

OBTENCIÓ DE NANOPARTÍCULES POLIMÈRIQUES PER A L'ADMINISTRACIÓ OCULAR DE FÀRMACS I ESTUDIS D'INTERACCIÓ AMB TÈCNIQUES BIOFÍSQUES

ESTERUELAS, GERARD¹; Sánchez-López, Elena; Ortiz, Alba;
GARCÍA, MARIA LUISA; PRAT, JOSEFINA; MUÑOZ, M. MONTSERRAT;
ESPINA, MARTA; PUJOL, MONTSERRAT

Secció Departamental de Físicoquímica,
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació,
Universitat de Barcelona
Av Joan XXIII 27-31. 08028 Barcelona

Abstract

Ageing is a biological process that leads to a decrease in physiological functions, and is the main risk factor for most common diseases in developed countries. The process causes modifications in biological membranes, especially affecting some body structures, such as the ocular surface. Specifically, the lipids of the corneal ocular surface present modifications related to age, with increased epithelial permeability making the elderly more vulnerable to corneal injuries. Inflammation is one of the most common pathologies evident in ophthalmology, which can affect different eye structures. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), such as ibuprofen, are widely used to treat ocular inflammation. Therefore, a drug delivery system such as PLGA biodegradable polymeric nanoparticles is an interesting alternative, as it can improve drug bioavailability, reduce the number of administrations required, and increase therapeutic adherence. This work also encompassed the proposal of a methodology for the development of formulations of nanoparticles that contain encapsulated dexibuprofen, and the creation of a model of corneal membrane that would permit *in vitro* studies of interactions.

Keywords: dexibuprofen, biological membranes, eye, nanoparticles.

Resumen

El envejecimiento es un proceso biológico que conduce a una disminución de las funciones biológicas y el principal factor de riesgo para las dolencias más frecuentes de los países desarrollados. Este proceso provoca cambios en las membranas biológicas, afectando especialmente a algunas estructuras del cuerpo, como por ejemplo la superficie ocular. Concretamente, los lípidos de la superficie ocular de la córnea presentan cambios relacionados con la edad que aumentan la permeabilidad del epitelio corneal y hacen que esta estructura sea más vulnerable a las lesiones. La inflamación es una de las dolencias más frecuentes en oftalmología, que puede afectar cualquier parte del ojo. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), como el ibuprofeno, son muy usados como fármacos para tratar la inflamación ocular. Sin embargo, su biodisponibilidad ocular en los tejidos es muy baja. Por lo tanto, los sistemas de administración modificada de fármacos, como las nanopartículas poliméricas biodegradables de PLGA, constituyen una alternativa adecuada, debido a que mejoran la biodisponibilidad de los fármacos y permiten reducir las administraciones aumentando la adherencia al tratamiento. En el desarrollo de este trabajo se ha propuesto la metodología para el desarrollo de formulaciones de nanopartículas que contengan dexibuprofeno encapsulado, por su administración ocular en forma de gotas oftálmicas así como la obtención de un modelo de membrana corneal que permita realizar estudios de interacción *in vitro*.

Palabras clave: dexibuprofeno, membranas biológicas, ojos, nanopartículas.

¹ Graduat en Farmàcia per la UB. Ha estat becari col·laborador al Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica, i Físicoquímica durant el curs acadèmic 2018-2019 (gerard.esteruelas.n@gmail.com).

Resum

L'envelliment és un procés biològic que comporta una disminució de les funcions biològiques i constitueix el principal factor de risc per a les malalties més freqüents dels països desenvolupats. Aquest procés provoca canvis en les membranes biològiques i afecta especialment algunes estructures del cos, com ara la superfície ocular. Concretament, els lípids de la superfície ocular de la còrnia presenten canvis relacionats amb l'edat que augmenten la permeabilitat de l'epiteli corneal i fan que aquesta estructura sigui més vulnerable a les lesions. La inflamació, que pot afectar qualsevol part de l'ull, és una de les malalties més freqüents en oftalmologia. Els antiinflamatoris no esteroïdals (AINE), com l'ibuprofèn, són molt usats com a fàrmacs per tractar la inflamació ocular. No obstant això, la seva biodisponibilitat ocular en els teixits és molt baixa. Per tant, els sistemes d'administració modificada de fàrmacs, com les nanopartícules polimèriques biodegradables d'àcid poli-D,L(làctic-co-glicòlic) (PLGA), constitueixen una alternativa adequada, ja que milloren la biodisponibilitat dels fàrmacs i permeten reduir les administracions i alhora augmentar l'adherència al tractament. Així, doncs, durant el desenvolupament d'aquest treball s'ha proposat la metodologia per al desenvolupament de formulacions de nanopartícules que continguin dexibuprofèn encapsulat, per a la seva administració ocular en forma de gotes oftàlmiques, així com l'obtenció d'un model de membrana corneal que permeti realitzar estudis d'interacció *in vitro*.

Paraules clau: dexibuprofèn, membranes biològiques, ulls, nanopartícules.

1. Introducció

L'envelliment és un procés biològic que comporta modificacions de les funcions biològiques i constitueix el principal factor de risc per a les malalties amb major prevalença als països desenvolupats. Aquest fet és degut que l'augment de l'esperança de vida, junt amb una disminució de la taxa de natalitat, han invertit la piràmide poblacional i han causat així un increment de les malalties relacionades amb l'edat (Turner, 2009; Desjardins, 2019). Aquest envelliment es reflecteix en modificacions en la composició de diverses membranes, especialment a les estructures oculars (Borchman i Yappert, 2010).

L'estructura de l'ull està altament organitzada i és extremament complexa, fet que reflecteix l'alt grau d'especialització requerit per donar suport a la seva funció (Sandeep *et al.*, 2013). Aquesta especialització fa que la majoria dels components de la superfície ocular, com també la composició lipídica de la còrnia, siguin susceptibles d'alterar-se i que aquests canvis afectin l'equilibri de la superfície ocular (Parrish, 2017). L'esfingomielina (SM), el colesterol (CHOL), la fosfatidilcolina i la fosfatidiletanolamina són els principals lípids relacionats amb l'envelliment de la còrnia. S'ha observat que amb l'edat augmenta significativament la proporció de CHOL i SM, que passen del 35% a la infància fins a representar més del 60% dels lípids totals en persones d'edat avançada. A la vegada, aquest envelliment també produeix, entre altres fenòmens, un increment de la proporció CHOL:SM, de manera que, en edats avançades, s'observa un increment d'aquesta proporció de més del doble (Broekhuysse, 1975; Gaynor *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1998; Kenchegowda i Bazan, 2010; Crispin, 2016). L'estudi de tots aquests processos és extremament complex i fa necessari el desenvolupament de models més senzills que permetin estudiar variacions concretes en la composició d'aquestes membranes. A més, aquests canvis comporten un augment de la permeabilitat de l'epiteli corneal amb l'edat que pot representar una ruptura de la seva funció de barrera, fet que fa augmentar la vulnerabilitat enfront de lesions externes i modifica la biodisponibilitat de fàrmacs administrats en forma de gotes oftàlmiques, com, per exemple, els fàrmacs antiinflamatoris (Rico del Viejo *et al.*, 2018). Aquests fàrmacs tracten la inflamació ocular, que pot afectar qualsevol part de l'ull o dels teixits circumdants i una de les malalties més prevalents en oftalmologia (Rico del Viejo *et al.*, 2018). Aquesta és una resposta no específica del cos contra les lesions de l'entorn extern, que actua com un mecanisme de defensa per aïllar i destruir l'agent desencadenant, així com per reparar els teixits danyats.

