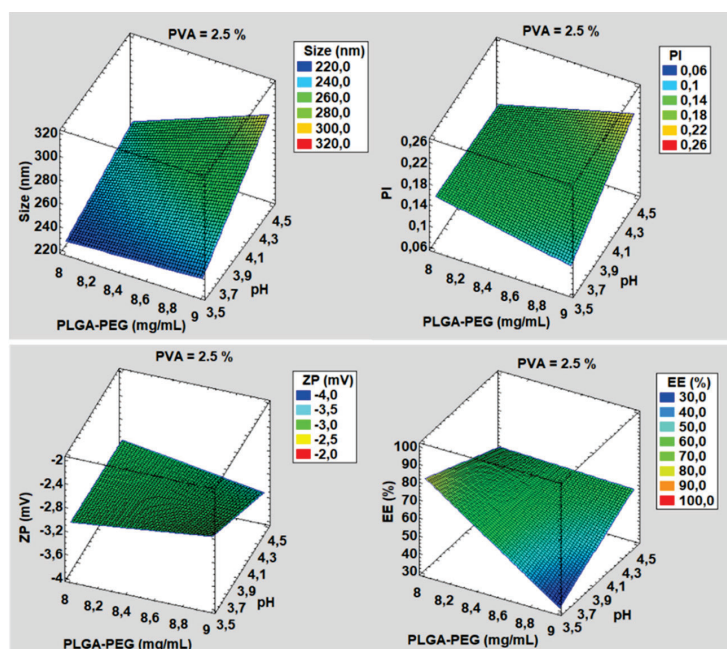


Figure 1. Surface response of PGZ-NPs developed by factorial design before the spray drying process. PVA=2.5%. pH and PLGA-PEG concentration influence on the size, PI, ZP and EE % of NPs.

After that, the experiment using the Nano Spray Dryer B-90 was carried out with this particular formulation. From here, four PGZ-NPs were obtained with different spray conditions (see Section 2.4). Parameters such as size, PI, ZP and EE % were determined (Table 2). The particles showed a slight decrease in the surface charge after spraying as well as a slight increase in mean particle size.

Moreover, size and surface morphology of the selected PGZ-NPs were determined by TEM (Figure 2), evidencing that PGZ-NPs were morphologically spherical and presented low dispersion. In addition, after the spray drying process, TEM (Figure 3) and SEM (Supplementary Materials, Figure S1) determinations were performed in order to ensure the drying process did not change the morphology of the particles.

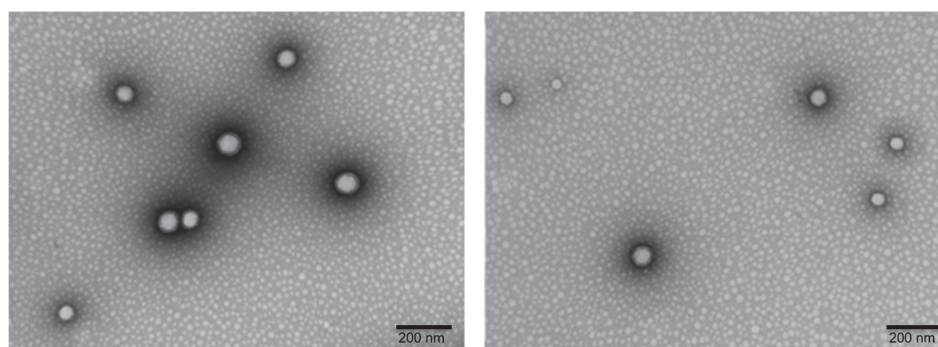


Figure 2. TEM images of PGZ-NPs in suspension before spray drying.

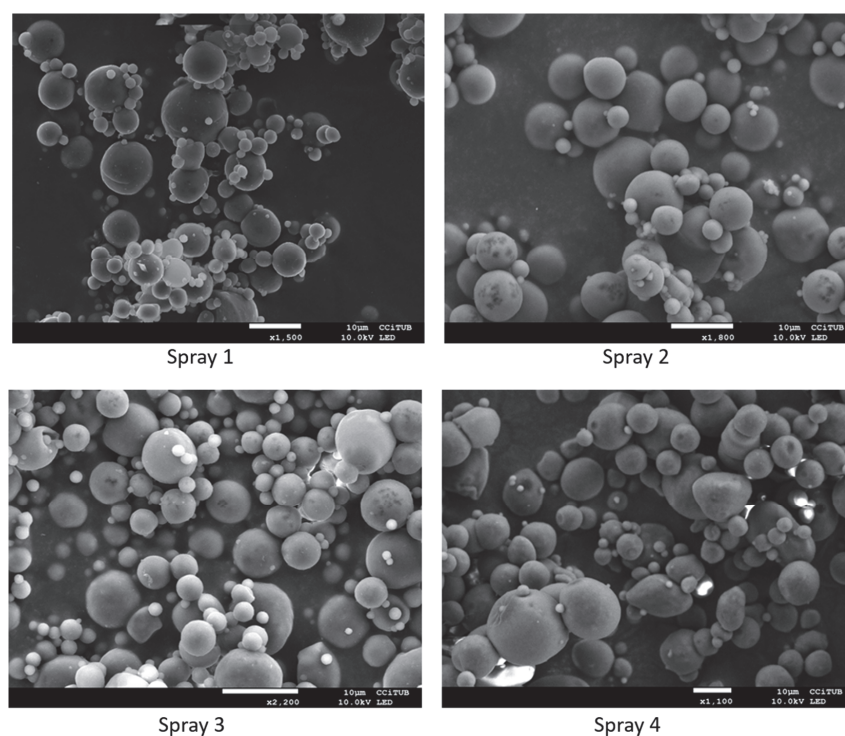


Figure 3. SEM images of PGZ-NPs after spray drying.

SEM images of NP-based dried solids showed a high polydispersity of the aggregates present in the powder, from nanometers to micrometers in diameter. This is the usual phenomenon when using the spray drying technology to dry this type of suspension [64]. After the resuspension of the NP-based dry solids in water (Figure S1), it was possible to observe an acceptable polydispersity (PI 0.24) that was correlated with DLS measurements (Table 2).

### 3.2. Water Content

The water content remaining in the nanoparticle-based dry powder after the spray drying process was investigated. Spray 1, 2, 3, and 4 formulations showed water contents of 2.62, 2.15, 3.24, and 3.15% wet basis, respectively.

### 3.3. Interaction Studies for PGZ-NPs and Their Components Using the Nanoparticle-based Dry Powder

A factor that greatly affects the release of the drug in *in vitro* and *in vivo* studies is the physical state of the drug within the NPs. Therefore, PGZ was characterized by DSC, X-ray diffraction, and FTIR (Figures 4A, 4B and 4C, respectively). During DSC analysis the produced thermogram showed an endothermic accident that corresponded to the fusion of the drug with a maximum temperature of 195.90 °C and an enthalpy of 140.33 J/g. In addition, individual thermograms of each component of the study were obtained: PVA, PLGA-PEG, PGZ-NPs before and after the spray drying process (Figure 4A). The PVA showed an endothermic event corresponding to the melting process with a maximum at 193.55 °C and an enthalpy of 5.32 J/g. The PLGA-PEG glass transition (T<sub>g</sub>) temperature was around 50 °C. However, when the method of removing water from the suspension of the NPs was carried out using the spray drying technique, the DSC analysis did not provide information of interest. The signal from the surfactant (PVA) overshadowed the other signals, since PVA is not removed when using this drying process. For this reason, in order to assess the effects of this process on the particles, a size control (Z<sub>av</sub>), sample homogeneity (PI) and EE were carried out after reconstitution of the sample formulation.

The diffraction pattern of the drug indicated a crystalline structure unlike the polymer (Figure 4B). The PVA, PGZ-NPs, and each NP formulation after the drying process (Spray 1, Spray 2, Spray 3, Spray 4) showed an amorphous structure. PGZ-NPs before the the drying process showed a profile similar to the PLGA-PEG, with small and attenuated peaks that corresponded to those that appeared in the drug diffraction pattern (Figure 4B).

The formation of new bonds was not observed. Related to the dry samples by spray drying, the absorption peaks were very similar to each other and corresponded mainly to the surfactant (PVA) (Figure 4C).

(A)

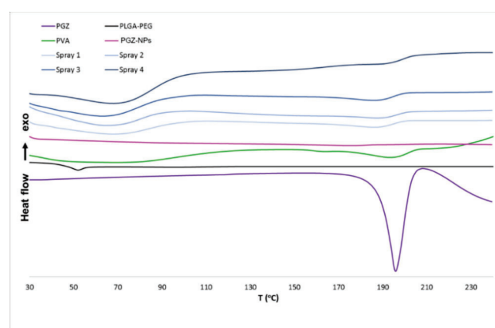


Figure 4. Cont.

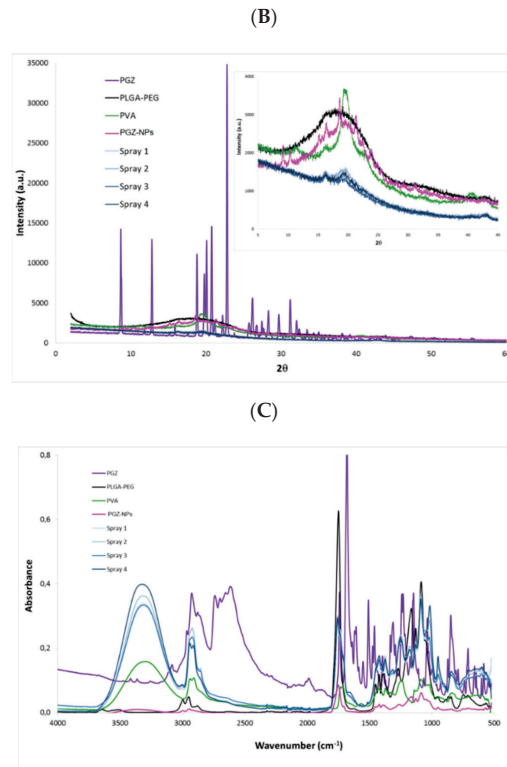


Figure 4. Interaction studies for PGZ-NPs. (A) Differential Scanning Calorimetry, (B) X-ray diffraction patterns, (C) FTIR spectra.

### 3.4. Release Profile

The release of PGZ from PGZ-NPs and from the nanoparticle-based dry powder coming from the spray drying process was evaluated before (Figure 5A) and after resuspension in water (Figure 5B). Different kinetic models were applied to evaluate the best kinetic profile for both cases (Supplementary Materials, Table S1). PGZ-NPs showed an AIC value of 13.20 and  $r^2$  of 0.99, adjusting well to the Korsmeyer–Peppas kinetic profile. After the drying process of the four formulations, the Spray 2 formulation was selected based on the similar kinetic profile and parameters before drying. The Spray 2 formulation showed values for AIC and  $r^2$  of 46.02 and 0.99, respectively. Moreover, it adjusted to Korsmeyer–Peppas kinetic profile.

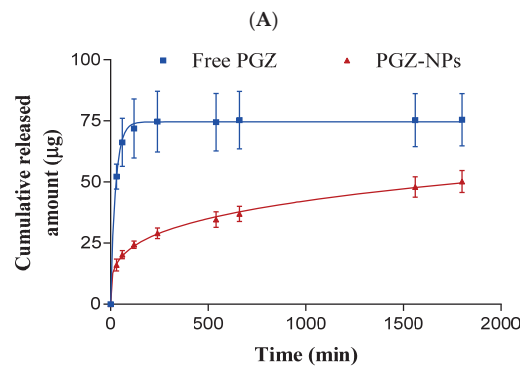


Figure 5. Cont.



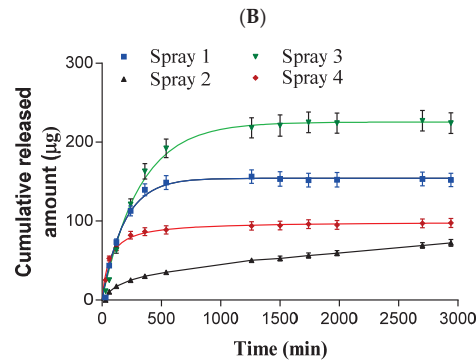


Figure 5. Release profile of PGZ-NPs before (A) and after (B) the spray drying process ( $n = 6$ ).

### 3.5. Ex Vivo Permeation Studies

Regarding the scleral tissue, PGZ-NPs and the Spray 2 formulation fitted to hyperbola and first order profiles, respectively (Figure 6A). PGZ-NPs showed a maximum quantity released ( $B_{max}$ ) of  $8.30 \mu\text{g}$  and a retained quantity ( $Q_{ret}$ ) in the tissue of  $945.32 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . The profile for the Spray 2 formulation was a conventional infinite dose, showing a flow penetration ( $J$ ) of  $1.40 \mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  and a latency period ( $T_L$ ) of 1.82 h. Moreover, a retained amount ( $Q_{ret}$ ) of  $584.85 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  was lower than PGZ-NPs.

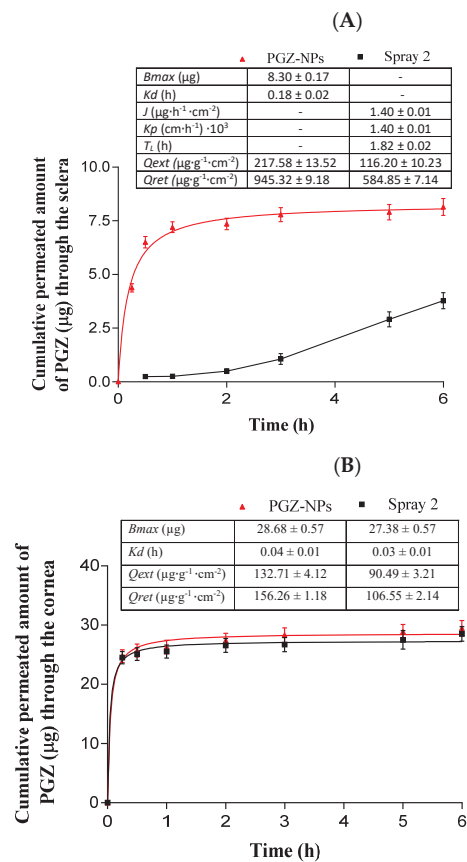


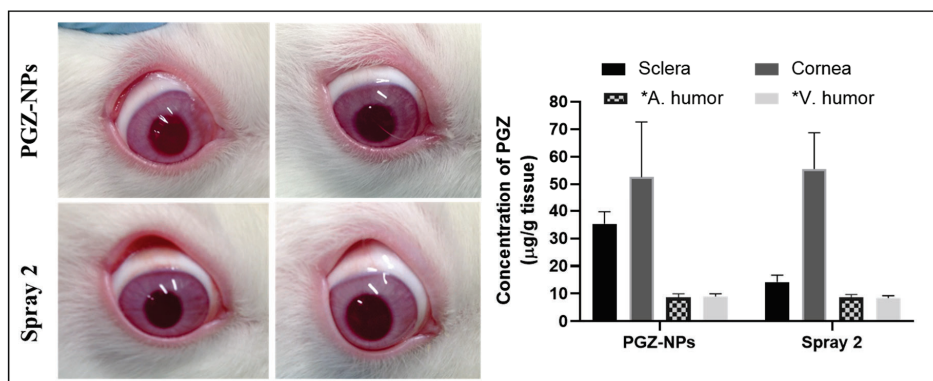
Figure 6. Permeation studies of PGZ-NPs and the Spray 2 formulation in the scleral tissue (A) and corneal tissue (B). The values are expressed by mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

For the corneal tissue, the permeation profiles for both formulations were similar (Figure 6B). They showed a hyperbola profile with a  $B_{max}$  of 28.68  $\mu\text{g}$  for PGZ-NPs and 27.38  $\mu\text{g}$  for the Spray 2 formulation. The  $Q_{ret}$  values for PGZ from NPs and the Spray 2 formulation were 156.26 and 106.55  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ , respectively.

Permeated amounts of PGZ from NPs and the Spray 2 formulation at 3 h in the scleral tissue were 12.96 and 1.56  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , respectively. In the case of the corneal tissue, at the same time they were 39.84 and 39.72  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , respectively.

### 3.6. In Vivo Studies and X-ray Synchrotron Corneal Analysis

Freshly prepared PGZ-NPs and Spray 2 formulation were administrated in rabbit eyes for 10 d and after that, the eyes were isolated, and the different ocular tissues were separated (Figure 7). PGZ from NPs was detected in the cornea, sclera, vitreous and aqueous humor at concentrations of  $52.57 \pm 20.11$   $\mu\text{g}/\text{g}$ ,  $35.31 \pm 4.32$   $\mu\text{g}/\text{g}$ ,  $9.06 \pm 0.90$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  and  $8.76 \pm 1.20$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. PGZ from the Spray 2 formulation was detected in the same tissues, with concentrations in cornea, vitreous and aqueous humor of  $55.47 \pm 13.26$   $\mu\text{g}/\text{g}$ ,  $8.46 \pm 0.82$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and  $8.70 \pm 1.00$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. A lesser concentration, 14.26  $\mu\text{g}/\text{g}$ , was found in scleral tissue.

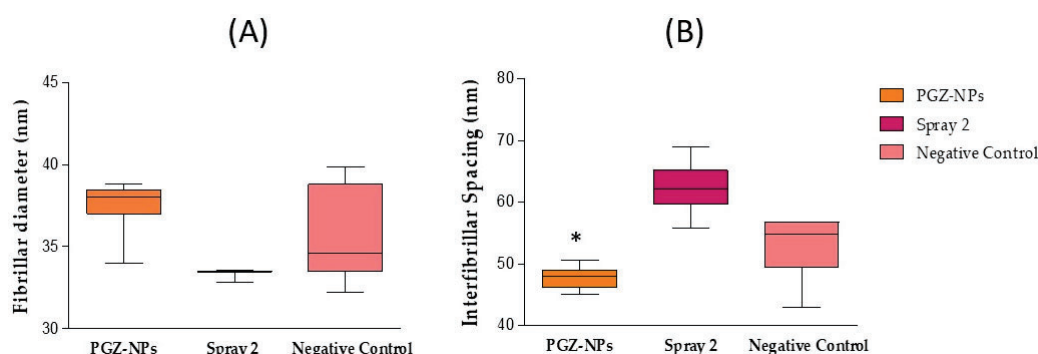


**Figure 7.** Bioavailability study. Levels of PGZ after 10 d of administration of PGZ-NPs and the Spray 2 formulation.

\* Vitreous Humor and Aqueous Humor: data are expressed as  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The values are expressed by mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

After the *in vivo* study, the corneal tissue was also evaluated by X-ray synchrotron analysis. The data obtained are the mean of 35 points in each cornea in the treatment groups. Both corneas for each treatment group were taken from the same animal in order to discard genetic factors in the analysis of data. Figure 8A,B represent the obtained values of fibrillar diameter and interfibrillar spacing of the collagen for each treatment, in box and whisker plots, respectively.

The cornea treated with PGZ-NPs showed an average value for collagen fibrillar diameter of  $37.7 \pm 0.8$  nm. For treatment with the Spray 2 formulation the average value was  $33.5 \pm 0.1$  nm, and  $37.6 \pm 1.9$  nm in the untreated cornea (negative control). The interfibrillar spacing was  $47.7 \pm 1.5$  nm for PGZ-NPs treatment,  $62.2 \pm 0.3$  nm for the Spray 2 formulation treatment, and  $52.8 \pm 4.4$  for the untreated cornea (Figure 8). The parametric, as well as the non-parametric ANOVA tests, revealed no significant differences in the fibrillar diameter between untreated and PGZ-NP treatment ( $p > 0.05$ ). The same test was applied to the interfibrillar spacing and showed significant differences between PGZ-NPs and the Spray 2 formulation. The corneal treatment with the Spray 2 formulation showed a decrease in the fibrillar diameter with respect to the untreated eye and the treated eye with PGZ-NPs not previously dried.



**Figure 8.** SAXS corneal synchrotron analysis. Collagen fibrillar diameter (A) and collagen interfibrillar spacing (B) ( $n = 2$ ) (\*  $p < 0.05$ ).

Although no explanation for this behavior was deduced in this study, we can conclude that the cornea was not damaged by the treatment with PGZ-NPs or the Spray 2 formulation since the values found for interfibrillar spacing and fibrillar diameter showed that the cornea did not lose its properties.

### 3.7. Stability Studies

Long time stability was determined using Turbiscan Formulation Lab ®(Formulation, Toulouse, France) for PGZ-NPs and the Spray 2 formulation over 6 months at 4 °C. Figure 8 shows that both formulations were stable over this time since fluctuation in backscattering signals was lower than 10% [40,65].

## 4. Discussion

PGZ-NPs were successfully developed by factorial design  $2^3$  and synthesized with high-performance using the nanoprecipitation method [57]. Based on the physicochemical characteristics of these systems (see Table 1), formulation number 8 was selected. These NPs showed an adequate size (247.22 nm), low PI (0.17), and a high percentage of EE (around 90%). PLGA-PEG is a very useful polymer to encapsulate different components, such as lipophilic and hydrophilic drugs and proteins [18,66,67]. The selected PGZ-NPs were stabilized under four different conditions of drying using Nano Spray Dryer B-90. This technique was applied to encapsulate drugs, preserving the included compound and also improving the % EE [31]. TEM and SEM images showed spherical and monodisperse particles before and after the spray drying process (Figure 2, Figure S1 and Figure 3, respectively).

Regarding the interaction's studies, DSC analysis showed a decrease in the  $T_g$  when the PEG was linked to the PLGA [68]. The decrease value after the incorporation of the PEG was due to a plasticizing effect based on the reduction of the attractive forces between the polymer chains [68]. The thermogram of the PGZ-NPs did not show the drug fusion, which indicated that the PGZ was inside the particles in the form of a molecular dispersion or in a solid solution (Figure 4A) [68]. Nevertheless, in the DSC analysis of the samples (Spray 1, Spray 2, Spray 3, and Spray 4) it was not possible to observe the effects of the drying process on the  $T_g$ , or the effect that the drying process could have had on the drug. This was due to the fact that the PVA was not removed in the drying process, and its signal appeared to overshadow the other signals. For that reason, X-ray and FTIR were carried out to corroborate these data.

The X-ray diffraction profiles showed that PGZ had a crystalline structure unlike the polymer, the surfactant, the PGZ-NPs, and spray formulations, which showed an amorphous structure. These results indicated that when the PGZ was loaded in the form of NPs, it showed a similar polymer profile (Figure 4B). These results agreed with previous studies [30,40,52,69,70]. The different drying conditions were not reflected in the X-ray diffraction profiles since they were similar, basically corresponding to the PVA profile as seen in Figure 4B. These results agreed with those obtained by DSC.

Regarding FTIR analysis, the formation of new covalent bonds was not observed (Figure 4C). These results were in accordance with other authors [30,45]. Related to the drying formulation, the absorption peaks were very similar and corresponded mainly to the surfactant, as in the previous cases.

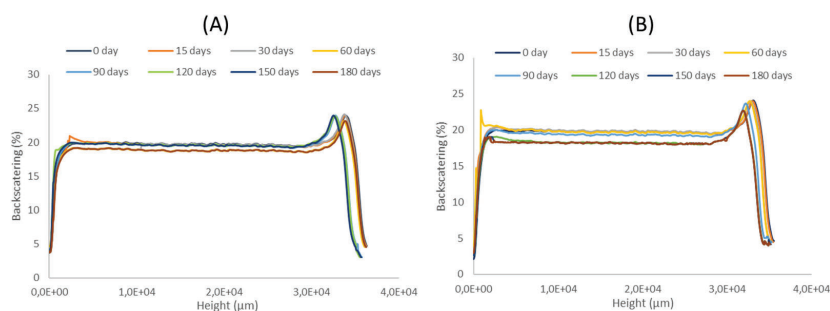
Furthermore, for the release profile, PGZ-NPs before drying showed an AIC of 13.20 and sustained release up to 30 h (Figure 5A). After drying the four spray formulations, the most similar release profile with respect to the previous one was the Spray 2 formulation (Figure 5B). PGZ-NPs before and after drying showed a sustained and slow profile, and both fitted to the Korsmeyer–Peppas kinetic model (Supplementary Materials Table S1). These results were in accordance with previous studies using similar polymers [68,71].

Parameters for *ex vivo* permeation in corneal and scleral tissue were determined (Figure 6). As shown in Figure 6A, PGZ-NPs before drying showed higher values for  $Q_{ret}$  and  $Q_t$  ( $946.32 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  and  $12.96 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , respectively). However, at 6 h when the flow was in steady state, the Spray 2 formulation increased the  $Q_t$  value to almost double with respect to PGZ-NPs. These results were in accordance with previous data [40,45,52,70] suggesting that these formulations could be used for the posterior pole. Nevertheless, for the corneal tissue (Figure 6B), the  $Q_{ret}$  was higher before drying, while the  $Q_t$  values at 3 h for both formulations were very similar, showing values around  $40 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  and a  $Kd$  around 0.04 h, indicating that both formulations could have similar therapeutic effects in the anterior pole of the eye.

After 10 d of topical application of PGZ-NPs and the Spray 2 formulation (0.05 mL/eye/day), PGZ was detected in different ocular tissues, including cornea, sclera, aqueous, and vitreous humors (Figure 7). Similar values for PGZ were found in the corneal tissue before and after the drying process, indicating that the spray drying process did not compromise the PGZ permeation through the tissue. However, for the scleral tissue, a decrease in the PGZ value was observed when using the aqueous suspension of NPs-based dried powder. Nevertheless, it did not compromise its effectiveness. These data correlated with those obtained in *ex vivo* corneal and scleral permeation studies [40,52].

The corneal tissue was analyzed by SAXS with synchrotron light to observe if, after *in vivo* application of PGZ-NPs and the Spray 2 formulation, the collagen had been damaged. Given the variability in the data of the fibrillar diameter and the interfibrillar spacing of collagen between treated and untreated eyes, it was possible to observe that PGZ-NPs before and after the spray drying process did not produce significant changes in the physical properties of collagen in the cornea with respect to the negative control (Figure 8) and hence, the corneal ultrastructure was not damaged post-treatment.

Regarding the stability of these systems, PGZ-NPs and the Spray 2 formulation were studied for 6 months at 4 °C (Figure 9). Both formulations were shown to be stable under those conditions and did not present a significant variation in the percentage of backscattering. These results were in accordance with other studies in which PLGA-NPs were stable for a quite long times [40,65,72].



**Figure 9.** Backscattering profiles of colloidal suspensions at 4 °C. (A) PGZ-NPs and (B) Spray 2 formulation.

## 5. Conclusions

A comparative study was performed using PGZ-NPs before and after stabilization by the Nano Spray Dryer B-90, including *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*, and stability studies. This technique demonstrated that, the structure was physically and morphologically maintained after stabilization. Moreover, the spray drying process did not affect the corneal bioavailability. Furthermore, the collagen structure in the corneal tissue remained intact after the treatment of rabbit eyes with PGZ-loaded PLGA-PEG NPs. The spray drying technique can be an alternative to stabilize PGZ-NPs for future therapeutic use.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics13111751/s1>, Figure S1. TEM image of Spray 2 formulation once resuspended in water. Table S1. Release kinetic parameters of PGZ-NPs before and after spraying.

