



Estudio biofarmacéutico de triterpenos pentacíclicos antiinflamatorios vehiculizados en sistemas nanoestructurados para aplicación tópica

Helen Lissette Alvarado Bonilla

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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (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) y a través del Repositorio Digital de la UB (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) service and by the UB Digital Repository (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.



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

**DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA Y
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA**

**ESTUDIO BIOFARMACÉUTICO DE TRITERPENOS
PENTACÍCLICOS ANTIINFLAMATORIOS VEHICULIZADOS
EN SISTEMAS NANOESTRUCTURADOS PARA APLICACIÓN
TÓPICA**

HELEN LISSETTE ALVARADO BONILLA, 2015



Universitat de Barcelona

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

**DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA Y
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO
INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y CONTROL DE MEDICAMENTOS**

**ESTUDIO BIOFARMACÉUTICO DE TRITERPENOS PENTACÍCLICOS
ANTIINFLAMATORIOS VEHICULIZADOS EN SISTEMAS
NANOESTRUCTURADOS PARA APLICACIÓN TÓPICA**

Memoria presentada por Helen Lissette Alvarado Bonilla, para optar al título de doctor por
la Universidad de Barcelona

Dra. María Luisa García López
Directora de Tesis

Dra. Ana Cristina Calpena Campmany
Directora de Tesis

Helen Lissette Alvarado Bonilla
Doctoranda

Dra. Ana Cristina Calpena Campmany
Tutora

Helen Lissette Alvarado Bonilla, 2015

AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias a todas las personas que me han ayudado a lo largo de toda esta etapa de mi vida, en primer lugar a Dios y a la Virgen María, porque me han permitido vivir esta experiencia tan increíble. Infinitas gracias a mis padres, Roberto Alvarado y Helen Bonilla y a mis hermanas Sandra Jamilette y Karen Michelle por todo su apoyo incondicional, tanto económico como emocional, gracias por ayudarme siempre a seguir mis sueños y metas, por todo su amor, confianza, dedicación, por estar siempre a mi lado, son los mejores padres y hermanas. A mis queridos sobrinitos, Cesar Roberto y Gabriel Alejandro, gracias por esperarme siempre con tanta emoción, por todo su amor. Los amo muchísimo a todos.

A mi abuelita Pimpa, a mi familia, tíos, primos, sobrinitos, gracias por todo su apoyo, cariño, buenos deseos y oraciones, por siempre estar al pendiente de mí y alegrarse de mis triunfos.

A mis queridas amigas, Lilian Sosa, Pamella Echenique, Silvia Garita, Kenya Carranza, Laura Flores, Cindy Zelaya, Pamela Alcántara, Ixmucane Padilla, Keyla Fúnez, gracias por todo su apoyo, por su cariño tan grande, por estar siempre para mí.

A mis amigos y compañeros de trabajo, Martha Vásquez, Paloma Flores, Danielle Rupert, Bessy Guevara, Alexander Parra, Mireia Mallandrich, Cristina Cañada, Elena Sánchez, Berenice Andrade, Valeri Domínguez, Francisco Fernández, Elizabeth Gonzalez, Estefania Vega, pero en especial a Guadalupe Abrego, que se convirtió en una hermana para mi, fue un largo y difícil camino pero muy divertido, gracias a todos ustedes.

A las doctoras, María Luisa Garduño, Beatriz Clares, Amelia Da Silva, Eliana Souto, gracias por todo el tiempo y ayuda que me brindaron.

Agradecimientos

Muchas gracias en especial a mis directoras de tesis, Ana Cristina Calpena y María Luisa García, gracias por toda su enseñanza, paciencia, tiempo, apoyo, ayudarme a crecer tanto a nivel personal como profesional.

Muchas gracias por todo, sin su ayuda y apoyo no habría sido posible cumplir esta meta.

ÍNDICE

ÍNDICE

Índice general.....i
 Abreviaturas.....iii

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Inflamación.....	3
1.1.1. Fases de la reacción inflamatoria.....	3
1.1.2. Células implicadas en el proceso inflamatorio.....	4
1.1.3. Mediadores de la inflamación.....	6
1.1.4. Terapia antiinflamatoria.....	13
1.1.4.1. Antiinflamatorios esteroides o glucocorticoides.....	13
1.1.4.2. Antiinflamatorios no esteroides.....	13
1.1.4.3. Compuestos antiinflamatorios de origen natural.....	15
1.2. Melanoma.....	16
1.2.1. Factores de riesgo.....	17
1.3. Triterpenos pentacíclicos: Ácidos oleanólico y ursólico.....	20
1.4. Administración dérmica de nanoemulsiones.....	29
1.4.1. Anatomofisiología de la piel.....	29
1.4.1.1. Epidermis.....	30
1.4.1.2. Dermis.....	32
1.4.1.3. Hipodermis.....	33
1.4.1.4. Glándulas.....	33
1.4.2. Absorción percutánea.....	34
1.4.2.1. Etapas de la absorción percutánea.....	34
1.4.2.2. Vías de penetración a través de la piel.....	35
1.5. Administración ocular de nanopartículas.....	37
1.5.1. Anatomofisiología ocular.....	37
1.5.2. La córnea.....	40
1.5.3. Permeación ocular.....	43
1.6. Sistemas de administración tópica.....	46

Índice general

1.6.1. Nanoemulsiones.....	46
1.6.1.1. Métodos de preparación.....	47
1.6.1.2. Componentes de las nanoemulsiones.....	48
1.6.2. Nanopartículas poliméricas.....	50
1.6.2.1. Métodos de preparación.....	53
1.6.2.2. Caracterización.....	54
2. OBJETIVOS.....	57
3. RESULTADOS.....	61
3.1. Artículo 1. Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the quantification of ursolic/oleanolic acids mixture isolated from <i>Plumeria obtusa</i>	65
3.2. Artículo 2. Design and optimization of oleanolic/ursolic acid-loaded nanoplatfoms for ocular anti-inflammatory applications.....	77
3.3. Artículo 3. Nanoemulsions for dermal controlled release of oleanolic and ursolic acids: in vitro, ex vivo and in vivo characterization.....	93
3.4. Artículo 4. Anticarcinogenic activity of natural pentacyclic triterpenes isolated from <i>Plumeria obtusa</i> against B16 melanoma cell line.....	107
4. DISCUSIÓN.....	125
5. CONCLUSIONES.....	141
6. BIBLIOGRAFÍA.....	145

ABREVIATURAS

AA	Acido araquidónico
AFM	Microscopia de fuerza atómica
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
CMI	Concentración mínima inhibitoria
COX	Ciclooxigenasa
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
H-NMR	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón
IC ₅₀	Concentración inhibitoria máxima media
IL	Interleucinas
LPO	Lipooxigenasa
LTs	Leucotrienos
NCs	Nanocápsulas
NEm	Nanoemulsiones
NEs	Nanoesferas
NM-OA/UA	Mezcla natural de acido oleanólico y ursólico
NPs	Nanopartículas poliméricas
NO	Oxido nítrico
OA	Acido oleanólico
P188	Poloxamer 188
PAF	Factor agregante plaquetario
PCL	Poli-ε-caprolactona
PCS	Espectroscopía de correlación fotónica
PGI	Prostaciclina
PGs	Prostaglandinas
PGA	Acido poli-glicólico
PLA	Acido poli-láctico

Índice general

PLGA	Acido poli (D,L-láctico-co-glicólico)
SEM	Microscopía electrónica de barrido
sGOT	Transaminasa glutámico oxalacética
sGTP	Transaminasa glutámico pirúvica
SM-OA/UA	Mezcla sintética de acido oleanólico y ursólico
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPA	13-acetato-12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol
TXs	Tromboxanos
UA	Acido ursólico
XP	Xeroderma pigmentoso

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Inflamación

La inflamación es un proceso que se inicia a consecuencia de una lesión y termina con la destrucción permanente del tejido o con su curación. Los agentes desencadenantes de la respuesta inflamatoria son de naturaleza muy variada, pudiendo ser estímulos físicos, químicos, agresiones por seres vivos o agresiones inmunológicas. La respuesta inflamatoria da lugar a una sintomatología local, caracterizada por dolor, rubor, tumor y calor, acompañada de la incapacidad funcional del tejido afectado y a una reacción sistémica que conlleva al desarrollo de fiebre, leucocitosis y aumento en la concentración plasmática de determinadas proteínas. La reacción inflamatoria tiene como finalidad la defensa del organismo frente al agente causal y la restauración del tejido lesionado. Dependiendo del órgano afectado y del balance entre el agente inductor y la respuesta inflamatoria, el proceso inflamatorio puede dar lugar a la restauración completa del tejido lesionado, a su sustitución por un tejido cicatricial o al fracaso de la respuesta inflamatoria y la subsiguiente cronificación del proceso. Las consecuencias de dicho fracaso dependerán del órgano afectado (Delgado, et al. 2003).

1.1.1. Fases de la reacción inflamatoria

Para poder sistematizar los acontecimientos que tienen lugar durante la inflamación, se puede dividir la respuesta inflamatoria en varias fases: fase inicial, fase vascular, fase celular y fase de reconstrucción de los tejidos afectados.

En la **fase inicial** al interactuar el estímulo dañino con los tejidos se induce la liberación de gran cantidad de mediadores, unos ya preformados en los tejidos como la histamina, y otros que se sintetizan y se liberan como resultado de esta interacción como es el caso de los derivados del ácido araquidónico (AA) (prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI), tromboxanos (TXs) y leucotrienos (LTs)), factor agregante plaquetario (PAF) y radicales libres de oxígeno. Al actuar los mediadores citados sobre los vasos sanguíneos se

Introducción

inicia la **fase vascular**. Esta fase consiste fundamentalmente en una vasodilatación, subsiguiente aumento de la circulación seguido de enlentecimiento y estasis de la sangre, aumento de la permeabilidad capilar y exudación del líquido vascular.

El líquido exudado contiene gran cantidad de mediadores de la inflamación que actúan sobre las células vecinas y sobre los vasos. Se inician en este momento tres cascadas enzimáticas: el sistema del complemento, el sistema de las cininas y el sistema de la coagulación. Cuando se produce el estasis vascular y consiguiente extravasación pasan a los tejidos vecinos células hemáticas que junto a los mastocitos ya existentes en los tejidos inician la **fase celular**.