Els corticoesteroides s'usen normalment com a medicaments per al tractament de la inflamació ocular, però indueixen efectes adversos greus quan s'administren de manera crònica. Les principals alternatives als corticoesteroides per al tractament de la inflamació ocular són els fàrmacs antiinflamatoris no esteroïdals (AINE). En el camp de l'oftalmologia, l'ibuprofèn (IBU) ha rebut una

atenció particular en els últims anys a causa de la seva activitat antiinflamatòria; no obstant això, presenta una sèrie d'efectes adversos, com ara la seva elevada toxicitat gàstrica, que limiten el seu ús. Aquests efectes poden minimitzar-se amb l'ús de l'enantiòmer actiu S-(+)-ibuprofèn, representat en la figura 1A i conegut com a dexibuprofèn (DXI) número CAS: 51146-56-6. Aquest enantiòmer és dues vegades més potent que la forma racèmica i també és més segur i tolerable a causa de la disminució de la dosi necessària (Silverstein *et al.*, 2000). En assajos clínics en humans els efectes secundaris més freqüents en pacients tractats amb DXI van ser molèsties gàstriques, nàusees i vòmits; tot i així, el DXI va presentar una menor toxicitat gàstrica respecte a l'IBU racèmic. Cal destacar també que els efectes del DXI en el sistema nerviós central van ser menys comuns que en el cas de l'IBU (Kaehler, Phleps i Hesse, 2003).

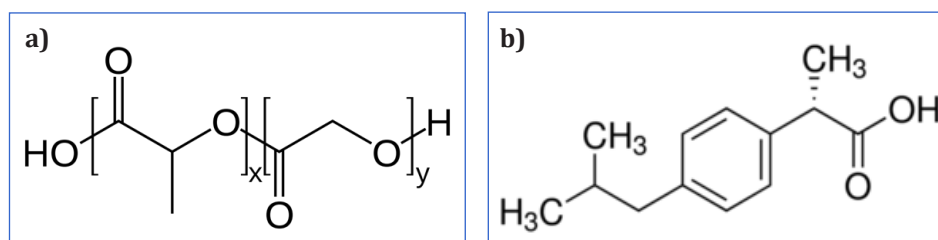


Figura 1. a) Estructura química del DXI.

b) Estructura del PLGA.

Les formes de dosificació ocular convencionals, com les gotes oftàlmiques, representen el 90% de les formulacions oculars comercialitzades. El seu desavantatge principal és el curt temps de contacte amb l'ull, la qual cosa condueix a un baix grau d'absorció del principi actiu. Concretament, és absorbida menys del 5 % de la dosi administrada, a causa de les restriccions anatòmiques i fisiològiques com el drenatge nasolacrimal, el parpelleig o les característiques del propi teixit (Gaudana *et al.*, 2010; Ray *et al.*, 2017). Això fa que calgui una administració freqüent, la qual cosa generalment condueix a una alta exposició sistèmica que genera efectes adversos, ja que l'absorció a través de la conjuntiva i el conducte nasolacrimal permet arribar a la circulació sistèmica. Concretament, en el cas dels AINE administrats com a gotes oftàlmiques, presenten una semivida precorneal del fàrmac entre 1 i 3 minuts (Nidhi *et al.*, 2006). Com a conseqüència, només una quantitat petita del fàrmac (1-5% de la dosi) penetra realment a la còrnia i pot arribar als teixits intraoculars (Nagarwal *et al.*, 2009).

Una possible solució a aquesta baixa biodisponibilitat és l'ús de sistemes nanoestructurats per a l'alliberació controlada de fàrmacs. Entre ells, les nanopartícules polimèriques biodegradables (NP) constitueixen una bona alternativa a l'administració tòpica a l'ull perquè protegeixen els fàrmacs de la inactivació pels enzims presents en la pel·lícula lacrimal o l'epiteli corneal, faciliten la seva penetració transcorneal, milloren la biodisponibilitat ocular, redueixen els efectes secundaris dels medicaments i, gràcies a la seva alliberació prolongada, permeten reduir el nombre d'administracions i millorar l'adherència al tractament del pacient (Peneva, 2015).

Copolímers com el PLGA, representat en la figura 1B, actualment aprovat per la Food and Drug Administration (FDA), s'han utilitzat àmpliament com a biomaterial en pròtesis mèdiques i sutures quirúrgiques (Sang-Soo *et al.*, 2007). Més recentment, el PLGA s'ha utilitzat en el desenvolupament de vehicles, sistemes nanoestructurats col·loïdals per a l'alliberació controlada de fàrmacs, a causa de la seva biocompatibilitat, biodegradabilitat i no toxicitat. A més, en comparació amb els polímers naturals, aquests polímers sintètics demostren una major reproductibilitat, es formulen fàcilment i permeten el control i la predicció de la cinètica de degradació (Makadia i Siegel, 2011).

Tot i això, per disminuir l'eliminació de les NP de PLGA pel sistema del reticle endotelial i augmentar el temps de contacte amb la superfície corneal, el seu recobriment amb polietilenglicol (PEG) ha demostrat que és una bona estratègia. Aquests avantatges s'atribueixen que les NP recobertes amb PEG interactuen amb la capa mucosa de la pel·lícula lacrimal, ja sigui per enllaç electroestàtic, hidròfob o de pont d'hidrogen, i que el PEG augmenta la internalització (Griffiths *et al.*, 2015; Sánchez-

López *et al.*, 2018). Per tant, l'acumulació de les NP de PLGA-PEG en el sac conjuntival, així com la capacitat de les partícules per penetrar en les primeres capes de l'epiteli corneal, contribueixen a millorar la biodisponibilitat dels fàrmacs

2. El globus ocular

L'ull humà presenta una estructura globular d'un pes aproximat de 7,8 g i un diàmetre d'aproximadament 2,6 cm. És un òrgan primordial en el procés de visió.

L'ull es pot dividir en dues regions anatòmiques diferents: el segment anterior i el segment posterior. Tal com es veu en la figura 2, en el segment anterior exterior de l'ull humà trobem la còrnia, seguida per la cambra anterior, l'humor aquós, la pupila, l'iris, la lent, els cossos ciliars i la conjuntiva. Pel que fa al segment posterior, està format per l'humor vitri, la retina, la coroide, la màcula, l'escleròtica i el nervi òptic.

Les estructures que tenen més rellevància clínica són la còrnia, la conjuntiva i la retina. La retina és un teixit sensible a la llum i té un gruix d'aproximadament mig mil·límetre. Histològicament està formada per múltiples capes: la capa de ganglió, la plexiforme interior, la capa nuclear central, la capa plexiforme exterior, la nuclear externa, la dels fotoreceptors i l'epiteli pigmentat (Kels, Grzybowski i Grant-Kels, 2015; Crispin, 2016; Tsai *et al.*, 2018). La funció principal de la retina és processar la informació visual, així com la formació d'imatges. Per tant, té un paper vital en l'agudesa visual i la visió del color.