**Author Contributions:** M.S.-A. conceived, carried out the experiments, wrote and edited the paper; E.M. wrote the introduction, helped with the synchrotron and HPLC analysis, and contributed to the revision of the manuscript; C.S.K.-L. participated in synchrotron data analysis and supervised the related sections; M.E. helped with factorial design and interactions studies; M.L.G. helped with supervision of the development and characterization of the nanoparticles; A.C.C. supervised and designed the *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* studies. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Juan Carlos Martinez and Alba Synchrotron Radiation Source (Cerdanyola, Barcelona, Spain) for help with synchrotron measurements. Moreover, M.S.-A. would like to acknowledge Coordenação Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brasil) for the support.

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

## References

1. Hans, M.; Lowman, A. A dual-responsive mesoporous silica nanoparticle for tumor-triggered targeting drug delivery for drug delivery and targeting. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2002**, *6*, 319–327. [[CrossRef](#)]
2. Kumari, A.; Yadav, S.K.; Yadav, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, *75*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Patra, J.K.; Das, G.; Fraceto, L.F.; Campos, E.V.R.; Rodriguez-Torres, M.D.P.; Acosta-Torres, L.S.; Diaz-Torres, L.A.; Grillo, R.; Swamy, M.K.; Sharma, S.; et al. Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnol.* **2018**, *16*, 1–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Jacob, J.; Haponiuk, J.; Thomas, S.; Gopi, S. Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review. *Mater. Today Chem.* **2018**, *9*, 43–55. [[CrossRef](#)]
5. De Jong, W.H.; Borm, P.J.A. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int. J. Nanomed.* **2008**, *3*, 133–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Jin, Z.; Gao, S.; Cui, X.; Sun, D.; Zhao, K. Adjuvants and delivery systems based on polymeric nanoparticles for mucosal vaccines. *Int. J. Pharm.* **2019**, *572*, 118731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Kim, K.-T.; Lee, J.-Y.; Kim, D.-D.; Yoon, I.-S.; Cho, H.-J. Recent Progress in the Development of Poly (lactic-co-glycolic acid)-Based Nanostructures for Cancer Imaging and Therapy. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Nagaraju, G.P.; Srivani, G.; Dariya, B.; Chalikonda, G.; Farran, B.; Behera, S.K.; Alam, A.; Kamal, M.A. Nanoparticles guided drug delivery and imaging in gastric cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2020**, *69*, 69–76. [[CrossRef](#)]
9. Su, S.; Kang, P.M. Systemic Review of Biodegradable Nanomaterials in Nanomedicine. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 656. [[CrossRef](#)]
10. Tornesello, A.L.; Tagliamonte, M.; Tornesello, M.L.; Buonaguro, F.M.; Buonaguro, L. Nanoparticles to Improve the Efficacy of Peptide-Based Cancer Vaccines. *Cancers* **2020**, *12*, 1049. [[CrossRef](#)]
11. Mir, M.; Ahmed, N.; Rehman, A.U. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**, *159*, 217–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Danhier, F.; Ansorena, E.; Silva, J.M.; Coco, R.; Le Breton, A.; Préat, V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J. Control. Release* **2012**, *161*, 505–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Li, T.; Liang, W.; Xiao, X.; Qian, Y. Nanotechnology, an alternative with promising prospects and advantages for the treatment of cardiovascular diseases. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 7349–7362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Rezvantalab, S.; Drude, N.; Moraveji, M.K.; Güvener, N.; Koons, E.K.; Shi, Y.; Lammers, T.; Kiessling, F. PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Xu, Q.; Ensign, L.M.; Boylan, N.J.; Schön, A.; Gong, X.; Yang, J.-C.; Lamb, N.W.; Cai, S.; Yu, T.; Freire, E.; et al. Impact of Surface Polyethylene Glycol (PEG) Density on Biodegradable Nanoparticle Transport in Mucus *ex Vivo* and Distribution *in Vivo*. *ACS Nano* **2015**, *9*, 9217–9227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Gref, R.; Domb, A.J.; Quellec, P.; Blunk, T.; Müller, R.; Verbavatz, J.; Langer, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 316–326. [[CrossRef](#)]
17. Owens, D.E.; Peppas, N.A. Oponization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2006**, *307*, 93–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Locatelli, E.; Franchini, M.C. Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: Synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system. *J. Nanoparticle Res.* **2012**, *14*, 1–17. [[CrossRef](#)]
19. Davis, M.; Walker, G. Recent strategies in spray drying for the enhanced bioavailability of poorly water-soluble drugs. *J. Control. Release* **2018**, *269*, 110–127. [[CrossRef](#)]
20. Fonte, P.; Reis, S.; Sarmiento, B. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *J. Control. Release* **2016**, *225*, 75–86. [[CrossRef](#)]
21. Ziaee, A.; Albadarin, A.; Padrela, L.; Femmer, T.; O'Reilly, E.; Walker, G. Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: Critical parameters and experimental process optimization approaches. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *127*, 300–318. [[CrossRef](#)]
22. Magri, G.; Franzé, S.; Musazzi, U.M.; Selmin, F.; Cilurzo, F. Maltodextrins as drying auxiliary agent for the preparation of easily resuspendable nanoparticles. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, *50*, 181–187. [[CrossRef](#)]
23. Ribeiro, R.F.; Motta, M.H.; Härter, A.P.G.; Flores, F.C.; Beck, R.; Schaffazick, S.R.; Silva, C.D.B.D. Spray-dried powders improve the controlled release of antifungal tioconazole-loaded polymeric nanocapsules compared to with lyophilized products. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *59*, 875–884. [[CrossRef](#)]
24. Kamiya, S.; Nakashima, K. Physicochemical interaction mechanism between nanoparticles and tetrasaccharides (stachyose) during freeze-drying. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2017**, *43*, 2026–2031. [[CrossRef](#)]
25. Pandey, P.; Dua, K.; Dureja, H. Erlotinib loaded chitosan nanoparticles: Formulation, physicochemical characterization and cytotoxic potential. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *139*, 1304–1316. [[CrossRef](#)]
26. Ding, S.; Serra, C.A.; Anton, N.; Yu, W.; Vandamme, T.F. Production of dry-state ketoprofen-encapsulated PMMA NPs by coupling micromixer-assisted nanoprecipitation and spray drying. *Int. J. Pharm.* **2018**, *558*, 1–8. [[CrossRef](#)]
27. Booyzen, L.; Kalombo, L.; Brooks, E.; Hansen, R.; Gilliland, J.; Gruppo, V.; Lungenhofer, P.; Semete-Makokotlela, B.; Swai, H.; Kotze, A.; et al. *In vivo*/in vitro pharmacokinetic and pharmacodynamic study of spray-dried poly-(dl-lactic-co-glycolic) acid nanoparticles encapsulating rifampicin and isoniazid. *Int. J. Pharm.* **2013**, *444*, 10–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Abdelwahed, W.; Degobert, G.; Stainmesse, S.; Fessi, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1688–1713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Wang, L.; Ma, Y.; Gu, Y.; Liu, Y.; Zhao, J.; Yan, B.; Wang, Y. Cryoprotectant choice and analyses of freeze-drying drug suspension of nanoparticles with functional stabilisers. *J. Microencapsul.* **2018**, *35*, 241–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Yacasi, G.R.R.; Campmany, A.C.C.; Gras, M.A.E.; García, M.E.; López, M.L.G. Freeze drying optimization of polymeric nanoparticles for ocular flurbiprofen delivery: Effect of protectant agents and critical process parameters on long-term stability. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2017**, *43*, 637–651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Arpagaus, C. PLA/PLGA nanoparticles prepared by nano spray drying. *J. Pharm. Investig.* **2019**, *49*, 405–426. [[CrossRef](#)]
32. Arpagaus, C.; Collenberg, A.; Rütli, D.; Assadpour, E.; Jafari, S.M. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* **2018**, *546*, 194–214. [[CrossRef](#)]
33. Gharsallaoui, A.; Roudaut, G.; Chambin, O.; Voilley, A.; Saurel, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.* **2007**, *40*, 1107–1121. [[CrossRef](#)]
34. Sosnik, A.; Seremeta, K. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *223*, 40–54. [[CrossRef](#)]
35. Salama, A.H. Spray drying as an advantageous strategy for enhancing pharmaceuticals bioavailability. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2019**, *10*, 1–12. [[CrossRef](#)]
36. Singh, A.; Mooter, G.V.D. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *100*, 27–50. [[CrossRef](#)]
37. De Mohac, L.M.; Raimi-Abraham, B.; Caruana, R.; Gaetano, G.; Licciardi, M. Multicomponent solid dispersion a new generation of solid dispersion produced by spray-drying. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *57*, 101750. [[CrossRef](#)]
38. Bachu, R.D.; Chowdhury, P.; Al-Saedi, Z.H.F.; Karla, P.K.; Boddu, S.H.S. Ocular Drug Delivery Barriers—Role of Nanocarriers in the Treatment of Anterior Segment Ocular Diseases. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Ghafoorianfar, S.; Ghorani-Azam, A.; Mohajeri, S.A.; Farzin, D. Efficiency of nanoparticles for treatment of ocular infections: Systematic literature review. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *57*, 101765. [[CrossRef](#)]

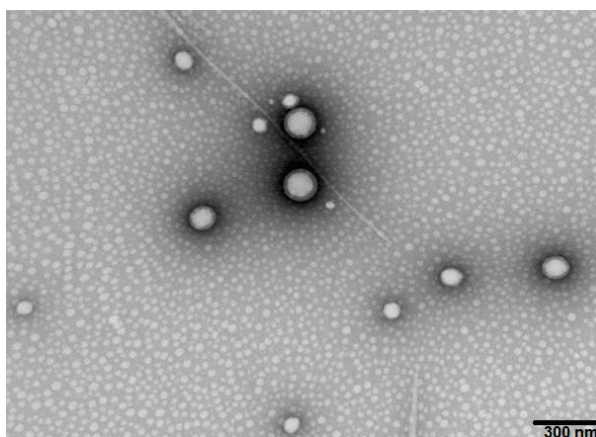
40. Gonzalez-Pizarro, R.; Silva-Abreu, M.; Calpena, A.C.; Egea, M.A.; Espina, M.; García, M.L. Development of fluorometholone-loaded PLGA nanoparticles for treatment of inflammatory disorders of anterior and posterior segments of the eye. *Int. J. Pharm.* **2018**, *547*, 338–346. [CrossRef] [PubMed]
41. Guo, D.; Li, Q.; Sun, Y.; Guo, J.; Zhao, Q.; Yin, X.; Wei, H.; Wu, S.; Bi, H. Evaluation of controlled-release triamcinolone acetone-loaded mPEG-PLGA nanoparticles in treating experimental autoimmune uveitis. *Nanotechnology* **2019**, *30*, 165702. [CrossRef] [PubMed]
42. Güven, U.M.; Yenilmez, E. Olopatadine hydrochloride loaded Kollidon® SR nanoparticles for ocular delivery: Nanosuspension formulation and *in vitro*–*in vivo* evaluation. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, *51*, 506–512. [CrossRef]
43. Sah, A.K.; Suresh, P.K.; Verma, V.K. PLGA nanoparticles for ocular delivery of loteprednol etabonate: A corneal penetration study. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2016**, *45*, 1156–1164. [CrossRef] [PubMed]
44. Cañadas, C.; Alvarado, H.; Calpena, A.C.; Silva, A.M.; Souto, E.B.; García, M.L.; Abrego, G. *In vitro*, *ex vivo* and *in vivo* characterization of PLGA nanoparticles loading pranoprofen for ocular administration. *Int. J. Pharm.* **2016**, *511*, 719–727. [CrossRef] [PubMed]
45. Abrego, G.; Alvarado, H.; Souto, E.B.; Guevara, B.; Bellows, L.H.; Parra, A.; Calpena, A.C.; Garcia, M.L. Biopharmaceutical profile of pranoprofen-loaded PLGA nanoparticles containing hydrogels for ocular administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *95*, 261–270. [CrossRef]
46. Silva-Abreu, M.; Espinoza, L.C.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Fabrega, M.J.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Human Skin Permeation Studies with PPAR $\gamma$  Agonist to Improve Its Permeability and Efficacy in Inflammatory Processes. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2548. [CrossRef]
47. Kanemaru, M.; Asai, J.; Jo, J.-I.; Arita, T.; Kawai-Ohnishi, M.; Tsutsumi, M.; Wada, M.; Tabata, Y.; Katoh, N. Nanoparticle-mediated local delivery of pioglitazone attenuates bleomycin-induced skin fibrosis. *J. Dermatol. Sci.* **2019**, *93*, 41–49. [CrossRef]
48. Silva-Abreu, M.; Gonzalez-Pizarro, R.; Espinoza, L.C.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Thiazolidinedione as an alternative to facilitate oral administration in geriatric patients with Alzheimer’s disease. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *129*, 173–180. [CrossRef]
49. Tokutome, M.; Matoba, T.; Nakano, Y.; Okahara, A.; Fujiwara, M.; Koga, J.-I.; Nakano, K.; Tsutsui, H.; Egashira, K. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma targeting nanomedicine promotes cardiac healing after acute myocardial infarction by skewing monocyte/macrophage polarization in preclinical animal models. *Cardiovasc. Res.* **2018**, *115*, 419–431. [CrossRef]
50. Jojo, G.M.; Kuppusamy, G.; De, A.; Karri, V.V.S.N.R. Formulation and optimization of intranasal nanolipid carriers of pioglitazone for the repurposing in Alzheimer’s disease using Box-Behnken design. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2019**, *45*, 1061–1072. [CrossRef]
51. Okunuki, Y.; Usui, Y.; Nakagawa, H.; Tajima, K.; Matsuda, R.; Ueda, S.; Hattori, T.; Kezuka, T.; Goto, H. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist pioglitazone suppresses experimental autoimmune uveitis. *Exp. Eye Res.* **2013**, *116*, 291–297. [CrossRef]
52. Silva-Abreu, M.; Calpena, A.C.; Espina, M.; Silva, A.M.; Gimeno, A.; Egea, M.A.; García, M.L. Optimization, Biopharmaceutical Profile and Therapeutic Efficacy of Pioglitazone-loaded PLGA-PEG Nanospheres as a Novel Strategy for Ocular Inflammatory Disorders. *Pharm. Res.* **2018**, *35*, 11. [CrossRef]
53. Uchiyama, M.; Shimizu, A.; Masuda, Y.; Nagasaka, S.; Fukuda, Y.; Takahashi, H. An ophthalmic solution of a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist prevents corneal inflammation in a rat alkali burn model. *Mol. Vis.* **2013**, *19*, 2135–2150.
54. Mehta, M. *Biopharmaceutics Classification System (BCS)*; John Wiley & Sons: New York, NY, USA, 2017; ISBN 978-1-118-47661-1.
55. Silva-Abreu, M.; Espinoza, L.C.; Halbaut, L.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Comparative Study of *Ex Vivo* Transmucosal Permeation of Pioglitazone Nanoparticles for the Treatment of Alzheimer’s Disease. *Polymers* **2018**, *10*, 316. [CrossRef]
56. Silva-Abreu, M.; Calpena, A.C.; Andrés-Benito, P.; Aso, E.; A Romero, I.; Roig-Carles, D.; Gromnicova, R.; Espina, M.; Ferrer, I.; García, M.L.; et al. PPAR $\gamma$  agonist-loaded PLGA-PEG nanocarriers as a potential treatment for Alzheimer’s disease: *In vitro* and *in vivo* studies. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 5577–5590. [CrossRef] [PubMed]
57. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*, R1–R4. [CrossRef]
58. Li, X.; Anton, N.; Arpagaus, C.; Belleleix, F.; Vandamme, T.F. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *J. Control. Release* **2010**, *147*, 304–310. [CrossRef] [PubMed]
59. Heng, D.; Lee, S.H.; Ng, W.K.; Tan, R.B.H. The nano spray dryer B-90. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2011**, *8*, 965–972. [CrossRef] [PubMed]
60. Berghof Easy H<sub>2</sub>O. (Berghof Products+Instruments GmbH). Available online: <https://www.lambda-at.com/pdf/easyH2O.pdf> (accessed on 5 October 2021).
61. Yamaoka, K.; Nakagawa, T.; Uno, T. Application of Akaike’s information Criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **1978**, *6*, 165–175. [CrossRef] [PubMed]
62. Miralles-Cardiel, E.; Silva-Abreu, M.; Calpena, A.; Casals, I. Development and Validation of an HPLC–MS/MS Method for Pioglitazone from Nanocarriers Quantitation in *Ex Vivo* and *In Vivo* Ocular Tissues. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 650. [CrossRef]
63. Abass, A.; Bell, J.S.; Spang, M.T.; Hayes, S.; Meek, K.M.; Boote, C. SAXS4COLL: An integrated software tool for analysing fibrous collagen-based tissues. *J. Appl. Crystallogr.* **2017**, *50*, 1235–1240. [CrossRef]

64. Chaubal, M.V.; Popescu, C. Conversion of Nanosuspensions into Dry Powders by Spray Drying: A Case Study. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2302–2308. [[CrossRef](#)]
65. López, E.S.; Egea, M.; Cano, A.; Espina, M.; Calpena, A.C.; Ettcheto, M.; Camins, A.; Souto, E.; Silva, A.; García, M. PEGylated PLGA nanospheres optimized by design of experiments for ocular administration of dexibuprofen—In vitro, ex vivo and in vivo characterization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *145*, 241–250. [[CrossRef](#)]
66. Ghitman, J.; Biru, E.I.; Stan, R.; Iovu, H. Review of hybrid PLGA nanoparticles: Future of smart drug delivery and theranostics medicine. *Mater. Des.* **2020**, *193*, 108805. [[CrossRef](#)]
67. Lee, P.W.; Pokorski, J.K. Poly(lactic-co-glycolic acid) devices: Production and applications for sustained protein delivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnology* **2018**, *10*, 1516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Vega, E.; Egea, M.A.; Calpena, A.C.; Espina, M.; García, M.L. Role of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on freeze-dried and gamma-irradiated PLGA and PLGA-PEG diblock copolymer nanospheres for ophthalmic flurbiprofen delivery. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 1357–1371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Rincón, M.; Calpena, A.C.; Fabrega, M.-J.; Garduño-Ramírez, M.L.; Espina, M.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; García, M.L.; Abrego, G. Development of Pranoprofen Loaded Nanostructured Lipid Carriers to Improve Its Release and Therapeutic Efficacy in Skin Inflammatory Disorders. *Nanomaterials* **2018**, *8*, 1022. [[CrossRef](#)]
70. Parra, A.; Mallandrich, M.; Clares, B.; Egea, M.A.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Bioin-terfaces Design and elaboration of freeze-dried PLGA nanoparticles for the transcorneal permeation of carprofen: Ocular anti-inflammatory applications. *Colloids Surf. B* **2015**, *136*, 935–943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Sánchez-López, E.; Esteruelas, G.; Ortiz, A.; Espina, M.; Prat, J.; Muñoz, M.; Cano, A.; Calpena, A.C.; Ettcheto, M.; Camins, A.; et al. Dexibuprofen Biodegradable Nanoparticles: One Step Closer towards a Better Ocular Interaction Study. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 720. [[CrossRef](#)]
72. Abrego, G.; Alvarado, H.L.; Egea, M.A.; Gonzalez-Mira, E.; Calpena, A.C.; Garcia, M.L. Design of Nanosuspensions and Freeze-Dried PLGA Nanoparticles as a Novel Approach for Ophthalmic Delivery of Pranoprofen. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103*, 3153–3164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



## Supplementary Materials: Stabilization by Nano Spray Dryer of Pioglitazone Polymeric Nanosystems: Development, In Vivo, Ex Vivo and Synchrotron Analysis.

Marcelle Silva-Abreu\*, Esther Miralles, Christina S. Kamma-Lorger, Marta Espina, Maria Luisa García and Ana Cristina Calpena



**Figure S1.** TEM image of Spray 2 formulation once resuspended in water.

**Table S1.** Release kinetic parameters of PGZ-NPs before and after spraying.

Kinetics Models	Equation	Parameters	Before spray	
			PGZ-NPs	Free PGZ
One exponential association	$Q_t = Q_\infty \cdot (1 - e^{-K \cdot t})$	AIC	-	16.79
		$r^2$	-	0.99
Korsmeyer Peppas	$Q_t = K \cdot t^n$	AIC	13.20	-
		$r^2$	0.99	-
<b>After spray</b>				
One exponential association	$Q_t = Q_\infty \cdot (1 - e^{-K \cdot t})$	AIC	Spray 1	64.85
		$r^2$		0.99
Korsmeyer Peppas	$Q_t = K \cdot t^n$	AIC	Spray 2	46.02
		$r^2$		0.99
One exponential association	$Q_t = Q_\infty \cdot (1 - e^{-K \cdot t})$	AIC	Spray 3	65.94
		$r^2$		0.99
Hyperbola	$Q_t = Q_\infty \cdot t / (Kd + t)$	AIC	Spray 4	43.66
		$r^2$		0.99

$Q_t$  = cumulative amount of drug release at time  $t$ ;  $Q_\infty$  = maximum amount of drug released;  $K_0$ ,  $K$  = release rate constants;  $t$  = time in hours;  $Kd$  = dissolution time;  $n$  is the diffusion release exponent that can be used to characterize the different release mechanisms;  $r^2$  = determination coefficient; AIC = Akaike's information criterion.



### 3.3. Article 3

#### Assessment of Efficacy and Safety Using PPAR- $\gamma$ Agonist-Loaded Nanocarriers for Inflammatory Eye Diseases.

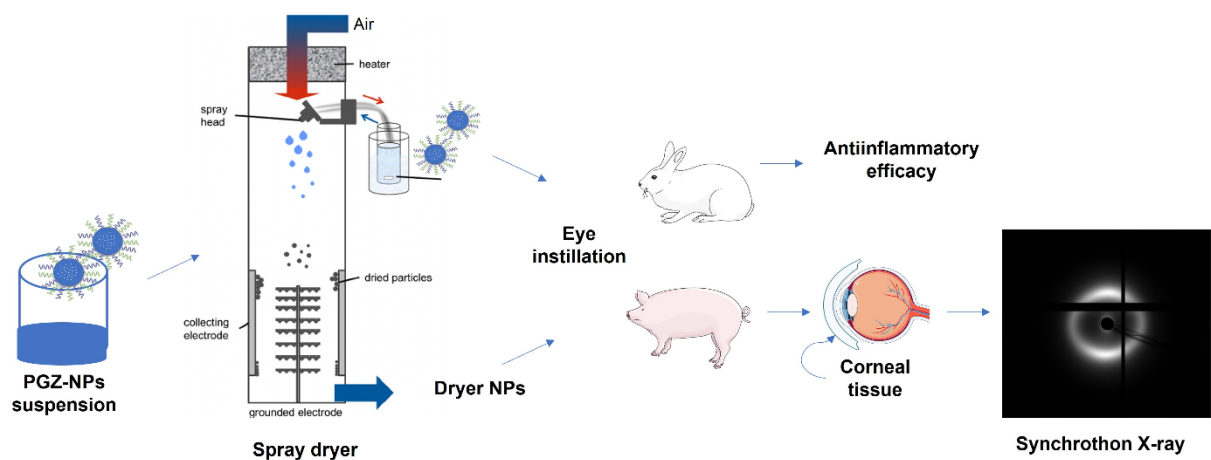
Esther Miralles, Christina S. Kamma-Lorger, Òscar Domènech, Lilian Sosa, Isidre Casals, Ana Cristina Calpena i Marcelle Silva-Abreu

International Journal of Molecular Sciences (Int. J. Mol. Sci. **2022**, *23*, 11184)

<https://doi.org/10.3390/ijms231911184>

Quartil Q1; factor d'impacte 6.208 els anys 2022-2023.

#### Resum gràfic







Article

# Assessment of Efficacy and Safety Using PPAR- $\gamma$ Agonist-Loaded Nanocarriers for Inflammatory Eye Diseases

Esther Miralles <sup>1</sup>, Christina S. Kamma-Lorger <sup>2</sup>, Òscar Domènech <sup>3,4</sup> , Lilian Sosa <sup>5</sup>, Isidre Casals <sup>1</sup>, Ana Cristina Calpena <sup>3,4</sup> and Marcelle Silva-Abreu <sup>3,4,\*</sup>

- <sup>1</sup> CCI TUB (Scientific and Technological Centers), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain  
<sup>2</sup> Scattering Group, ANSTO Australian Synchrotron, Clayton, VIC 3168, Australia  
<sup>3</sup> Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain  
<sup>4</sup> Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain  
<sup>5</sup> Pharmaceutical Technology Research Group, Faculty of Chemical Sciences and Pharmacy, National Autonomous University of Honduras (UNAH), Tegucigalpa 11101, Honduras  
\* Correspondence: silvadeabreu@ub.edu; Tel.: +34-93-402-4578

**Abstract:** Drug-loaded nanocarriers (NCs) are new systems that can greatly improve the delivery and targeting of drugs to specific tissues and organs. In our work, a PPAR- $\gamma$  agonist loaded into polymeric NCs was prepared, stabilized by spray-drying, and tested *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* (animal models) to provide a safe formulation for optical anti-inflammatory treatments. The NCs were shown to be well tolerated, and no signs of irritancy or alterations of the eye properties were detected by the *in vitro* HET-CAM test and *in vivo* Draize test. Furthermore, no signs of cytotoxicity were found in the NC formulations on retinoblastoma cells (Y-79) analyzed using the alamarBlue assay, and the transmittance experiments evidenced good corneal transparency with the formulations tested. The ocular anti-inflammatory study confirmed the significant prevention efficacy using the NCs, and these systems did not affect the corneal tissue structure. Moreover, the animal corneal structure treated with the NCs was analyzed using X-ray diffraction using synchrotron light. Small-angle X-ray scattering (SAXS) analysis did not show a significant difference in corneal collagen interfibrillar spacing after the treatment with freshly prepared NCs or NCs after the drying process compared to the corresponding negative control when inflammation was induced. Considering these results, the PPAR- $\gamma$  agonist NCs could be a safe and effective alternative for the treatment of inflammatory ocular processes.

**Keywords:** PPAR- $\gamma$  agonist; polymeric nanocarriers; eye inflammation; ocular efficacy; corneal tissue



**Citation:** Miralles, E.; Kamma-Lorger, C.S.; Domènech, Ò.; Sosa, L.; Casals, I.; Calpena, A.C.; Silva-Abreu, M. Assessment of Efficacy and Safety Using PPAR- $\gamma$  Agonist-Loaded Nanocarriers for Inflammatory Eye Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 11184. <https://doi.org/10.3390/ijms231911184>

Academic Editor: Stefano Loporatti

Received: 2 August 2022

Accepted: 19 September 2022

Published: 23 September 2022

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



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

## 1. Introduction

The human cornea consists of five layers: the epithelium, Bowman's layer, stroma, Descemet's layer, and endothelium, with the stroma constituting about 90% of the thickness of the cornea. The stroma consists mainly of collagen and cells, and it is responsible for the transparency of the cornea. However, in 2013, a sixth layer was discovered, which was named Dua's layer [1]. This layer is a well-defined, tough acellular lining, only 10  $\mu\text{m}$  to 15  $\mu\text{m}$  thick, sandwiched between the corneal stroma and Descemet's membrane [2].