Toda reacción inflamatoria desemboca en una necrosis tisular más o menos importante. La reconstrucción de los tejidos depende de la cantidad de pérdida de tejido durante el proceso inflamatorio, de la capacidad de proliferación del tejido afectado y de la persistencia o repetición del agente lesivo. Puede ocurrir que la inflamación desaparezca sin dejar rastro (curación) o si los tejidos han sido lesionados (citotoxicidad, supuración...), queda un tejido cicatrizal que puede tener graves consecuencias patológicas para la función en determinados órganos como el ojo.

1.1.2. Células implicadas en el proceso inflamatorio

Las células que intervienen en el proceso inflamatorio son:

- Células de los tejidos: mastocitos.
- Células hemáticas:
 - Células fagocíticas:
 - Polimorfonucleares: neutrófilos, eosinófilos y basófilos.
 - Mononucleares: monocitos-macrófagos.
 - Células no fagocíticas:
 - Mononucleares: linfocitos.
 - Plaquetas.

- Células de los tejidos

Mastocitos: Son numerosas cerca de las superficies cutáneas y mucosas, y menos abundantes en los órganos profundos donde se disponen alrededor de los vasos sanguíneos. Cuando los mastocitos son estimulados liberan sustancias almacenadas en sus gránulos de secreción tales como aminas vasoactivas (histamina, serotonina), proteasas neutras, proteoglicanos, enzimas implicadas en el metabolismo oxidativo y factores quimiotácticos. Por otro lado, la estimulación celular también activa la síntesis de sustancias nuevas: PGs, LTs y PAF. La activación de los mastocitos representa el mecanismo inflamatorio principal de las conjuntivitis alérgicas del tipo de la fiebre de heno, conjuntivitis primaveral, conjuntivitis papilar gigante y queratoconjuntivitis atópica (Lee Stock, et al. 1990).

- Células hemáticas

- Células fagocitarias

- Polimorfonucleares: Son las primeras células hemáticas que llegan a las zonas de inflamación. Emigran activamente hacia el lugar de la inflamación atraídos por sustancias químicas liberadas por microorganismos, producidas localmente o bien por el LTB₄. Entre los polimorfonucleares, los *neutrófilos* son los que tienen mayor capacidad para fagocitar y digerir los microorganismos que se fijan a su membrana. Poseen enzimas digestivas que pueden digerir prácticamente todos los componentes de la mayor parte de los microorganismos y que en determinadas circunstancias pasan al exterior celular, rompen los componentes del complemento e inician la cascada de las cininas. Así pues, proporcionan otro sistema de activación de los mediadores de la inflamación. Los *basófilos* son muy similares a los mastocitos y responden de forma semejante a los mismos estímulos, mientras que los *eosinófilos* son fagocitos débiles que presentan un papel particular en la destrucción de los parásitos, en conjunción con los mediadores de los mastocitos, los anticuerpos y el complemento.

- Mononucleares: Los *monocitos* entran en la zona inflamatoria ya en el último estadio, después de los polimorfonucleares. En los tejidos se transforman en macrófagos y fagocitan no solamente los microorganismos, sino también los restos celulares, en particular los de los polimorfonucleares. Son capaces de segregar múltiples mediadores de

Introducción

la inflamación, entre los que destacan agentes antiinfecciosos (interferón), componentes del complemento, citocinas-interleucina 1 (IL-1)- y derivados del AA (PGE₂, TXA₂ y LTs).

- Células no fagocitarias

- Linfocitos: Estas células sólo participan en el terreno de las respuestas inflamatorias inmunes, donde el organismo busca alcanzar un estado inmune. Para ello, los macrófagos son los encargados de procesar a los antígenos, de presentarlos a los linfocitos T y de activar a estos últimos. Los linfocitos T activados expresan su actividad cooperadora o citotóxica y sintetizan unas linfocinas que intervienen en la activación y diferenciación de los linfocitos B, responsables de la síntesis de anticuerpos.

- Plaquetas: Aunque las plaquetas influyen principalmente en la coagulación, también intervienen en los procesos inflamatorios. Poseen numerosas funciones inflamatorias, pueden activar y regular el complemento, adherir microorganismos sobre su superficie, alterar la permeabilidad vascular, producir factores quimiotácticos, liberar y metabolizar sustancias vasoactivas, producir derivados del AA y liberar factores de crecimiento celular que participan en las fases de reparación que siguen a la lesión de los vasos sanguíneos.

1.1.3. Mediadores de la inflamación

Los mediadores son sustancias presentes en el medio extracelular que permiten la comunicación entre las diferentes células que participan en las reacciones inflamatorias o inmunológicas. Académicamente podemos distinguir dos tipos de mediadores: humorales y celulares.

Por un lado la estimulación de la célula desencadena la síntesis de mediadores humorales a partir de precursores inactivos presentes en los humores (plasma). Por otro lado, los mediadores celulares son preformados en las células y la activación de las mismas produce su liberación. Los mediadores son múltiples según su naturaleza química (aminas, péptidos, proteínas, lípidos) y su actividad biológica. Tienen como característica común una vida biológica muy corta, ya que sólo son activos durante el período de inflamación porque

son rápidamente inactivados por el catabolismo o por la acción de antagonistas. Los mediadores celulares y los factores que activan los mediadores humorales proceden de las diferentes células que participan en las reacciones inflamatorias e inmunológicas.

- **Mediadores humorales**

Cuatro sistemas humorales principales contribuyen a iniciar y mantener las respuestas inflamatorias: sistema del complemento, sistema de cininas, coagulación y fibrinólisis.

El sistema de complemento está integrado por nueve componentes (C1 a C9), algunos de ellos (C3a y C5a) pueden inducir la liberación de otros factores de la inflamación por parte de los mastocitos (histamina, heparina) manteniéndose así la respuesta inflamatoria.

El sistema de cininas produce uno de los mediadores más potentes de la inflamación, la bradicinina. Se trata de uno de los más potentes factores vasoactivos. Contrae las fibras musculares lisas, aumenta la permeabilidad vascular y estimula las fibras nerviosas sensitivas (dolor).

La cascada de la coagulación participa tanto en los procesos inflamatorios con lesión vascular como sin ella. El sistema de la coagulación, a través de la trombina, principal enzima en este sistema, puede activar a su vez, el sistema del complemento y el sistema extrínseco de la coagulación a través del factor XII o de Hageman que está implicado en la activación tanto del sistema de la cininas como en la fibrinólisis.

- **Mediadores celulares**

Entre los mediadores celulares de la inflamación están la histamina, metabolitos del ácido araquidónico, factores de activación plaquetaria, factores quimiotácticos, linfocinas, óxido nítrico y radicales libres.

Introducción

En el foco inflamatorio la principal fuente de **histamina** se encuentra en los mastocitos, aunque también está presente en los basófilos y en las plaquetas. La acción de la histamina se produce a través de su unión a receptores específicos de membrana (H_1 y H_2), de manera que, a nivel capilar, la unión a los receptores H_1 contribuye a la extravasación sanguínea y la unión a los receptores H_2 a la vasodilatación y al aumento del aporte arterial al foco inflamatorio. La histamina posee un efecto regulador sobre las reacciones inflamatorias inmunes, ya que estimula la formación de linfocinas por los linfocitos T.

El ácido araquidónico (AA) es un derivado del ácido graso esencial ácido linoleico, con muchos enlaces dobles, que se encuentra normalmente esterificado en forma de fosfolípido en las membranas celulares. El AA se libera por acción de las fosfolipasas celulares, a partir de cualquier célula activada (plaquetas), estresada o a punto de morir por necrosis. Una vez liberado, el AA puede metabolizarse por dos vías:

La primer vía, se asimila por las ciclooxigenasas (la forma constitutiva COX-1 y la inducible COX-2) generan intermediarios que, después de ser procesados por enzimas específicas, producen las prostaglandinas (PGD_2 producido por mastocitos, PGE_2 por macrófagos y células endoteliales, entre otros), estas son las moléculas más abundantes, encontrándose en todos los tejidos y fluidos del organismo, cuya molécula base es un ácido graso de 20 átomos de carbono unido a un anillo de ciclopentano (**Gómez, et al. 2011**). Otro metabolito son los tromboxanos (TXA_2 , el principal metabolito del AA generado por las plaquetas); el endotelio vascular carece de tromboxano sintetasa, pero posee una prostaciclina sintetasa, y por tanto genera prostaciclina (PGI_2) (Fig. 1).

Y la segunda vía, metabolizada por lipooxigenasas, estas generan intermediarios de los leucotrienos (LTs) (por acción enzimática de la 5-lipooxigenasa) y las lipoxinas. Los derivados del AA (también denominados eicosanoides) sirven como señales intra o extracelulares en una gran variedad de procesos biológicos, entre ellos la inflamación y la hemostasis (Fig. 2).

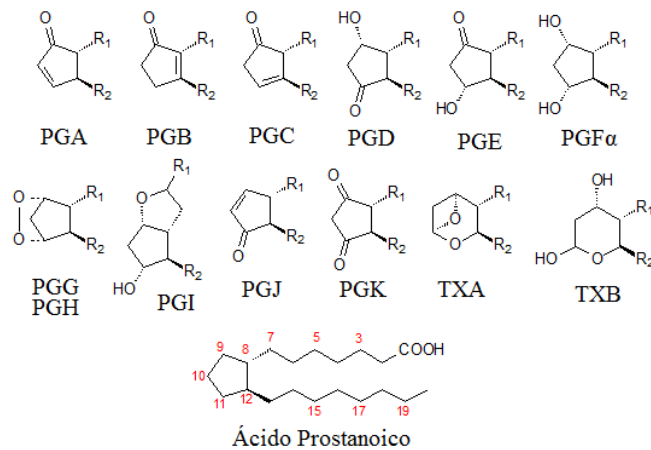


Figura 1. Estructuras de las prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos

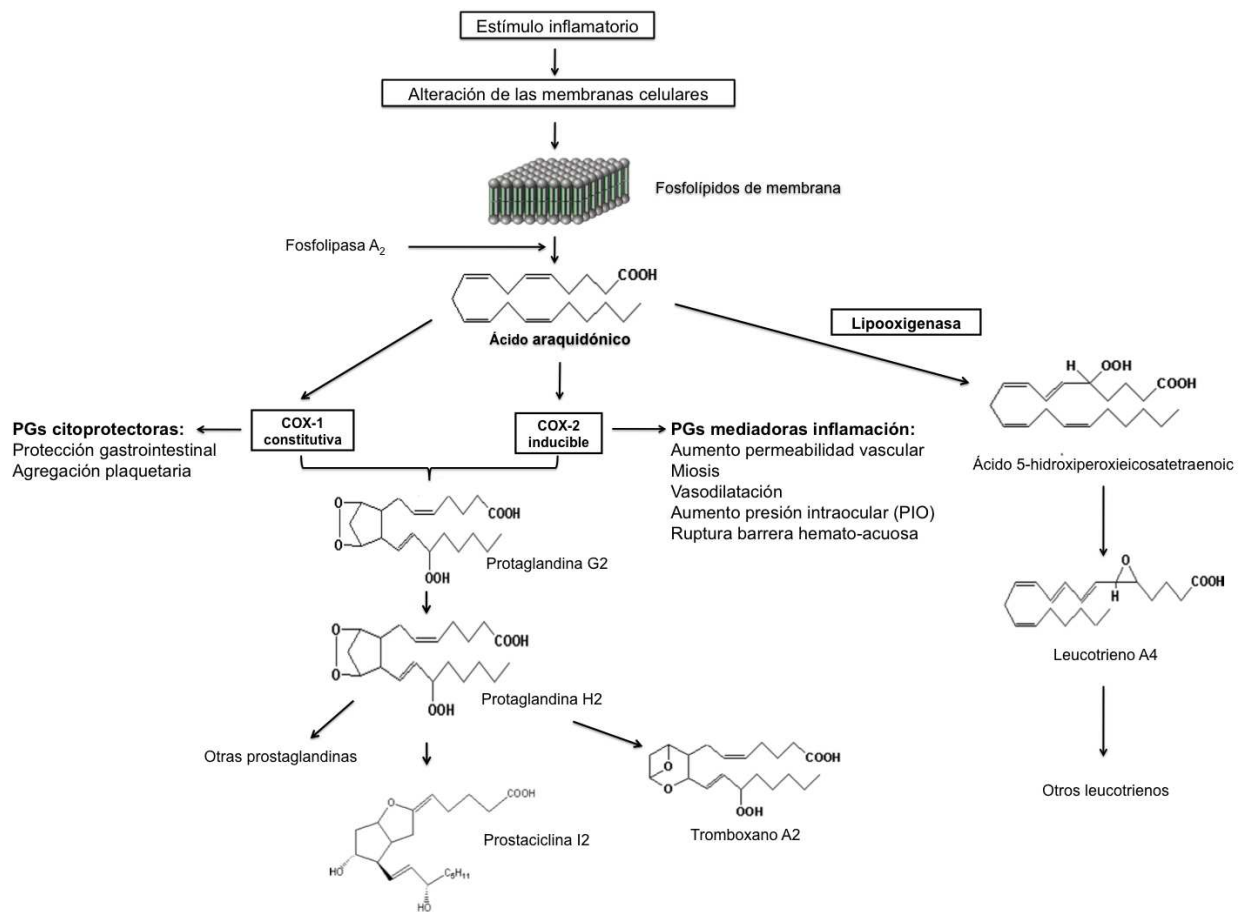


Figura 2. Mecanismo de la Inflamación

Introducción

Los efectos principales de los metabolitos del AA son:

- Prostaglandinas (PGD₂, PGE₂): vasodilatación, dolor y fiebre.
- Prostaciclina (PGI₂): vasodilatación e inhibición de la agregación plaquetaria.
- Tromboxanos (TXA₂): vasoconstricción y activación de la agregación plaquetaria.
- Leucotrienos: LTB₄ es quimiotáctico y activador de los neutrófilos; los otros leucotrienos son vasoconstrictores, inducen el broncoespasmo y aumentan la permeabilidad vascular (mucho más potentes que la histamina).
- Lipoxinas: vasodilatación, inhibición de la adhesión de los leucocitos polimorfonucleares: neutrófilos; estos metabolitos del AA producen una disminución de la inflamación, por lo que intervienen en la detención de la inflamación, a diferencia del resto de los derivados del AA, necesitan de dos tipos celulares para ser sintetizados: los neutrófilos producen intermediarios de la síntesis, que son convertidos en lipoxinas por plaquetas al interactuar con los neutrófilos (Espinosa, et al. 2004).

Los **factores de activación plaquetaria**, conocidos bajo las siglas PAF, encierran a un grupo de mediadores lipídicos que se sintetizan cuando empieza el proceso inflamatorio. Estos mediadores se sintetizan en neutrófilos, plaquetas, basófilos, mastocitos, eosinófilos, células endoteliales y macrófagos. Todos estos tipos de células sintetizan PAF cuando son estimuladas por complejos inmunes, factores del complemento, trombina, antígenos, bradicinina, histamina, anticuerpos y linfocinas. En cuanto a su acción, el PAF liberado provoca la agregación y degranulación de las plaquetas y la liberación de sus mediadores. También provoca vasoconstricción venular con incremento de la permeabilidad vascular. Por otro lado, el PAF determina la marginación vascular de neutrófilos y monocitos, y aumenta su diapédesis a través de la pared vascular. Sobre los neutrófilos y macrófagos de los tejidos actúa estimulando la secreción de sus gránulos lisosomales al mismo tiempo que estimula su metabolismo oxidativo (Moilanen, et al. 1993).

Los **factores quimiotácticos** son de naturaleza muy variada. Ciertos productos exógenos (bacterianos) tienen actividad quimiotáctica propia, pero la mayor parte de los tipos de antígeno depositados en los tejidos, atraen a los leucocitos indirectamente por la intermediación de factores endógenos de naturaleza muy variada tales como el sistema del

complemento o fibrina. Entre los lípidos bioactivos, el principal quimioatrayente es el LTB₄, actuando fundamentalmente sobre los neutrófilos. El quimiotactismo es una función accesoria para el PAF, linfocitos y mastocitos.

Las linfocinas juegan un papel esencial en las manifestaciones inflamatorias, provocando el reclutamiento y la activación de los linfocitos, monocitos-macrófagos y polimorfonucleares, e incluso la liberación de ciertos mediadores. De todos los tipos de interleucinas conocidos, la IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF α) son las principales interleucinas detectadas en el foco inflamatorio. Ambos estimulan la síntesis de PGE₂ en diversas células inflamatorias (células endoteliales, macrófagos y fibroblastos) y la síntesis de PAF en las células endoteliales durante el proceso inflamatorio (**Elias, et al. 1987**).

El óxido nítrico producido por los macrófagos actúa como un radical libre y es citotóxico para ciertos microorganismos y células tumorales. Puede oxidar los grupos sulfhidrilos de las proteínas con el consiguiente agotamiento del glutatión citosólico y puede reaccionar con el anión superóxido para formar dióxido de nitrógeno, el cual resulta ser fuertemente oxidante, y un radical hidroxilo, muy reactivo. La producción incontrolada de óxido nítrico por parte del macrófago en caso de shock séptico puede producir vasodilatación periférica extrema con la consiguiente hipotensión que conlleva al shock y a su vez el óxido nítrico también ha sido involucrado en diversas enfermedades inflamatorias (**Pérez Ruiz, et al. 1997; Gómez, et al. 2011**).

Las células inflamatorias producen **radicales libres** como el O₂⁻ (anión superóxido) y OH (radical hidroxilo). Los neutrófilos activados son una fuente importante de producción de estos radicales, aunque éstos también pueden formarse durante la cascada del AA, tanto por la vía de las ciclooxigenasas como por la de las lipooxigenasas. Los radicales libres liberados causan lesiones macromoleculares del espacio extracelular, membrana celular y entorno microvascular produciendo un aumento de la permeabilidad y adhesión de leucocitos al endotelio vascular.

Introducción

En la tabla 1 se resume el papel de los mediadores en las diferentes reacciones de la inflamación.

Tabla 1. Papel de los mediadores en las diferentes reacciones de la inflamación

Papel de la Inflamación	Mediadores
Vasodilatación	<ul style="list-style-type: none">- Prostaglandinas- Óxido nítrico- Histamina
Aumento de la permeabilidad vascular	<ul style="list-style-type: none">- Histamina y Serotonina- C3a y C5a (mediado por vasoaminas)- Bradiquinina- Leucotrienos C₄, D₄, E₄- Factor activador de las plaquetas (PAF)- Sustancia P
Quimiotaxis, reclutamiento de leucocitos y activación	<ul style="list-style-type: none">- TNF, IL-1- Quimioquinas- C3a, C5a- Leucotrieno B₄- Productos bacterianos, como péptidos N-formilmetil
Fiebre	<ul style="list-style-type: none">- TNF, IL-1- Prostaglandinas
Dolor	<ul style="list-style-type: none">- Prostaglandinas- Bradiquinina- Sustancia P
Daño tisular	<ul style="list-style-type: none">- Enzimas lisosomales de los leucocitos- Especies reactivas del oxígeno- Oxido nítrico

1.1.4. Terapia antiinflamatoria

Existen dos grupos importantes de agentes antiinflamatorios: los antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides y los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

1.1.4.1. Antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides

Son los más potentes antiinflamatorios, actúan sobre la inflamación por diversos caminos, por ejemplo, reducen el número y la activación de eosinófilos, desencadenando la apoptosis de los mismos y disminuyendo algunos de sus factores quimiotácticos que incluyen las IL-3 y 5, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), eotaxina y la citoquina RANTES (citoquina expresada y secretada en células T normales), entre otras. También reducen la proliferación de linfocitos T, e inducen la apoptosis de los mismos, al disminuir la acción de la IL-2. Disminuyen también la cantidad de monocitos, células dendríticas, mastocitos, y otras células inflamatorias, y por lo tanto inducen una disminución en la producción de citoquinas y mediadores proinflamatorios. Estos efectos son producidos por diversos mecanismos, que incluyen entre otros la síntesis de proteínas con efecto antiinflamatorio y la inhibición de la síntesis de numerosos factores proinflamatorios y de crecimiento. En este grupo de fármacos se encuentran la dexametasona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, cortisona, hidrocortisona, mometasona, entre otros (**Gómez, et al. 2011**).

1.1.4.2. Analgésicos, antipiréticos, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los AINEs son un grupo de agentes de estructura química diferente que tienen como efecto primario inhibir la síntesis de prostaglandinas a través de la inhibición de la enzima COX. Estos fármacos comparten acciones farmacológicas y efectos indeseables semejantes. Los AINEs son sustancias capaces de suprimir los signos y síntomas de la inflamación, algunos también ejercen acciones antipiréticas y analgésicas pero son sus propiedades antiinflamatorias las que los hacen útiles en el tratamiento de trastornos en los cuales el dolor está relacionado con la intensidad del proceso inflamatorio. Estos fármacos se agrupan en varias clases químicas (Tabla 2).