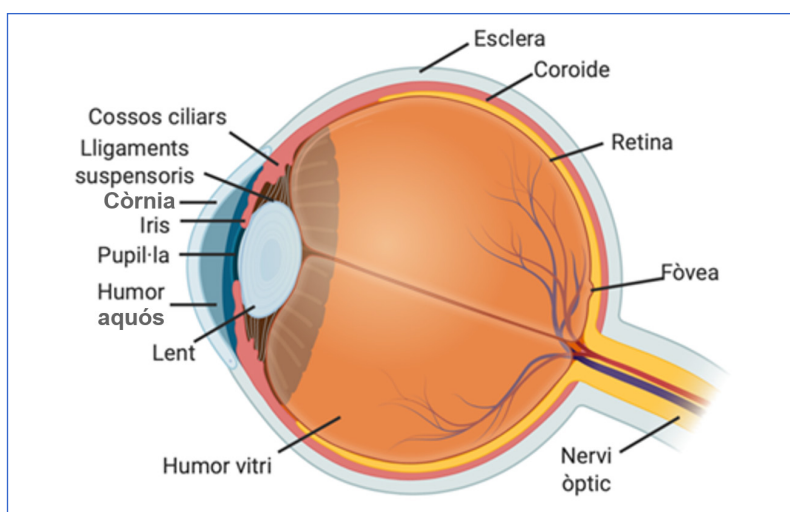


Figura 2. Estructura anatòmica del globus ocular. Basada en Karmakar, 2018.

L'anatomia i la fisiologia de l'ull fan que sigui un òrgan altament protegit de la circulació sistèmica; és a dir, les patologies oculars rarament poden ser tractades amb fàrmacs que no siguin d'administració local, especialment si aquesta patologia es produeix en el segment posterior de l'ull. Anatòmicament, hi ha un seguit de barreres que conformen l'ull humà. En primer lloc es troba la barrera anterior, la més externa, formada entre altres, per la pel·lícula lacrimal, que es troba al llarg de tota la superfície ocular i la qual per mitjà del flux lacrimal en pocs minuts pot traslladar el fàrmac cap al conducte nasolacrimal; per tant, aquest drenatge comportarà una baixa biodisponibilitat farmacològica per als tractaments tòpics (Kels, Grzybowski i Grant-Kels, 2015).

A continuació trobem la còrnia, un teixit que té un gruix aproximat de mig mil·límetre i que presenta unions molt estretes; per tant, limita la permeabilitat de les molècules, especialment les hidròfiles. Aquest teixit és avascular, transparent i està format per cinc capes: l'epiteli corneal, la capa de Bowman, l'estroma, l'endoteli i la membrana de Descemet. L'estroma corneal presenta un alt

grau d'organització de les fibres de col·lagen, de manera que esdevé una barrera molt efectiva tant per als microorganismes com per als fàrmacs que s'han d'administrar. En la capa més interna de la còrnia, l'endoteli corneal forma una barrera entre l'humor aquós i la còrnia que modula l'afluència d'aigua (Tsai *et al.*, 2018).

En la zona exterior de la còrnia, situada a la superfície posterior de les parpelles trobem una membrana de mucosa anomenada conjuntiva. Està implicada en la formació de la pel·lícula lacrimal, atès que protegeix la superfície ocular, dificulta l'entrada de fàrmacs i afavoreix la seva eliminació a través del sistema lacrimal.

Pel que fa a les barreres de la part posterior de l'ull, a la part més externa trobem l'escleròtica, que connecta la part posterior amb l'anterior, està formada per una matriu extracel·lular de fibres de col·lagen i diferents proteïnes, i és una barrera molt permeable. Tot seguit trobem la coroid, altament vascularitzada i la funció principal de la qual és mantenir la pressió intraocular. És una capa pigmentada entre l'escleròtica i la retina que, a causa de la seva vascularització, proporciona oxigen i nutrients als teixits adjacents (Sidjanin *et al.*, 2008).

Pel que fa a l'humor vitri, és una estructura gelatinosa formada majoritàriament per aigua i la seva funció és proporcionar nutrients, principalment. Gràcies a la seva alta viscositat dificulta la difusió de molècules i permet que aquestes interaccionin amb elements que el conformen.

Finalment trobem una de les principals barreres de transport ocular especialitzades: la barreira hematoretiniana. Es troba entre la retina i els capil·lars sanguinis i les cèl·lules que la componen presenten una forta unió entre elles. A causa de les seves característiques, és molt eficaç a limitar el transport de les molècules, com podrien ser els fàrmacs (Tsai *et al.*, 2018).

Actualment hi ha tot un ventall de mètodes per a l'administració de fàrmacs per via ocular, tal com es mostra en la figura 3. La injecció intravítrea és el mètode invasiu més emprat actualment per a l'administració de fàrmacs en el segment posterior de l'ull. Tot i això, és un mètode que requereix ser realitzat per personal especialista i que comporta riscos, tant de dolor com de sagnat o infeccions, entre d'altres. Per tot això, és necessari instaurar mètodes d'administració tòpica que permetin l'administració de fàrmacs a la part posterior, mètodes que permetin l'administració autònoma del fàrmac per part del pacient i que presentin un risc menor.

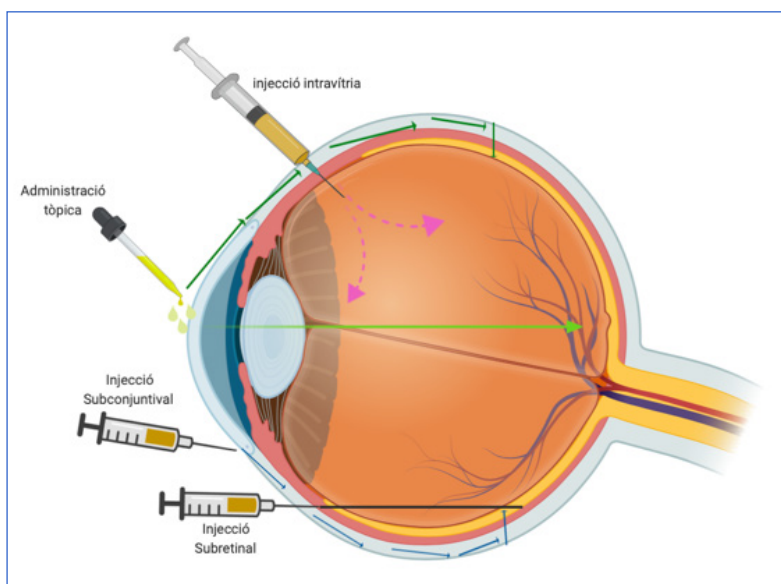


Figura 3. Representació de les vies d'administració oculars. Basada en Tsai *et al.*, 2018.

3. Uveïtis

La uveïtis és un tipus d'inflamació ocular que afecta la capa intermèdia de la paret ocular, anomenada úvea.

La podem classificar, segons l'etiologia de la seva causa, en uveïtis infecciosa, que pot ser d'origen bacterià, vírica mitòtica o parasitària; en uveïtis no infecciosa, deguda a una patologia sistèmica, com un trastorn autoimmunitari, o derivada d'una lesió ocular; i, finalment, en uveïtis d'emascarament, com podria ser la derivada d'una neoplàsia.

També la podem classificar en funció de la regió de l'ull afectada: uveïtis anterior o iritis, que afecta la part frontal de l'ull; uveïtis intermèdia o ciclitis, que afecta els cossos ciliars; uveïtis posterior o coroiditis i retinitis, que afecta la part posterior de l'ull, i uveïtis difusa o panuveïtis, quan la inflamació afecta totes les parts del teixit.

Aquesta patologia, si no és tractada, pot derivar en complicacions com ara glaucoma, cataractes, lesions al nervi òptic, despreniments de retina o ceguesa (Sullivan *et al.*, 2006).