If the ordered collagen structure of the cornea is disrupted, such as in the case of inflammation, caused by injury or disease, the cornea becomes opaque, and the normal visual function is put at risk. Therefore, it is very important to find medical agents that are capable of recovering the normal structure of the cornea [3,4].

The mechanical strength of the cornea, together with its refractive index and transparency, is directly related to the collagen arrangement in its lamellar structure, which contains long collagen fibrils of uniform diameter. Small-angle X-ray scattering (SAXS) and wide-angle X-ray scattering (WAXS) techniques have been widely used to study collagen

ultrastructure in the cornea and to observe differences between healthy and diseased tissue. They have been proven valuable tools in evaluating structural changes in the tissue [5]. SAXS allows the measurement of the average fibril center-to-center spacing (interfibrillar spacing) and fibril diameter [6]. WAXS allows the calculation of the collagen intermolecular spacing and the orientation of corneal collagen fibrils [7–9].

Pioglitazona (PZ) is a drug used to treat type 2 diabetes by enhancing insulin sensitivity [10], acting as an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- $\gamma$ ), a nuclear receptor that regulates glucose homeostasis, lipid metabolism, and inflammation [11]. Therefore, PZ has been investigated beyond its primary use, and studies are looking into it as an anti-inflammatory, anti-arteriosclerotic, antifibrotic, or neovascularization agent [12–16].

This drug belongs to class II in the Biopharmaceutic Classification System (BCS) [17], which has poor aqueous solubility and high permeability. These factors could reduce the absorption of the drug and decrease the dissolution rate, adversely affecting the levels of the drug in blood and consequently decreasing the pharmacological activity. Different approaches have been explored to deal with the limitations of low water solubility to improve its transport [18–22].

Polymeric nanocarriers (NCs) have been developed to improve drug targeting to tissues and organs and to increase drug bioavailability across biological membranes. Poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) is a polymer approved by the FDA for its use in humans [23], and it is the most widely used vehicle in drug delivery research and therapeutic devices, due to its biodegradability and biocompatibility. PLGA must be able to deliver its payload with appropriate duration, biodistribution, and concentration for the intended therapeutic effect, loading hydrophilic and hydrophobic molecules. To promote the stability of the nanomaterials and increase the circulation time because of the ‘stealth’ effect on the macrophages, polyethylene glycol (PEG) is used in association with PLGA [24–26].

Polymeric NCs are obtained mainly as aqueous suspensions, which present stability problems during their storage, such as aggregation, hydrolysis, or drug leakage. Spray-drying technology is an alternative used for the rapid elimination of water in the fields of chemical materials, cosmetics, food, and flavor, as well as the pharmaceutical industry [27], at both laboratory and industrial scale. The dry powder obtained in dehydrating nanosuspensions, before being resuspended for use, must maintain the physicochemical properties and efficacy.

Classical ocular drug delivery systems often fail to combat diseases due to poor ocular bioavailability and low ocular residence time. Therefore, the use of polymeric nanosystems has generated interest for ophthalmic drug delivery. Recently published reviews [28–30] concerning the use of nanotherapeutic systems for the treatment of ocular diseases demonstrated that these systems improve the efficacy of drugs by increasing their penetration into the cornea. Usually, in clinical practice, ocular inflammatory disorders are treated with corticosteroids, and the field of nanoparticles is being explored as there is a need to enhance the bioavailability of these drugs [31,32]. In addition, the encapsulation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) into nanoparticles for ocular route delivery has been investigated [33,34]. Topical application of drug solutions (eye drops) is the preferred route of administration for the treatment of eye disorders [35]. These conventional dosage forms must be sterile, stable, and isotonic, and they must not create irritation or vision problems.

In previous studies, PLGA-PEG-PZ NCs were formulated, optimized and characterized physicochemically, and stabilized using the spray-drying technique [36] in order to be used in ocular diseases, but no studies have been conducted to assess the performance and safety of these NCs. A variety of techniques were used in the present study, including tolerability assays, cell toxicity, *in vivo* anti-inflammation assays, histological visualization, synchrotron SAXS analysis, and corneal transparency, to determine the ocular safety of these systems.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Physicochemical Characterization of PZ-NCs

In our previous studies, PZ-NCs of PLGA-PEG were optimized and characterized physicochemically and biopharmaceutically as a new delivery system suitable for the ocular route [36,37]. PZ-NCs were previously synthesized using the solvent displacement technique, showing a particle size of  $247.22 \pm 2.77$  nm with polydispersity index (PI) values lower than 0.2 ( $0.17 \pm 0.03$ ) and a negative charge with zeta potential (ZP) values of  $-3.34 \pm 0.42$  mV. Moreover, the percentage of PZ encapsulated (EE) was  $90.12\% \pm 1.15\%$ . To stabilize the PZ-NCs, a spray-drying process was carried out. After that, the NCs were resuspended in water, and the values found were a particle size of  $271.31 \pm 2.78$  nm, PI of approximately  $0.24 \pm 0.00$ , ZP of  $-7.57 \pm 1.53$  mV, and EE of  $89.13\% \pm 2.21\%$ . These physicochemical parameters before and after the spray-drying process were considered suitable for ocular delivery [36,37]. These parameters are in concordance with other authors for the use of polymeric systems in ocular therapies [18,28,38,39].

### 2.2. In Vitro HET-CAM Test

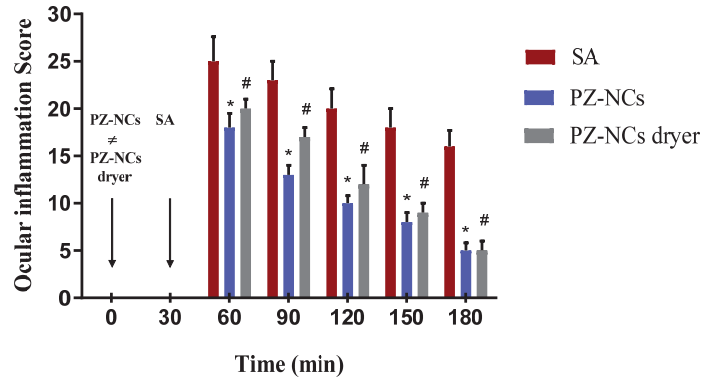
In order to evaluate the ocular tolerability of the developed formulation, the hen's egg test with a chorioallantoic membrane (HET-CAM) was carried out. The potential irritancy of compounds may be detected by observing adverse changes that occur in the CAM of the egg after exposure to test chemicals [40]. The HET-CAM test is based on the direct application of the sample into the chorioallantoic membrane and the observation of reactions such as hemorrhage, intravasal coagulation, or lysis of blood vessels. The results of the assay showed that the positive control (NaOH 0.1 M) caused severe hemorrhage, lysis, and coagulation, increasing after 5 min to become a strongly irritating solution. However, the NC formulations did not irritate the chorioallantoic membrane within 5 min of the assay (score 0), thus revealing optimal ocular tolerance (Figure S1).

### 2.3. In Vivo Ocular Tolerance (Draize Test)

The *in vivo* Draize test [41] was performed to confirm the results obtained by the HET-CAM assay. In the present work, the irritancy of the developed PZ-NCs formulations was evaluated in New Zealand white rabbits. No signs of ocular irritancy or damage were detected after PZ-NCs instillation at the studied times, with zero scores in all cases for both formulations, i.e., freshly prepared or resuspended after spray-drying (image not shown). Moreover, these results agree with previous studies developed using PLGA-NCs [42,43] and also are in concordance with the HET-CAM test confirming the nonirritant potential of PZ-loaded polymeric nanoparticles [42,43].

### 2.4. In Vivo Efficacy Assay: Anti-Inflammatory and Histological Studies

One method of evaluating the ocular anti-inflammatory efficacy of PZ-NCs formulations consists of administering the samples to rabbits 30 min before inducing inflammation with sodium arachidonate (SA). In this study, the PZ-NC formulations showed significant differences in the prevention profile in comparison to the positive control at all times tested ( $p < 0.05$ ) with a higher decrease in scores over time (Figure 1). They significantly reduced the degree of conjunctival inflammation and iris hyperemia (Figure 2). Moreover, the polymer used to prepare the NCs was PLGA-PEG, which affects the ocular bioavailability of drugs due to its special behavior that facilitates drug–mucin interactions, including mucoadhesive and mucus-penetrating properties [44–48]. According to another study, mucoadhesivity in the PLGA-PEG NCs can be related to the PEG corona as it allows a better and longer interaction between the particles and the eye [49]. Furthermore, the PEG surface increases nanoparticle permeability and influences the anti-inflammatory effect when compared with formulations with only PLGA [48,50]. This result fits in with that of other authors regarding the efficacy of using these systems [51–53].



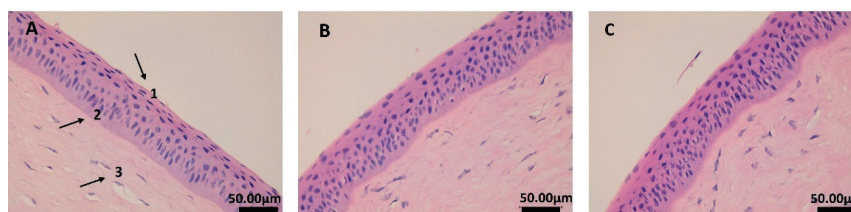
**Figure 1.** Comparison of prevention anti-inflammatory efficacy after sodium arachidonate (SA)-induced inflammation in the rabbit's eye. Values are expressed as the average  $\pm$  SD ( $n = 3$ ); \*  $p < 0.05$  comparison of PZ-NCs vs. positive control (SA); #  $p < 0.05$  comparison of PZ-NCs dryer vs. positive control (SA).



**Figure 2.** Anti-inflammatory efficacy of different formulations containing PZ in the ocular edema induced by instillation of sodium arachidonate (SA). Time 0 = negative control (without treatment).



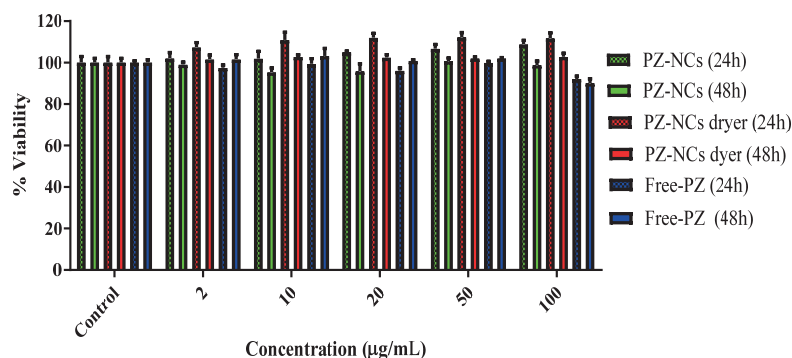
Regarding histological studies, it is possible to observe the corneal structure in Figure 3. The pictures confirm that the tissue and structure were preserved using both formulations of NCs. The epithelium (1) and the own laminate (3) are separated by a thin layer called the Bowman membrane (2). As can be seen in images B and C, the corneal structure was not affected, and the epithelium (1) cells were not altered by any of the formulations tested.



**Figure 3.** Corneal histological structure: (A) negative control (cornea without treatment); (B) cornea treated with PZ-NCs; (C) cornea treated with PZ-NCs dryer. 1: Stratified flat keratinized epithelium; 2: Bowman's membrane; 3: own laminate. All images were observed at 400 $\times$ .

#### 2.5. Toxicity Assay (Cell Culture Cell Line Y-79)

The extent of cell growth inhibition was measured using a Y-79 cell model at 24 h and 48 h with the alamarBlue™ assay. Different concentrations of PZ were either added in solution (Free-PZ) or encapsulated (PZ-NCs and PZ-NCs dryer) to the wells with the medium as a control in the Y-79 cell line. The cell viability after treatment with various concentrations of the different formulations is shown in Figure 4. The formulations were tested in the presence of polyvinyl alcohol (PVA), which is widely used as a stabilizer in nanoparticle synthesis [39] and cryoprotectant in freeze-drying processes [54].



**Figure 4.** Evaluation of *in vitro* toxicity using the resazurin assay (alamarBlue™ assay). Variation of cell viability (%) with PZ concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Data are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $n = 6$ ).

It was observed that, even at the higher concentration (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of PZ, the viability remained at 90% at 48 h. These data corroborate previous results, confirming that polymeric nanosystems are nontoxic in different cell models [51,55,56] and in ocular cell models [31,57].

#### 2.6. SAXS Analysis

The tolerance and efficacy *in vivo* assays were performed with rabbits, which are one of the most commonly used species in ophthalmology-related studies for their ready availability, as well as their acute inflammatory response [58–60]. However, the study of the cornea ultrastructure with synchrotron X-ray diffraction was performed with pigs, which are used for surgery practices in the Faculty of Medicine of the University of Barcelona, for species correlation. The reason for using porcine eyes for this research is the similarity

between pig and human eye morphology and tear film [61]. One of the most remarkable characteristics of the pig eye is the thickness of the cornea, which is around 1500  $\mu\text{m}$  in the center, compared with that of humans, which measures around 500  $\mu\text{m}$ .

Each cut of the cornea (four cuts per group) provided six scatter patterns from the anterior to the posterior part. For each position, the values of fibrillar diameter (FD) and interfibrillar spacing (IFS) were averaged; therefore, each value includes the variability between different animals. Tables 1 and 2 summarize the fibrillar diameter and the interfibrillar distance, respectively. These values are represented graphically in Figure 5.

**Table 1.** Fibrillar diameter (nm). Data are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ).

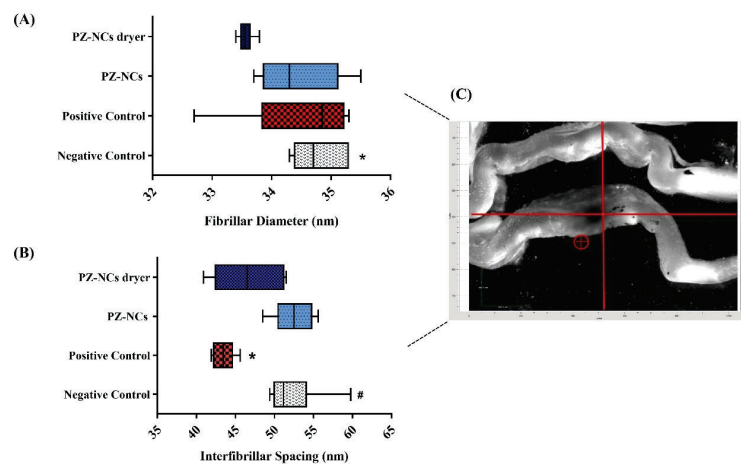
Position *	No Treatment	Positive Control	PZ-NCs Treatment	PZ-NCs Dryer Treatment
1	34.3 $\pm$ 0.5	35.3 $\pm$ 2.1	35.5 $\pm$ 1.8	33.5 $\pm$ 0.3
2	35.3 $\pm$ 0.3	35.0 $\pm$ 1.9	35.0 $\pm$ 1.3	33.4 $\pm$ 0.3
3	35.3 $\pm$ 0.3	35.2 $\pm$ 1.6	34.6 $\pm$ 0.8	33.6 $\pm$ 0.3
4	34.9 $\pm$ 0.1	34.7 $\pm$ 0.8	34.0 $\pm$ 0.3	33.6 $\pm$ 0.3
5	34.5 $\pm$ 0.3	34.2 $\pm$ 0.7	33.9 $\pm$ 0.7	33.8 $\pm$ 0.6
6	34.4 $\pm$ 1.2	32.7 $\pm$ 0.6	33.7 $\pm$ 1.0	33.5 $\pm$ 0.4

\* Position: from 1 (epithelium) to 6 (endothelium).

**Table 2.** Interfibrillar spacing (nm). Data are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ).

Position *	No Treatment	Positive Control	PZ-NCs Treatment	PZ-NCs Dryer Treatment
1	59.8 $\pm$ 0.8	45.6 $\pm$ 9.9	53.5 $\pm$ 4.0	40.9 $\pm$ 9.8
2	52.3 $\pm$ 4.7	44.4 $\pm$ 8.1	55.6 $\pm$ 3.4	45.6 $\pm$ 10.4
3	51.0 $\pm$ 3.3	44.0 $\pm$ 7.9	54.6 $\pm$ 4.2	42.8 $\pm$ 10.9
4	49.4 $\pm$ 3.2	42.9 $\pm$ 6.1	51.5 $\pm$ 3.0	47.4 $\pm$ 11.1
5	50.0 $\pm$ 1.9	41.9 $\pm$ 5.5	51.0 $\pm$ 3.6	51.2 $\pm$ 19.1
6	51.3 $\pm$ 1.8	42.2 $\pm$ 5.7	48.5 $\pm$ 4.0	51.5 $\pm$ 16.3

\* Position: from 1 (epithelium) to 6 (endothelium).



**Figure 5.** Series of data obtained from epithelium to endothelium in the center of the cornea (animal group,  $n = 4$ ). Fibrillar diameter and interfibrillar spacing results using a box plot graph. Box: median, quartiles, and extreme values. Error bars: 95% confidence interval of the mean. (A) Fibrillar diameter; \*  $p < 0.05$  negative control vs. PZ-NCs dryer. (B) Interfibrillar spacing; \*  $p < 0.05$  positive control vs. PZ-NCs, #  $p < 0.05$  positive control vs. negative control. (C) Image of the cornea positioned in the sample holder; the circle indicates the position of the beam.

The results reveal a small decrease in the interfibrillar distance from the anterior to the posterior part of the cornea (Table 2), except for the group treated with PZ-NCs dried and resuspended (PZ-NCs dryer), as well as a more uniform fibril diameter across the explored data (Table 1). The results agree with the existing literature [62,63].

The ANOVA nonparametric test indicated that the differences found in fibrillar diameter were not significant between groups ( $p > 0.05$ ) except for the negative control (no treatment) and treatment with PZ-NCs after spray-drying ( $p < 0.05$ ) (Figure 5A). These results for fibril diameter agree with the literature data, indicating that this parameter is less affected by injury, inflammation, etc. [6]. As no significant difference was found between the positive and negative controls, the fibrillar diameter average was not appropriate to differentiate if the treatment with PZ-NCs damaged or recovered the cornea. The differences in the positions nearer to the endothelium were less significant between groups, which can be attributed to the fact that the inflammation was caused in the cornea periphery.

The interfibrillar spacing differences were significant when comparing the positive control versus the negative control, and the positive control versus treatment with PZ-NCs ( $p < 0.05$ ) (Figure 5B). The large dispersion of the data obtained in the group of animals treated with PZ-NCs dryer could be the reason for no significant difference being found in this group versus the positive control group as was expected. The box plot in Figure 5B shows this phenomenon more clearly. This could be explained by the fact that, after damaging the cornea (via inflammation in our study), a first reaction was shrinkage, causing a decrease in the interfibrillar spacing (positive control). Moreover, when the PZ-NC formulation was instilled to avoid the inflammation, the interfibrillar spacing did not differ significantly between the negative control (no treatment) and the treatment groups PZ-NCs ( $p > 0.05$ ) and PZ-NCs dryer ( $p > 0.05$ ), thus providing a protective effect against inflammation. In addition, these results could indicate that fresh PZ-NCs recovered the corneal structure after the inflammation faster, but animals treated with stabilized PZ-NCs reacted more slowly (variability of values found). Therefore, it could not be concluded that the NC stabilization process succeeded in preserving the properties of the original formulation from the point of view of the SAXS results. The variability found in values of IFS of animals treated with dried NCs could be due to the slight increase in particle size and polydispersity of the NCs after the drying process. Future investigation related to stabilizing the PZ-NCs by freeze-drying should be carried out and evaluated, as the process is easier to control with respect to spray drying and is more widely used in the pharmaceutical industry [64,65]. Moreover, the number of animals used for SAX analysis should be increased to reduce variability, mainly in treated animals.

The intensity of the first-order collagen scatters decreased with the irradiation exposure time, which confirms the damage caused by the irradiation (Figure 6). With continuous irradiation, the collagen structure was damaged over time, and diffraction patterns were weaker. This means that there was a disorder in the tissue. The intensity of the peak decreased from approximately  $3.5 \times 10^7$  to  $2 \times 10^7$  (from 0 s to 600 s, respectively) (Figure S2). However, during the first irradiations, there was no significant decrease in intensity, indicating that the degree of order in the fibrillar array did not change.

### 2.7. Corneal Transparency

Loss of or reduction in corneal transparency could occur if the nano-based drug delivery systems damage the cornea [66]; therefore, light transmission was measured after *ex vivo* corneal formulation contact. In Figure 7, the absorbance values are shown as a function of the wavelength for differently treated corneas in the range of visible light. As expected, the positive control group showed lower transmittance values than the untreated cornea (negative control). On one hand, corneas exposed to PZ-NCs dryer almost recovered the clearness of the negative control, especially in the range of 500–780 nm. In addition, corneas exposed directly to the fresh PZ-NCs showed slightly lower values than the negative control. Transmittance experiments evidenced that the NC formulations did not alter the corneal transparency, and the lower transmittance values obtained with the

fresh nanoparticle solution (PZ-NCs) could have been due to dispersion of light attributable to the presence of non-absorbed nanoparticles on the cornea surface, whereas PZ-NCs dryer fully penetrated the cornea. Further investigation can productively focus on how nanoparticle size affects the dispersion of light when intact absorbed nanoparticles remain on the cornea surface.

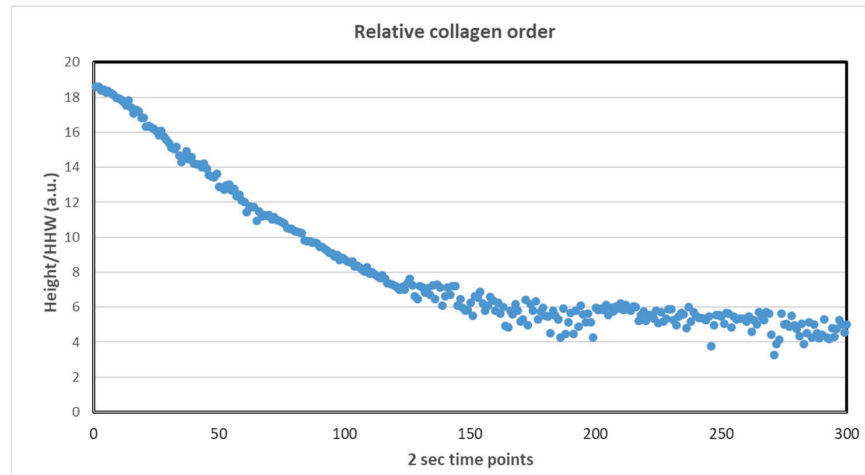


Figure 6. Height of the background-subtracted peak divided by peak width at half height (HHW) (arbitrary units, a.u.) versus the irradiation time (s).

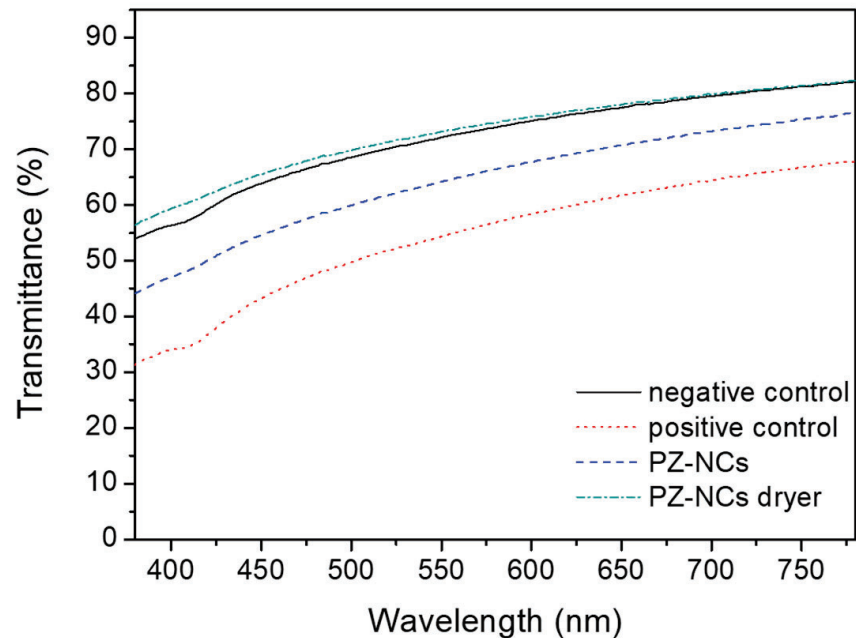


Figure 7. Transmittance values (%) as a function of wavelength in the visible region for the different studied pig corneas.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Materials

Diblock copolymer PLGA-PEG (Resomer<sup>®</sup> Select 50:50 DLG mPEG 5000–5 wt.% PEG) was obtained from Evonik Corporation (Birmingham, AL, USA), Mw 95 kDa. The PZ was obtained from Capot Chemical (Hangzhou, China). Acetone, dimethylsulfoxide (DMSO), and polyvinyl alcohol (PVA) Mw 30–70 kDa, 87–90% hydrolyzed, were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Reagents and chemicals for performing efficacy assays were purchased from Sigma-Aldrich and Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). Milli-Q water (Millipore-Sigma, Saint Louis, MO, USA) was used for all experiments, and the reagents were of analytical grade.

#### 3.2. Nanocarrier Synthesis and Stabilization Process

PZ-NCs were prepared using the nanoprecipitation technique first described by Fessi et al. [67]. The organic phase consisted of PLGA-PEG at a final concentration of 0.9 mg/mL and PZ at a final concentration of 1.0 mg/mL; beforehand, the drug was solubilized in 0.5 mL DMSO, and then mixed with the PLGA-PEG dissolved in 5 mL of acetone. This organic phase was added dropwise under magnetic stirring (700 rpm) into 10 mL of an aqueous solution of PVA 2.5% adjusted to pH = 4.5 with HCl 0.1 M. Then, acetone was evaporated under reduced pressure in a rotary evaporator Büchi B-480 (Büchi, Fawil, Switzerland). This formulation was optimized and characterized physiochemically beforehand [36].

Once the PZ-NCs were in suspension, the formulation was stabilized using a Nano Spray Dryer B-90 (Büchi Labortechnik AG, Fawil, Switzerland) to improve their long-term stability. Moreover, this instrument carries out the spray-drying process using a piezoelectric-driven ultrasonic atomizer to generate droplets, and the dried particles are collected using an electrostatic collector [68,69]. In our study, a spray mesh of 5.5 µm was used, the airflow rate was set to 140–150 L/min, and the spray rate was 75%; the outlet temperature was in the range of 25–30 °C [36].

The resuspension of the formulation was prepared by mixing the PZ-NC powder with Milli-Q water in a proportion of 1 mg/mL and vortex mixing for 1 min to ensure the deagglomeration procedure. Moreover, in our previous study both suspensions obtained were shown to be stable in the fridge for at least 6 weeks [36].

In all experiments, a comparative study was performed using both NCs (before and after the spray-drying process) to evaluate if the spray-drying process interfered with the drug efficacy. PZ-NCs were denoted for the initial formulation, pre-stabilization, and PZ-NCs dryer for the NCs after the spray-drying and resuspended process.