Introducción

Tabla 2. Ejemplos de AINEs por sus clases químicas

Clases químicas de AINEs	Ejemplos
Salicilatos	Ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, acetilsalicilato de lisina, diflunisal, sulfazalacina o salicilazo sulfapiridina, salicilato de sodio, salicilamida
Pirazolonas y análogos	Fenilbutazona, pirazinobutazona o feprazona, antipirina o fenasona, aminopirina, dipirona, oxifenbutazona, gamacetofenilbutazona, carudol clofenazona, bumadizona, suxibuzona, azapropazona, metamizol
Paraminofenol	Paracetamol o acetaminofén, fenacetina
Derivados indolacéticos (Indoles)	Indometacina, benzydamina, sulindac, acemetacina, proglumetacina, talmetacina
Derivados arilacéticos o fenilacéticos	Diclofenaco, pirrolacético (ketorolac), piranoacético (etodolac), otros (clometacina)
Fenamatos o arilantranílicos (Fenamatos)	Ácido mefenámico, flufenamico, niflúmico, flufenamato de aluminio, talniflumato, floctafenina, glafenina, meclofenamato, ácido tolfenámico, ácido meclofenámico, tolfenámico
Derivados arilpropiónicos	Ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, indoprofeno, procetofeno, fenbufen, piroprofeno, suprofeno, flurbiprofeno, fenilpropionato de lisina, fenoprofeno
Oxicanes	Piroxicam, tenoxicam, sudoxicam, isoxicam, meloxicam
Derivados del ácido nicotínico	Clonixinato de lisina, isonixina
Derivados de la naftilalcanonas	Nabumetona
Derivados de ácido heterocíclico	Oxaprozin
Derivados de la sulfonanilida	Nimesulida
Derivados de las benzoxazocinas	Nefopam
Analgésicos opiáceos	Morfina, meperidina, fentanilo, nalorfina, metadona, naltrexona
Inhibidores selectivos de COX ₂	Celecoxib

En los últimos años las investigaciones han revelado que los efectos indeseables de los AINEs, tales como la toxicidad gastrointestinal y renal, se debían al menos en parte, a la inhibición de la síntesis de PGs en el estómago o en la médula renal. El hecho de la existencia de las dos isoenzimas de la COX en el organismo, podría explicar los efectos antiinflamatorios a través de la inhibición de la COX-2 y los efectos indeseables (como los gastrointestinales y renales), por la inhibición de la COX-1.

1.1.4.3. Compuestos antiinflamatorios de origen natural

Existen muchos trabajos sobre evaluación de la actividad antiinflamatoria que se han realizado tanto en extractos como en metabolitos secundarios aislados de fuentes naturales. Estos estudios se han realizado guiados a través de diferentes modelos farmacológicos tanto *in vivo* como *in vitro* (Setty y Sigal, 2005; Gautam y Jachak, 2009; Jang, et al. 2011; Wang, et al. 2013).

Terpenos y compuestos relacionados, se ha reportado que un extracto de *Tripterygium wilfordii* Hook. f. (Calatraceae) inhibía notablemente la síntesis de mRNA y la expresión de las proteínas MMP-3 y MMP-13, inducida por citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-17 y TNF- α en osteoartritis primaria humana (concentración media inhibitoria, IC₅₀ > 5 η g/mL). Investigaciones sugieren que este extracto puede ser utilizado como fuente para nuevos agentes antiartríticos y protectores de cartílagos de los huesos (Tao y Lipsky, 2000; Silvester, et al. 2001). Iridoides glicosilados como aucubina y catalpol representan un grupo de monoterpenoides ciclopentano[c] pirano encontrados en varias plantas medicinales orientales. Aucubina previene la producción de TNF- α (IC₅₀ = 101 η g/mL) e IL-6 en monocitos estimulados (IC₅₀ = 190 η g/mL), a través de un mecanismo que involucra el bloqueo de la activación NF- κ B. Catalpol, el principal metabolito obtenido de corteza de *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae) fue efectivo en la prevención de la producción de TNF- α , IL1 β e IL-6 en macrófagos estimulados con lipopolisacáridos de bacterias gram-negativas (LPS) (Gómez, et al. 2011).

Introducción

A este grupo de sustancias también pertenecen los ginsenósidos, un conjunto de metabolitos con potencial actividad antiinflamatoria, los cuales han sido motivo de decenas de investigaciones encaminadas a elucidar el posible mecanismo de su actividad biológica. Son saponinas triterpénicas, tetracíclicas aisladas de especies vegetales del género *Panax* (Araliaceae) con el esqueleto básico de dammarano-eufano (17 α H) que se biosintetizan a partir del escualeno. Las estructuras de estos compuestos contienen oxígeno en su cadena lateral, generalmente en el carbono-20 (C-20) o formando éteres cíclicos con los C-24 ó C-25 (Park, et al. 2004; Li, et al. 2014). Otro tipo son los flavonoides, una clase de metabolitos aromáticos ampliamente distribuidos en la naturaleza, poseen una gran variedad de efectos biológicos entre los que sobresale la actividad antiinflamatoria (Domínguez-Villegas, et al. 2013).

1.2. Melanoma

El melanoma es un cáncer que se origina en los melanocitos, éstos son células de la epidermis que se encarga de producir melanina, un pigmento pardo-oscuro de la piel, el pelo y los ojos. La función de la melanina es bloquear los rayos ultravioleta del sol, para evitar que se dañe el ADN de las células de la piel expuestas a la luz. Las pecas y los lunares son zonas de la piel con gran concentración de melanocitos.

Entre otros nombres de este tipo de cáncer se encuentran los de *melanoma maligno* y *melanoma cutáneo*. Debido a que la mayoría de las células del melanoma continúan produciendo melanina, los tumores tipo melanoma usualmente son de color café o negro. Sin embargo, algunos melanomas no producen melanina y pueden lucir color rosado, café o incluso blanco. Los melanomas pueden ocurrir en cualquier parte de la piel, pero son más propensos a comenzar en ciertas áreas. El sitio más común en los hombres es en el torso (pecho y espalda). En las mujeres, las piernas son la parte donde se presentan con más frecuencia. El cuello y el rostro son otros sitios comunes (Owens, 2014).

Tener una piel con pigmentación oscura disminuye el riesgo de melanoma en estos lugares más comunes, aunque cualquier persona puede desarrollar este tipo de cáncer en las

palmas de las manos, las plantas de los pies y debajo de las uñas. Los melanomas en estas áreas representan más de la mitad de todos los melanomas en los estadounidenses de raza negra, pero menos del 10% de melanomas en los de raza blanca. También los melanomas pueden formarse en otras partes del cuerpo como los ojos, la boca, los genitales y el área anal, pero estos son mucho menos comunes que los melanomas de la piel.

El melanoma es mucho menos común que el cáncer de piel de células basales o de células escamosas, pero es mucho más peligroso. Al igual que el cáncer de células basales y de células escamosas, el melanoma es casi siempre curable en sus etapas iniciales. Sin embargo, tiene muchas más probabilidades de propagarse a otras partes del cuerpo, si no se detecta temprano, en comparación con el cáncer de células basales o escamosas.

De acuerdo con la Sociedad Americana del Cáncer, el melanoma representa menos del 2% de todos los casos de cáncer de piel, pero la gran mayoría de las muertes por cáncer de piel. Las tasas de incidencia del melanoma han estado aumentando durante los últimos 30 años. De 2006 a 2010, las tasas de incidencia entre los blancos aumentaron un 2.7% por año y se estima que 76.100 nuevos casos de melanoma se diagnostican en 2014, con un estimado de 9.710 muertes.

1.2.1. Factores de riesgo

Entre los factores de riesgo que podrían causar que una persona sea más propensa a padecer melanoma están:

- Exposición a la luz ultravioleta (UV)

La exposición a los rayos ultravioleta (UV) es un factor de riesgo principal para la mayoría de los melanomas. La luz solar es la fuente principal de la radiación ultravioleta. Las lámparas y camas bronceadoras también son fuentes de radiación ultravioleta. Las personas que se exponen mucho a la luz ultravioleta de estas fuentes tienen un mayor riesgo de cáncer de piel, incluyendo el melanoma. Aunque los rayos UV representan sólo una pequeña porción de los rayos del sol, son los principales causantes de daño solar en la piel.

Introducción

Los rayos UV dañan el ADN de las células de la piel. Los cánceres de piel comienzan cuando este daño afecta el ADN de los genes que controlan el crecimiento de las células de la piel. La incidencia y mortalidad del melanoma maligno son mayores en áreas cercanas al ecuador, donde la intensidad de radiación ultravioleta es mayor (**Bulliard, et al. 1994**).

- Lunares

Un lunar es un tumor pigmentado benigno (no canceroso). Por lo general, los lunares no están presentes al nacer, sino que empiezan a aparecer en la infancia y cuando las personas llegan a ser adultos jóvenes. Los lunares pueden aparecer en la piel expuesta a la luz solar, así como en la piel que por lo general está cubierta, tal como en los glúteos o el cuero cabelludo. La mayoría de los lunares nunca causará ningún problema, aunque una persona que tiene muchos lunares es más propensa a padecer melanoma (**Miller y Mihm, 2006**).

Nevos displásicos: Los nevos displásicos, también llamados *nevos atípicos*, suelen parecerse ligeramente a los lunares normales, pero también tienen algunas características del melanoma. Éstos suelen ser más grandes que otros lunares, y presentan una forma o color anormal. Un pequeño número de lunares displásicos puede convertirse en melanomas. Sin embargo, la mayoría de los lunares displásicos nunca se vuelven cancerosos, y muchos melanomas parecen originarse sin un lunar displásico pre-existente.

Nevos melanocíticos congénitos: Los lunares que están presentes en el momento de nacer se llaman *nevos melanocíticos congénitos*. El riesgo de que un melanoma se desarrolle en nevos melanocíticos congénitos en el transcurso de la vida ha sido estimado en alrededor de 0 a 10%, dependiendo del tamaño del nevo. Las personas con nevos congénitos muy grandes tienen un mayor riesgo, mientras que este riesgo es menor para las que tienen nevos pequeños.

- Piel muy blanca, pecas y cabello claro

El riesgo de padecer melanoma es más de diez veces superior en las personas de raza blanca que en las de raza negra. Las personas de raza blanca con cabello rubio o pelirrojo

que tienen ojos azules o verdes, o de piel muy blanca, que se queman o se llenan de pecas con facilidad, están bajo un mayor riesgo.