4. Variacions del teixit corneal amb l'edat

Tal com s'ha descrit, la còrnia és un teixit complex format per diferents capes i és vital per a la visió. Presenta nombrosos canvis relacionats amb l'edat, dels quals un dels més importants és l'engrossiment de les membranes basals, tant l'epitelial com l'endotelial, així com la disminució del nombre de queratòcits conjuntivals, de cèl·lules endotelials i de la densitat del teixit nerviós del plexe subbasal. És rellevant destacar els canvis en els lípids d'aquest teixit, ja que s'ha comprovat que amb l'edat es produeix un augment de la proporció de CHOL i SM respecte dels fosfolípids majoritaris d'aquest teixit, la fosfatidilcolina (PCOL) i la fosfatidilserina (PSER) (Broekhuysse, 1975; Gaynor *et al.*, 1996; Rico del Viejo *et al.*, 2018).

4.1 Desenvolupament d'un model de membrana corneal

Com que les membranes lipídiques tenen un paper clau en la majoria de processos fisiològics, és útil desenvolupar models de membrana per conèixer l'efecte de les diferents propietats (càrrega elèctrica, hidrofobicitat, fase lipídica, etc.) en les possibles interaccions amb fàrmacs i formes farmacèutiques, així com per al desenvolupament d'aquestes (García *et al.*, 1997; Siontorou *et al.*, 2017).

Els models de membrana són utilitzats àmpliament en el desenvolupament i el descobriment de fàrmacs, en estudis d'interacció i com a eines moleculars de recerca per dilucidar la mecànica i els mecanismes de funcionament de les membranes biològiques (Siontorou *et al.*, 2017).

Per tant, per tal d'obtenir un model de membrana caldrà definir-ne la composició, la tipologia i la metodologia d'obtenció. La composició reproduirà una de les propietats de la membrana d'interès per a l'estudi corresponent (Elliott i Yuan, 2011). Per a l'estudi de la interacció del dexibuprofèn amb la còrnia, resulta especialment important el contingut de CHOL i SM, entre altres lípids, ja que, tal com s'ha indicat, la ràtio CHOL/SM augmenta molt amb l'edat.

La tipologia del model de membrana és molt variada. Des d'un punt de vista biofísic, les membranes es poden classificar en dos grans grups: monocapes i bicapes. En el grup de les monocapes es troben les pel·lícules de Langmuir (LMs) i les de Langmuir-Blodgett (LBs) (Wang, Cruz i Flach, 2007; Miyoshi i Kato, 2015). Entre les bicapes distingim les vesícules unilamelars o liposomes, els quals, segons la seva mida, es classifiquen en SUV (40-100 nm) (Maguire, Zhang i Shamlou, 2003) and in the present paper we describe the operation of a new high-velocity jet homogenizer for downsizing of multilamellar large vesicles to produce small unilamellar vesicles (SUV, LUV (100-500 nm) (Farías *et al.*, 2018) i GUV (> 500 nm) (Esquembre *et al.*, 2012). En l'apartat de bicapes cal no oblidar les bicapes sobre suport sòlid (SLB) (Loose i Schwille, 2009).

4.1.1 Obtenció de monocapes

La metodologia d'obtenció dels diferents tipus de membrana es troba àmpliament descrita en la bibliografia (Petty, 1996; Wang, Cruz i Flach, 2007; Grauby-heywang i Turlet, 2008; Peetla, Stine i Labhasetwar, 2009; Akbarzadeh *et al.*, 2013; Hagedorn *et al.*, 2015).

La balança de Langmuir és un instrument amb el qual es poden comprimir i expandir monocapes de molècules amfifíliques esteses en la superfície d'una subfase líquida per tal de determinar les característiques d'una LM (Pujol *et al.*, 1999; Miyoshi i Kato, 2015). També s'empra per obtenir LB per compressió i transferència posterior sobre un suport sòlid (Naumann *et al.*, 2002), que permetrà la seva anàlisi per tècniques microscòpiques (microscòpia de fluorescència [LM] o microscòpia de força atòmica [AFM]) (Hagedorn *et al.*, 2015; Prat *et al.*, 2015). L'interès a escollir treballar amb LM i LB recau en el fet que constitueixen un model homogeni estable on els lípids presenten una orientació específica i una geometria plana i que permet l'estudi termodinàmic.

4.1.3 Obtenció de bicapes

La metodologia per obtenir vesícules unilamelars està ben definida (Farías *et al.*, 2018), però caldrà tenir en compte la seva composició i finalitat d'ús en el moment de seleccionar la metodologia emprada.

El mètode de la dispersió simple (Akbarzadeh *et al.*, 2013) consisteix a preparar una pel·lícula un cop està seleccionada la composició de les vesícules unilamelars. Per fer-ho es pesa la quantitat desitjada de cada lípid i es dissol en cloroform/metanol (2:1); a continuació s'evapora el dissolvent en el rotavapor fins que queda una pel·lícula homogènia al fons del matràs. Es tapa el matràs amb paper Parafilm foradat i s'introdueix en l'assecador durant tota la nit per tal d'acabar d'eliminar les restes del dissolvent.

A continuació es rehidrata la pel·lícula amb una dissolució amortidora de Tris pH 7,4 i s'agita amb l'ajuda del bany d'ultrasons fins que tota la pel·lícula quedi en suspensió.

Finalment, per tal d'aconseguir les vesícules d'un diàmetre determinat, s'extrudeixen, és a dir, es fa passar la suspensió de les vesícules a través de diferents filtres amb la mida de porus determinat.

Per a l'obtenció de GUV, una de les metodologies més emprades és l'electroformació (Okumura i Sugiyama, 2011; Farías *et al.*, 2018) characterized by using electrochemical techniques, dynamic light scattering (DLS, en la qual es disposa una pel·lícula sobre uns elèctrodes i se li aplica un camp elèctric normalment oscil·lant de 2,2 V i 1-10 Hz, i en presència d'un medi líquid com pot ser una solució de sacarosa es formen els GUV (Akbarzadeh *et al.*, 2013; Tiwari *et al.*, 2018).

Les SLB consisteixen en un model de membrana en el qual una bicapa lipídica es troba dipositada sobre un suport sòlid. Aquest model es considera particularment adequat per a la reconstitució de processos que tenen lloc en la membrana plasmàtica (Naumann *et al.*, 2002; Loose i Schwill, 2009).

Per a la formació de les SLB hi ha diferents mètodes, però el de fusió de vesícules lipídiques és el més emprat i senzill. Consisteix a deixar incubar les vesícules, d'aproximadament 100 nm de composició lipídica desitjada, amb presència de Ca^{2+} sobre una superfície hidrofílica (vidre, sílice...). De manera espontània, aquestes vesícules es fusionaran i donaran lloc a la formació d'una bicapa que quedarà dipositada sobre el suport (Liu i Conboy, 2005).

Aquestes membranes també es podrien obtenir a partir de la tècnica de les LB (Lieser *et al.*, 1994; Clausell *et al.*, 2004) since they rarely spur the evolution of resistance. At low concentrations in the membrane, PxB forms vesicle-vesicle contacts and induces lipid exchange without leakage or fusion, a phenomenon that can explain its specificity towards Gram-negative bacteria by contact formation between the two phospholipids interfaces in the periplasmic space. In this work, the interaction of PxB and the nonantibiotic derivative polymyxin B nonapeptide (PxB-NP: es forma una monocapa de Langmuir, s'introdueix un suport de manera perpendicular i posteriorment s'extreu; durant aquest procés, la monocapa de Langmuir es transfereix al suport i així es forma sobre el suport una bicapa que és la LB.