#### 3.3. In Vitro Ocular Irritation Test (HET-CAM)

Fertilized hen's eggs obtained from a farm (GALL S.A., Tarragona, Spain) were maintained at a temperature of  $12 \pm 1$  °C for at least 24 h before placing them in the incubator with a controlled temperature (37.8 °C) and humidity (50–60%) for 9 days. Six chicken eggs were used for each formulation, and two eggs were used as controls (NaOH 0.1 M as positive control and NaCl 0.9% as negative control).

The shell was cut just above the marked line of the air cell. The inner membrane directly in contact with the CAM was moistened with 1 mL of 0.9% saline solution added with a pipette and incubated for a maximum of 30 min. Then, the saline solution was decanted, and the inner membrane was carefully removed using forceps, without causing injury to the blood vessels, to make visible the chorioallantoic membrane underneath. The test solutions (300 µL of PZ-NCs and PZ-NCs dryer) were then added directly into the CAM using a pipette and left in contact for 5 min.

Any vascular lysis, hemorrhage, and/or coagulation at different times, over a 5 min period after application of the test solution, was documented, and any effect was noted and compared with the controls: saline (negative) and sodium hydroxide (positive) solutions. The scores were recorded according to the scoring schemes described by Luepke [40]

and the ocular irritation index (OII) was calculated using the expression formulated in INVITOX protocol 1992 [70]. The following classification was used:  $OII \leq 0.9$  slightly irritating;  $0.9 < OII \leq 4.9$  moderately irritating,  $4.9 < OII \leq 8.9$  irritating, and  $8.9 < OII \leq 12$  severely irritating.

#### 3.4. *In Vivo* Draize Test

New Zealand white rabbits with no signs of abnormalities or ocular inflammation and weighing 1.8–2.2 kg were used. All experiments were performed in compliance with the standards of the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) resolution for the use of animals in research, and the corresponding protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona.

Rabbits ( $n = 6$ /group) were used to assess the irritancy of the PZ-NCs by applying the methods described by Draize and Kay et al. [41,71]. A single instillation of 50  $\mu$ L of the PZ-NCs and PZ-NCs dryer was placed in the conjunctival sac of the right eye, using an untreated contralateral eye as a control. The level of irritation was evaluated 1 h after application of the formulation, then after 1, 2, 3, 4, and 7 days. The analysis of ocular lesions in the cornea, iris (opacity), and conjunctiva (inflammation, congestion, chemosis, and discharge) was performed by applying the ocular irritation score by visual assessment of any changes in the cornea, conjunctiva, and iris [41,72].

#### 3.5. *In Vivo* Efficacy Assay: Anti-Inflammatory and Histological Studies

To assess inflammation prevention, PZ-NCs was tested in rabbits ( $n = 3$ /group) from the animal facility of the Faculty of Pharmacy, protocol 326/19, approved 13 May 2021 (according to Catalan Government Decret 214/97 of 30 July), by the Animal Experimentation Ethics Committee (CEEA) of the University of Barcelona.

The anti-inflammatory efficacy of the PZ formulations was assessed using the method described by Spampinato et al. [73]. Firstly, 50  $\mu$ L of a single dose of fresh PZ-NCs, PZ-NCs dryer, or 0.9% (*w/v*) isotonic saline solution (negative control) was instilled in the conjunctival sac of the right eye. The contralateral eye was used as an untreated control. After 30 min, ocular inflammation in the right eye was induced by administering 50  $\mu$ L of sodium arachidonate (SA) 0.5% (*w/v*) dissolved in phosphate buffer solution (pH = 7.4). The inflammation was measured 30, 60, 90, 120, 150, and 180 min after the instillation of SA. The level of inflammation was quantified through ocular changes, which are shown as the sum of the inflammation score according to a modified Draize scoring system [72] expressed as the average  $\pm$  SD of three replicates.

After the *in vivo* experiment, the animals were sacrificed by an intravenous overdose of sodium thiopental, and the eyes were collected and fixed overnight (ON) in 4% paraformaldehyde (PFA) in 20 mM phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. Furthermore, samples were paraffin-embedded onto cassettes, and vertical histological sections were obtained, stained with hematoxylin and eosin, and mounted on microscope slides to be viewed at 400 $\times$  with a Leica DMD 108 optical microscope.

#### 3.6. Assessment of Cytotoxicity

The cytotoxicity of PZ-NCs and PZ-NCs dryer in comparison to the Free-PZ not encapsulated was determined in the Y-79 cell line (human retinoblastoma cell line; Cell Lines Service CLS, Eppelheim, Germany), exposed to different concentrations of PZ ranging from 2  $\mu$ g/mL to 100  $\mu$ g/mL, using the AlamarBlue™ assay (AB). AB (resazurin) is a sensitive oxidation–reduction metabolic indicator; after entering the cells and in the presence of metabolic reducing equivalent molecules (originating from cell metabolism), it fluoresces and changes coloration from blue to rose, thus leading to a shift in the absorbance spectrum.

The Y-79 cells were maintained in RPMI-1640 medium, supplemented with 10% (*v/v*) fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL of streptomycin), in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 37 °C. The cells were centrifuged, resuspended in a culture medium, counted, and seeded, after appropriate

dilution, at  $1 \times 10^5$  cells/mL in poly-L-lysine pre-coated 96-well plates (100  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) for adherence, which was achieved in about 24 h. After adherence, the culture medium was replaced by the test solutions.

The PZ-NCs, PZ-NCs dryer, and Free-PZ (firstly prepared by dissolving the drug in DMSO) were diluted with an FBS-free culture medium to achieve the desired final concentrations (test solutions) and then added to cells (100  $\mu\text{L}/\text{well}$ ). Microplates were placed in the incubator, and cells were exposed to test solutions for 24 h and 48 h. After the exposure time, the media containing the NCs, Free-PZ, and the control (culture medium) were removed and replaced by an FBS-free medium supplemented with 10% (*v/v*) AB and incubated. The absorbance readings were performed about 4–5 h after AB addition, at 570 nm (reduced form) and 620 nm (oxidized form) using a Multiskan EX microplate reader (MTX Lab Systems, Vienna, Austria; Virginia, VA, USA). Wells with culture medium without cells, containing 10% (*v/v*) AB, were used as negative controls, necessary for the calculation. Untreated cells were used as a control with 100% viability. The cell viability was calculated by the percentage of AB reduction, using equations as indicated by AB manufacturers and as described before [74].

### 3.7. Synchrotron Small Angle X-ray Diffraction (SAXS)

#### 3.7.1. Sample Preparation

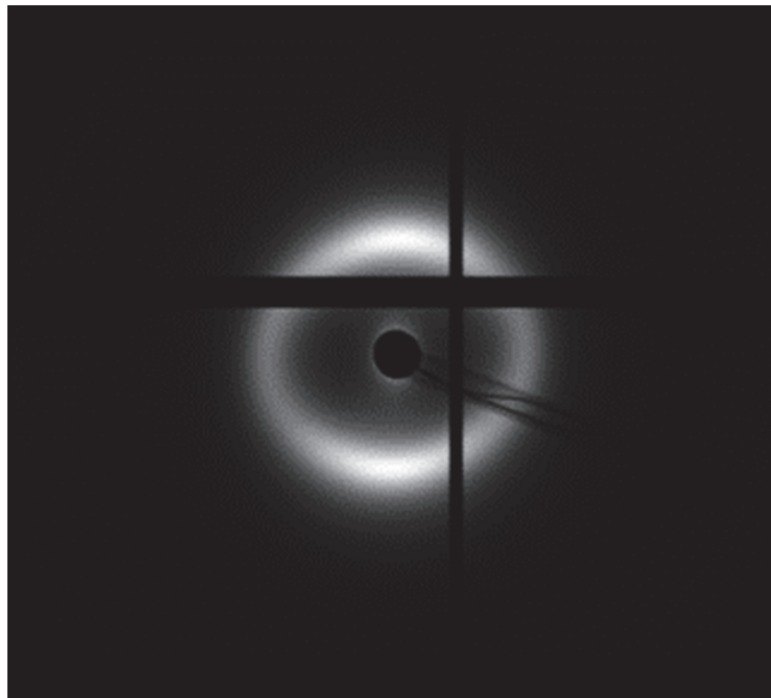
Ocular specimens were obtained under veterinary supervision from pigs used in surgical University practices at the Faculty of Medicine, according to the Ethics Committee of Animals Experimentation at the University of Barcelona. Four groups of animals were obtained: (1) the negative control treated with saline solution 0.09% (*w/v*) (blank sample), (2) the positive control inflammation treated with sodium arachidonate (SA), (3) treatment with PZ-NCs, and (4) treatment with PZ-NCs dryer. Ocular inflammation was induced by administering 50  $\mu\text{L}$  of SA 0.5% (*w/v*) dissolved in phosphate-buffered solution, pH 7.4. All samples of NCs treated groups were instilled after 30 min of the ocular inflammation. The animals were then sacrificed after 4 h of NCs application.

Pigs (male, weight 30–40 kg) were anesthetized with intramuscular administration of ketamine hydrochloride (3 mg/kg), xylazine (2.5 mg/kg), and midazolam (0.17 mg/kg). Once sedated, the propofol (3 mg/kg) was administered via the auricular vein, and, immediately afterward, they were intubated and maintained under anesthesia using inhaled isoflurane. After surgical experimentation, the animals were euthanized (250 mg/kg of sodium pentobarbital was administered through the auricular ear vein under deep anesthesia), and the eyes were immediately extracted and transported to the laboratory in dry ice. The whole corneas with a surrounding sclera rim were preserved in 4% formalin until they were used for the SAXS experiments (Figure S3).

#### 3.7.2. Data Collection

SAXS data were collected on the BL11-NCD-SWEET beamline at the ALBA Synchrotron Light Source (Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain). Each pattern was generated from an X-ray beam with an energy of 12.4 keV and the sample to detector distance was 7.67 m. All small-angle X-ray scatter patterns were calibrated against AgBh (with a standard periodicity of 58.38 Å).

A thin strip of tissue, measuring approximately 1–2 mm wide, was dissected from the center of each cornea in the superior/inferior direction covering from limbus to limbus. After dissection, the corneas were wrapped in a plastic membrane to prevent dehydration, mounted in a sealed Perspex/Mylar chamber, and positioned ready for X-ray scattering data collection (Figure S4). The strips of swine corneas were positioned so that their cut edge was perpendicular to the incident beam direction, and SAXS patterns were obtained from the center of the corneas and from the anterior to the posterior part (Figure 8). Two experiments were performed.



**Figure 8.** Example of a small-angle diffraction pattern from pig corneal stroma produced by collagen obtained in the Pilatus detector.

Experiment 1. SAXS patterns were obtained at 250  $\mu\text{m}$  intervals throughout the thickness of the tissue with an exposure time of 5 s, with four cornea cuts for each animal group. Six images per cornea cut were obtained covering the area between the epithelium to the endothelium.

Experiment 2 (radiation damage study). The cornea treated with PZ-NCs was irradiated 300 times at the same point with an exposure time of 2 s. The objective of the experiment was to study the effect of irradiation on the structure of the collagen during the experiments.

The data obtained (Tables 1 and 2, and Figure 5) are averages from collagen fibrils of the different animals, along with the thickness of the cornea through which the X-rays pass; thus, they are highly representative of the tissue as a whole.

Data analysis for SAXS experiments was performed using the program SAXS4COLL [75,76], which was developed for the analysis of collagen-based tissues (Figure S5).

### 3.8. Corneal Transparency

*Ex vivo* swine corneas were obtained from pigs used in surgical practices at the Faculty of Medicine (University of Barcelona). The corneas were set out in the receptor compartment of Franz Cells with PBS (phosphate-buffered saline) in the chamber, and the temperature was kept at 32  $^{\circ}\text{C}$ . Four different corneas were treated with 1 mL of solution as follows: the positive control (using ethanol to damage the cornea), the negative control (saline solution), PZ-NCs, and PZ-NCs dryer. For 1.5 h, two drops of saline solution were added to each cornea every 10 min to simulate the natural clearing of the eye.

The transmittance through each sample was analyzed using a Nanodrop<sup>®</sup> spectrophotometer TM 2000 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA). Briefly, samples were cleaned with saline solution to eliminate any contaminants and dried carefully under a  $\text{N}_2$



stream. Samples were mounted directly to the base of the instrument, and transmittance was measured in the range of 190–850 nm in at least three different regions of the cornea close to its center.

### 3.9. Statistics

Graphics and statistics were carried out using Windows-based programs: GraphPad Prism version 8 software package (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and Excel Office 16 (Microsoft, Reading, Berkshire, UK).

Student's unpaired *t*-test was used for two-group comparisons, and differences were taken as statistically significant when the *p*-value was below 0.05. All of the data are presented as the average  $\pm$  SD.

For X-ray scattering, a one-way ANOVA test was performed between all groups, and, when significant differences were found, Dunn's multiple-comparison test was used to analyze differences between pairs of groups, with the null hypothesis rejected at the 95% confidence interval.

## 4. Conclusions

In the current study, PZ-NCs were used as a nanotherapeutic system; they were developed to achieve their safe use in an ocular animal model before and after the spray-drying stabilization process. Moreover, with the administration of both formulations (PZ-NCs and PZ-NC dryer), it was possible to observe the effectiveness of the therapeutic prevention (significant decrease in the level of inflammation). In addition, the corneal structure was not affected, and the epithelium and cells were not altered by any NCs formulations.

Our study represents the first detailed description of the corneal ultrastructure (stroma) of pigs treated with PZ formulated in nanocarriers, analyzed by X-ray diffraction with synchrotron light, and the results demonstrated that the treatment did not appear to contribute to damage to or disorder of the cornea ultrastructure.

In summary, through different analyses and techniques, this study indicated that PZ-NC formulations did not cause any corneal damage within a 180 min time window of testing, and that these systems are safe and effective for the prevention of ocular inflammatory processes.

**Supplementary Materials:** The supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms231911184/s1>.

**Author Contributions:** E.M., investigation, formal analysis, visualization, writing—original draft, and writing—review and editing; C.S.K.-L., methodology (synchrotron) and formal analysis (synchrotron); Ò.D., methodology (transparency) and formal analysis; L.S., methodology and formal analysis; I.C., editing and review; A.C.C., conceptualization, methodology, and resources; M.S.-A., conceptualization, methodology, investigation, formal analysis, visualization, writing—review and editing, and supervision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee (CEEA) from the University of Barcelona. Protocol number 326/19 was approved on 13 May 2021 (according to Catalan Government Decret 214/97 of 30 July).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors thank Juan Carlos Martinez and Alba Synchrotron Radiation Source (Cerdanyola, Barcelona, Spain) for help with technical assistance and synchrotron measurements.

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

## References

1. Dua, H.S.; Faraj, L.A.; Said, D.G.; Gray, T.; Lowe, J. Human corneal anatomy redefined: A novel pre-descemet's layer (Dua's Layer). *Ophthalmology* **2013**, *120*, 1778–1785. [\[CrossRef\]](#)
2. Dua, H.S.; Faraj, L.A.; Said, D.G. Dual layer: Discovery, characteristics, clinical applications, controversy and potential relevance to glaucoma. *Expert Rev. Ophthalmol.* **2015**, *10*, 531–547. [\[CrossRef\]](#)
3. Hayes, S.; Boote, C.; Tuft, S.J.; Quantock, A.J.; Meek, K.M. A study of corneal thickness, shape and collagen organisation in keratoconus using videokeratography and X-ray scattering techniques. *Exp. Eye Res.* **2007**, *84*, 423–434. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Mi, S.; Dooley, E.P.; Albon, J.; Boulton, M.E.; Meek, K.M.; Kamma-Lorger, C.S. Adhesion of laser in situ keratomileusis-like flaps in the cornea: Effects of crosslinking, stromal fibroblasts, and cytokine treatment. *J. Cataract Refract. Surg.* **2011**, *37*, 166–172. [\[CrossRef\]](#)
5. Meek, K.M.; Fullwood, N.J.; Cooke, P.H.; Elliott, G.F.; Maurice, D.M.; Quantock, A.J.; Wall, R.S.; Worthington, C.R. Synchrotron x-ray diffraction studies of the cornea, with implications for stromal hydration. *Biophys. J.* **1991**, *60*, 467–474. [\[CrossRef\]](#)
6. Kamma-Lorger, C.S.; Boote, C.; Hayes, S.; Albon, J.; Boulton, M.E.; Meek, K.M. Collagen ultrastructural changes during stromal wound healing in organ cultured bovine corneas. *Exp. Eye Res.* **2009**, *88*, 953–959. [\[CrossRef\]](#)
7. Boote, C.; Hayes, S.; Young, R.D.; Kamma-Lorger, C.S.; Hocking, P.M.; Elsheikh, A.; Inglehearn, C.F.; Ali, M.; Meek, K.M. Ultrastructural changes in the retinopathy, globe enlarged (rge) chick cornea. *J. Struct. Biol.* **2009**, *166*, 195–204. [\[CrossRef\]](#)
8. Kamma-Lorger, C.S.; Hayes, S.; Boote, C.; Burghammer, M.; Boulton, M.E.; Meek, K.M. Effects on collagen orientation in the cornea after trephine injury. *Mol. Vis.* **2009**, *15*, 378–385.
9. Kamma-Lorger, C.S.; Boote, C.; Hayes, S.; Moger, J.; Burghammer, M.; Knupp, C.; Quantock, A.J.; Sorensen, T.; Di Cola, E.; White, N.; et al. Collagen and mature elastic fibre organisation as a function of depth in the human cornea and limbus. *J. Struct. Biol.* **2010**, *169*, 424–430. [\[CrossRef\]](#)
10. Miyazaki, Y.; Mahankali, A.; Matsuda, M.; Glass, L.; Mahankali, S.; Ferrannini, E.; Cusi, K.; Mandarino, L.J.; DeFronzo, R.A. Improved glycemic control and enhanced insulin sensitivity in type 2 diabetic subjects treated with pioglitazone. *Diabetes Care* **2001**, *24*, 710–719. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Lehrke, M.; Lazar, M.A. The many faces of PPAR $\gamma$ . *Cell* **2005**, *123*, 993–999. [\[CrossRef\]](#)
12. Tokutome, M.; Matoba, T.; Nakano, Y.; Okahara, A.; Fujiwara, M.; Koga, J.I.; Nakano, K.; Tsutsui, H.; Egashira, K. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma targeting nanomedicine promotes cardiac healing after acute myocardial infarction by skewing monocyte/macrophage polarization in preclinical animal models. *Cardiovasc. Res.* **2019**, *115*, 419–431. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Ishibashi, M.; Egashira, K.; Hiasa, K.I.; Inoue, S.; Ni, W.; Zhao, Q.; Usui, M.; Kitamoto, S.; Ichiki, T.; Takeshita, A. Antiinflammatory and antiarteriosclerotic effects of pioglitazone. *Hypertension* **2002**, *40*, 687–693. [\[CrossRef\]](#)
14. Nagahama, R.; Matoba, T.; Nakano, K.; Kim-Mitsuyama, S.; Sunagawa, K.; Egashira, K. Nanoparticle-mediated delivery of pioglitazone enhances therapeutic neovascularization in a murine model of hindlimb ischemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 2427–2434. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Yamamoto, A.; Kakuta, H.; Miyachi, H.; Sugimoto, Y. Involvement of the retinoid X receptor ligand in the anti-inflammatory effect induced by peroxisome proliferator-activated receptor agonist in vivo. *PPAR Res.* **2011**, *2011*, 840194. [\[CrossRef\]](#)
16. Aoki, Y.; Maeno, T.; Aoyagi, K.; Ueno, M.; Aoki, F.; Aoki, N.; Nakagawa, J.; Sando, Y.; Shimizu, Y.; Suga, T.; et al. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, suppresses bleomycin-induced acute lung injury and fibrosis. *Respiration* **2009**, *77*, 311–319. [\[CrossRef\]](#)
17. Mehta, M. *Biopharmaceutics Classification System (BCS): Development, Implementation, and Growth*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2016; ISBN 978-1-118-47661-1.
18. Silva-Abreu, M.; Calpena, A.C.; Espina, M.; Silva, A.M.; Gimeno, A.; Egea, M.A.; García, M.L. Optimization, Biopharmaceutical Profile and Therapeutic Efficacy of Pioglitazone-loaded PLGA-PEG Nanospheres as a Novel Strategy for Ocular Inflammatory Disorders. *Pharm. Res.* **2018**, *35*, 11. [\[CrossRef\]](#)
19. Laddha, U.D.; Kshirsagar, S.J. Formulation of nanoparticles loaded in situ gel for treatment of dry eye disease: In vitro, ex vivo and in vivo evidences. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2021**, *61*, 102112. [\[CrossRef\]](#)
20. Wong, L.R.; Wong, P.; Ho, P.C.L. Metabolic profiling of female tg2576 mouse brains provides novel evidence supporting intranasal low-dose pioglitazone for long-term treatment at an early stage of alzheimer's disease. *Biomedicines* **2020**, *8*, 589. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Silva-Abreu, M.; Gonzalez-Pizarro, R.; Espinoza, L.C.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Thiazolidinedione as an alternative to facilitate oral administration in geriatric patients with Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *129*, 173–180. [\[CrossRef\]](#)
22. Silva-Abreu, M.; Espinoza, L.C.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Fábrega, M.J.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Human skin permeation studies with PPAR $\gamma$  agonist to improve its permeability and efficacy in inflammatory processes. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2548. [\[CrossRef\]](#)
23. Hirenkumar, M.; Steven, S. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* **2012**, *3*, 1377–1397. [\[CrossRef\]](#)
24. Locatelli, E.; Franchini, M.C. Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: Synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system. *J. Nanoparticle Res.* **2012**, *14*, 1316. [\[CrossRef\]](#)

25. Vllasaliu, D.; Fowler, R.; Stolnik, S. PEGylated nanomedicines: Recent progress and remaining concerns. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2014**, *11*, 139–154. [[CrossRef](#)]
26. Suk, J.S.; Xu, Q.; Kim, N.; Hanes, J.; Ensign, L.M. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99*, 28–51. [[CrossRef](#)]
27. Salama, A.H. Spray drying as an advantageous strategy for enhancing pharmaceuticals bioavailability. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2020**, *10*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Ghafoorianfar, S.; Ghorani-Azam, A.; Mohajeri, S.A.; Farzin, D. Efficiency of nanoparticles for treatment of ocular infections: Systematic literature review. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *57*, 101765. [[CrossRef](#)]
29. Begines, B.; Ortiz, T.; Pérez-Aranda, M.; Martínez, G.; Merinero, M.; Argüelles-Arias, F.; Alcudia, A. Polymeric nanoparticles for drug delivery: Recent developments and future prospects. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Tsai, C.H.; Wang, P.Y.; Lin, I.C.; Huang, H.; Liu, G.S.; Tseng, C.L. Ocular drug delivery: Role of degradable polymeric nanocarriers for ophthalmic application. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2830. [[CrossRef](#)]
31. Guo, D.; Li, Q.; Sun, Y.; Guo, J.; Zhao, Q.; Yin, X.; Wei, H.; Wu, S.; Bi, H. Evaluation of controlled-release triamcinolone acetonide-loaded mPEG-PLGA nanoparticles in treating experimental autoimmune uveitis. *Nanotechnology* **2019**, *30*, 165702. [[CrossRef](#)]
32. Gonzalez-Pizarro, R.; Carvajal-Vidal, P.; Halbault Bellowa, L.; Calpena, A.C.; Espina, M.; García, M.L. In-situ forming gels containing fluorometholone-loaded polymeric nanoparticles for ocular inflammatory conditions. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2019**, *175*, 365–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Katara, R.; Sachdeva, S.; Majumdar, D.K. Enhancement of ocular efficacy of aceclofenac using biodegradable PLGA nanoparticles: Formulation and characterization. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2017**, *7*, 632–641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Parra, A.; Mallandrich, M.; Clares, B.; Egea, M.A.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Design and elaboration of freeze-dried PLGA nanoparticles for the transcorneal permeation of carprofen: Ocular anti-inflammatory applications. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2015**, *136*, 935–943. [[CrossRef](#)]
35. Bachu, R.D.; Chowdhury, P.; Al-Saedi, Z.H.F.; Karla, P.K.; Boddu, S.H.S. Ocular drug delivery barriers—role of nanocarriers in the treatment of anterior segment ocular diseases. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 28. [[CrossRef](#)]
36. Silva-Abreu, M.; Miralles, E.; Kamma-Lorger, C.S.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Stabilization by Nano Spray Dryer of Pioglitazone Polymeric Nanosystems: Development, In Vivo, Ex Vivo and Synchrotron Analysis. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Miralles-Cardiel, E.; Silva-Abreu, M.; Calpena, A.C.; Casals, I. Development and validation of an hplc–ms/ms method for pioglitazone from nanocarriers quantitation in ex vivo and in vivo ocular tissues. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kalam, M.A.; Alshamsan, A. Poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for sustained release of tacrolimus in rabbit eyes. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *94*, 402–411. [[CrossRef](#)]
39. Gupta, H.; Aqil, M.; Khar, R.K.; Ali, A.; Bhatnagar, A.; Mittal, G. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2010**, *6*, 324–333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Luepke, N.P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food Chem. Toxicol.* **1985**, *23*, 287–291. [[CrossRef](#)]
41. Draize, J.H.; Woodard, G.; Calvery, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1944**, *82*, 377–390.
42. Abrego, G.; Alvarado, H.; Souto, E.B.; Guevara, B.; Bellowa, L.H.; Parra, A.; Calpena, A.; Garcia, M.L. Biopharmaceutical profile of pranoprofen-loaded PLGA nanoparticles containing hydrogels for ocular administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *95*, 261–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Alvarado, H.L.; Abrego, G.; Garduño-Ramirez, M.L.; Clares, B.; Calpena, A.C.; García, M.L. Design and optimization of oleanolic/ursolic acid-loaded nanoplateforms for ocular anti-inflammatory applications. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2015**, *11*, 521–530. [[CrossRef](#)]
44. Andreani, T.; Miziara, L.; Lorenzón, E.N.; De Souza, A.L.R.; Kiill, C.P.; Fanguero, J.F.; Garcia, M.L.; Gremião, P.D.; Silva, A.M.; Souto, E.B. Effect of mucoadhesive polymers on the in vitro performance of insulin-loaded silica nanoparticles: Interactions with mucin and biomembrane models. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *93*, 118–126. [[CrossRef](#)]
45. Huckaby, J.T.; Lai, S.K. PEGylation for enhancing nanoparticle diffusion in mucus. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *124*, 125–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Varela-Fernández, R.; García-Otero, X.; Díaz-Tomé, V.; Regueiro, U.; López-López, M.; González-Barcia, M.; Lema, M.I.; Otero-Espinar, F.J. Mucoadhesive PLGA Nanospheres and Nanocapsules for Lactoferrin Controlled Ocular Delivery. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kaldybekov, D.B.; Filippov, S.K.; Radulescu, A.; Khutoryanskiy, V.V. Maleimide-functionalised PLGA-PEG nanoparticles as mucoadhesive carriers for intravesical drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *143*, 24–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Xu, Q.; Ensign, L.M.; Boylan, N.J.; Schön, A.; Gong, X.; Yang, J.C.; Lamb, N.W.; Cai, S.; Yu, T.; Freire, E.; et al. Impact of Surface Polyethylene Glycol (PEG) Density on Biodegradable Nanoparticle Transport in Mucus ex Vivo and Distribution in Vivo. *ACS Nano* **2015**, *9*, 9217–9227. [[CrossRef](#)]
49. Ludwig, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1595–1639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