- Antecedente familiar y personal de melanoma

El riesgo de padecer un melanoma es mayor si uno o varios de los familiares de primer grado (madre, padre, hermano/a, hijo/a) han tenido melanoma. Aproximadamente 10% de todas las personas con melanoma tienen antecedentes familiares de esta enfermedad. El aumento en el riesgo pudiera deberse a que compartieron un estilo de vida de exposición frecuente al sol en la familia, una familia de piel muy blanca o una combinación de factores. También puede deberse a cambios genéticos (mutaciones) en una familia. Las mutaciones genéticas han sido encontradas en aproximadamente 10% a 40% de las familias con una tasa elevada de melanoma.

Una persona que ha padecido melanoma tiene un mayor riesgo de padecer melanoma nuevamente. Alrededor del 5% de las personas con melanoma padecerán un segundo melanoma en algún momento de sus vidas.

- Inmunosupresión

Las personas que tienen sistemas inmunológicos debilitados o que han sido tratadas con medicamentos que suprimen significativamente el sistema inmunológico, tales como los pacientes de trasplantes de órganos, tienen un riesgo aumentado de melanoma.

- Edad

Aunque el melanoma es más probable que se presente en personas de más edad, también se detecta en personas más jóvenes. De hecho, el melanoma es uno de los cánceres más comunes en las personas que tienen menos de 30 años de edad (especialmente en mujeres jóvenes). El melanoma que tiende a darse entre las personas de una misma familia puede presentarse a una edad más temprana.

Introducción

- *Xeroderma pigmentoso*

El xeroderma pigmentoso (XP) es un padecimiento hereditario poco común que resulta como consecuencia de un defecto en una enzima que normalmente repara daños al ADN. Las personas con XP tienen un alto riesgo de melanoma y otros cánceres de piel a una edad temprana. Debido a que las personas con XP tienen menor capacidad de reparar el daño al ADN causado por la luz solar, pueden desarrollar muchos cánceres en las áreas expuestas de su piel.

Aunque se han encontrado estos factores de riesgo, aun no está exactamente claro cómo causan la enfermedad. Según la etapa del cáncer y otros factores, las opciones de tratamiento pueden incluir: cirugía, inmunoterapia, terapia dirigida, quimioterapia, radioterapia. Algunos fármacos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para tratar el melanoma son: aldesleukina, dabrafenib, dacarbazina, ipilimumab, pembrolizumab, trametinib, nivolumab, vemurafenib, etc.

1.3. Triterpenos Pentacíclicos: Acido Oleanólico y Ursólico

Los triterpenos constituyen el grupo más extenso de terpenoides debido a su gran diversidad estructural y a que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal en estado libre, como glicósidos o como ésteres, aunque también han sido hallados algunos importantes en el reino animal. Los triterpenos incluyen el escualeno, aislado por primera vez del aceite de hígado de tiburón y un gran número de compuestos con distinto número de anillos como el lanosterol, presente en la grasa de la lana (**Phillips, et al. 2006**).

Los terpenos se clasifican, atendiendo al número de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) que posee su esqueleto hidrocarbonado, en monoterpenos (10 carbonos, 2 unidades), sesquiterpenos (15 carbonos, 3 unidades), diterpenos (20 carbonos, 4 unidades), sesterterpenos (25 carbonos, 5 unidades), triterpenos (30 carbonos, 6 unidades) y tetraterpenos (40 carbonos, 8 unidades).

Biogénesis de Triterpenos Pentacíclicos

El químico Croata, Leopold Ružička, a mediados del siglo pasado inició el estudio de la estructura de los terpenos. Todos los triterpenos presentes en la naturaleza tienen su origen en el escualeno, alcohol triterpénico formado por una condensación cola-cola del farnesol. Basándose en una amplia información estructural, Ružička fue capaz de racionalizar la biogénesis de terpenoides y desarrollarla (regla biogenética del isopreno) (Eschenmoser, et al. 1955).

La biosíntesis de los compuestos terpénicos se inicia con el ácido mevalónico (ácido (R)-3,5-dihidroxi-3-metilpentanoico), que se forma por condensación de tres unidades de acetil-CoA (Nakanishi, et al. 1984). Posteriormente, ocurre una activación por fosforilación y descarboxilación del ácido mevalónico (Fig. 3). Se forma de esta manera el pirofosfato de 3-isopentenilo, que puede isomerizar a pirofosfato de γ,γ -dimetilalilo (pirofosfato de 2-isopentenilo), y que presenta una gran reactividad en procesos de sustitución nucleofílica.

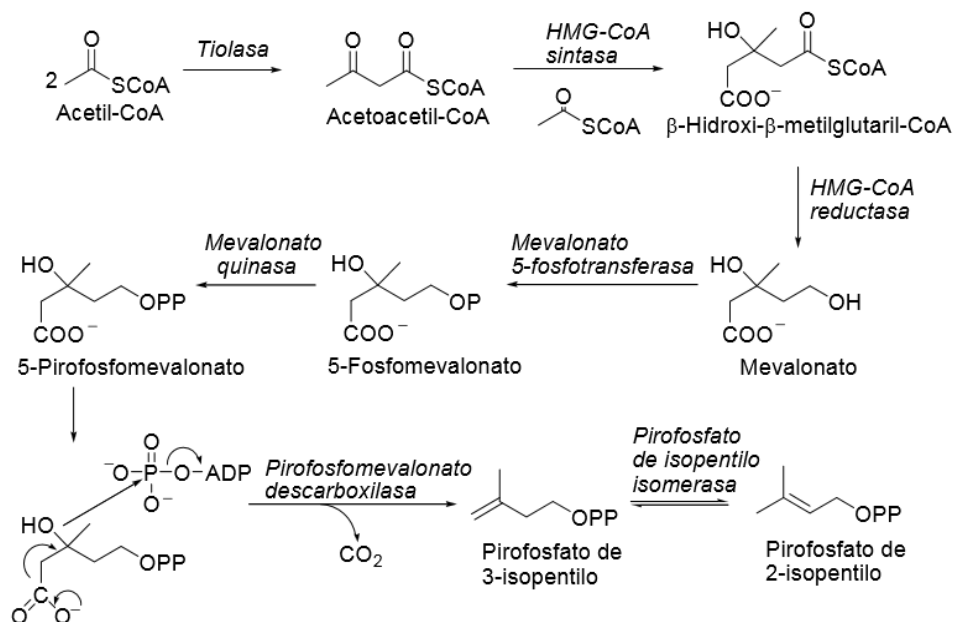


Figura 3. Biosíntesis de los precursores biológicos de los terpenos (pirofosfato de 3-isopentenilo y pirofosfato de 2-isopentenilo)

Introducción

El doble enlace nucleófilo del pirofosfato de 3-isopentenilo, desplaza al grupo pirofosfato de 2-isopentenilo dando lugar al monoterpeno lineal fundamental, denominado pirofosfato de geranilo, tras la pérdida de un protón por parte del intermedio de reacción carbocatiónico. Este monoterpeno lineal, puede transformarse en los más diversos esqueletos de diez carbonos, denominados monoterpenos (geraniol, limoneno, mentol, etc.), según tenga lugar la acción de las enzimas apropiadas.

Si el pirofosfato de geranilo reacciona con una nueva unidad isoprenica en forma de pirofosfato de 3-isopentenilo por la acción de la geranil transferasa, se obtiene el pirofosfato de farnesilo, que es la base de toda la gama de productos con quince átomos de carbono, sesquiterpenos, que presentan diferentes esqueletos carbonados (germacranos, eudesmanos, cariofilanos, etc.). Si el farnesil pirofosfato reacciona de nuevo con pirofosfato de 3-isopentenilo, da lugar a pirofosfato de geranil-geranilo, intermedio que se supone precursor de los compuestos diterpénicos (kauranos, beyeranos, atisanos, etc.). El acoplamiento cabeza-cabeza de dos unidades de pirofosfato de farnesilo conduce a escualeno, con la ayuda de la escualeno sintasa, a partir del que se forman los triterpenos (dammarano, lupano, oleanano, ursano, etc.) (Fig. 4).

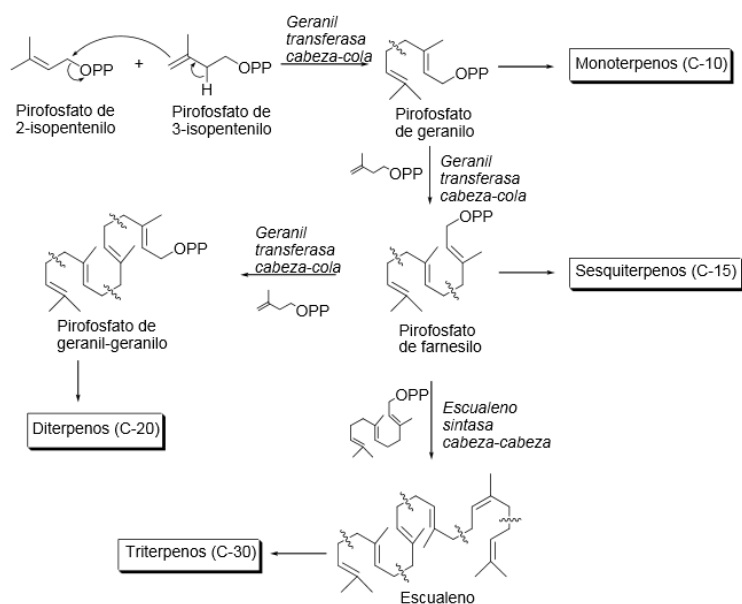


Figura 4. Rutas biogénicas hacia mono, sesqui, di y triterpenos a partir de sus precursores (pirofosfato de 2-isopentenilo y pirofosfato de 3-isopentenilo)

La oxidación de uno de los dobles enlaces terminales del escualeno proporciona óxido de escualeno, que sufre una ciclación controlada por enzimas. En esta compleja reacción la cadena del escualeno debe plegarse de forma precisa como se puede observar en la Fig. 5, (silla-silla-silla-bote) formándose un carbocatión tetracíclico con esqueleto de dammarano, que es la molécula de partida para la formación de otros triterpenos tetracíclicos. Además, mediante diferentes carbocationes generados por ciclaciones y migraciones de metilo o hidruro se obtienen también los triterpenos pentacíclicos con esqueleto de lupano, ursano, oleanano.