5. Nanopartícules per a l'administració de medicaments

La utilització de NP ha representat una revolució en l'àmbit de la investigació de fàrmacs. En el camp farmacèutic, aquestes es defineixen com partícules sòlides col·loïdals d'una mida inferior a 1 µm on el principi actiu interacciona amb el material que conforma la matriu de la NP i s'incorpora per encapsulació, per adsorció a la superfície o per conjugació (Oropesa-Núñez i Jáuregui-Haza, 2012).

Depenent de la composició de la matriu, les NP es poden classificar en: orgàniques (Urrejola *et al.*, 2018), on trobem principalment les polimèriques, liposomes (Maeki *et al.*, 2017), micelles i dendrímers (Abbasi *et al.*, 2014); inorgàniques, com ara les metàl·liques d'or, de plata, diferents òxids (Venkatesh, 2018), NP de sílice o nanotubs de carboni (Narayan *et al.*, 2018); i, finalment, les híbrides entre els dos tipus explicats.

5.1. Desenvolupament de nanopartícules per a l'administració de dexibuprofèn

Les NP obtingudes a partir de polímers ofereixen una versatilitat incomparable amb altres materials (Pilar, 2016).

5.1.1. Fabricació de les nanopartícules

El mètode que es proposa utilitzar per a la fabricació de les NP polimèriques és el de desplaçament de dissolvent (figura 4), metodologia adequada per a l'encapsulació de fàrmacs poc hidròfils (Abrego *et al.*, 2014).

Aquest mètode consisteix en la preparació de dues fases: una primera fase aquosa formada per 10 ml de tensioactiu dissolt en medi aquós (pH 3,5) i una segona fase orgànica en la qual es troben dissolts el fàrmac, en aquest cas 5 mg DXI, juntament amb 90 mg del polímer en 5 ml d'acetona de qualitat HPLC. La fase orgànica s'addiciona gota a gota sobre la fase aquosa en agitació magnètica a 80 rpm. És important assegurar la dispersió correcta de cada gota en addicionar la fase orgànica, ja que és el moment en què es produeix la nanoprecipitació. Posteriorment es deixa la mostra en agitació durant 10 minuts i a continuació es procedeix a eliminar l'acetona mitjançant evaporació a baixa pressió.

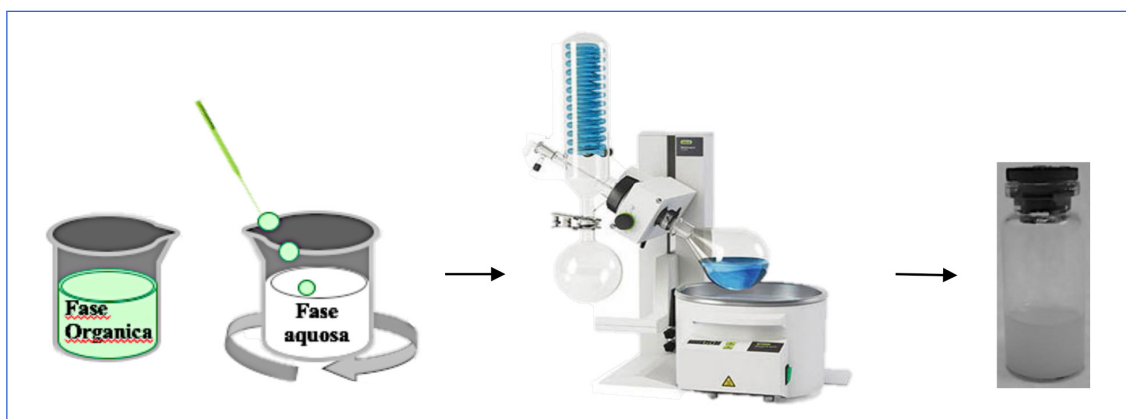


Figura 4. Diagrama d'elaboració de nanopartícules per dispersió de solvent.

En el cas de les NP en què s'utilitza PVA com a tensioactiu, cal una ultracentrifugació addicional, després de l'evaporació de l'acetona a 15.000 rpm durant 20 minuts, a fi de poder extreure el PVA

addicionat, ja que interfereix amb la càrrega de les NP i generaria un efecte estèric (Sánchez-López *et al.*, 2016; Urrejola *et al.*, 2018)

5.1.2. Caracterització de les NP

5.1.2.1. Morfometria

La caracterització morfològica es duu a terme a partir de l'espectroscòpia de correlació fotònica en l'equip Zetasizer NanoZS. El fonament d'aquesta tècnica és la mesura de les variacions de la intensitat de la llum incidida sobre la mostra, que són degudes al moviment brownià de les NP. D'aquesta manera es pot determinar tant la mida mitjana de les NP com la seva polidispersió (IP), que serà indicativa de l'homogeneïtat de la mostra.

Per tal de dur a terme aquesta caracterització s'ha de realitzar una dilució 1:10 de les NP i fer cada lectura per triplicat.

5.1.2.2. Potencial ζ

La caracterització de la càrrega superficial o potencial ζ es realitza a partir de la mobilitat electroforètica amb l'equip Zetasizer NanoZS. Aquest paràmetre mesura la càrrega superficial de les NP, relacionada amb la seva estabilitat, ja que amb un major potencial ζ (en valor absolut) les partícules es repel·leixen i augmenta així la seva estabilitat (Oropesa-Nuñez i Jáuregui-Haza, 2012).

Per tal de fer la caracterització s'ha de realitzar una dilució 1:20 de les mostres i fer un mínim de tres replicats de cada lectura.

5.1.2.3. Eficiència d'encapsulació del fàrmac

L'eficiència d'encapsulació (EE) es mesura de manera indirecta: es mesura el fàrmac no encapsulat a les NP aplicant l'equació 1. Per tal de realitzar aquesta mesura es fa una dilució prèvia 1:100 amb aigua mill-Q per assegurar que tot el fàrmac que està fora de les NP està dissolt correctament. Si no es fes aquesta dilució, el DXI lliure podria precipitar en forma de cristalls i obturar el filtre, cosa que generaria mesures errònies. Un cop feta la dilució, se centrifuguen les mostres incorporant un filtre (Ultra-0,5 Centrifugal Filter Units MWCO-10000Daltons, EMD Millipore™, Amicon™) a 14.000 rpm durant 15 minuts. El sobrenedant obtingut conté el fàrmac lliure que s'ha de quantificar.

$$\% EE = \frac{Fàrmac_{total} - Fàrmac_{lliure}}{Fàrmac_{total}} \cdot 100 \quad /Equació 1/$$

5.1.2.4. Quantificació del principi actiu dexibuprofèn

La quantificació del DXI es pot realitzar a partir d'una cromatografia líquida d'alta eficàcia (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) de fase reversa amb un mètode isocràtic amb un flux d'1 ml/min.

La columna emprada per a la quantificació ha de ser una columna Kromasil® C18 (5 μ m, 150 $\times$ 4,6 mm). Com a fase mòbil s'utilitza metanol de qualitat HPLC i àcid ortofosfòric al 0,05% (v/v) en una proporció de 80:20. El DXI es detecta a una longitud d'ona de 220 nm.

5.1.2.5. Estudis d'alliberació in vitro

Un dels avantatges de la utilització de NP polimèriques és poder obtenir un perfil d'alliberació del fàrmac constant en el temps per així aconseguir una millor pauta posològica per al pacient.