50. Sánchez-López, E.; Esteruelas, G.; Ortiz, A.; Espina, M.; Prat, J.; Muñoz, M.; Cano, A.; Calpena, A.C.; Ettcheto, M.; Camins, A.; et al. Article dexibuprofen biodegradable nanoparticles: One step closer towards a better ocular interaction study. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 720. [CrossRef] [PubMed]
51. Gonzalez-Pizarro, R.; Parrotta, G.; Vera, R.; Sánchez-López, E.; Galindo, R.; Kjeldsen, F.; Badia, J.; Baldoma, L.; Espina, M.; García, M.L. Ocular penetration of fluorometholone-loaded PEG-PLGA nanoparticles functionalized with cell-penetrating peptides. *Nanomedicine* **2019**, *14*, 3089–3104. [CrossRef] [PubMed]
52. Cañadas, C.; Alvarado, H.; Calpena, A.C.; Silva, A.M.; Souto, E.B.; García, M.L.; Abrego, G. In vitro, ex vivo and in vivo characterization of PLGA nanoparticles loading pranoprofen for ocular administration. *Int. J. Pharm.* **2016**, *511*, 719–727. [CrossRef] [PubMed]
53. Giannavola, C.; Bucolo, C.; Maltese, A.; Paolino, D.; Vandelli, M.A.; Puglisi, G.; Lee, V.H.L.; Fresta, M. Influence of preparation conditions on acyclovir-loaded poly-D,L-lactic acid nanospheres and effect of PEG coating on ocular drug bioavailability. *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 584–590. [CrossRef] [PubMed]
54. Ramos Yacasi, G.R.; Calpena Campmany, A.C.; Egea Gras, M.A.; Espina García, M.; García López, M.L. Freeze drying optimization of polymeric nanoparticles for ocular flurbiprofen delivery: Effect of protectant agents and critical process parameters on long-term stability. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2017**, *43*, 637–651. [CrossRef] [PubMed]
55. Luis de Redín, I.; Boiero, C.; Martínez-Ohárriz, M.C.; Agüeros, M.; Ramos, R.; Peñuelas, I.; Allemandi, D.; Llabot, J.M.; Irache, J.M. Human serum albumin nanoparticles for ocular delivery of bevacizumab. *Int. J. Pharm.* **2018**, *541*, 214–223. [CrossRef] [PubMed]
56. Feczko, T.; Piiper, A.; Pleli, T.; Schmithals, C.; Denk, D.; Hehlhans, S.; Rödel, F.; Vogl, T.J.; Wacker, M.G. Theranostic sorafenib-loaded polymeric nanocarriers manufactured by enhanced gadolinium conjugation techniques. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 489. [CrossRef] [PubMed]
57. Sánchez-López, E.; Egea, M.A.; Cano, A.; Espina, M.; Calpena, A.C.; Ettcheto, M.; Camins, A.; Souto, E.B.; Silva, A.M.; García, M.L. PEGylated PLGA nanospheres optimized by design of experiments for ocular administration of dexibuprofen-in vitro, ex vivo and in vivo characterization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *145*, 241–250. [CrossRef] [PubMed]
58. Ruberti, J.W.; Klyce, S.D.; Smolek, M.K.; Karon, M.D. Anomalous Acute Inflammatory Response in Rabbit Corneal Stroma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2000**, *41*, 2523–2530.
59. Connon, C.J.; Meek, K.M. Organization of corneal collagen fibrils during the healing of trephined wounds in rabbits. *Wound Repair Regen.* **2003**, *11*, 71–78. [CrossRef] [PubMed]
60. Quantock, A.J.; Padroni, S.; Connon, C.J.; Milne, G.; Schanzlin, D.J. Proteoglycan alterations in the rabbit corneal stroma after a lamellar incision. *J. Cataract Refract. Surg.* **2003**, *29*, 821–824. [CrossRef]
61. Crespo-Moral, M.; García-Posadas, L.; López-García, A.; Diebold, Y. Histological and immunohistochemical characterization of the porcine ocular surface. *PLoS ONE* **2020**, *15*, 1–17. [CrossRef] [PubMed]
62. Quantock, A.J.; Boote, C.; Young, R.D.; Hayes, S.; Tanioka, H.; Kawasaki, S.; Ohta, N.; Iida, T.; Yagi, N.; Kinoshita, S.; et al. Small-angle fibre diffraction studies of corneal matrix structure: A depth-profiled investigation of the human eye-bank cornea. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 335–340. [CrossRef]
63. Boote, C.; Dennis, S.; Newton, R.H.; Puri, H.; Meek, K.M. Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: Optical and biomechanical implications. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2003**, *44*, 2941–2948. [CrossRef] [PubMed]
64. Fonte, P.; Reis, S.; Sarmento, B. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *J. Control. Release* **2016**, *225*, 75–86. [CrossRef]
65. Franks, F.; Auffret, T. *Freeze-Drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals*; Chemistry, R.S., Ed.; Royal Society of Chemistry: London, UK, 2008; ISBN 0854041516.
66. Meek, K.M.; Knupp, C. Corneal structure and transparency. *Prog. Retin. Eye Res.* **2015**, *49*, 1–16. [CrossRef] [PubMed]
67. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*, R1–R4. [CrossRef]
68. Li, X.; Anton, N.; Arpagaus, C.; Belleteix, F.; Vandamme, T.F. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *J. Control. Release* **2010**, *147*, 304–310. [CrossRef]
69. Heng, D.; Lee, S.H.; Ng, W.K.; Tan, R.B. The nano spray dryer B-90. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2011**, *8*, 965–972. [CrossRef]
70. INVTTOX 1992 Protocol No. 47: HET-CAM Test. Available online: [https://www.researchgate.net/profile/Horst-Spielmann/publication/15647765\\_HET-CAM\\_test/links/00b7d523a17404a3c4000000/HET-CAM-test.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Horst-Spielmann/publication/15647765_HET-CAM_test/links/00b7d523a17404a3c4000000/HET-CAM-test.pdf) (accessed on 13 March 2022).
71. Kay, J.; Calandra, J. Interpretation of eye irritation tests. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1962**, *13*, 281–289.
72. Wilhelmus, K.R. The Draize eye test. *Surv. Ophthalmol.* **2001**, *45*, 493–515. [CrossRef]
73. Spampinato, S.; Marino, A.; Bucolo, C.; Canossa, M.; Bachetti, T.M.S. Effects of sodium naproxen eye drops on rabbit ocular inflammation induced by sodium arachidonate. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **1991**, *7*, 125–133. [CrossRef]
74. Andreani, T.; Kiill, C.P.; Souza, A.L.R.d.; Fangueiro, J.F.; Fernandes, L.; Doktorovová, S.; Santos, D.L.; Garcia, M.L.; Gremião, M.P.D.; Souto, E.B.; et al. Surface engineering of silica nanoparticles for oral insulin delivery: Characterization and cell toxicity studies. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, *123*, 916–923. [CrossRef] [PubMed]
75. Abass, A.; Bell, J.S.; Spang, M.T.; Hayes, S.; Meek, K.M.; Boote, C. SAXS4COLL: An integrated software tool for analysing fibrous collagen-based tissues. *J. Appl. Crystallogr.* **2017**, *50*, 1235–1240. [CrossRef] [PubMed]
76. SAXS4COLL Software. Available online: <https://bio.tools/saxs4coll> (accessed on 16 October 2021).



## Supplementary Materials:

### Assessment of efficacy and safety using an Agonist PPAR- $\gamma$ loaded nanocarriers for inflammatory eye diseases

AUTORS: Esther Miralles <sup>1</sup>, Christina S. Kamma-Lorger <sup>2</sup>, Òscar Domènech <sup>3,4</sup>, Lilian Sosa<sup>5</sup>, Isidre Casals <sup>1</sup>, Ana Cristina Calpena <sup>3,4</sup> and Marcelle Silva-Abreu <sup>3,4\*</sup>

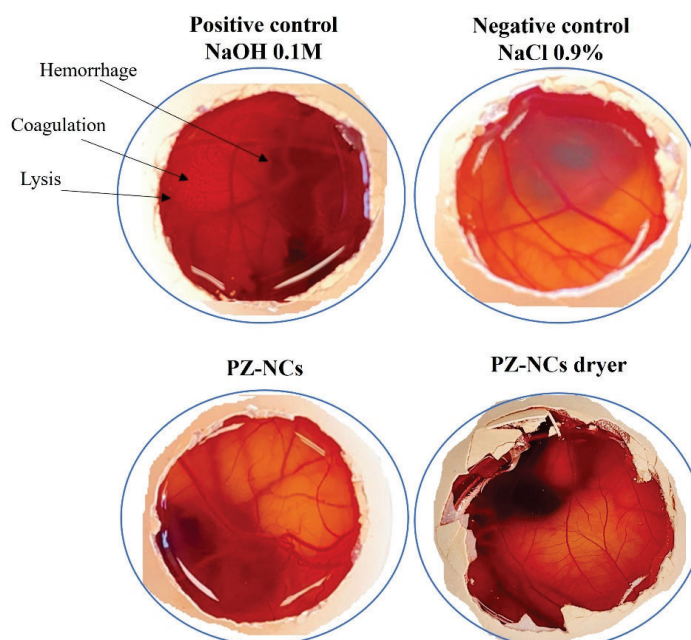
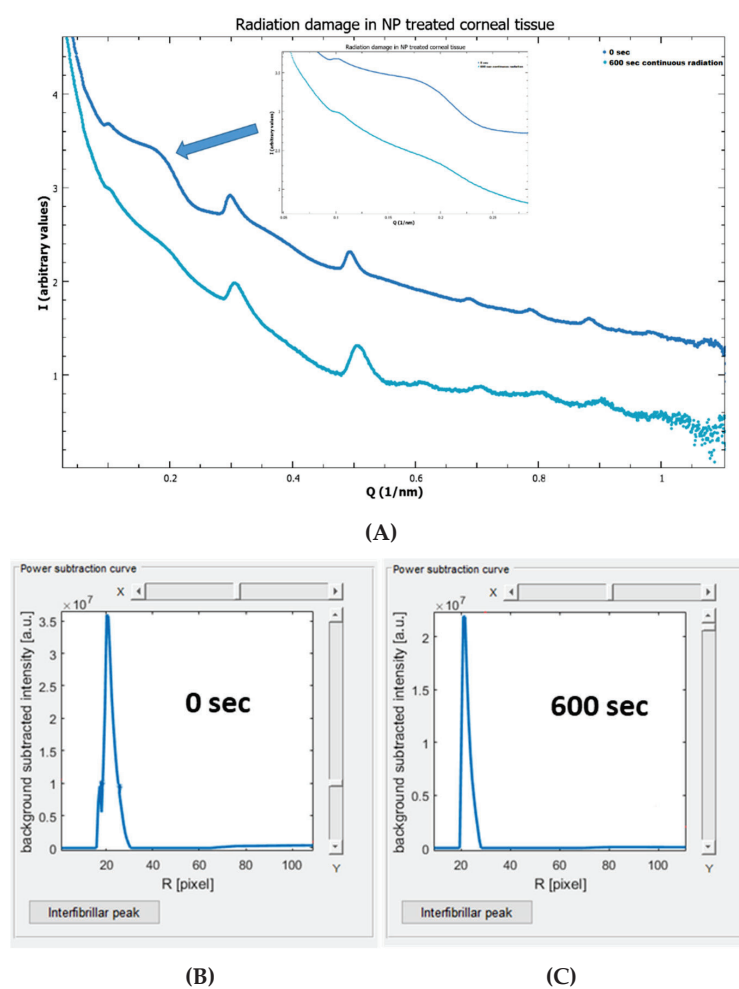
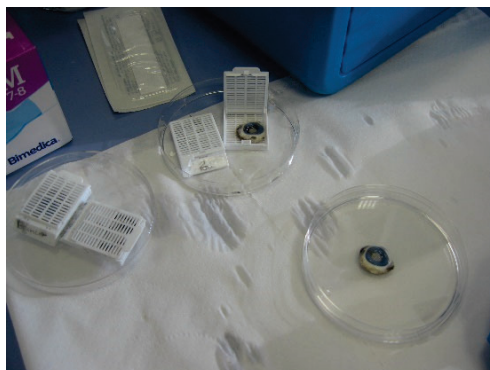


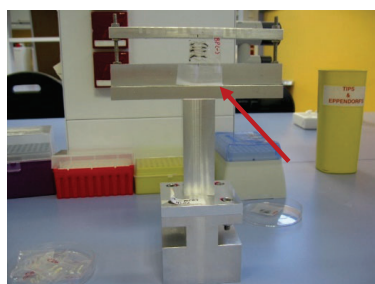
Figure S1. Photography of eggs used in the experiments of HET-CAM.



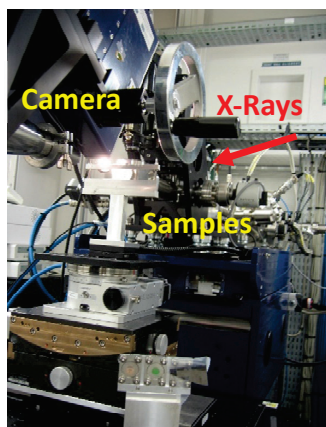
**Figure S2.** Radiation damage study in a cornea treated with PZ-NCs. (A) First-order collagen peak (B) Intensity of the peak at the first irradiation and (C) Intensity of the peak at the last irradiation.



**Figure S3.** Photograph of pig eyes before separating the cornea.



(A)



(B)



(C)

**Figure S4.** (A) Samples in the sample holder (the red arrow indicates the four corneal cuts); (B) Sample holder positioned in the beamline station; (C) Detector.

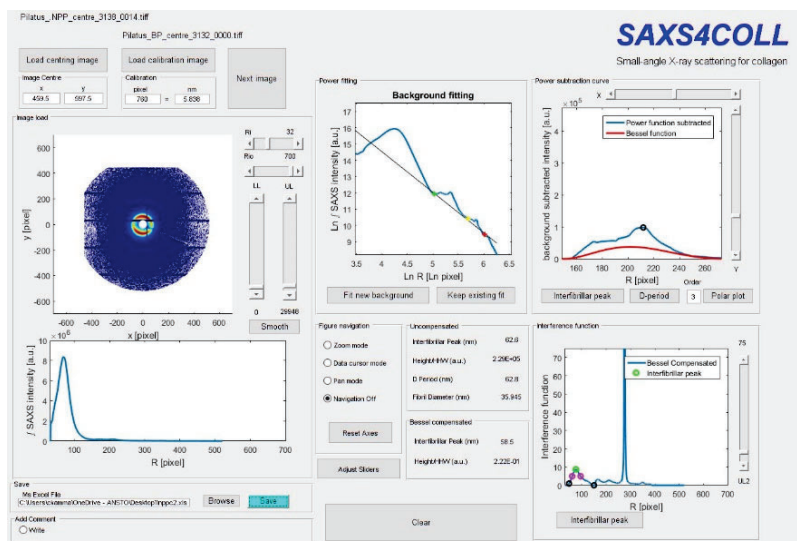


Figure S5. Illustration of SAX4COLL program when processing images (example of pig cornea treated with PZ-NCs SAXS pattern).



## 4. DISCUSSIÓ



#### 4. DISCUSSIÓ

Aquesta recerca es va centrar en la formulació i estabilització de nanopartícules polimèriques de pioglitazona per a ús oftàlmic per reduir la inflamació ocular. La pioglitazona és una tiazolidinediona comercialitzada com a medicament per al tractament de la diabetis tipus II. El seu mecanisme d'acció és a través de l'activació del receptor nuclear PPAR $\gamma$ . Un gran nombre de compostos de naturalesa lipòfila, són capaços de modificar l'expressió gènica de la cèl·lula per interacció amb factors de transcripció dependents de lligand, agrupats en allò que es coneix, de forma genèrica, com la superfamília dels receptors nuclears. Aquest tipus de receptors intracel·lulars presenten una gran antiguitat en la història de la vida. Van aparèixer en els éssers vius abans de la divergència de vertebrats i invertebrats, i actualment es coneixen més de 150 proteïnes diferents integrades en aquest grup una de les quals és l'anomenada PPAR $\gamma$ , les accions bioquímiques de la qual són activades quan una molècula de pioglitazona s'hi enllaça (ligand).

Una estratègia habitual en farmacologia és estudiar fàrmacs aprovats per l'autoritat reguladora per a una determinada patologia i buscar-los aplicacions per a altres patologies, alhora que formular-los per a vies d'aplicació adaptades a les noves patologies a què es destinarà.

S'ha estudiat i seleccionat aquest fàrmac perquè hi ha estudis que demostren que la pioglitazona té capacitat antiinflamatòria en diferents tipus d'òrgan i teixit, i per aprofundir en la recerca del tractament ocular en forma de suspensió de nanopartícules polimèriques, la qual s'havia iniciat en estudis anteriors [165] perquè tenen avantatges respecte a les formes farmacèutiques tradicionals de tractament ocular, els col·liris i les cremes [5,150,200].

Quan es desenvolupa una formulació en primer lloc s'ha de caracteritzar fisicoquímicament, a continuació s'ha d'estudiar la seva estabilitat a curt termini, i s'ha d'estudiar el seu comportament farmacològic, el seu comportament biofarmacèutic i la seva eficàcia. Quan la fórmula, per les seves característiques, presenta poca estabilitat cal investigar com preservar-la. En el cas d'una suspensió aquosa de nanopartícules

polimèriques que encapsulen un fàrmac, la conservació a llarg termini rau en eliminar l'aigua, i per tant en la producció d'un pols deshidratat. La forma més coneguda de deshidratar fàrmacs i productes químics en general és la liofilització, però a nivell de laboratori de recerca i que també s'ha escalat a producció, es pot utilitzar la tècnica de l'assecatge de l'aerosol, sobre la qual hi ha nombroses publicacions [142,201]. Aquesta deshidratació permet que el fàrmac es pugui emmagatzemar en condicions ambientals i durant un temps relativament llarg.

El producte sec obtingut s'ha de reconstituir amb aigua abans de la seva aplicació i s'ha de comprovar que un cop reconstituïda la suspensió, la formulació no ha modificat el seu comportament farmacològic i no ha perdut la seva eficàcia.

En aquest estudi s'han formulat nanopartícules de PLGA-PEG amb pioglitazona per a ús oftàlmic, s'han caracteritzat fisicoquímicament, i s'han estabilitzat mitjançant la tècnica de l'assecatge de l'aerosol. A continuació s'han fet estudis farmacològics, de biodistribució, de tolerància i d'eficàcia amb la fórmula acabada de preparar i amb la fórmula reconstituïda.

#### **4.1. MÈTODE CROMATOGRÀFIC LC-MS/MS DE DETERMINACIÓ DE PIOGLITAZONA EN TEIXITS OCULARS**

A la literatura s'hi troben alguns estudis de determinació de PGZ en fluids biològics (plasma, orina, sèrum) per HPLC-MS [202] els quals s'han realitzat en relació al tractament de la diabetis, però no hi ha cap estudi de validació i determinació de PGZ en teixits i en concret teixits oculars, que són l'objecte d'aquest treball.

La determinació de PGZ en teixits oculars es va realitzar mitjançant cromatografia de líquids amb detector d'espectrometria de masses, en concret amb un triple quadrupol treballant en mode *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) (Article 1 de la memòria). El mètode analític es va validar seguint la guia de l'Agència Europea del Medicament EMA/CHMP/ICH/172948/2019. ICH Guideline M10 on Bioanalytical Method Validation [203] la qual és equivalent a la guia de la U.S. FDA *Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry* [204]. Considerant criteris d'acceptació recomanats per les guies indicades, en la validació es van avaluar els següents paràmetres: selectivitat/especificitat, efecte de la

matriu, corba de calibratge (funció resposta), límits de quantificació i detecció, exactitud/recuperació, precisió (intra- i inter- dia), *carry-over*, integritat de la dilució i estabilitat de les dissolucions. La robustesa és un paràmetre que s'avalua durant el desenvolupament analític i durant la validació en sí mateixa, ja que no es validaria un mètode que no demostra robustesa.

La composició de la formulació de PGZ-NPs utilitzada en aquest estudi de validació va ser una prova preliminar a l'optimització de la formulació realitzada a l'article 2 de la memòria. Això no obstant, es va caracteritzar pel que fa a grandària, ZP, PI i eficàcia d'encapsulació, obtenint-se valors de  $200 \pm 2.5$  nm,  $-15.0 \pm 1.3$  mV,  $0.2 \pm 0.03$  i  $92.1 \pm 3.2$  % respectivament, donant validesa a la formulació utilitzada per al tractament ocular.

L'absència d'interferències de matriu en la resposta de la PGZ va permetre utilitzar un mètode de calibratge extern. Les determinacions es van realitzar mitjançant l'anàlisi de mostres addicionades, tant amb la PGZ lliure com amb la PGZ encapsulada en NPs de PLGA-PEG (formulació del nanotransportador) per confirmar que tant la PGZ fàrmac lliure com encapsulat es podien extraure del teixit i determinar amb el mateix mètode. En un estudi previ s'havien detectat altes concentracions de PGZ en teixits oculars [165], amb diferències importants segons el teixit, per tant el mètode es va validar en un rang de concentracions, però es va contemplar també l'estudi de la integritat de la dilució de mostres de teixit més concentrades perquè en mostres reals la concentració pot ésser molt variada i així s'ampliaria el rang d'aplicabilitat del mètode.

La determinació de l'exactitud es basa a calcular la recuperació del fàrmac addicionat. L'addició de PGZ lliure es va realitzar mitjançant la preparació d'un patró de PGZ en metanol. L'addició de PGZ encapsulada es va realitzar addicionant la suspensió col·loidal, sempre diluïda en aigua per evitar la ruptura de les nanopartícules, i la quantificació de la PGZ en la suspensió col·loidal es va realitzar mitjançant cromatografia de líquids [35] per poder calcular posteriorment la recuperació del teixit addicionat.

L'ús de la detecció per espectrometria de masses amb triple quadrupol ha permès determinar concentracions molt baixes i amb una gran selectivitat, mitjançant la

quantificació de la transició de l'ió principal (357.2/134.1 en uma/z). La transició 357.2/119.1 en uma/z s'ha utilitzat com a confirmació.

La linealitat de la corba de calibratge es va establir entre 5 i 100 ng/ml. La resposta de la PGZ per espectrometria de masses és molt intensa a causa de la facilitat de protonació del nitrògens de la seva estructura, principalment el piperidínic i en menys mesura el tiazolidínic. Es va trobar que concentracions superiors a 100 ng/ml provocaven pèrdua de la linealitat. Aquesta alta intensitat pot estar relacionada amb el *carry-over* que es va observar durant les jornades de treball. Molt probablement es podria disminuir la concentració i modificar a la vegada el volum d'injecció, per arribar a concentracions d'un o dos ordres de magnituds més baixes trobant bons intervals de linealitat i que permeti quantificar amb exactitud i precisió. El mètode s'ha validat en els teixits en el rang 80-1600 ng/g amb límits de quantificació de 80 ng/g per l'humor aquós i vitri, i 160 ng/g per còrnia, escleròtica i cristal·lí. Els LOD es van estimar de l'ordre de 0.4-0.8 ng/g (dos ordres de magnitud per sota dels LOQ) per això s'obre la porta a una extensió de la validació a nivells més baixos tal com s'ha indicat anteriorment.

Tots els resultats de la validació compleixen els requisits de les guies de validació de mètodes bioanalítics: exactitud en l'interval  $\pm 15\%$ , precisió amb CV  $< 15\%$ , residuals de la corba de calibratge en l'interval  $\pm 15\%$ , *carry-over* inferior al 20 % del LOQ, i quan es dilueixen els extractes concentrats fins a 50 cops per tal de caure en l'interval de linealitat, es compleixen igualment els paràmetres d'exactitud i precisió. Els extractes són estables en els temps estudiats: 8 h a temperatura ambient, 24 h en nevera i 3 mesos en congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

El mètode d'extracció és molt senzill (extracció directa amb metanol) gràcies a què no cal preconcentrar ni purificar l'extracte per l'elevada sensibilitat i selectivitat de la detecció per MS/MS i al fet que la composició de l'extracte és compatible amb el mètode cromatogràfic. Això permet analitzar moltes mostres en poc temps. Aquest mètode es podrà adaptar fàcilment si en un futur es fan estudis de determinació de PGZ en altres tipus de teixit.

S'ha pogut determinar i detectar la PGZ en els teixits oculars de porc tractats amb suspensió de PGZ-NPs: còrnia, escleròtica, cristal·lí, humor aquós i humor vitri. Això ha

demostrat que després d'una instil·lació de la suspensió en porcs, al cap de 4 h la PGZ es detecta en el teixits oculars, tant del segment anterior com posterior, indicant que no és eliminada amb facilitat i que el fàrmac penetra a través de la còrnia cap als altres teixits. El teixit on es troba més concentració de PGZ és l'escleròtica (Figura 6 de l'article 1). També es van analitzar mitjançant aquest mètode cromatogràfic els teixits oculars de conills tractats amb la formulació acabada de preparar i amb la fórmula reconstituïda, durant 10 dies, amb una instil·lació diària, i també es va detectar la PGZ en els teixits analitzats, si bé en aquest cas es va observar més concentració a la còrnia que a l'escleròtica (Figura 7 de l'article 2). Això es pot explicar possiblement pel fet que l'estudi dels conills estava realitzat a més temps, amb instil·lacions diàries, mentre que l'estudi en porcs era una sola instil·lació feta 4 h abans del sacrifici de l'animal.

Per fer estudis més complexos de dosificació, temps de permanència o eliminació, etc, seria necessari utilitzar i sacrificar molts animals i per això no s'ha contemplat fer-ho en aquests estudis preliminars.

#### **4.2. DESENVOLUPAMENT, OPTIMITZACIÓ I CARACTERITZACIÓ FÍSICOQUÍMICA DE LA FORMULACIÓ EN FORMA DE NANOPARTÍCULES POLIMÈRIQUES**

Una suspensió col·loidal de nanopartícules polimèriques que contenen un fàrmac encapsulat és la forma més similar a un col·liri per al tractament ocular. La majoria del col·liri és eliminat amb les llàgrimes per això l'avantatge de les nanopartícules és que la poca quantitat que quedin adherides als teixits o traspassin els teixits, poden disposar de prou temps per anar alliberant lentament el fàrmac fins on han penetrat, fent que provoqui una acció del fàrmac perllongada en el temps, i per tant amb menys instil·lacions s'aconsegueix l'efecte terapèutic.

El desenvolupament de la formulació, destinada al seu posterior assecatge per la tècnica de l'assecatge de l'aerosol, es va realitzar emprant PVA com a estabilitzant de la suspensió col·loidal perquè no és tòxic i s'acostuma a fer servir en la síntesis de nanopartícules de PLGA perquè pot ajudar a la retenció de les nanopartícules en l'ull [93,100].