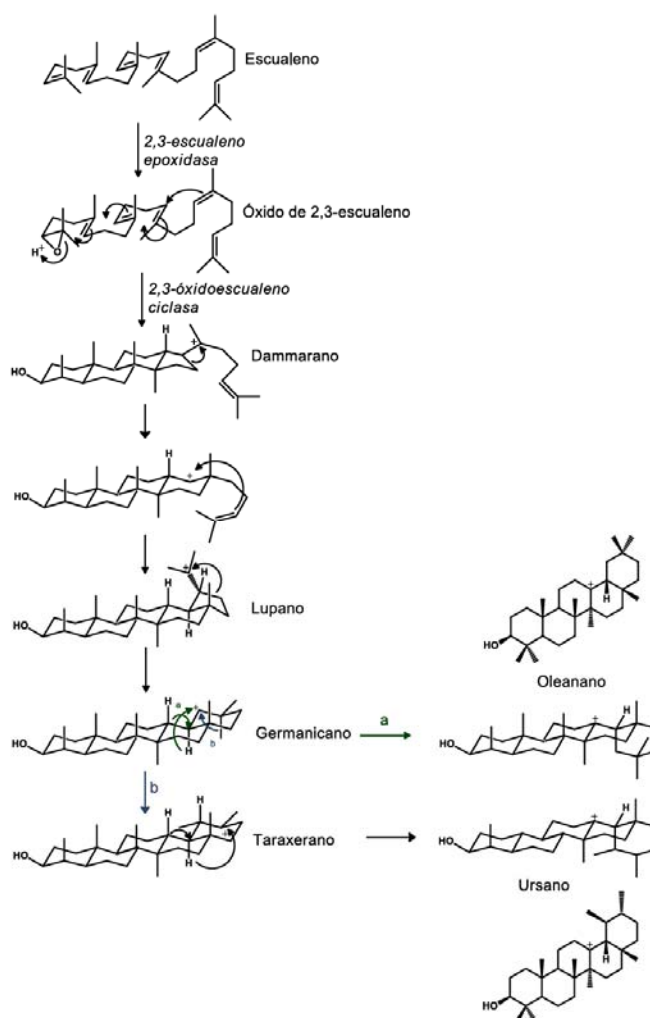


Figura 5. Biogénesis de triterpenos a partir de óxido de escualeno

Introducción

Los triterpenos pentacíclicos empleados para este trabajo cuentan con la estructura base del oleanano y del ursano, los cuales son el ácido oleanólico (OA) (ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico) y su isómero el ácido ursólico (UA) (ácido 3 β -hidroxio-urs-12-en-28-oico), respectivamente, ambos con fórmula molecular C₃₀H₄₈O₃ y peso molecular de 456.70 g/mol (Fig. 6). Estos compuestos con 30 átomos de carbonos, existen ampliamente en las plantas naturales en forma de ácido libre o agliconas de saponinas triterpenoides (Liu, 1995; Liu, 2005), también son parte integral de la dieta humana, encontrándose en aceitunas, uvas, aceite de oliva, en la piel de algunas frutas (manzanas, peras, arándanos y ciruelas) y en la cera protectora de las algas marinas, etc.

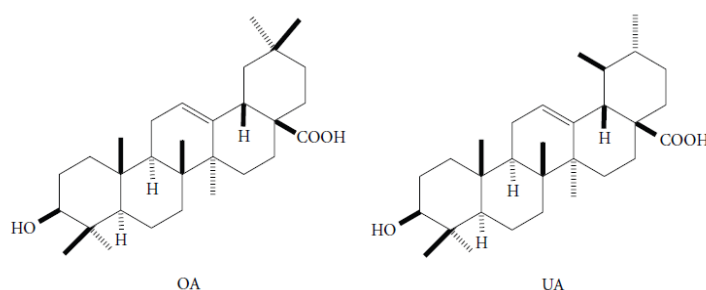


Figura. 6. Estructuras del Ácido Oleanólico (OA) y Ácido Ursólico (UA)

Estos triterpenos son de gran interés como agentes terapéuticos y sus actividades biológicas son bastante similares teniendo en cuenta la cercanía de sus estructuras químicas, entre las que se destacan:

- Actividad Antiinflamatoria

El efecto antiinflamatorio es una propiedad común de muchos triterpenoides (Mahato, et al. 1988). El efecto antiinflamatorio de OA se informó por primera vez en 1960, donde se reportaba los efectos inhibidores sobre edema de la pata de rata inducido por carragenina y la artritis inducida por formaldehído (Gupta, et al. 1969). El UA se ha identificado como un componente activo en la prevención de edema de pata de ratas inducido por carragenina, así también como en la prevención de edema de oreja de ratón inducida por 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA) (Liu, 1995).

Se han reportado varios de los mecanismos por medio de los cuales estos triterpenos ejercen su acción antiinflamatoria, entre los que destacan la inhibición de enzimas involucradas en la producción de eicosanoides como las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) y la fosfolipasa A2 (FLA2); la inhibición de la liberación de citoquinas, histamina y serotonina y la interacción con algunas serina/treonina quinasas (**Liu, 1995; Kwon, et al. 2009**).

- Actividad Anticancerígena

Ambos compuestos han mostrado actuar en varios estados en el desarrollo tumoral, incluyendo inhibición de tumorigénesis, inhibición de la promoción tumoral e inducción de la diferenciación celular. En efecto, inhiben la angiogénesis, la invasión tumoral y la metástasis. Sin embargo, el mecanismo mediante el que actúan no se ha determinado de forma suficientemente clara. OA y UA son relativamente no tóxicos, pudiendo ser utilizados clínicamente como agentes quimiopreventivos/quimioprotectivo (**Ovesna, et al. 2004**). El uso de estos compuestos ha sido recomendado como terapia contra el cáncer de piel. Preparaciones cosméticas que contienen OA y UA han sido patentadas en Japón para la prevención del cáncer de piel por uso tópico. Preparaciones farmacéuticas que contienen OA están patentadas para el tratamiento de leucemia no linfática (**Ishida, et al. 1990; Muto, et al. 1990; Hsu, et al. 1997**).

- Actividad Antihiperlipidémica

Las propiedades hipolipemiantes y antiateroscleróticas del UA fueron descritas por primera vez por científicos en la Unión Soviética en 1979. En ratas y conejos alimentados con UA, se observó la prevención de la aterosclerosis experimental, reducción del colesterol en la sangre (44%) y niveles de lipoproteínas (50%). También se demostró que el OA, prevenía la hiperlipidemia en conejos, cobayas y ratas, disminuyendo los niveles de colesterol en sangre y lipoproteínas en más de un 40%. El OA no afecta los niveles de lipoproteínas de la sangre en conejos normales, pero disminuye los niveles de colesterol elevados en la sangre y previene la precipitación de lípidos en los vasos sanguíneos y órganos principales de conejos hiperlipidémicos experimentales (**Liu, 1995**).

Introducción

- *Actividad Antioxidante*

El efecto antioxidante *in vivo* se ha demostrado sobre la molécula de UA, encontrando que presenta un efecto protector sobre la peroxidación de lípidos, estrés oxidativo y evita el daño al ADN inducido por radiación ultravioleta (**Ramachandran y Prasad 2008**). También se ha demostrado que el UA posee efecto antioxidante no enzimático, al secuestrar al anión superóxido, al quelar iones metálicos (como consecuencia de esto evita la reacción de Fenton), y al inhibir a la xantina oxidasa (XO) (**Yin y Chan 2007**). Se ha demostrado el efecto antioxidante y antiinflamatorio del UA y OA sobre células PC12 al inducir estos efectos con peróxido de hidrógeno y con el ión 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+). Estos compuestos provocan la muerte celular por liberación de citosinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α y por disminución de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPX). El tratamiento de las células PC12 con UA y OA disminuye la liberación de IL-6 y TNF- α por lo que podrían ser agentes protectores en desórdenes de tipo neurodegenerativos (**Tsai y Yin, 2008**).

- *Actividad Hepatoprotectora*

El efecto hepatoprotector del UA y OA se ha determinado en modelos *in vivo e in vitro*, de forma individual y conjunta. Ambos son efectivos frente a lesiones hepáticas inducidas en animales en laboratorio. Se han utilizado desde la antigüedad en Asia como fármacos orales contra los desórdenes hepáticos. La mezcla de UA/OA disminuye el daño hepático producido por tetracloruro de carbono, disminuyendo los niveles séricos de transaminasa glutámico oxalacética (sGOT) y los niveles de transaminasa glutámico pirúvica (sGTP), regenerando la viabilidad de los hepatocitos. También se documentó que estos triterpenos protegen contra el daño hepático provocado por D-galactosamina y acetaminofén, entre otros (**Liu, 1995; Martín-Aragón, et al. 2001**). Los mecanismos de hepatoprotección de estos dos compuestos involucran la inhibición de la actividad tóxica de xenobióticos, la activación del sistema inmune del organismo y la disminución de la actividad del citocromo P450, familia de enzimas requerida por una gran cantidad de compuestos hepatotóxicos para su activación (**Liu, 1995**).

- Actividad Antimicrobiana

En cuanto al efecto antibacteriano se ha encontrado que el UA tiene actividad contra *Staphylococcus aureus* (CMI= 8 µg/mL) y *Enterococcus faecalis* (CMI= 4 µg/mL), pero es inactivo contra cepas resistentes a antibióticos como *S. aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus sp* resistente a vancomicina (Fontay, et al. 2008). En otro estudio se encontraron CMI's de 62.5, 47, 259 y 4 µg/mL contra *S. Aureus*, *E. faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* respectivamente (Shai, et al. 2008). Otra actividad relevante que se le ha demostrado al UA, es su efecto contra diversas cepas de *M. tuberculosis*. Contra la cepa H37Ra presentó una CMI de 12.5 µg/mL, al evaluarlo por el micrométodo colorimétrico de azul de alamar (MABA) (Tanachatchairatana, et al. 2008). Recientemente, se ha descrito que la mezcla de UA/OA presenta una CMI = 62.5 µg/mL *in vitro* al ser evaluada por MABA (Higuchi, et al. 2008). Por otra parte, se ha descrito que el UA presenta actividad antifúngica contra *Sporothrix schenki*, *Microsporium canis*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* con valores de CMI's de 32, 12, 24, 63 y 63 µg/mL, respectivamente (Shai, et al. 2008); actividad antiparasitaria contra promastigotes y amastigotes de *Leishmania amazonensis* con CI₅₀ de 5 y 11 µg/mL, respectivamente, siendo el UA más activo que los fármacos de referencia, contra amastigotes (Torres-Santos, et al. 2004).