Hi ha diferents mètodes per caracteritzar l'alliberació de fàrmacs, el més emprat dels quals és la diàlisi. A causa de la baixa solubilitat del fàrmac en medi aquós, el mètode que s'ha de portar a terme és una diàlisi inversa, que es fonamenta en la dispersió de les NP en el medi de diàlisi. D'aquesta manera, es preparen tants sacs de diàlisi com temps d'experimentació, cada sac amb 0,5 ml de PBS. Aquests sacs estan formats per una membrana de diàlisi semipermeable que deixa passar el fàrmac lliure, però no les NP.

Cada vas de diàlisi s'omple amb el medi d'alliberació (PBS, pH 7,4) i s'hi dispersa la formulació que s'ha d'estudiar; també s'hi introdueixen 14 sacs de diàlisi. Aquest dispositiu s'ha de mantenir en agitació magnètica contínua a 37 °C i cada cert temps s'extreu un sac. S'estudia l'alliberament *in vitro* del DXI respecte a les NP durant les primeres 24 hores. En el moment prèviament establert es procedeix a la retirada de cadascun dels sacs i es reomple el medi amb el mateix volum de PBS. Un cop recollida cada mostra, s'ha de procedir a la seva quantificació (figura 5).

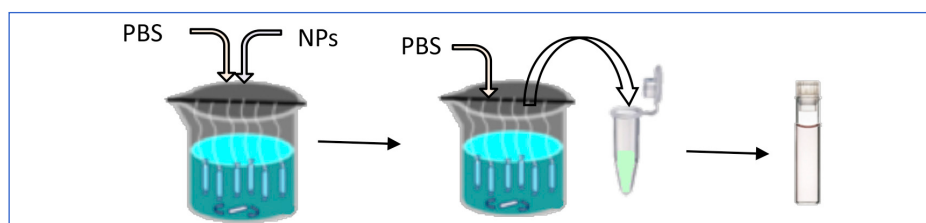


Figura 5. a) Esquema de la realització de la diàlisi inversa per a l'estudi del perfil d'alliberació.

5.1.2.6 Avaluació de la tolerància ocular in vitro

El test de HET-CAM (*Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane*) es considera un model vàlid per a l'assaig de productes potencialment irritants a nivell ocular, a causa de la vascularització de la membrana i la similitud del teixit amb la conjuntiva (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods [ICCVAM], 2010). Aquest test es basa en l'observació directa dels efectes irritants durant els primers 5 minuts posteriors a l'aplicació de la substància en la membrana corioal-lantoida (CAM) en un ou de gallina de 10 dies embrionat.

Per realitzar aquest assaig, primerament s'ha de pesar l'ou per tal d'avaluar que el pes es trobi en l'interval entre 50 i 60 g (ICCVAM, 2010). Es col·loca l'ou sobre un suport amb la càmera d'aire cap a dalt, tal com s'observa en la figura 6A, i amb unes tisores es perfora la part superior de l'ou. Amb l'ajuda d'unes pinces i les tisores corbes es retalla la closca de manera circular amb cura de no perforar o danyar la membrana CAM (figura 6B). A continuació s'humecta la membrana testàcia, d'aparença blanquinosa i que es troba sobre la CAM, amb una solució de NaCl 0,9% (figura 6C) a fi de poder-la retirar i deixar descoberta la CAM. Aquest últim pas és crític perquè si no es fa correctament es poden danyar els vasos (figura 6D).

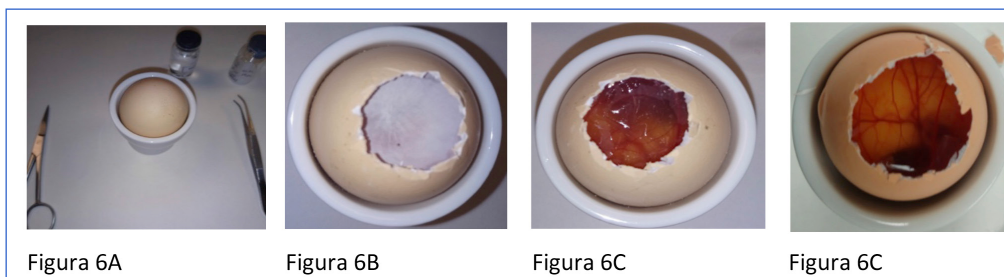


Figura 6. Conjunt fotogràfic dels passos que s'han de realitzar per a la preparació de l'ou per a la realització del test HET-CAM

A continuació es dipositen 300 µl de les diferents formulacions de NP sobre la CAM i s'observen els possible canvis en la membrana durant els 5 minuts posteriors a l'aplicació. Per tal de facilitar l'observació, com que les solucions de NP són d'una tonalitat blanquinosa, se'n retira l'excés. S'observen els possibles fenòmens d'irritació (hemorràgia, vasoconstricció i coagulació) i s'anoten els temps d'aparició (figura 7). S'ha de realitzar un registre fotogràfic abans i un cop transcorreguts els 5 minuts de cada ou.

Cal fer un control positiu, un NaOH (0,1 M), que produeix una irritació ràpida, i un control negatiu, en el qual s'utilitza NaCl al 0,9%.

Per tal de garantir els resultats de l'estudi s'ha de realitzar cada assaig per triplicat.

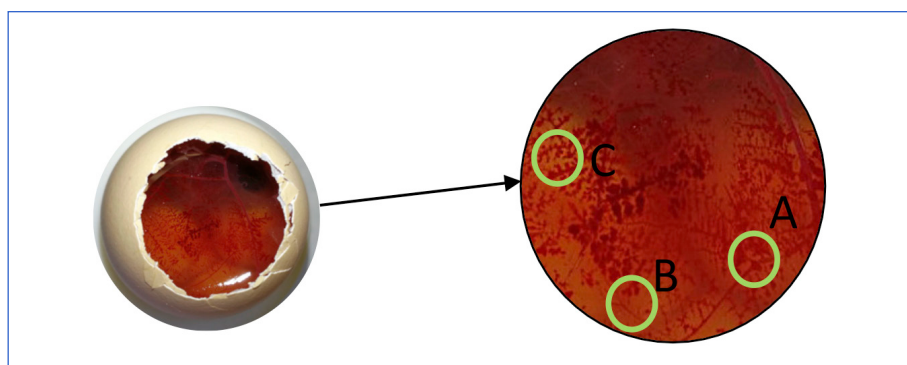


Figura 7. Fenòmens d'irritació en la CAM, a) coagulació, b) vasoconstricció, c) hemorràgia.

A partir de l'equació 2 s'ha de calcular el potencial d'irritació (IIO), on H és el temps en segons que triga a aparèixer l'hemorràgia, V és el temps en segons que triga a aparèixer la vasoconstricció i C és el temps en segons que triga a aparèixer la coagulació.

Posteriorment s'ha de classificar a partir de la taula 1 per tal de veure el poder irritant de cada formulació.

$$IIO = \frac{5(301-H)}{300} + \frac{7(301-V)}{300} + \frac{9(301-C)}{300} \quad /Equació 2/$$

TAULA 1. PUNTUACIÓ I CLASSIFICACIÓ DEL IIO.

IIO	Classificació
0-0,9	Pràcticament no irritants
1-4,9	Dèbilment irritants
5-8,9	Moderadament irritants
9-21	Irritants

5.1.2.7. Resultats

Amb la metodologia descrita en l'apartat 2.4.1 s'obtenen formulacions de NP de PLGA-PEG monodisperses, amb un valor de polidispersió inferior a 0,1, una mida mitjana de partícules inferior a 200 nm i una càrrega superficial negativa al voltant de -20 mV, les quals permeten encapsular més del 99% del fàrmac, cosa que permet una alliberació perllongada en el temps d'aproximadament el 50% del fàrmac al cap de 12 hores i sense presentar potencial d'irritabilitat (Sánchez-López *et al.*, 2016).