Els valors de pH de la fase aquosa d'estudi van ser 4.5 i 3.5 ja que a valors més baixos el PLGA es pot degradar molt més ràpidament. Els valors obtinguts de l'eficàcia d'encapsulació són clarament més elevats a pH = 4.5 respecte a pH = 3.5, probablement a causa de la inestabilitat del polímer (Taula 1 de l'article 2).

La solubilitat de la PGZ en DMSO és elevada respecte a altres dissolvents però és limitada (79 mg/ml) i per tant la concentració de PGZ havia de ser prou significativa per a ser determinada químicament en els estudis d'alliberació i penetració, i que fos soluble en la fase orgànica. El DMSO és un dissolvent difícil d'evaporar completament amb un sistema de buit per això és important que la quantitat utilitzada sigui la mínima possible.

La FDA ha classificat el DMSO en la llista de dissolvents més segurs assignant-li la Classe 3 (poc tòxic i baix risc per a la salut humana) en la "ICH Guia per a la Indústria Q3C Impureses: Dissolvents Residuals" [166]. El DMSO és acceptat amb uns límits recomanats que no cal justificar, però convé minimitzar-lo per evitar la seva contribució a l'osmolaritat de la dissolució ja que, pel seu pes molecular baix, en fa augmentar el valor.

El polímer PLGA-PEG que s'ha utilitzat té un pes molecular relativament elevat (Mw aproximadament 95000 Da) i per tant és més difícil de degradar. El pes molecular del PEG enllaçat és de Mw 5000 Da, amb un percentatge d'enllaç del 5 %, el qual es consideraria de baixa densitat. Tot i que no s'ha publicat perquè no era un objectiu d'aquest treball, es va comprovar el pes molecular del polímer mitjançant GPC (*Gel Permeation Chromatography*) utilitzant columnes Styragel de Waters, eluent cloroform, detector d'índex de refracció i calibratge amb patrons de poliestirè de pes molecular certificat amb l'obtenció de valors propers als donat pel fabricant.

La fórmula seleccionada després d'una optimització amb disseny factorial on els paràmetres variables eren el pH de la dissolució aquosa, el % de PVA i la concentració del polímer, tenia una grandària mitjana de  $247.00 \pm 2.77$  nm, una polidispersitat de  $0.17 \pm 0.03$  nm, un potencial Z de  $-3.34 \pm 0.42$  mV i una eficàcia d'encapsulació del  $90.12 \pm 1.15$  % (n=3).

Aquesta formulació es va sotmetre al procés d'assecatge mitjançant la tècnica de l'assecatge de l'aerosol amb l'aparell Büchi Nano Spray Dryer B-90. Per estudiar com



afectaven diferents factors de l'assecatge es va variar el gicler del nebulitzador (5.5  $\mu\text{m}$  i 7.0  $\mu\text{m}$ ) i la temperatura de sortida (25  $^{\circ}\text{C}$  i 30  $^{\circ}\text{C}$ ). Els altres paràmetres es van mantenir constants: flux d'aire i velocitat de l'esprai. L'evaporació és molt ràpida però cal vigilar sobretot la temperatura de sortida que sigui inferior a la  $T_g$  del polímer. No es pot escalfar per sobre de  $T_g$  ni a prop perquè el polímer es pot fondre i formar incrustacions. La pols seca obtinguda es va recollir i guardar en un vial encapsulat a temperatura ambient. Es van obtenir quatre fórmules amb èxit (Figura 3 de l'article 2). La tècnica de l'assecatge de l'aerosol és molt experimental (prova i error) [205,206] i cal optimitzar per a cada formulació tot i que hi ha algunes publicacions destinades a l'estudi de com afecten els diferents factors [144]. Està descrit que es produeix aglomeració i un increment de la grandària de les NPs després d'assecar per aquesta tècnica [207] però quan la pols obtinguda es va redispersar en medi aquós, no hi va haver variació notable de la grandària (Taules 1-2 de l'article 2).

Les suspensions inicials i les fórmules assecades es van caracteritzar mitjançant DSC, XRD i FTIR per comprovar que la pioglitazona formava part de l'estructura de les nanopartícules [97,100,157].

Qualsevol variació intensa i/o extrema en el comportament tèrmic del fàrmac o del polímer pot ser indicatiu d'una interacció entre ells. El pic endotèrmic agut al voltant de 200  $^{\circ}\text{C}$  correspon al punt de fusió de la PGZ i indica la naturalesa cristal·lina i anhidra del fàrmac (Figura 4A de l'article 2). El petit pic endotèrmic al voltant de 50  $^{\circ}\text{C}$  s'atribueix a la temperatura de transició vítria ( $T_g$ ) del polímer PLGA-PEG, la qual és consistent amb un material amorf [157]. El PVA també presenta un pic endotèrmic ample al voltant de 195  $^{\circ}\text{C}$  corresponent a la seva  $T_g$ . L'absència d'un pic de cristal·lització a les NPs es deu possiblement a l'efecte de la dilució del polímer, a la dispersió/dissolució molecular de la PGZ en el polímer o bé a una possible amorfització del fàrmac per haver quedat atrapat i dispers en la matriu pastosa corresponent al polímer fos.

La difracció de rajos-X és una eina per reconèixer qualsevol canvi en la cristal·linitat i polimorfisme de les substàncies. Els espectres de difracció del fàrmac pur, del polímer, de l'estabilitzant i de les NPs es mostren a la Figura 4B de l'article 2. Els patrons de difracció de la PGZ mostren pics aguts atribuïbles a la seva naturalesa cristal·lina mentre

que el PLGA-PEG i el PVA no presenten pics distintius cosa que demostra el seu estat amorf. Els pics del fàrmac desapareixen al difractograma de les formulacions cosa que es pot atribuir a la solubilització de la PGZ en el polímer i a l'alta concentració de polímer i l'estabilitzant en proporció a la PGZ. Els pics de les formulacions són similars a les del polímer estabilitzant cosa que indica que el fàrmac s'ha mesclat completament amb el polímer, s'ha encapsulat i possiblement s'ha amorfitzat perquè passa a formar part de l'estructura polimèrica [50]. A l'espectre de la formulació no assecada s'hi pot apreciar algun pic agut possiblement a restes de PGZ lliure [158,165,208].

L'espectre FTIR de la PGZ pura es caracteritza per un conjunt de pics aguts per sota de  $2000\text{ cm}^{-1}$  [209]. L'espectre FTIR del PVA destaca per una banda ampla principal entre  $3200$  i  $3550\text{ cm}^{-1}$  que correspon a les vibracions de tensió (*stretching*) d'enllaços O-H, la qual també destaca a les formulacions de NPs. La banda vibracional entre  $2800$  i  $3000\text{ cm}^{-1}$  correspon a vibracions de tensió d'enllaços C-H que són presents a totes les substàncies i a les formulacions. Els pics aguts al voltant de  $1750\text{ cm}^{-1}$  són deguts a vibracions de tensió C=O i C-O. La PGZ presenta el pic característic de vibracions de tensió C=O del grup amida al voltant de  $1700\text{ cm}^{-1}$ . Per sota de  $1700\text{ cm}^{-1}$  hi trobem vibracions de tensió C-C, C-N i C-S.

L'espectre FTIR de les PGZ-NPs sense aplicar-los el procés d'estabilització va resultar molt poc intens respecte a les NPs estabilitzades per *spray drying*. Això no obstant, els pics més característics de la PGZ desapareixen de l'espectre indicant l'efecte de la dilució en el polímer i/o un encapsulament físic del fàrmac en la matriu polimèrica. Les NPs no mostren pics addicionals per tant, amb molta probabilitat, no hi ha reacció química entre les matèries primeres. El gran excés de massa de polímer respecte la massa de PGZ pot ser la causa que no es vegin interaccions polímer-PGZ. Analitzant els espectres, no hi ha evidència de l'existència de nous enllaços covalents entre les molècules que constitueixen les nanopartícules.

De les quatre fórmules deshidratades obtingudes, les indicades com *Spray 2* i *Spray 4* a l'article publicat (Taules 1-2 de l'article 2) mantenen una grandària i PI més similars a la suspensió prèvia a l'estabilització per l'assecatge de l'aerosol. Tot i que els valors de grandària, PI, ZP i EE eren molt similars en les dues fórmules, la imatge obtinguda per

microscòpia SEM (Figura 3 - article 2) de la fórmula *Spray 2* mostrava que les nanopartícules eren lleugerament més esfèriques. Després de l'assecatge i reconstitució, es produeix en general un lleuger increment de la grandària de les nanopartícules i de la polidispersitat. La càrrega superficial augmenta lleugerament en valor absolut i l'eficàcia d'encapsulació no varia, mantenint-se al voltant del 90 % (Taula 2 de l'article 2). Cal puntualitzar que la tècnica que s'ha utilitzat per mesurar la grandària de les partícules, DLS (*dynamic light scattering*: dispersió dinàmica de la llum), s'aplica a partícules en suspensió, la qual és diferent de la tècnica de difracció amb làser que s'aplica a mostres sòlides.

L'estabilitat de les suspensions de nanopartícules tant de la fórmula acabada de preparar com de la fórmula reconstituïda, emmagatzemades en condicions de refrigeració, es va avaluar durant 6 mesos i no es van observar fenòmens d'aglomeració o sedimentació ja que els perfils de dispersió obtinguts (*backscattering*) no es van alterar significativament (Figura 9 de l'article 2). Tot i que l'avaluació es va realitzar fins a 6 mesos perquè es tractava de l'estudi del comportament d'una nova formulació, cal destacar que per norma general els col·liris no s'han d'utilitzar durant massa temps després de ser oberts (< 4 setmanes) per assegurar la seva esterilitat.

### 4.3. COMPORTAMENT BIOFARMACÈUTIC

En l'estudi d'alliberació (*release in vitro*) realitzat amb membranes de diàlisi en cel·les de Franz, l'alliberament (traspàs a través de la membrana) de la PGZ lliure és molt ràpida en comparació a quan la PGZ està encapsulada en nanopartícules de PLGA-PEG (Figura 5A de l'article 2). La PGZ lliure arriba en pocs minuts al seu màxim de concentració en el medi receptor (alliberament sobtat), mentre que l'alliberació de la PGZ de les nanopartícules va augmentant lentament amb el temps si bé inicialment es produeix una alliberació més ràpida.

L'alliberament de la PGZ de les quatre fórmules seques (deshidratades) i resuspeses (Figura 5B de l'article 2) tenen perfils similars que s'ajusten a equacions diferents (Taula S1 de l'article 2), si bé la formulació anomenada *Spray 2* s'ajusta al perfil cinètic

Korsmeyer-Peppas el qual s'utilitza per descriure l'alliberament de fàrmacs d'un sistema polimèric considerant mecanismes que no segueixen pròpiament la llei de Fick [210]. El model és útil quan el mecanisme d'alliberació és desconegut o quan hi ha involucrats més d'un mecanisme. Aquest fet, juntament amb les característiques de grandària i EE, van fer que se seleccionés aquesta fórmula per a l'estudi de penetració a través de la còrnia i de l'escleròtica.

L'estudi de penetració *ex vivo* realitzat amb còrnia i escleròtica de conills es va fer per comparar els perfils entre la fórmula acabada de preparar i la fórmula estabilitzada escollida, l'anomenada *Spray 2*. El comportament de les dues formulacions respecte a la penetració a través de la còrnia va ser equivalent i força ràpida, mentre que amb l'escleròtica la formulació deshidratada i reconstituïda va mostrar una penetració més lenta (Figura 6 de l'article 2) respecte a la formulació sense estabilitzar, i en global una penetració més lenta que a través de la còrnia.

Aquests estudis d'alliberació i de penetració corneal i a través de l'escleròtica, van indicar que l'alliberació de la PGZ és contínua i controlada, fet que permetria reduir la freqüència d'instil·lació del col·liri, a diferència dels tractaments oculars clàssics amb col·liris que contenen el fàrmac lliure.

#### 4.4. TOLERÀNCIA, CITOTOXICITAT I SEGURETAT

Els tests de tolerància ocular de les formulacions de PGZ-NPs es van realitzar tant *in vitro* (test de HET-CAM) com *in vivo* (test de Draize). Els conills del grup control i dels grups experimentals tractats amb nanopartícules no van mostrar signes de malestar ni irritació ocular durant les primeres hores ni durant els 7 dies que va durar l'assaig. El tractament dels conills amb les suspensions de nanopartícules es va poder realitzar perquè que el test previ de la membrana corioal·lantoide d'ou fecundat (HET-CAM) no va mostrar cap signe d'irritació (Figura S1 de l'article 3). Aquests resultats coincideixen amb altres estudis trobats a la literatura referents al tractament ocular amb nanopartícules de PLGA [147,168] o de PLGA-PEG [160,170].

Un dels problemes que pot portar l'ús de nanopartícules com a agents terapèutics i que comporta força controvèrsia, és la seva possible toxicitat cel·lular. És per això que es va comprovar la citotoxicitat amb cèl·lules Y-79 de retinoblastoma humà mitjançant la realització del test de l'AlamarBlue [211]. Les formulacions acabades de preparar i les reconstituïdes després de l'assecatge de l'aerosol no van afectar significativament la viabilitat de les cèl·lules durant 48 hores (Figura 4 de l'article 3). Aquests resultats estan d'acord amb altres estudis de citotoxicitat realitzats amb NPs de PLGA i PLGA-PEG [147,212].

La histologia de les còrnies de conill en un estudi *ex vivo* va confirmar normalitat en l'estructura dels teixits, sense alteracions morfològiques, tant en les còrnies control com en les còrnies tractades amb nanopartícules de les formulacions estudiades, la suspensió fresca i la suspensió reconstituïda després de l'assecatge (Figura 3 de l'article 3).

La tècnica SAXS permet mesurar la distància interfibril·lar de les fibres de col·lagen de la còrnia així com el diàmetre fibril·lar del les fibres. L'estroma de la còrnia és una estructura ordenada, similar a un cristall, la qual està associada a les seves propietats de transparència i refracció. Si la còrnia pateix algun dany, aquesta estructura s'altera i es poden estudiar els canvis mitjançant tècniques de difracció de raigs-X amb radiació de sincrotró. Per tal d'avaluar si les formulacions de nanopartícules provocaven alguna alteració en la còrnia respecte un control negatiu tractat amb dissolució salina, es van obtenir imatges de difracció al llarg de la part central de la còrnia de conills i es van tractar matemàticament (Figura 8 de l'article 2). Aquestes còrnies provenien de conills tractats durant 10 dies (0.05 ml/ull·dia) amb la formulació acabada de preparar i la formulació reconstituïda.

Pel que fa al diàmetre de les fibres no es van trobar diferències significatives entre el control negatiu i els animals tractats amb la suspensió fresca i la suspensió reconstituïda després de l'assecatge. Pel que fa a l'espai interfibril·lar, no es van detectar diferències significatives amb el control negatiu però sí que les diferències eren significatives entre els dos tractaments. Tot i això es va poder deduir que el tractament ocular amb nanopartícules fet durant 10 dies amb una instil·lació per dia, no alterava la còrnia perquè els patrons de difracció obtinguts eren d'estructura ordenada. Aquest estudi es

va realitzar amb pocs animals (n=2) i per això les diferències trobades entre els tractaments no serien concloents estadísticament.

La transparència de la còrnia en un estudi *ex vivo* fet amb còrnies de porc, en el qual es van mantenir en contacte amb les formulacions a 32 °C en cel·les de Franz, durant 1.5 h, no es va observar disminució significativa de la transmitància respecte al control negatiu tractat amb solució salina, per part de la còrnia tractada amb les nanopartícules de pioglitazona reconstituïdes. Això no obstant es va produir una lleugera disminució de la transmitància en les còrnies tractades amb la suspensió fresca que es podria atribuir a algun fenomen de dispersió provocat per la presència de nanopartícules adherides a la còrnia i que convindria comprovar en futurs estudis (Figura 7 de l'article 3).

#### 4.5. EFICÀCIA

L'eficàcia de les PGZ-NPs per prevenir processos inflamatoris oculars es va investigar amb conills, instil·lant primer les formulacions (fórmula acabada de preparar i fórmula reconstituïda) i induint una inflamació amb araquidonat sòdic (SA) passats 30 min des de la instil·lació. Les formulacions van mostrar diferències significatives respecte el control positiu ja després dels primers 30 min de l'administració de SA (mesura dels *scores*,  $p < 0.05$ ), i observant una disminució de la puntuació (*scores*) a cada temps estudiat i fins a 3 hores, provocant una clara reducció de la inflamació de la conjuntiva i de la hiperèmia (Figures 1-2 de l'article 3). Aquests resultats demostren que la formulació té capacitat antiinflamatòria, i està d'acord amb els resultats de penetració en la còrnia observats en la Figura 6 de l'article 2.

Es va fer un estudi d'eficàcia similar però utilitzant porcs, amb l'objectiu d'estudiar si es produïen alteracions en la ultraestructura de la còrnia. En aquest cas s'instil·laven també les formulacions (fórmula acabada de preparar i fórmula reconstituïda), i passats 30 min es provocava la irritació ocular amb l'administració de SA als animals instil·lats amb les NPs. També es disposava d'un control negatiu instil·lat amb dissolució salina i un control positiu instil·lat només amb SA. Passades unes 4 h es va procedir a l'eutanàsia dels porcs i es van separar els ulls per a fer l'estudi de la ultraestructura de la còrnia mitjançant difracció de rajos-X de sincrotró amb la tècnica SAXS. Per tal d'avaluar si les

nanopartícules provocaven alguna alteració en la còrnia respecte els controls positiu i negatiu, es van fer mesures SAXS al llarg de diferents talls de la còrnia a la part central de diferents animals. Les dades trobades del diàmetre fibril·lar (DF) en els grups estudiats presentaven poca variació, i no hi havia diferències significatives entre el control positiu i negatiu, per tant no va ser un paràmetre que va permetre diferenciar l'efecte de la formulació en la còrnia (Taula 1 i Figura 5-A de l'article 3). De fet, aquestes dades confirmen les dades trobades a la bibliografia en que el DF és un paràmetre que varia poc [213,214]. Els valors trobats per l'espai interfibril·lar van mostrar que aquest paràmetre disminuïa lleugerament de la part anterior a la posterior de la còrnia, excepte en la còrnia tractada amb la fórmula reconstituïda (Taula 2 i Figura 5-B de l'article 3). Diferents estudis demostren que l'espai interfibril·lar no és uniforme en tota la superfície de la còrnia [195] i decreix de fora a dins [213]. Ara bé, el fet que l'espai interfibril·lar no mostrés diferències significatives entre el control negatiu i els animals tractats amb les formulacions, indica que aquestes tenen un efecte protector en cas d'inflamació. El control positiu mostrava un espai interfibril·lar inferior als altres grups, similar a l'efecte d'una deshidratació [215], si bé la variabilitat trobada al grup tractat amb la formulació reconstituïda després de l'assecatge va fer que estadísticament no hi hagués diferències significatives comparant amb el control positiu.

Cal destacar que aquests estudis de la ultraestructura de la còrnia d'animals tractats amb formulacions de fàrmacs en forma de nanopartícules, mitjançant difracció de rajos-X de radiació de sincrotró, és el primer cop que s'inclouen a la bibliografia com un element més per avaluar la seguretat i l'eficàcia de la formulació.





## **5. CONCLUSIONS**



## 5. CONCLUSIONS

Aquest treball s'ha dissenyat per preparar nanopartícules polimèriques de PLGA-PEG amb el fàrmac pioglitazona per al tractament de la inflamació ocular i estabilitzar-les amb la tècnica d'assecatge de l'aerosol. S'ha avaluat el seu comportament farmacològic, la seguretat, l'eficàcia i la biodisponibilitat amb estudis *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*.

- El mètode LC-MS/MS desenvolupat i validat per a la determinació de PGZ en teixits oculars, compleix els requisits de les guies de validació de mètodes bioanalítics tant per a la determinació de PGZ lliure com per a la determinació de PGZ encapsulada en forma de nanopartícules de PLGA-PEG en diferents teixits oculars. És un mètode molt sensible i relativament ràpid.
- La PGZ es detecta en els diferents teixits oculars dels animals tractats amb la formulació de PGZ-NPs, còrnia, escleròtica, cristal·lí, humor aquós i humor vitri, demostrant que el fàrmac penetra per la barrera corneal i les barreres de l'escleròtica.
- Les PGZ-NPs optimitzades mitjançant un disseny factorial i preparades pel mètode de la nanoprecipitació són fisicoquímicament adequades per al tractament ocular (grandària, PI, ZP, EE).
- Les suspensions de PGZ-NPs acabades de preparar i les reconstituïdes són estables físicament durant 6 mesos, amb absència de sedimentació, agregació o floculació.
- La determinació de l'eficàcia d'encapsulació, la caracterització espectroscòpica (FTIR i XRD) i calorimètrica (DSC) confirmen que el fàrmac està encapsulat en la matriu polimèrica.
- La deshidratació de la suspensió amb la tècnica d'assecatge de l'aerosol no altera significativament les propietats físiques i químiques del sistema nanoestructurat.
- Les nanopartícules polimèriques proporcionen una alliberació lenta i perllongada de la pioglitazona.
- Amb les nanopartícules es produeix penetració de la pioglitazona a través de la còrnia i de l'escleròtica.

- Les PGZ-NPs no presenten citotoxicitat en la línia cel·lular Y-79 de retinoblastoma a la concentració estudiada durant 48 h.
- Els assajos amb la membrana corioal·lantoide demostren que la formulació no és irritant.
- Els assajos *in vivo* demostren que la formulació presenta eficàcia antiinflamatòria i que la tolerància ocular és òptima.
- Les PGZ-NPs aplicades *in vivo* no afecten la ultraestructura de la còrnia i es demostra que possiblement tenen un efecte protector de la inflamació.
- La transparència de la còrnia *ex vivo* no es veu afectada significativament després d'estar en contacte amb la suspensió de nanopartícules.
- La histologia de la còrnia *ex vivo* no és afectada en estar en contacte amb a suspensió de nanopartícules.

### **Continuació de la recerca**

De tot aquest treball també es conclou que en un futur es pot continuar la línia de recerca fent un estudi de la liofilització de la suspensió de NPs, com a tècnica d'assecatge per a preservar la formulació, ja que és un procés molt utilitzat en la indústria farmacèutica. I explorar en detall l'impacte del procés en la integritat de l'estructura de les NPs, la repercussió en els perfils d'alliberació i l'efecte en l'activitat farmacològica.

D'altra banda, una altra etapa en la fabricació d'un fàrmac destinat a ser utilitzat com un col·liri és l'esterilització, i per tant també caldria estudiar com afecta la irradiació gamma a les propietats del nanosistema.

Finalment també seria interessant fer un estudi de l'estabilitat en el temps, a temperatura ambient, de la formulació deshidratada per establir la caducitat del producte, etapa del desenvolupament d'un medicament que sempre és necessària per treure un fàrmac al mercat.

## **6. REFERÈNCIES**



## 6. REFERÈNCIES

1. Koutsoviti, M.; Siamidi, A.; Pavlou, P.; Vlachou, M. Recent advances in the excipients used for modified ocular drug delivery. *Materials (Basel)* **2021**, *14*, 4290, doi:10.3390/ma14154290.
2. Dua, H.S.; Faraj, L.A.; Said, D.G.; Gray, T.; Lowe, J. Human corneal anatomy redefined: A novel pre-descemet's layer (Dua's Layer). *Ophthalmology* **2013**, *120*, 1778–1785, doi:10.1016/j.ophtha.2013.01.018.
3. Dua, H.S.; Faraj, L.A.; Said, D.G. Dua's layer: Discovery, characteristics, clinical applications, controversy and potential relevance to glaucoma. *Expert Rev. Ophthalmol.* **2015**, *10*, 531–547.
4. Maurice, D.M. The structure and transparency of the cornea. *J. Physiol.* **1957**, *136*, 263–286, doi:https://doi.org/10.1113/jphysiol.1957.sp005758.
5. Guo, D.; Li, Q.; Sun, Y.; Guo, J.; Zhao, Q.; Yin, X.; Wei, H.; Wu, S.; Bi, H. Evaluation of controlled-release triamcinolone acetate-loaded mPEG-PLGA nanoparticles in treating experimental autoimmune uveitis. *Nanotechnology* **2019**, *30*, 165702, doi:10.1088/1361-6528/aafe36.
6. Wang, H.; Zhou, Y.; Sun, Q.; Zhou, C.; Hu, S.; Lenahan, C.; Xu, W.; Deng, Y.; Li, G.; Tao, S. Update on Nanoparticle-Based Drug Delivery System for Anti-inflammatory Treatment. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 1–9, doi:10.3389/fbioe.2021.630352.
7. Begines, B.; Ortiz, T.; Pérez-Aranda, M.; Martínez, G.; Merinero, M.; Argüelles-Arias, F.; Alcudia, A. Polymeric nanoparticles for drug delivery: Recent developments and future prospects. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1403.
8. Dubald, M.; Bourgeois, S.; Andrieu, V.; Fessi, H. Ophthalmic drug delivery systems for antibiotherapy- A review. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 10, doi:10.3390/pharmaceutics10010010.
9. Tsai, C.H.; Wang, P.Y.; Lin, I.C.; Huang, H.; Liu, G.S.; Tseng, C.L. Ocular drug delivery: Role of degradable polymeric nanocarriers for ophthalmic application. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2830, doi:10.3390/ijms19092830.
10. Gaffney, E.A.; Tiffany, J.M.; Yokoi, N.; Bron, A.J. A mass and solute balance model for tear volume and osmolarity in the normal and the dry eye. *Prog. Retin. Eye Res.* **2010**, *29*, 59–78, doi:10.1016/j.preteyeres.2009.11.002.
11. Bachu, R.D.; Chowdhury, P.; Al-Saedi, Z.H.F.; Karla, P.K.; Boddu, S.H.S. Ocular drug delivery barriers—role of nanocarriers in the treatment of anterior segment ocular diseases. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 1–31, doi:10.3390/pharmaceutics10010028.
12. Agarwal, R.; Iezhita, I.; Agarwal, P.; Abdul Nasir, N.A.; Razali, N.; Alyautdin, R.; Ismail,

- N.M. Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update. *Drug Deliv.* 2016, 23, 1075–1091.
13. Halasz, K.; Kelly, S.J.; Iqbal, M.T.; Pathak, Y.; Sutariya, V. Micro/Nanoparticle Delivery Systems for Ocular Diseases. *Assay Drug Dev. Technol.* **2019**, 17, 152–166, doi:10.1089/adt.2018.911.
14. Lynch, C.; Kondiah, P.P.D.; Choonara, Y.E.; du Toit, L.C.; Ally, N.; Pillay, V. Advances in biodegradable nano-sized polymer-based ocular drug delivery. *Polymers (Basel)*. **2019**, 11, 1371, doi:10.3390/polym11081371.
15. Zimmer, A.; Kreuter, J. Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, 16, 61–73, doi:10.1016/0169-409X(95)00017-2.
16. DiMasi, J.A.; Hansen, R.W.; Grabowski, H.G. The price of innovation: New estimates of drug development costs. *J. Health Econ.* **2003**, 22, 151–185, doi:10.1016/S0167-6296(02)00126-1.
17. Brown, K. Repurposing Old Drugs for New Uses. *DePaul J. Art Technol. Intellect. Prop. Law* **2017**, 28, Article 2.
18. Medina, G.; Sewter, C.; Vidal Puig, A.J. PPAR $\gamma$  y tiazolidinedionas, algo más que un tratamiento contra la diabetes. *Med. Clin. (Barc)*. **2000**, 115, 392–397, doi:10.1016/s0025-7753(00)71569-7.
19. Lehrke, M.; Lazar, M.A. The many faces of PPAR $\gamma$ . *Cell* **2005**, 123, 993–999, doi:10.1016/j.cell.2005.11.026.
20. Daynes, R.A.; Jones, D.C. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, 2, 748–759, doi:10.1038/nri912.
21. Miyazaki, Y.; Mahankali, A.; Matsuda, M.; Glass, L.; Mahankali, S.; Ferrannini, E.; Cusi, K.; Mandarino, L.J.; DeFronzo, R.A. Improved glycemic control and enhanced insulin sensitivity in type 2 diabetic subjects treated with pioglitazone. *Diabetes Care* **2001**, 24, 710–719, doi:10.2337/diacare.24.4.710.
22. Zhang, C.; Matzger, A.J. A newly discovered racemic compound of pioglitazone hydrochloride is more stable than the commercial conglomerate. *Cryst. Growth Des.* **2017**, 17, 414–417, doi:10.1021/acs.cgd.6b01638.
23. Mehta, M. *Biopharmaceutics Classification System (BSC)*; John Wiley & Sons, Ed.; New York, **2017**; ISBN 978-1-118-47661-1.
24. Cardot, J.M.; Garcia Arieta, A.; Paixao, P.; Tasevska, I.; Davit, B. Implementing the Biopharmaceutics Classification System in Drug Development: Reconciling Similarities, Differences, and Shared Challenges in the EMA and US-FDA-Recommended Approaches. *AAPS J.* **2016**, 18, 1039–1046, doi:10.1208/s12248-016-9915-0.