Se han descrito, así mismo, efectos antiulcerosos, anticaries, cardiovasculares, antihipertensivos, etc. (Liu, 1995, Liu, 2005; Senthil, et al. 2007). Además, estos compuestos se utilizan también en la preparación de complementos alimenticios y son ingredientes importantes en formulaciones cosméticas. Por lo tanto, de acuerdo a su amplia gama de aplicaciones, estos triterpenos son de alto valor comercial, por lo que han sido aislados en más de 120 especies de plantas diferentes por sus beneficios (Liu, 1995, Liu, 2005; Zacchigna, et al. 2009).

Los compuestos utilizados para esta tesis, fueron aislados y purificados de las hojas de la planta *Plumeria obtusa* L. var. *sericifolia* (C. Wright ex Griseb.) Woodson (Apocynaceae) (Fig. 7), originaria de las Antillas Mayores, Florida, la parte norte de Centro América y el sur de México, pero cultivada ampliamente por sus flores ornamentales y

Introducción

aromáticas en todo el mundo, donde existe el clima cálido adecuado. Esta puede crecer, ya sea como un pequeño arbusto o árbol con altura de 0.9 a 6.1 metros, sus hojas se encuentran en racimos cerca de las puntas de las ramas, de un tamaño grande (6-22 cm de largo y 2-7 cm de ancho) con una forma oblonga característica y la punta de la hoja es obtuso (redondeado). Las hojas son de color oscuro con la superficie brillante y nervios secundarios paralelos visibles que van desde la vena media a los bordes de las hojas. Las flores de esta especie son portadas en inflorescencias (racimos) que se forman en los extremos de las ramas en un tallo largo y grueso. Cada inflorescencia contiene muchas flores blancas con un pequeño centro amarillo. Las flores contienen cinco pétalos que se fusionan en la base en un tubo en forma de embudo corto que se ensancha gradualmente a medida que los lóbulos de los pétalos se extienden. Los ejemplares utilizados fueron recolectados en Calakmul, Campeche, México. La primera colecta de la planta se realizó en 1997. A partir de esa colección un ejemplar de herbario se preparó, y fueron depositados en el Herbario Nacional, Instituto de Biología, MEXU, UNAM, con número de registro Martínez 27824-A.



Fig. 7. Árbol, hojas y flores de la especie vegetal *Plumeria obtusa*

1.4, Administración dérmica de Nanoemulsiones

1.4.1. Anatomofisiología de la piel

La piel constituye el órgano corporal más extenso que separa al organismo del medio externo. La piel de una persona adulta cubre aproximadamente una superficie de 2 m² y recibe un tercio de la sangre que circula por el cuerpo. Es elástica, y presentan distintas características según la región. Con un espesor de unos pocos milímetros (2.97 ± 0.28 mm), separa el entramado circulatorio y los órganos del medio externo (**Montagna, 1974; Ritschel y Hussain, 1988**).

La principal función de la piel es la protección del organismo de factores externos como bacterias, sustancias químicas y temperatura. La piel contiene secreciones que pueden destruir bacterias y la melanina, que es un pigmento químico que sirve como defensa contra los rayos ultravioleta que pueden dañar las células. Otra función importante de la piel es la regulación de la temperatura corporal. Cuando se expone la piel a una temperatura fría, los vasos sanguíneos de la dermis se contraen, lo cual hace que la sangre, que es caliente, no entre a la piel, por lo que ésta adquiere la temperatura del medio frío al que está expuesta. El calor se conserva debido a que los vasos sanguíneos no continúan enviando calor hacia el cuerpo.

La piel está formada por tres capas (Fig. 8) que desde el exterior al interior son la epidermis, dermis e hipodermis (tejido subcutáneo). Contiene además glándulas sebáceas, sudoríparas y folículos pilosos, que junto a las uñas conforman el sistema tegumentario. La superficie de la piel está normalmente cubierta por una emulsión epicutánea o manto hidrolipídico que se forma a partir de los ácidos grasos de las secreciones sebáceas de los queratinocitos y el agua que proviene de las glándulas sudoríparas. Este coadyuva al mantenimiento de su función protectora y de la flora cutánea.

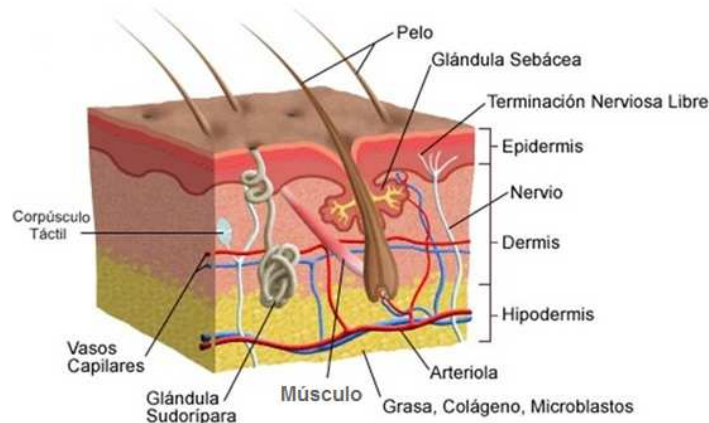


Figura 8. Estructura de la piel

1.4.1.1. Epidermis

Es un epitelio plano estratificado, queratinizado y no vascularizado de un espesor que varía entre 0.02 y 0.2 mm según la zona anatómica. Posee un alto contenido lipídico (colesterol, ceramidas y ácidos grasos) y muy bajo contenido en agua (20-30%). Los queratinocitos al ascender hacia la superficie se vuelven más anchos y aplanados, van perdiendo gradualmente el núcleo y orgánulos y se van enriqueciendo en queratina (**Wertz, 1996**). En la epidermis pueden diferenciarse cinco estratos (Fig. 9):

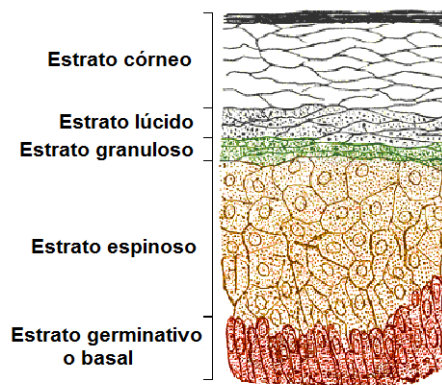


Figura 9. Estratos de la epidermis

El *estrato córneo*, es la parte más externa de la epidermis y la principal barrera del medio externo, siendo el principal responsable de la impermeabilidad de la piel y la resistencia a la difusión de fármacos o cualquier otra sustancia (**Elias, et al. 1981**). Está

formado por células aplanadas altamente queratinizadas, llamadas corneocitos, unidos entre sí por una sustancia cementante de naturaleza lipídica y estratificada en múltiples capas (**Elias, 1983**). Estos lípidos intercelulares están compuestos por aproximadamente un 70% de lípidos neutros (esteroles libres, 14%; ácidos grasos libres, 19.3%; triglicéridos, 25.2%; ésteres de colesterol y ésteres grasos, 5.4%; escualeno, 4.8%; alcanos, 6.1%), en un 18% por esfingolípidos (ceramidas y glucosilceramidas), un 5% de lípidos polares (fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, esfingomielina y lisolecitina) (**Lampe, et al. 1983**).

El *estrato lúcido* está ubicado entre la capa granulosa y el estrato córneo. En esta capa las células empiezan a perder los orgánulos celulares por la acción de proteasas y nucleasas.

El *estrato granuloso* está compuesto por células que contienen gránulos de queratohialina (cuya degradación final produce sustancias higroscópicas responsables de la hidratación natural de la piel. Los gránulos también contienen glicolípidos y esteroles. Estos son excretados a medio extracelular, siendo uno de los responsables de la impermeabilidad de la epidermis.

El *estrato espinoso*, debe su nombre a la morfología que le confiere la existencia de numerosas estructuras proteicas intra y extracelulares denominadas desmosomas, constituidas por diversas moléculas de adhesión que unen células adyacentes (**Elias, et al. 1981**).

El *estrato basal o germinativo*, es una única capa de células casi cubicas enlazadas entre sí por desmosomas y a la lámina basal, sobre la que se apoya, por hemidesmosomas. Este estrato es el encargado de la regeneración constante del resto de capas celulares epidérmicas por su continua replicación celular. Además de los queratinocitos también se encuentra melanocitos, células de Langergans (relacionados con el sistema inmune) y células de Merkel (del sistema neuroendocrino).

Introducción

1.4.1.2. Dermis

La dermis o corion, es un tejido resistente, flexible y muy elástico, con un espesor de 1 a 3 mm. Está compuesta por una matriz densa de tejido conectivo o conjuntivo y posee fibras colágenas (~70- 75%), elásticas (~ 4%), reticulares (~ 0,4%) y células (fibroblastos, mastocitos, leucocitos y melanocitos). Esta matriz está embebida en una sustancia mucopolisacárida amorfa e incluye, aproximadamente, el 20% de la masa dérmica, que le proporciona elasticidad al contener distintas fibras. Los fibroblastos, son los encargados de producir los componentes del tejido conectivo de colágeno, laminina, fibronectina y vitronectina. Los mastocitos están implicados en procesos de respuesta inmune e inflamatoria y los melanocitos, cuya función es fabricar melanina (**Walters, 2002**). La capa superficial, o capa papilar, se interdigita con la epidermis de la que queda claramente delimitada. La capa más profunda o capa reticular, se pierde en el tejido subcutáneo.

La dermis, es un componente sustancial de nuestro cuerpo, ya que no sólo es el sostén de la epidermis, la que le proporciona nutrientes y sistemas de soporte e inmunológico, todo ello a través de la fina capa capilar adyacente a la epidermis, sino que además juega un papel importante en la regulación de la temperatura, presión y dolor de nuestro organismo (**Walters, 2002**).