6. Estudis d'interacció

Per a la realització d'estudis d'interacció dels fàrmacs amb les diferents membranes caldrà definir les propietats de la membrana que es poden veure afectades en entrar en contacte amb el fàrmac o la forma farmacèutica. L'espectroscòpia de fluorescència és una tècnica que permet l'estudi de les interaccions per diferents mètodes. Es destaquen els estudis d'unió (*binding*) o de desactivació (*quenching*) entre la membrana (generalment LUV marcats amb sondes fluorescents adients) (Loose i Schwille, 2009) i el fàrmac o NP, estudis d'anisotropia que permetran conèixer el nivell en què es produeix la pertorbació, canvis en el potencial dipolar de la membrana, estudis de transferència d'energia per ressonància de fluorescència (FRET) (Shi *et al.*, 2015), que ens ajuda a discernir entre processos d'agregació o fusió de vesícules o aproximació entre NP i LUV. En aquest cas, caldrà marcar cada tipus de partícula amb un sonda fluorescents diferents que permetin que es produeixi FRET (parells amb una distància de Förster adient, per exemple rhodamina i NBD) (Shi *et al.*, 2015).

Els estudis de microscòpia electrònica o de fluorescència permetran observar les interaccions i els canvis que es produeixen en interaccionar les NP amb els GUV (Brown i Hondow, 2013; Tiwari *et al.*, 2018).

Amb tot aquest conjunt d'estudis es pretén fer una primera aproximació a com s'estableixen les interaccions entre les NP i els diferents teixits representats en els models de membrana.

7. Conclusions

En el present treball s'ha evidenciat la importància de la realització d'estudis i el desenvolupament de nanopartícules per al tractament de la inflamació ocular, com també de les diferents metodologies que trobem per tal d'establir un model de membrana per poder realitzar proves *in vitro* simulant els teixits oculars, com ara la còrnia.

S'ha presentat una metodologia que permet associar un agent antiinflamatori no esteroïdal (dexibuprofèn) a diferents polímers i copolímers biodegradables i biocompatibles en forma de NP en medi aquós pel procediment de dispersió del dissolvent, així com la metodologia per poder-les caracteritzar morfològicament i la valoració del potencial ζ que es podrà correlacionar amb l'estabilitat. També s'ha presentat com es poden realitzar els estudis de difusió i d'irritació *in vitro*.

Finalment, els estudis a partir de tècniques biofísiques amb models de membrana proporcionen un enfocament senzill però eficaç per tal de comprendre processos altament complexos com ara la interacció de sistemes d'alliberació perllongada de fàrmac, com les NP, i les diferents barreres biològiques.

8. Agraïments

Aquest treball s'ha pogut realitzar gràcies al suport del projecte ART2018 de l'Institut de Nanociència i Nanotecnologia de la Universitat de Barcelona (IN2UB).

9. Bibliografia

- ABBASI, E. *et al.* (2014) «Dendrimers: synthesis, applications, and properties», pp. 1-10.
- ABREGO, G. *et al.* (2014) «Design of Nanosuspensions and Freeze-Dried PLGA Nanoparticles as a Novel Approach for Ophthalmic Delivery of Pranoprofen». *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(10), pp. 3153-3164.
- AKBARZADEH, A. *et al.* (2013) «Liposome: classification, preparation, and applications». *Nanoscale Research Letters* 2013, 102, pp. 1-9.

- BORCHMAN, D., YAPPERT, M.C. (2010) «Lipids and the ocular lens». *Lipid Research*, 51(1), pp. 2473-2488.
- BROEKHUYSE, R.M. (1975) «The lipid composition of aging sclera and cornea». *Ophthalmologica*, 171(1), pp. 82-85.
- BROWN, A., HONDOW, N. (2013) «Electron microscopy of nanoparticles in cells». *Frontiers of Nanoscience* 5, pp. 95-120.
- CLAUSELL, A. *et al.* (2004) «Polymyxin B-lipid interactions in Langmuir-Blodgett monolayers of Escherichia coli lipids: A thermodynamic and atomic force microscopy study». *Biopolymers*, 75(6), pp. 480-490.
- CRISPIN, S.M. (2016) «Lipids and the eye». *The Veterinary Journal*, 212(1), pp. 90-98.
- DESJARDINS, J. (2019) *The World Population Pyramid (1950-2100)*. Disponible a: www.visualcapitalist.com/world-population-pyramid-1950-2100/ (accés: 9 maig 2019).
- ELLIOTT, N.T., YUAN, F. (2011) «A Review of Three-Dimensional In Vitro Tissue Models for Drug Discovery and Transport Studies». *Pharmaceutical Sciences*, 100, pp. 59-74.
- ESQUEMBRE, R. *et al.* (2012) «Immobilization and characterization of giant unilamellar vesicles (GUVs) within porous silica glasses». *Soft Matter*, 8(2), pp. 408-417.
- FARÍAS, M.E. *et al.* (2018) «Characterization of a label system formed by large unilamellar vesicles for its potential use in the design of electrochemical biosensors». *Microchemical Journal* (Elsevier B.V.), 140(2017), pp. 105-113.
- GARCÍA, M.L. *et al.* (1997) «Interaction of flurbiprofen sodium with cornea model monolayers at the air-water interface». *Thin Solid Films*, 301(1-2), pp. 169-174.
- GAUDANA, R. *et al.* (2010) «Ocular Drug Delivery». *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 12(3), pp. 348-360.
- GAYNOR, P.M. *et al.* (1996) «Cholesterol accumulation in human cornea: evidence that extracellular cholesterol ester-rich lipid particles deposit independently of foam cells». *Lipid Research*, 37(1), pp. 1849-1861.
- GRAUBY-HEYWANG, C., TURLET, J. (2008) «Study of the interaction of β -cyclodextrin with phospholipid monolayers by surface pressure measurements and fluorescence microscopy». *Colloid and Interface Science*, 322(1), pp. 73-78.
- GRIFFITHS, P.C. *et al.* (2015) «Probing the interaction of nanoparticles with mucin for drug delivery applications using dynamic light scattering», *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier B.V., 97(1), pp. 218-222.
- HAGEDORN, S. *et al.* (2015) «Atomic force microscopy and Langmuir-Blodgett monolayer technique to assess contact lens deposits and human meibum extracts». *Journal of Optometry* (Spanish General Council of Optometry), 8(3), pp. 187-199.
- Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (2010) «ICCVAM-Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method». *ICCVAM Test Method Evaluation Report*, 13(10), pp. 30-38.
- KAHLER, S.T., PHLEPS, W., HESSE, E. (2003) «Dexibuprofen: Pharmacology, therapeutic uses and safety». *Inflammopharmacology*, 11(1), pp. 371-383.
- KARMAKAR, P. (2018) *How many parts are in a human eye?* Disponible a: www.quora.com/How-many-parts-are-in-a-human-eye (accés: 24 setembre 2019).
- KELS, B.D., GRZYBOWSKI, A., GRANT-KELS, J.M. (2015) «Human ocular anatomy». *Clinics in Dermatology* (Elsevier Inc.), 33, pp. 140-146.
- KENCHEGOWDA, S., BAZAN, H.E.P. (2010) «Significance of lipid mediators in corneal injury and repair». *Lipid Research*, 51(1), pp. 879-891.
- LIESER, G. *et al.* (1994) «Electron microscopic investigations on free-standing mixed lipid Langmuir-Blodgett-Kuhn monolayers: phase separation and aging process». *BBA - Biomembranes*, 1192(1), pp. 14-20.
- LIU, J., CONBOY, J.C. (2005) «Structure of a Gel Phase Lipid Bilayer Prepared by the». *Langmuir*, 21(20), pp. 9091-9097.
- LOOSE, M., SCHWILLE, P. (2009) «Biomimetic membrane systems to study cellular organization». *Journal of Structural Biology* (Elsevier Inc.), 168(1), pp. 143-151.