25. Yamamoto, A.; Kakuta, H.; Miyachi, H.; Sugimoto, Y. Involvement of the retinoid X receptor ligand in the anti-inflammatory effect induced by peroxisome proliferator-activated receptor agonist *in vivo*. *PPAR Res.* **2011**, *2011*, 840194, doi:10.1155/2011/840194.
26. Ishibashi, M.; Egashira, K.; Hiasa, K. ichi; Inoue, S.; Ni, W.; Zhao, Q.; Usui, M.; Kitamoto, S.; Ichiki, T.; Takeshita, A. Antiinflammatory and antiarteriosclerotic effects of pioglitazone. *Hypertension* **2002**, *40*, 687–693, doi:10.1161/01.HYP.0000036396.64769.C2.
27. Moraes, L.A.; Piqueras, L.; Bishop-Bailey, D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *110*, 371–385, doi:10.1016/j.pharmthera.2005.08.007.
28. Gelman, L.; Fruchart, J.C.; Auwerx, J. An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, *55*, 932–943, doi:10.1007/s000180050345.
29. Ahmadian, M.; Suh, J.M.; Hah, N.; Liddle, C.; Atkins, A.R.; Downes, M.; Evans, R.M. Ppar $\gamma$  signaling and metabolism: The good, the bad and the future. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 557–566, doi:10.1038/nm.3159.
30. Matoba, T.; Koga, J. ichiro; Nakano, K.; Egashira, K.; Tsutsui, H. Nanoparticle-mediated drug delivery system for atherosclerotic cardiovascular disease. *J. Cardiol.* **2017**, *70*, 206–211.
31. Tokutome, M.; Matoba, T.; Nakano, Y.; Okahara, A.; Fujiwara, M.; Koga, J.I.; Nakano, K.; Tsutsui, H.; Egashira, K. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma targeting nanomedicine promotes cardiac healing after acute myocardial infarction by skewing monocyte/macrophage polarization in preclinical animal models. *Cardiovasc. Res.* **2019**, *115*, 419–431, doi:10.1093/cvr/cvy200.
32. Wahli, W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs): From metabolic control to epidermal wound healing. *Swiss Med. Wkly.* **2002**, *132*, 83–91, doi:10.4414/smw.2002.09939.
33. Gupta, M.; Mahajan, V.K.; Mehta, K.S.; Chauhan, P.S.; Rawat, R. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and PPAR agonists: the ‘future’ in dermatology therapeutics? *Arch. Dermatol. Res.* **2015**, *307*, 767–780, doi:10.1007/s00403-015-1571-1.
34. Sakai, S.; Sato, K.; Tabata, Y.; Kishi, K. Local release of pioglitazone (a peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonist) accelerates proliferation and remodeling phases of wound healing. *Wound Repair Regen.* **2016**, *24*, 57–64, doi:10.1111/wrr.12376.
35. Silva-Abreu, M.; Espinoza, L.C.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Fábrega, M.J.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Human skin permeation studies with PPAR $\gamma$  agonist to improve its permeability and efficacy in inflammatory processes. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*,

- 2548, doi:10.3390/ijms18122548.
36. Rojewska, A.; Karewicz, A.; Karnas, K.; Wolski, K.; Zajac, M.; Kamiński, K.; Szczubiałka, K.; Zapotoczny, S.; Nowakowska, M. Pioglitazone-loaded nanostructured hybrid material for skin ulcer treatment. *Materials (Basel)*. **2020**, *13*, 2050, doi:10.3390/MA13092050.
37. Kanemaru, M.; Asai, J.; Jo, J. ichiro; Arita, T.; Kawai-Ohnishi, M.; Tsutsumi, M.; Wada, M.; Tabata, Y.; Katoh, N. Nanoparticle-mediated local delivery of pioglitazone attenuates bleomycin-induced skin fibrosis. *J. Dermatol. Sci.* **2019**, *93*, 41–49, doi:10.1016/j.jdermsci.2018.11.012.
38. Espinoza, L.C.; Silva-Abreu, M.; Calpena, A.C.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Fábrega, M.J.; Garduño-Ramírez, M.L.; Clares, B. Nanoemulsion strategy of pioglitazone for the treatment of skin inflammatory diseases. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2019**, *19*, 115–125, doi:10.1016/j.nano.2019.03.017.
39. Kuehn, B.M. In Alzheimer Research, Glucose Metabolism Moves to Center Stage. *JAMA* **2020**, *323*, 297–299.
40. Wong, L.R.; Wong, P.; Ho, P.C.L. Metabolic profiling of female tg2576 mouse brains provides novel evidence supporting intranasal low-dose pioglitazone for long-term treatment at an early stage of alzheimer’s disease. *Biomedicines* **2020**, *8*, 1–23, doi:10.3390/biomedicines8120589.
41. Jojo, G.M.; Kuppusamy, G. Scope of new formulation approaches in the repurposing of pioglitazone for the management of Alzheimer’s disease. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2019**, *44*, 337–348, doi:10.1111/jcpt.12808.
42. Jojo, G.M.; Kuppusamy, G.; De, A.; Karri, V.V.S.N.R. Formulation and optimization of intranasal nanolipid carriers of pioglitazone for the repurposing in Alzheimer’s disease using Box-Behnken design. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2019**, *45*, 1061–1072, doi:10.1080/03639045.2019.1593439.
43. Silva-Abreu, M.; Calpena, A.C.; Andrés-Benito, P.; Aso, E.; Romero, I.A.; Roig-Carles, D.; Gromnicova, R.; Espina, M.; Ferrer, I.; García, M.L.; et al. PPAR $\gamma$  agonist-loaded PLGA-PEG nanocarriers as a potential treatment for Alzheimer’s disease: In vitro and in vivo studies. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *13*, 5577–5590, doi:10.2147/IJN.S171490.
44. Silva-Abreu, M.; Gonzalez-Pizarro, R.; Espinoza, L.C.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Thiazolidinedione as an alternative to facilitate oral administration in geriatric patients with Alzheimer’s disease. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *129*, 173–180, doi:10.1016/j.ejps.2019.01.008.
45. Silva-Abreu, M.; Espinoza, L.C.; Halbaut, L.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Comparative study of Ex Vivo transmucosal permeation of pioglitazone nanoparticles for

- the treatment of Alzheimer's disease. *Polymers (Basel)*. **2018**, *10*, 316, doi:10.3390/polym10030316.
46. Sarayba, M.A.; Li, L.; Tungsiripat, T.; Liu, N.H.; Sweet, P.M.; Patel, A.J.; Osann, K.E.; Chittiboyina, A.; Benson, S.C.; Pershadsingh, H.A.; et al. Inhibition of corneal neovascularization by a peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  ligand. *Exp. Eye Res.* **2005**, *80*, 435–442, doi:10.1016/j.exer.2004.10.009.
47. Zhang, Y.X.; Zhang, M.C. Inhibitory effects of pioglitazone on alkaline burn induced corneal neovascularization in rats. *Int. J. Ophthalmol.* **2008**, *1*, 99–103.
48. Uchiyama, M.; Shimizu, A.; Masuda, Y.; Nagasaka, S.; Fukuda, Y.; Takahashi, H. An ophthalmic solution of a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist prevents corneal inflammation in a rat alkali burn model. *Mol. Vis.* **2013**, *19*, 2135–2150.
49. Pan, H.; Chen, J.; Xu, J.; Chen, M.; Ma, R. Antifibrotic effect by activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in corneal fibroblasts. *Mol. Vis.* **2009**, *15*, 2279–2286.
50. Laddha, U.D.; Kshirsagar, S.J. Formulation of nanoparticles loaded in situ gel for treatment of dry eye disease: In vitro, ex vivo and in vivo evidences. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2021**, *61*, 102112, doi:10.1016/j.jddst.2020.102112.
51. Guo, N.; Woeller, C.F.; Feldon, S.E.; Phipps, R.P. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands inhibit transforming growth factor- $\beta$ -induced, hyaluronan-dependent, T cell adhesion to orbital fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 18856–18867, doi:10.1074/jbc.M110.179317.
52. Starkey, K.; Heufelder, A.; Baker, G.; Joba, W.; Evans, M.; Davies, S.; Ludgate, M. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in thyroid eye disease: Contraindication for thiazolidinedione use? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, *88*, 55–59, doi:10.1210/jc.2002-020987.
53. Okunuki, Y.; Usui, Y.; Nakagawa, H.; Tajima, K.; Matsuda, R.; Ueda, S.; Hattori, T.; Kezuka, T.; Goto, H. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist pioglitazone suppresses experimental autoimmune uveitis. *Exp. Eye Res.* **2013**, *116*, 291–297, doi:10.1016/j.exer.2013.09.017.
54. Diebold, Y.; Calonge, M. Applications of nanoparticles in ophthalmology. *Prog. Retin. Eye Res.* **2010**, *29*, 596–609, doi:10.1016/j.preteyeres.2010.08.002.
55. Patra, J.K.; Das, G.; Fraceto, L.F.; Campos, E.V.R.; Rodriguez-Torres, M.D.P.; Acosta-Torres, L.S.; Diaz-Torres, L.A.; Grillo, R.; Swamy, M.K.; Sharma, S.; et al. Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnology* **2018**, *16*, 1–33, doi:10.1186/s12951-018-0392-8.
56. Riehemann, K.; Schneider, S.W.; Luger, T.A.; Godin, B.; Ferrari, M.; Fuchs, H.

- Nanomedicine - Challenge and perspectives. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48*, 872–897, doi:10.1002/anie.200802585.
57. Gómez-Garzón, M.; Alejandra Martínez-Ceballos, M.; Gómez-López, A.; Rojas-Villarraga, A. Nanotechnology applications in ophthalmology: An update. *Rev. Mex. Oftalmol.* **2021**, *94*, 221–233, doi:10.24875/rmo.m20000125.
58. Onugwu, A.L.; Nwagwu, C.S.; Onugwu, O.S.; Echezona, A.C.; Agbo, C.P.; Ihim, S.A.; Emeh, P.; Nnamani, P.O.; Attama, A.A.; Khutoryanskiy, V. V. Nanotechnology based drug delivery systems for the treatment of anterior segment eye diseases. *J. Control. Release* **2023**, *354*, 465–488, doi:10.1016/j.jconrel.2023.01.018.
59. Bouchemal, K.; Briançon, S.; Perrier, E.; Fessi, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation. *Int. J. Pharm.* **2004**, *280*, 241–251, doi:10.1016/j.ijpharm.2004.05.016.
60. Jacob, J.; Haponiuk, J.T.; Thomas, S.; Gopi, S. Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review. *Mater. Today Chem.* **2018**, *9*, 43–55, doi:10.1016/j.mtchem.2018.05.002.
61. Silva, B.; Marto, J.; Braz, B.S.; Delgado, E.; Almeida, A.J.; Gonçalves, L. New nanoparticles for topical ocular delivery of erythropoietin. *Int. J. Pharm.* **2020**, *576*, 119020, doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119020.
62. Jin, Z.; Gao, S.; Cui, X.; Sun, D.; Zhao, K. Adjuvants and delivery systems based on polymeric nanoparticles for mucosal vaccines. *Int. J. Pharm.* **2019**, *572*, 118731, doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118731.
63. Su, S.; Kang, P.M. Systemic review of biodegradable nanomaterials in nanomedicine. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 656, doi:10.3390/nano10040656.
64. Le Boursais, C.; Acar, L.; Zia, H.; Sado, P.A.; Needham, T.; Leverge, R. Ophthalmic drug delivery systems - Recent advances. *Prog. Retin. Eye Res.* **1998**, *17*, 33–58, doi:10.1016/S1350-9462(97)00002-5.
65. Kimura, H.; Ogura, Y. Biodegradable Polymers for Ocular Drug Delivery. *Source Sci. New Ser.* **2002**, *297*, 803–807.
66. Sahoo, S.K.; Dilnawaz, F.; Krishnakumar, S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 144–151, doi:10.1016/j.drudis.2007.10.021.
67. Nagarwal, R.C.; Kant, S.; Singh, P.N.; Maiti, P.; Pandit, J.K. Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. *J. Control. Release* **2009**, *136*, 2–13, doi:10.1016/j.jconrel.2008.12.018.
68. Zhou, H.Y.; Hao, J.L.; Wang, S.; Zheng, Y.; Zhang, W.S. Nanoparticles in the ocular drug delivery. *Int. J. Ophthalmol.* **2013**, *6*, 390–396, doi:10.3980/j.issn.2222-3959.2013.03.25.

69. Janagam, D.R.; Wu, L.; Lowe, T.L. Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *122*, 31–64, doi:10.1016/j.addr.2017.04.001.
70. Weng, Y.; Liu, J.; Jin, S.; Guo, W.; Liang, X.; Hu, Z. Nanotechnology-based strategies for treatment of ocular disease. *Acta Pharm. Sin. B* **2017**, *7*, 281–291, doi:10.1016/j.apsb.2016.09.001.
71. Ghafoorianfar, S.; Ghorani-Azam, A.; Mohajeri, S.A.; Farzin, D. Efficiency of nanoparticles for treatment of ocular infections: Systematic literature review. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *57*, 101765, doi:10.1016/j.jddst.2020.101765.
72. Meza-Rios, A.; Navarro-Partida, J.; Armendariz-Borunda, J.; Santos, A. Therapies Based on Nanoparticles for Eye Drug Delivery. *Ophthalmol. Ther.* **2020**, *9*, 401–414, doi:10.1007/s40123-020-00257-7.
73. Swetledge, S.; Jung, J.P.; Carter, R.; Sabliov, C. Distribution of polymeric nanoparticles in the eye: implications in ocular disease therapy. *J. Nanobiotechnology* **2021**, *19*, 1–19, doi:10.1186/s12951-020-00745-9.
74. Zhang, J.; Jiao, J.; Niu, M.; Gao, X.; Zhang, G.; Yu, H.; Yang, X.; Liu, L. Ten years of knowledge of nano-carrier based drug delivery systems in ophthalmology: Current evidence, challenges, and future prospective. *Int. J. Nanomedicine* **2021**, *16*, 6497–6530, doi:10.2147/IJN.S329831.
75. Berillo, D.; Zharkinbekov, Z.; Kim, Y.; Raziyeva, K.; Temirkhanova, K.; Saparov, A. Stimuli-responsive polymers for transdermal, transmucosal and ocular drug delivery. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1–30, doi:10.3390/pharmaceutics13122050.
76. Allyn, M.M.; Luo, R.H.; Hellwarth, E.B.; Swindle-Reilly, K.E. Considerations for Polymers Used in Ocular Drug Delivery. *Front. Med.* **2022**, *8*, 1–25, doi:10.3389/fmed.2021.787644.
77. Yang, C.; Yang, J.; Lu, A.; Gong, J.; Yang, Y.; Lin, X.; Li, M.; Xu, H. Nanoparticles in ocular applications and their potential toxicity. *Front. Mol. Biosci.* **2022**, *9*, 1–18, doi:10.3389/fmolb.2022.931759.
78. Han, H.; Li, S.; Xu, M.; Zhong, Y.; Fan, W.; Xu, J.; Zhou, T.; Ji, J.; Ye, J.; Yao, K. Polymer- and lipid-based nanocarriers for ocular drug delivery: Current status and future perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2023**, *196*, 114770, doi:10.1016/j.addr.2023.114770.
79. K.S. Soppimath, T.M. Aminabhavi, A.R. Kulkarni, W.E.R. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* **2001**, *70*, 1–20.
80. Murakami, H.; Kawashima, Y.; Niwa, T.; Hino, T.; Takeuchi, H.; Kobayashi, M. Influence of the degrees of hydrolyzation and polymerization of poly(vinylalcohol) on the preparation and properties of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle. *Int. J. Pharm.* **1997**, *149*, 43–49, doi:10.1016/S0378-5173(96)04854-5.

81. M.Yu, J.Shi, O.C.F. Nanotechnology for Protein Delivery: Overview and Perspectives. *J. Control. Release* **2016**, *240*, 24–37, doi:10.1016/j.jconrel.2015.10.012.Nanotechnology.
82. Yasamineh, S.; Kalajahi, H.G.; Yasamineh, P.; Yazdani, Y.; Gholizadeh, O.; Tabatabaie, R.; Afkhami, H.; Davodabadi, F.; farkhad, A.K.; Pahlevan, D.; et al. An overview on nanoparticle-based strategies to fight viral infections with a focus on COVID-19. *J. Nanobiotechnology* **2022**, *20*, 1–26, doi:10.1186/s12951-022-01625-0.
83. Suffredini, G.; East, J.E.; Levy, L.M. New applications of nanotechnology for neuroimaging. *Am. J. Neuroradiol.* **2014**, *35*, 1246–1253, doi:10.3174/ajnr.A3543.
84. Amo, L. Del; Cano, A.; Ettcheto, M.; Souto, E.B.; Espina, M.; Camins, A.; García, M.L.; Sánchez-López, E. Surface functionalization of plga nanoparticles to increase transport across the bbb for alzheimer's disease. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 4305, doi:10.3390/app11094305.
85. Pinto Reis, C.; Neufeld, R.J.; Ribeiro, A.J.; Veiga, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2006**, *2*, 8–21, doi:10.1016/j.nano.2005.12.003.
86. Peracchia, M.T.; Gref, R.; Minamitake, Y.; Domb, A.; Lotan, N.; Langer, R. PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: Investigation of their drug encapsulation and release characteristics. *J. Control. Release* **1997**, *46*, 223–231, doi:10.1016/S0168-3659(96)01597-0.
87. Kumari, A.; Yadav, S.K.; Yadav, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2010**, *75*, 1–18, doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.
88. Hans, M.L.; Lowman, A.M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2002**, *6*, 319–327, doi:10.1016/S1359-0286(02)00117-1.
89. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*, R1–R4, doi:10.1016/0378-5173(89)90281-0.
90. Peltonen, L.; Valo, H.; Kolakovic, R.; Laaksonen, T.; Hirvonen, J. Electrospraying, spray drying and related techniques for production and formulation of drug nanoparticles. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2010**, *7*, 705–7019.
91. Salama, A.H. Spray drying as an advantageous strategy for enhancing pharmaceuticals bioavailability. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2020**, *10*, 1–12, doi:10.1007/s13346-019-00648-9.
92. Arpagaus, C.; Collenberg, A.; Rütli, D.; Assadpour, E.; Jafari, S.M. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* **2018**, *546*, 194–214.
93. Sahoo, S.K.; 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. *J. Control. Release* **2002**, *82*, 105–114, doi:10.1016/S0168-3659(02)00127-X.
94. Vega, E.; Egea, M.A.; Garduño-Ramírez, M.L.; García, M.L.; Sánchez, E.; Espina, M.; Calpena, A.C. Flurbiprofen PLGA-PEG nanospheres: Role of hydroxy- $\beta$ -cyclodextrin on *ex vivo* human skin permeation and *in vivo* topical anti-inflammatory efficacy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2013**, *110*, 339–346, doi:10.1016/j.colsurfb.2013.04.045.
95. Fonte, P.; Soares, S.; Costa, A.; Andrade, J.C.; Seabra, V.; Reis, S.; Sarmiento, B. Effect of cryoprotectants on the porosity and stability of insulin-loaded PLGA nanoparticles after freeze-drying. *Biomatter* **2012**, *2*, 329–339, doi:10.4161/biom.23246.
96. Gref, R.; Domb, A.; Quellec, P.; Blunk, T.; Müller, R.H.; Verbavatz, J.M.; Langer, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 316–326.
97. Abrego, G.; Alvarado, H.L.; Egea, M.A.; Gonzalez-Mira, E.; Calpena, A.C.; Garcia, M.L. Design of nanosuspensions and freeze-dried PLGA nanoparticles as a novel approach for ophthalmic delivery of pranoprofen. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103*, 3153–3164, doi:10.1002/jps.24101.
98. Ferreira Lima, A.F.; Amado, I.R.; Pires, L.R. Poly(d,l-lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanoparticles Loaded with Proteolipid Protein (PLP)—Exploring a New Administration Route. *Polymers (Basel)*. **2020**, *12*, 3063, doi:10.3390/polym12123063.
99. Holzer, M.; Vogel, V.; Mäntele, W.; Schwartz, D.; Haase, W.; Langer, K. Physico-chemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *72*, 428–437, doi:10.1016/j.ejpb.2009.02.002.
100. Gupta, H.; Aqil, M.; Khar, R.K.; Ali, A.; Bhatnagar, A.; Mittal, G. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2010**, *6*, 324–333, doi:10.1016/j.nano.2009.10.004.
101. Lanao, R.P.F.; Jonker, A.M.; Wolke, J.G.C.; Jansen, J.A.; Van Hest, J.C.M.; Leeuwenburgh, S.C.G. Physicochemical properties and applications of poly(lactic-co-glycolic acid) for <sup>use</sup> in bone regeneration. *Tissue Eng. - Part B Rev.* **2013**, *19*, 380–390, doi:10.1089/ten.teb.2012.0443.
102. Danhier, F.; Ansorena, E.; Silva, J.M.; Coco, R.; Le Breton, A.; Pr eat, V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J. Control. Release* **2012**, *161*, 505–522.
103. Sharma, S.; Parmar, A.; Kori, S.; Sandhir, R. PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2016**, *80*, 30–40, doi:10.1016/j.trac.2015.06.014.
104. Semete, B.; Booyesen, L.; Lemmer, Y.; Kalombo, L.; Katata, L.; Verschoor, J.; Swai, H.S. In

- vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2010**, *6*, 662–671, doi:10.1016/j.nano.2010.02.002.
105. Mir, M.; Ahmed, N.; Rehman, A. ur Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, *159*, 217–231, doi:10.1016/j.colsurfb.2017.07.038.
106. Rezvantalab, S.; Drude, N.I.; Moraveji, M.K.; Güvener, N.; Koons, E.K.; Shi, Y.; Lammers, T.; Kiessling, F. PLGA-based nanoparticles in cancer treatment. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1–19, doi:10.3389/fphar.2018.01260.
107. Wang, Y.; Li, P.; Tran, T.T.D.; Zhang, J.; Kong, L. Manufacturing techniques and surface engineering of polymer based nanoparticles for targeted drug delivery to cancer. *Nanomaterials* **2016**, *6*, 26, doi:10.3390/nano6020026.
108. Arpagaus, C. PLA/PLGA nanoparticles prepared by nano spray drying. *J. Pharm. Investig.* **2019**, *49*, 405–426, doi:10.1007/s40005-019-00441-3.
109. Draheim, C.; De Crécy, F.; Hansen, S.; Collnot, E.M.; Lehr, C.M. A design of experiment study of nanoprecipitation and nano spray drying as processes to prepare plga nano-and microparticles with defined sizes and size distributions. *Pharm. Res.* **2015**, *32*, 2609–2624, doi:10.1007/s11095-015-1647-9.
110. Kim, K.T.; Lee, J.Y.; Kim, D.D.; Yoon, I.S.; Cho, H.J. Recent progress in the development of poly(lactic-co-glycolic acid)-based nanostructures for cancer imaging and therapy. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 280, doi:10.3390/pharmaceutics11060280.
111. Lee PLGA Devices: Production and Applications for Sustained Protein Delivery. *Physiol. Behav.* **2017**, *176*, 100–106, doi:10.1002/wnan.1516.PLGA.
112. Feczko, T.; Piiper, A.; Pleli, T.; Schmithals, C.; Denk, D.; Hehlhans, S.; Rödel, F.; Vogl, T.J.; Wacker, M.G. Theranostic sorafenib-loaded polymeric nanocarriers manufactured by enhanced gadolinium conjugation techniques. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 1–16, doi:10.3390/pharmaceutics11100489.
113. Jiang, G.; Jia, H.; Qiu, J.; Mo, Z.; Wen, Y.; Zhang, Y.; Wen, Y.; Xie, Q.; Ban, J.; Lu, Z.; et al. Plga nanoparticle platform for trans-ocular barrier to enhance drug delivery: A comparative study based on the application of oligosaccharides in the outer membrane of carriers. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, *15*, 9373–9387, doi:10.2147/IJN.S272750.
114. Locatelli, E.; Franchini, M.C. Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: Synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system. *J. Nanoparticle Res.* **2012**, *14*, 1316.
115. Rafiei Pedram, H.A. Docetaxel-loaded PLGA and PLGA -PEG nanoparticles for



- intravenous application: pharmacokinetics and biodistribution profile. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 935–947.
116. Owens, D.E.; Peppas, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2006**, *307*, 93–102, doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.010.
117. Suk, J.S.; Xu, Q.; Kim, N.; Hanes, J.; Ensign, L.M. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99*, 28–51, doi:10.1016/j.addr.2015.09.012.
118. El-Hammadi, M.M.; Delgado, Á. V.; Melguizo, C.; Prados, J.C.; Arias, J.L. Folic acid-decorated and PEGylated PLGA nanoparticles for improving the antitumour activity of 5-fluorouracil. *Int. J. Pharm.* **2017**, *516*, 61–70, doi:10.1016/j.ijpharm.2016.11.012.
119. Giannavola, C.; Bucolo, C.; Maltese, A.; Paolino, D.; Vandelli, M.A.; Puglisi, G.; Lee, V.H.L.; Fresta, M. Influence of preparation conditions on acyclovir-loaded poly-D,L-lactic acid nanospheres and effect of PEG coating on ocular drug bioavailability. *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 584–590, doi:10.1023/A:1023290514575.
120. Vega, E.; Antònia Egea, M.; Calpena, A.C.; Espina, M.; Luisa García, M. Role of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on freeze-dried and gamma-irradiated PLGA and PLGA-PEG diblock copolymer nanospheres for ophthalmic flurbiprofen delivery. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 1357–1371, doi:10.2147/IJN.S28481.
121. Vasconcelos, A.; Vega, E.; Pérez, Y.; Gómara, M.J.; García, M.L.; Haro, I. Conjugation of cell-penetrating peptides with poly(Lactic-co-glycolic acid)-polyethylene glycol nanoparticles improves ocular drug delivery. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, *10*, 609–631, doi:10.2147/IJN.S71198.
122. Sánchez-López, E.; Esteruelas, G.; Ortiz, A.; Espina, M.; Prat, J.; Muñoz, M.; Cano, A.; Calpena, A.C.; Ettcheto, M.; Camins, A.; et al. Article dexibuprofen biodegradable nanoparticles: One step closer towards a better ocular interaction study. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 720, doi:10.3390/nano10040720.
123. Xu, Q.; Ensign, L.M.; Boylan, N.J.; Schön, A.; Gong, X.; Yang, J.C.; Lamb, N.W.; Cai, S.; Yu, T.; Freire, E.; et al. Impact of Surface Polyethylene Glycol (PEG) Density on Biodegradable Nanoparticle Transport in Mucus *ex Vivo* and Distribution *in Vivo*. *ACS Nano* **2015**, *9*, 9217–9227, doi:10.1021/acsnano.5b03876.
124. Etheridge, M.L.; Campbell, S.A.; Erdman, A.G.; Haynes, C.L.; Wolf, S.M.; McCullough, J. The big picture on nanomedicine: The state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2013**, *9*, 1–14, doi:10.1016/j.nano.2012.05.013.
125. Vllasaliu, D.; Fowler, R.; Stolnik, S. PEGylated nanomedicines: Recent progress and

- remaining concerns. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2014**, *11*, 139–154, doi:10.1517/17425247.2014.866651.
126. Bobo, D.; Robinson, K.J.; Islam, J.; Thurecht, K.J.; Corrie, S.R. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* **2016**, *33*, 2373–2387, doi:10.1007/s11095-016-1958-5.
127. Trenkenschuh, E.; Friess, W. Freeze-drying of nanoparticles: How to overcome colloidal instability by formulation and process optimization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2021**, *165*, 345–360, doi:10.1016/j.ejpb.2021.05.024.
128. Saez, A.; Guzmán, M.; Molpeceres, J.; Aberturas, M.R. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 379–387, doi:10.1016/S0939-6411(00)00125-9.
129. Fonte, P.; Reis, S.; Sarmento, B. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *J. Control. Release* **2016**, *225*, 75–86, doi:10.1016/j.jconrel.2016.01.034.
130. Ribeiro, R.F.; Motta, M.H.; Härter, A.P.G.; Flores, F.C.; Beck, R.C.R.; Schaffazick, S.R.; De Bona Da Silva, C. Spray-dried powders improve the controlled release of antifungal tioconazole-loaded polymeric nanocapsules compared to with lyophilized products. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *59*, 875–884, doi:10.1016/j.msec.2015.10.035.
131. Ali, M.E.; Lamprecht, A. Spray freeze drying as an alternative technique for lyophilization of polymeric and lipid-based nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2017**, *516*, 170–177, doi:10.1016/j.ijpharm.2016.11.023.
132. Kho, K.; Hadinoto, K. Optimizing aerosolization efficiency of dry-powder aggregates of thermally-sensitive polymeric nanoparticles produced by spray-freeze-drying. *Powder Technol.* **2011**, *214*, 169–176, doi:10.1016/j.powtec.2011.08.010.
133. Franco, P.; De Marco, I. Nanoparticles and nanocrystals by supercritical CO<sub>2</sub>-assisted techniques for pharmaceutical applications: A review. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 1–27, doi:10.3390/app11041476.
134. Soh, S.H.; Lee, L.Y. Microencapsulation and nanoencapsulation using supercritical fluid (SCF) techniques. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 21, doi:10.3390/pharmaceutics11010021.
135. Wang, L.; Ma, Y.; Gu, Y.; Liu, Y.; Zhao, J.; Yan, B.; Wang, Y. Cryoprotectant choice and analyses of freeze-drying drug suspension of nanoparticles with functional stabilisers. *J. Microencapsul.* **2018**, *35*, 241–248, doi:10.1080/02652048.2018.1462416.
136. Ramos Yacasi, G.R.; Calpena Campmany, A.C.; Egea Gras, M.A.; Espina García, M.; García López, M.L. Freeze drying optimization of polymeric nanoparticles for ocular

- flurbiprofen delivery: effect of protectant agents and critical process parameters on long-term stability. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2017**, *43*, 637–651, doi:10.1080/03639045.2016.1275669.
137. Abdelwahed, W.; Degobert, G.; Stainmesse, S.; Fessi, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1688–1713, doi:10.1016/j.addr.2006.09.017.
138. Heng, D.; Lee, S.H.; Ng, W.K.; Tan, R.B. The nano spray dryer B-90. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2011**, *8*, 965–972, doi:10.1517/17425247.2011.588206.
139. Sosnik, A.; Seremeta, K.P. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *223*, 40–54.
140. Arpagaus, C. Nano Spray Dryer B-90: Literature review and applications. *Büchi Inf. Bull.*
141. Czyz, S.; Wewers, M.; Finke, J.H.; Kwade, A.; van Eerdenbrugh, B.; Juhnke, M.; Bunjes, H. Spray drying of API nanosuspensions: Importance of drying temperature, type and content of matrix former and particle size for successful formulation and process development. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2020**, *152*, 63–71, doi:10.1016/j.ejpb.2020.04.021.
142. Ding, S.; Serra, C.A.; Anton, N.; Yu, W.; Vandamme, T.F. Production of dry-state ketoprofen-encapsulated PMMA NPs by coupling micromixer-assisted nanoprecipitation and spray drying. *Int. J. Pharm.* **2019**, *558*, 1–8, doi:10.1016/j.ijpharm.2018.12.031.
143. Kanojia, G.; Have, R. ten; Soema, P.C.; Frijlink, H.; Amorij, J.P.; Kersten, G. Developments in the formulation and delivery of spray dried vaccines. *Hum. Vaccines Immunother.* **2017**, *13*, 2364–2378, doi:10.1080/21645515.2017.1356952.
144. Vehring, R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 999–1022, doi:10.1007/s11095-007-9475-1.
145. Murugesan, R.; Orsat, V. Spray Drying for the Production of Nutraceutical Ingredients-A Review. *Food Bioprocess Technol.* **2012**, *5*, 3–14, doi:10.1007/s11947-011-0638-z.
146. Alvarado, H.L.; Abrego, G.; Garduño-Ramirez, M.L.; Clares, B.; Calpena, A.C.; García, M.L. Design and optimization of oleanolic/ursolic acid-loaded nanoplatforams for ocular anti-inflammatory applications. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2015**, *11*, 521–530, doi:10.1016/j.nano.2015.01.004.
147. López-Machado, A.; Díaz, N.; Cano, A.; Espina, M.; Badía, J.; Baldomà, L.; Calpena, A.C.; Biancardi, M.; Souto, E.B.; García, M.L.; et al. Development of topical eye-drops of lactoferrin-loaded biodegradable nanoparticles for the treatment of anterior segment inflammatory processes. *Int. J. Pharm.* **2021**, *609*, 121188, doi:10.1016/j.ijpharm.2021.121188.
148. Danaei, M.; Dehghankhold, M.; Ataei, S.; Hasanzadeh Davarani, F.; Javanmard, R.; Dokhani, A.; Khorasani, S.; Mozafari, M.R. Impact of particle size and polydispersity

- index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 1–17, doi:10.3390/pharmaceutics10020057.
149. Araújo, J.; Vega, E.; Lopes, C.; Egea, M.A.; Garcia, M.L.; Souto, E.B. Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2009**, *72*, 48–56, doi:10.1016/j.colsurfb.2009.03.028.
150. Cañadas, C.; Alvarado, H.; Calpena, A.C.; Silva, A.M.; Souto, E.B.; García, M.L.; Abrego, G. In vitro, ex vivo and in vivo characterization of PLGA nanoparticles loading pranoprofen for ocular administration. *Int. J. Pharm.* **2016**, *511*, 719–727, doi:10.1016/j.ijpharm.2016.07.055.
151. Mohammadi-Jam, S.; Waters, K.E.; Greenwood, R.W. A review of zeta potential measurements using electroacoustics. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2022**, *309*, 102778, doi:10.1016/j.cis.2022.102778.
152. Saupe, A.; Gordon, K.C.; Rades, T. Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. *Int. J. Pharm.* **2006**, *314*, 56–62, doi:10.1016/j.ijpharm.2006.01.022.
153. Jain, A.K.; Thareja, S. In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **2019**, *47*, 524–539, doi:10.1080/21691401.2018.1561457.
154. Gupta, H.; Aqil, M.; Khar, R.K.; Ali, A.; Bhatnagar, A.; Mittal, G. Biodegradable levofloxacin nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *J. Drug Target.* **2011**, *19*, 409–417, doi:10.3109/1061186X.2010.504268.
155. Cano, A.; Ettcheto, M.; Espina, M.; Auladell, C.; Calpena, A.C.; Folch, J.; Barenys, M.; Sánchez-López, E.; Camins, A.; García, M.L. Epigallocatechin-3-gallate loaded PEGylated-PLGA nanoparticles: A new anti-seizure strategy for temporal lobe epilepsy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2018**, *14*, 1073–1085, doi:10.1016/j.nano.2018.01.019.
156. Öztürk, A.A.; Yenilmez, E.; Şenel, B.; Kıyan, H.T.; Güven, U.M. Effect of different molecular weight PLGA on flurbiprofen nanoparticles: formulation, characterization, cytotoxicity, and in vivo anti-inflammatory effect by using HET-CAM assay. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2020**, *46*, 682–695, doi:10.1080/03639045.2020.1755304.
157. Gonzalez-Pizarro, R.; Silva-Abreu, M.; Calpena, A.C.; Egea, M.A.; Espina, M.; García, M.L. Development of fluorometholone-loaded PLGA nanoparticles for treatment of inflammatory disorders of anterior and posterior segments of the eye. *Int. J. Pharm.* **2018**, *547*, 338–346, doi:10.1016/j.ijpharm.2018.05.050.

158. Sah, A.K.; Suresh, P.K.; Verma, V.K. PLGA nanoparticles for ocular delivery of loteprednol etabonate: a corneal penetration study. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **2017**, *45*, 1156–1164, doi:10.1080/21691401.2016.1203794.
159. Celia, C.; Trapasso, E.; Cosco, D.; Paolino, D.; Fresta, M. Turbiscan Lab® Expert analysis of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2009**, *72*, 155–160, doi:10.1016/j.colsurfb.2009.03.007.
160. Sánchez-López, E.; Egea, M.A.; Cano, A.; Espina, M.; Calpena, A.C.; Ettcheto, M.; Camins, A.; Souto, E.B.; Silva, A.M.; García, M.L. PEGylated PLGA nanospheres optimized by design of experiments for ocular administration of dexibuprofen-*in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* characterization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *145*, 241–250, doi:10.1016/j.colsurfb.2016.04.054.
161. Crucho, C.I.C.; Barros, M.T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *80*, 771–784, doi:10.1016/j.msec.2017.06.004.
162. Dinarvand, R.; Sepehri, N.; Manoochehri, S.; Rouhani, H.; Atyabi, F. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int. J. Nanomedicine* **2011**, *6*, 877–895, doi:10.2147/ijn.s18905.
163. Franz, T.J. Percutaneous absorption. On the relevance of *in vitro* data. *J. Invest. Dermatol.* **1975**, *64*, 190–195, doi:10.1111/1523-1747.ep12533356.
164. Ng, S.F.; Rouse, J.J.; Sanderson, F.D.; Meidan, V.; Eccleston, G.M. Validation of a static Franz diffusion cell system for *in vitro* permeation studies. *AAPS PharmSciTech* **2010**, *11*, 1432–1441, doi:10.1208/s12249-010-9522-9.
165. Silva-Abreu, M.; Calpena, A.C.; Espina, M.; Silva, A.M.; Gimeno, A.; Egea, M.A.; García, M.L. Optimization, Biopharmaceutical Profile and Therapeutic Efficacy of Pioglitazone-loaded PLGA-PEG Nanospheres as a Novel Strategy for Ocular Inflammatory Disorders. *Pharm. Res.* **2018**, *35*, 11, doi:10.1007/s11095-017-2319-8.
166. FDA Guidance Document. Q3C Tables and List. Rev. 4. Guidance for the Industry **2018**, 1–10.
167. Debandi, M. V; François, N.J.; Daraio, M.E. Evaluación De Distintas Membranas Para Liberación *in Vitro* De Principios Activos Anticelulíticos. *Av. en Ciencias e Ing.* **2011**, *2*, 97–105.
168. Kalam, M.A.; Alshamsan, A. Poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for sustained release of tacrolimus in rabbit eyes. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *94*, 402–411, doi:10.1016/j.biopha.2017.07.110.

169. Parra, A.; Mallandrich, M.; Clares, B.; Egea, M.A.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Design and elaboration of freeze-dried PLGA nanoparticles for the transcorneal permeation of carprofen: Ocular anti-inflammatory applications. *2015*, *136*, 935–943.
170. Galindo, R.; Sánchez-López, E.; Gómara, M.J.; Espina, M.; Ettcheto, M.; Cano, A.; Haro, I.; Camins, A.; García, M.L. Development of Peptide Targeted PLGA-PEGylated Nanoparticles Loading Licochalcone-A for Ocular Inflammation. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 285, doi:10.3390/pharmaceutics14020285.
171. Luepke, N.P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food Chem. Toxicol.* **1985**, *23*, 287–291, doi:10.1016/0278-6915(85)90030-4.
172. Luepke, N.P.; Kemper, F.H. The HET-CAM Test: an Alternative to the Draize Eye Test. **1986**, *24*, 495–496.
173. Gonzalez-Pizarro, R.; Carvajal-Vidal, P.; Halbault Bellowa, L.; Calpena, A.C.; Espina, M.; García, M.L. In-situ forming gels containing fluorometholone-loaded polymeric nanoparticles for ocular inflammatory conditions. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2019**, *175*, 365–374, doi:10.1016/j.colsurfb.2018.11.065.
174. Draize, J.H.; Woodard, G.; Calvery, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1944**, *82* (3) 377-390.
175. Wilhelmus, K.R. The Draize eye test. *Surv. Ophthalmol.* **2001**, *45*, 493–515, doi:10.1016/S0039-6257(01)00211-9.
176. Spampinato, S., Marino A., Bucolo C., Canossa M., Bachetti T., M.S. Effects of sodium naproxen eye drops on rabbit ocular inflammation induced by sodium arachidonate. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **1991**, *7*, 125–133.
177. Page B, Page M, and N.C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. *Int J Oncol* **1993**, *3*, 473–476.
178. Parveen, S.; Sahoo, S.K. Evaluation of cytotoxicity and mechanism of apoptosis of doxorubicin using folate-decorated chitosan nanoparticles for targeted delivery to retinoblastoma. *Cancer Nanotechnol.* **2010**, *1*, 47–62, doi:10.1007/s12645-010-0006-0.
179. Luis de Redín, I.; Boiero, C.; Martínez-Ohárriz, M.C.; Agüeros, M.; Ramos, R.; Peñuelas, I.; Allemandi, D.; Llabot, J.M.; Irache, J.M. Human serum albumin nanoparticles for ocular delivery of bevacizumab. *Int. J. Pharm.* **2018**, *541*, 214–223, doi:10.1016/j.ijpharm.2018.02.003.
180. Meek, K.M.; Boote, C. The use of X-ray scattering techniques to quantify the orientation and distribution of collagen in the corneal stroma. *Prog. Retin. Eye Res.* **2009**, *28*, 369–392,

- doi:10.1016/j.preteyeres.2009.06.005.
181. Meek, K.M.; Knupp, C. Corneal structure and transparency. *Prog. Retin. Eye Res.* **2015**, *49*, 1–16, doi:10.1016/j.preteyeres.2015.07.001.
182. Lewis, R. Medical applications of synchrotron radiation x-rays. *Phys. Med. Biol.* **1997**, *42*, 1213–1243, doi:10.1088/0031-9155/42/7/001.
183. Meek, K.M.; Quantock, A.J. The Use of X-ray Scattering Techniques to Determine Corneal Ultrastructure. *Prog. Retin. Eye Res.* **2001**, *20*, 95–137, doi:10.1016/S1350-9462(00)00016-1.
184. Quantock, A.J.; Meek, K.M.; Brittain, P.; Ridgway, A.E.A.; Thonar, E.J.M.A. Alteration of the stromal architecture and depletion of keratan sulphate proteoglycans in oedematous human corneas: Histological, immunochemical and x-ray diffraction evidence. *Tissue Cell* **1991**, *23*, 593–606, doi:10.1016/0040-8166(91)90016-M.
185. Palka, B.P.; Sotozono, C.; Tanioka, H.; Akama, T.O.; Yagi, N.; Boote, C.; Young, R.D.; Meek, K.M.; Kinoshita, S.; Quantock, A.J. Structural collagen alterations in macular corneal dystrophy occur mainly in the posterior stroma. *Curr. Eye Res.* **2010**, *35*, 580–586, doi:10.3109/02713681003760150.
186. Kamma-Lorger, C.S.; Pinali, C.; Martinez, J.C.; Harris, J.; Young, R.D.; Bredrup, C.; Crosas, E.; Malfois, M.; RÅdahl, E.; Meek, K.M.; et al. Role of decorin core protein in collagen organisation in congenital stromal corneal dystrophy (CSCD). *PLoS One* **2016**, *February 1*, doi:10.1371/journal.pone.0147948.
187. Hayes, S.; Boote, C.; Tuft, S.J.; Quantock, A.J.; Meek, K.M. A study of corneal thickness, shape and collagen organisation in keratoconus using videokeratography and X-ray scattering techniques. *Exp. Eye Res.* **2007**, *84*, 423–434, doi:10.1016/j.exer.2006.10.014.
188. Fullwood, N.J.; Tuft, S.J.; Malik, N.S.; Meek, K.M.; Ridgway, A.E.A.; Harrison, R.J. Synchrotron x-ray diffraction studies of keratoconus corneal stroma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1992**, *33*, 1734–1741.
189. Boote, C.; Hayes, S.; Young, R.D.; Kamma-Lorger, C.S.; Hocking, P.M.; Elsheikh, A.; Inglehearn, C.F.; Ali, M.; Meek, K.M. Ultrastructural changes in the retinopathy, globe enlarged (rge) chick cornea. *J. Struct. Biol.* **2009**, *166*, 195–204, doi:10.1016/j.jsb.2009.01.009.
190. Kamma-Lorger, C.S.; Boote, C.; Hayes, S.; Albon, J.; Boulton, M.E.; Meek, K.M. Collagen ultrastructural changes during stromal wound healing in organ cultured bovine corneas. *Exp. Eye Res.* **2009**, *88*, 953–959, doi:10.1016/j.exer.2008.12.005.
191. Bolfa, P.; Kelly, S.J.; Wells, H.C.; Sizeland, K.H.; Scott, E.M.; Kirby, N.; Mudie, S.; Armien, A.G.; Haverkamp, R.G.; Kelly, P.J. Tropical Keratopathy (Florida Spots) in Cats. *Vet. Pathol.* **2018**, *55*, 861–870, doi:10.1177/0300985818789483.
192. Beecher, N.; Carlson, C.; Allen, B.R.; Kipchumba, R.; Conrad, G.W.; Meek, K.M.;

- Quantock, A.J. An x-ray diffraction study of corneal structure in mimecan-deficient mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2005**, *46*, 4046–4049, doi:10.1167/iovs.05-0325.
193. Hayes, S.; Kamma-Lorger, C.S.; Boote, C.; Young, R.D.; Quantock, A.J.; Rost, A.; Khatib, Y.; Harris, J.; Yagi, N.; Terrill, N.; et al. The Effect of Riboflavin/UVA Collagen Cross-linking Therapy on the Structure and Hydrodynamic Behaviour of the Ungulate and Rabbit Corneal Stroma. *PLoS One* **2013**, *8*, e52860, doi:10.1371/journal.pone.0052860.
194. Boote, C.; Dooley, E.P.; Gardner, S.J.; Kamma-Lorger, C.S.; Hayes, S.; Nielsen, K.; Hjortdal, J.; Sorensen, T.; Terrill, N.J.; Meek, K.M. Quantification of Collagen Ultrastructure after Penetrating Keratoplasty - Implications for Corneal Biomechanics. *PLoS One* **2013**, *8*, e68166, doi:10.1371/journal.pone.0068166.
195. Boote, C.; Dennis, S.; Newton, R.H.; Puri, H.; Meek, K.M. Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: Optical and biomechanical implications. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2003**, *44*, 2941–2948, doi:10.1167/iovs.03-0131.
196. Meek, K.M.; Tuft, S.J.; Huang, Y.; Gill, P.S.; Hayes, S.; Newton, R.H.; Bron, A.J. Changes in collagen orientation and distribution in keratoconus corneas. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2005**, *46*, 1948–1956, doi:10.1167/iovs.04-1253.
197. Tseng, S.H.; Yang, C.-Y.; Li, J.-H.; Jeng, Y.-M.; Ranasinghesagara, J.C.; Venugopalan, V. Corneal transparency and scleral opacity arises from the nanoarchitecture of the constituent collagen fibrils. *Biomed. Opt. Express* **2022**, *13*, 1485–1496, doi:10.1364/boe.444832.
198. Freegard, T.J. The physical basis of transparency of the normal cornea. *Eye* **1997**, *11*, 465–471, doi:10.1038/eye.1997.127.
199. Jain, G.K.; Pathan, S.A.; Akhter, S.; Jayabalan, N.; Talegaonkar, S.; Khar, R.K.; Ahmad, F.J. Microscopic and spectroscopic evaluation of novel PLGA-chitosan Nanoplexes as an ocular delivery system. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2011**, *82*, 397–403, doi:10.1016/j.colsurfb.2010.09.010.
200. Gonzalez-Pizarro, R.; Parrotta, G.; Vera, R.; Sánchez-López, E.; Galindo, R.; Kjeldsen, F.; Badia, J.; Baldoma, L.; Espina, M.; García, M.L. Ocular penetration of fluorometholone-loaded PEG-PLGA nanoparticles functionalized with cell-penetrating peptides. *Nanomedicine* **2019**, *14*, 3089–3104, doi:10.2217/nnm-2019-0201.
201. Pandey, P.; Dua, K.; Dureja, H. Erlotinib loaded chitosan nanoparticles: Formulation, physicochemical characterization and cytotoxic potential. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *139*, 1304–1316, doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.08.084.
202. Sengupta, P.; Chatterjee, B.; Mandal, U.K.; Gorain, B.; Pal, T.K. Development and validation of a high throughput LC–MS/MS method for simultaneous quantitation of



- pioglitazone and telmisartan in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study. *J. Pharm. Anal.* **2017**, *7*, 381–387, doi:10.1016/j.jpha.2017.05.004.
203. European Medicines Agency. EMA/CHMP/ICH/172948/2019. ICH Guideline M10 on Bioanalytical Method Validation.
204. U.S. Food and Drug Administration. Bioanalytical method validation, guidance for industry (2018).
205. Cal, K.; Sollohub, K. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 575–586, doi:10.1002/jps.21886.
206. Sollohub, K.; Cal, K. Spray Drying Technique: II. Current Applications in Pharmaceutical Technology. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 587–597, doi:10.1002/jps.21963.
207. Oliveira, A.M.; Guimarães, K.L.; Cerize, N.N.P.; Tunussi, A.S.; Poço, J.G.R. Nano spray drying as an innovative technology for encapsulating hydrophilic active pharmaceutical ingredients (API). *J. Nanomedicine Nanotechnol.* **2013**, *4*, 1000186, doi:10.4172/2157-7439.1000186.
208. Mittal, N.; Kaur, G. Investigations on polymeric nanoparticles for ocular delivery. *Adv. Polym. Technol.* **2019**, *2019*, 1316249, doi:10.1155/2019/1316249.
209. Khosro Adibkia; Barzegar-Jalali, M.; Balaei, N.; Osouli-Bostanabad, K.; Ghajar, S.; Emami, S.; Zakhireh, S. Formulation of Pioglitazone-Eudragit® RS100 Nanobeads and Nanofibers Using Electrospraying Technique. *Polym. Sci. - Ser. A* **2019**, *61*, 407–416, doi:10.1134/S0965545X19030015.
210. Heredia, N.S.; Vizuite, K.; Flores-Calero, M.; Katherine Pazmiño, V.; Pilaquina, F.; Kumar, B.; Debut, A. Comparative statistical analysis of the release kinetics models for nanoprecipitated drug delivery systems based on poly(lactic-co-glycolic acid). *PLoS One* **2022**, *17*, 1–28, doi:10.1371/journal.pone.0264825.
211. Andreani, T.; Kiill, C.P.; Souza, A.L.R. d.; Fangueiro, J.F.; Fernandes, L.; Doktorovová, S.; Santos, D.L.; Garcia, M.L.; Gremião, M.P.D.; Souto, E.B.; et al. Surface engineering of silica nanoparticles for oral insulin delivery: Characterization and cell toxicity studies. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, *123*, 916–923, doi:10.1016/j.colsurfb.2014.10.047.
212. Sánchez-López, E.; Egea, M.A.; Davis, B.M.; Guo, L.; Espina, M.; Silva, A.M.; Calpena, A.C.; Souto, E.M.B.; Ravindran, N.; Ettcheto, M.; et al. Memantine-Loaded PEGylated Biodegradable Nanoparticles for the Treatment of Glaucoma. *Small* **2018**, *14*, 1–12, doi:10.1002/smll.201701808.
213. Sibillano, T.; De Caro, L.; Scattarella, F.; Scarcelli, G.; Siliqi, D.; Altamura, D.; Liebi, M.; Ladisa, M.; Bunk, O.; Giannini, C. Interfibrillar packing of bovine cornea by table-top and synchrotron scanning SAXS microscopy. *J. Appl. Crystallogr.* **2016**, *49*, 1231–1239,

doi:10.1107/S1600576716010396.

214. Quantock, A.J.; Boote, C.; Young, R.D.; Hayes, S.; Tanioka, H.; Kawasaki, S.; Ohta, N.; Iida, T.; Yagi, N.; Kinoshita, S.; et al. Small-angle fibre diffraction studies of corneal matrix structure: A depth-profiled investigation of the human eye-bank cornea. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 335–340, doi:10.1107/S0021889807005523.
215. Meek, K.M.; Fullwood, N.J.; Cooke, P.H.; Elliott, G.F.; Maurice, D.M.; Quantock, A.J.; Wall, R.S.; Worthington, C.R. Synchrotron x-ray diffraction studies of the cornea, with implications for stromal hydration. *Biophys. J.* **1991**, *60*, 467–474, doi:10.1016/S0006-3495(91)82073-2.