- MAEKI, M. *et al.* (2017) «Understanding the formation mechanism of lipid nanoparticles in microfluidic devices with chaotic micromixers». *PLoS ONE*, 12(11), pp. 1-16.
- MAGUIRE, L.A., ZHANG, H., SHAMLOU, P.A. (2003) «Preparation of small unilamellar vesicles (SUV) and biophysical characterization of their complexes with poly-l-lysine-condensed plasmid DNA». *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37(1), p. 73.
- MAKADIA, H.K., SIEGEL, S.J. (2011) «Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier». *PolymerS*, 3(3), pp. 1377-1397.
- MIYOSHI, T., KATO, S. (2015) «Detailed Analysis of the Surface Area and Elasticity in the Saturated 1, 2-Diacylphosphatidylcholine / Cholesterol Binary Monolayer System». *Langmuir*, 31(1), pp. 9086-9096.
- NAGARWAL, R.C. *et al.* (2009) «Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery». *Journal of Controlled Release* (Elsevier B.V.), 136(1), pp. 2-13.
- NARAYAN, R. *et al.* (2018) «Mesoporous silica nanoparticles: A comprehensive review on synthesis and recent advances». *Pharmaceutics*, 10(3), pp. 1-49.
- NAUMANN, C.A. *et al.* (2002) «The polymer-supported phospholipid bilayer: Tethering as a new approach to substrate-membrane stabilization». *Biomacromolecules*, 3(1), pp. 27-35. doi: 10.1021/bm0100211.
- NIDHI, K. *et al.* (2006) «Microstructural Imaging of Early Gel Layer Formation in HPMC Matrices». *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95(10), pp. 2145-2157.
- OKUMURA, Y., SUGIYAMA, T. (2011) «Electroformation of giant vesicles on a polymer mesh». *Membranes*, 1(3), pp. 184-194.
- OROPESA-NUÑEZ, R., JÁUREGUI-HAZA, U.J. (2012) «Nanoparticles as drug carriers: characteristics and perspectives». *Cenic*, 43(3), pp. 64-70.
- PARRISH, A. (2017) «The impact of aging on epithelial barriers». *Tissue Barriers* (Taylor & Francis), 5(4), pp. 1-8.
- PEETLA, C., STINE, A., LABHASETWAR, V. (2009) «Biophysical interactions with model lipid membranes: Applications in drug discovery and drug delivery». *Molecular Pharmaceutics*, 6(5), pp. 1264-1276.
- PENEVA, P.T. (2015) «Non-steroidal anti-inflammatory drugs for topical ophthalmic administration: Contemporary trends». *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(9), pp. 13-19.
- PETTY, M. (1996) *langmuir-Blodgett Films: an Introduction*. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- PILAR, G.-C. del (2016) «Nanopartículas poliméricas de administración intranasal para la liberación de activos en el sistema nervioso central», *Ars Pharmaceutica*, 57(1), pp. 27-35.
- PRAT, J. *et al.* (2015) «A study of HIV-1 FP inhibition by GBV-C peptides using lipid nano-assemblies». *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 480(1), pp. 184-190.
- PUJOL, M. *et al.* (1999) «Miscibility of the Hepatocyte Membrane Lipids at the Air / Water Interface and Interaction with the Sequence (110 - 121) of the Capsid Protein VP3 of Hepatitis A Virus». *Langmuir*, 15(7), pp. 1101-1107.
- RAY, A. *et al.* (2016) «A comprehensive insight on ocular pharmacokinetics». *Drug Delivery and Translational Research*. 6(6): 735-754. Rico del Viejo, L. *et al.* (2018) «The effect of ageing on the ocular surface parameters». *Contact Lens & Anterior Eye* (Elsevier), 41(1), pp. 5-12.
- SÁNCHEZ-LÓPEZ, E. *et al.* (2018) «Memantine-Loaded PEGylated Biodegradable Nanoparticles for the Treatment of Glaucoma». *Nanoparticles*, 14(1), p. e1701808.
- SÁNCHEZ-LÓPEZ, E. *et al.* (2016) «PEGylated PLGA nanospheres optimized by design of experiments for ocular administration of dexibuprofen-in vitro, ex vivo and in vivo characterization». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (Elsevier B.V.), 145(1), pp. 241-250.
- SANDEEP, C. *et al.* (2013) «Current Trends Towards an Ocular Drug Delivery System: Review». *Pharmacy and Pharmaceutical Science Research*, 3(2), pp. 28-34.
- SANG-SOO, K. *et al.* (2007) «A poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffold with enhanced osteoconductivity». *Biomedical Materials Research*, 80(1), pp. 206-215.
- SHI, J. *et al.* (2015) «Nanoparticle based fluorescence resonance energy transfer (FRET) for biosensing applications». *Journal of Materials Chemistry B* (Royal Society of Chemistry), 3(35), pp. 6989-7005. doi: 10.1039/c5tb00885a.

- SIDJANIN, D.J. *et al.* (2008) «Pharmacogenetics of ophthalmic topical β -blockers». *Personalized Medicine*, 5(4), pp. 377-385.
- SILVERSTEIN, F.E. *et al.* (2000) «Gastrointestinal Toxicity With Celecoxib vs Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs for Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis». *Jama*, 284(10), p. 1247.
- SIONTOROU, C.G. *et al.* (2017) «Artificial lipid membranes: Past, present, and future». *Membranes*, 7(3), pp. 1-24.
- SULLIVAN, B.D. *et al.* (2006) «Influence of Aging on the Polar and Neutral Lipid Profiles in Human Meibomian Gland Secretions». *Archives of Ophthalmology* (American Medical Association), 124(9), p. 1286.
- TIWARI, A. *et al.* (2018) «Passive membrane penetration by ZnO nanoparticles is driven by the interplay of electrostatic and phase boundary conditions». *Nanoscale*, 10(7), pp. 3369-3384.
- TSAI, C.H. *et al.* (2018) «Ocular drug delivery: Role of degradable polymeric nanocarriers for ophthalmic application». *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9).
- TURNER, A. (2009) «Population ageing: what should we worry about?». *The Royal Society B*, 364(1), pp. 3009-3021.
- URREJOLA, M.C. *et al.* (2018) «Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly)». *International Journal of Morphology*, 36(4), pp. 1463-1471.
- VENKATESH, N. (2018) «Metallic Nanoparticle: A Review». *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 4(2), pp. 3765-3775.
- WANG, L., CRUZ, A., FLACH, C.R. (2007) «Langmuir - Blodgett Films Formed by Continuously Varying Surface Pressure. Characterization by IR Spectroscopy and Epifluorescence Microscopy». *Langmuir*, 23(2), pp. 4950-4958.
- YAMADA, M. *et al.* (1998) «Quantitative analysis of lipid deposits from Schnyder's corneal dystrophy Quantitative analysis of lipid deposits from Schnyder's corneal dystrophy». *British Journal of Ophthalmology*, 82(1), pp. 444-447.