Esta capa proporciona a la piel una gran fuerza mecánica gracias al alto contenido de fibras colágenas, aportando, mediante sus distintos componentes celulares, una reserva de elementos regenerativos y defensivos, capaces de combatir la infección y reparar las heridas profundas. La dermis soporta los apéndices cutáneos: glándulas sudoríparas (apocrinas y ecrinas) y pilosebáceas. Las glándulas sudoríparas secretan sudor y las sebáceas situadas generalmente en la base del pelo, secretan el sebo cutáneo. La dermis también contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. Los vasos sanguíneos juegan un papel muy importante en la regulación de la temperatura corporal, aporte de nutrientes y oxígeno a la piel, eliminación de productos de desecho y toxinas y reparación de la piel dañada. Los capilares se encuentran a unos 0,2 mm de la superficie corporal y, esencialmente, proporcionan condiciones “sink” para la mayoría de las moléculas que atraviesan la barrera cutánea, porque una vez que la sustancia accede a la dermis, la

sustancia llega a la extensa red capilar que existe en la dermis, que, además están anastomosados, pasa a arteriolas, arterias, alcanzando la circulación general. De este modo, la sangre ayuda a garantizar, que la concentración dérmica de un penetrante, esté generalmente próxima a cero y que la diferencia de concentración a través de la epidermis proporcione la fuerza de conducción necesaria para la permeación transdérmica (**Williams y Barry, 1992**).

1.4.1.3 Hipodermis

Por debajo de la dermis se encuentra la hipodermis o tejido subcutáneo. En muchas regiones del organismo este tejido celular es de tipo conectivo laxo y contiene numerosas células adiposas. Además de sus propiedades mecánicas, como amortiguador de los traumatismos, y de su capacidad para almacenar energía, esta capa es un importante aislante térmico. La mayor parte de las terminaciones nerviosas cutáneas, vasos sanguíneos y órganos de presión sensorial se encuentran en la hipodermis (**Williams y Barry, 1992**).

1.4.1.4. Glándulas

Las **glándulas sebáceas** son pequeñas y saculares y se encuentran en la dermis, son abundantes en el cuero cabelludo y en la cara. Están formadas por un conducto único, que emerge de un racimo de alvéolos ovoides o piriformes. Cada alvéolo está compuesto por una membrana basal que encierra varias células epiteliales y tiene una cavidad llena de materia grasa que constituye el sebo cutáneo. Dado que las células sebáceas producen su secreción a consecuencia de la completa degeneración de sus células centrales a estas glándulas se las llama holocrinas (**Williams y Warwick, 1992**).

Las **glándulas sudoríparas** se encuentran en casi todas las regiones de la piel y se dividen en dos:

- *Glándulas ecrinas*, son las más numerosas, cada una de ellas está formada por un tubo único cuya parte más profunda se enrolla para constituir un cuerpo esférico u oval, que se sitúa en las capas más profundas del corión o en el tejido subcutáneo y se denomina cuerpo de la glándula. El tamaño de las glándulas es variable, siendo grandes en las regiones donde

Introducción

la transpiración es intensa (axilas). Su número también varía, son muy numerosas en la zona de las palmas de las manos y plantas de los pies.

- *Glándulas apocrinas*, son mayores que las ecrinas y producen una secreción más espesa. Las glándulas apocrinas son de forma tubular y presentan una amplia porción secretora enrollada desembocan mediante un conducto recto, y muy estrecho que corre paralelo a los folículos pilosos cercanos (**Williams y Warwick, 1992**).

1.4.2. Absorción percutánea

La absorción percutánea de medicamentos puede ser definida como la absorción de fármacos a través de la piel intacta para enriquecer el sistema circulatorio.

1.4.2.1. Etapas de la absorción percutánea

La piel constituye una barrera muy selectiva al paso de sustancias. La epidermis, y dentro de la epidermis, el estrato córneo es el principal responsable de este control (**Barry, 1983**). Además, el flujo de moléculas a través de la piel depende de la naturaleza de la sustancia, del coeficiente de reparto vehículo-piel y del coeficiente de difusión de la sustancia difusora a través de la piel (**Yasunori, et al. 1994**). La absorción de los fármacos se produce en tres etapas:

- *Liberación del principio activo y difusión*

El principio activo contenido en una determinada formulación, difunde en el sistema de administración hasta la superficie cutánea. Esta etapa viene condicionada por las características del principio activo y del sistema de dosificación.

- *Penetración en la capa córnea*

El principal obstáculo que se encuentra el fármaco para penetrar a través de la piel son las propiedades de barrera del estrato córneo. Esto está originado, en parte, por la geometría de la estructura interna de los corneocitos y en parte por la resistencia a la difusión de la estructura lipídica extracelular.

1.4.2.2 Vías de penetración a través de la piel

Cuando se administra una sustancia a través de la piel, puede alcanzar los capilares sanguíneos de la dermis a través de dos rutas fundamentales de acceso: la transepidérmica y la transapédicular (Fig. 10).

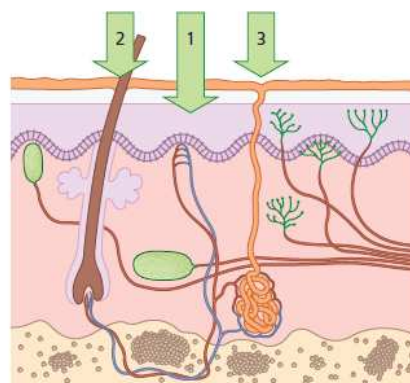


Figura 10. Vías de penetración a través de la piel: Penetración (1) Transepidérmica, (2) Transudorípara y (3) Transfolicular

Los fármacos pueden atravesar el estrato córneo siguiendo tres vías:

- *Transepidérmica*

Las moléculas polares y no polares difunden a través del estrato córneo por diferentes mecanismos. Dos microvías fundamentales existen para la absorción percutánea a través del estrato córneo: la ruta intercelular y la intracelular.

En la ruta **intracelular**, el estrato córneo se hidrata, acumulando agua cerca de la superficie de los filamentos de las proteínas, y es a través de esta agua inmovilizada por donde las moléculas polares pueden pasar a través de la piel. Las moléculas no polares, por el contrario, probablemente, se disuelven y difunden a través de la matriz lipídica intracelular, no acuosa, que existe entre los filamentos de las proteínas fundamentalmente, a través de los triglicéridos. (Barry, 2001). La energía de activación de las moléculas no polares es algo más baja que la difusión de las moléculas polares.

Introducción

Por la vía **intercelular**, el fármaco atraviesa el estrato córneo siguiendo un camino a través de los lípidos de la matriz intercelular. Esta vía se considera menos importante ya que el fármaco tiene que salvar la impermeabilidad de los corneocitos, unidos a la distribución repetida del propio principio activo entre las regiones hidrófilas y lipófilas de las bicapas lipídicas del estrato corneo (**Aulton, 2004**).

- *Transapédicular*

Si el fármaco utiliza esta vía de acceso lo hará a través de las glándulas sudoríparas y sistema pilo-sebáceo. Ambas alternativas, tienen una contribución escasa a la cinética global de la penetración transdérmica.

La penetración **transfolicular** de las sustancias químicas está ligada a la presencia de un mayor o menor número de folículos pilosos en la piel. Cada folículo piloso lleva asociado una glándula sebácea, que segrega sebo, barrera de protección del estrato basal germinativo. Un centímetro cuadrado de piel humana puede contener 10 folículos pilosos y 15 glándulas sebáceas (**Williams y Barry, 1992**)

El sistema pilo-sebáceo, está constituido por el pelo y la glándula sebácea. La existencia de esta vía de penetración fue demostrada por Mackee, et al. (1943) quienes piensan que es la óptima para la absorción percutánea, ya que las moléculas sólo tienen que atravesar la capa basal del folículo pilo-sebáceo. En el aparato pilo-sebáceo, la epidermis se vuelve más delgada, hasta reducirse, al nivel de la base del pelo, a una única capa de células no queratinizadas. Si un fármaco es capaz de difundir en el sebo del folículo pilo-sebáceo, podrá acceder a la dermis y llegar a la microcirculación sistémica con facilidad. Por vía transfolicular, las partículas se absorben a través de la vaina epitelial (unicelular no queratinizada), que corresponde al estrato basal germinativo, fácil de atravesar. Se puede, llegar así fácilmente a la dermis y a los vasos sanguíneos sin pasar por la barrera de Rein.

Ciertos medicamentos, bastante lipófilos, al disolverse en el sebo, son capaces de superar esa barrera, viendo favorecida su absorción percutánea a través de la glándula. Por esta vía se absorben sustancias que tienen un alto coeficiente de reparto (lípidos/agua),

solubles en el sebo. En ciertas circunstancias también es posible que difundan moléculas que se pueden acumular en los folículos pilosos.

La vía **transudorípara** es menos importante ya que proporciona una pequeña ruta de absorción (1 cm² de piel humana puede contener 100 glándulas sudoríparas) (**Williams y Barry, 1992**). Se cree que la difusión por esta vía sigue el modelo de “difusión por poros”.

1.5. Administración ocular de Nanopartículas

1.5.1. Anatomofisiología ocular

El ojo humano es el órgano anatómico que recoge en su interior la estructura sensible que hace posible el inicio del complejo proceso de la visión. Por su forma se le denomina globo ocular (Fig. 11). Es un órgano par situado a ambos lados del plano sagital, protegido por grasa y tejidos blandos y por las paredes óseas que componen las cavidades orbitarias, donde además del globo ocular se alojan el nervio óptico, los músculos oculares, la glándula lagrimal, vasos y nervios. Los párpados, las pestañas y las lágrimas son protectores del ojo.

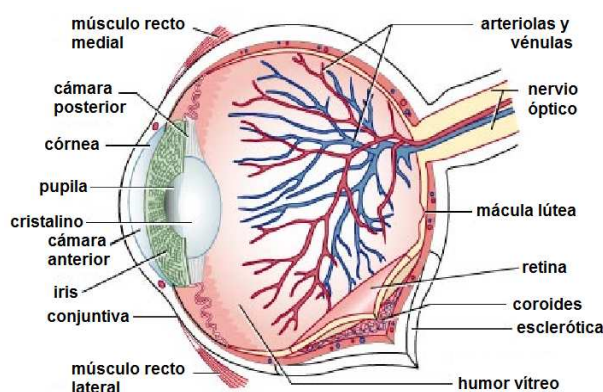


Figura 11. Estructura del ojo humano

El globo ocular, es una esfera de unos 24 mm de diámetro anteroposterior, constituida de fuera a dentro por tres capas concéntricas:

1. La exterior es la *túnica fibrosa* o *córneo-escleral* que se compone de dos segmentos esféricos, el anterior la córnea, es la porción más pequeña y prominente, el posterior es la

Introducción

esclerótica. Revistiendo los párpados por su cara posterior (interior) y parte de la esclera anterior (por su exterior) está la conjuntiva, membrana en la que se vierte la secreción lagrimal que participará en la nutrición y protección de las capas superficiales de la córnea.

2. La capa intermedia (úvea) es la *túnica vascular*, la componen por delante, el iris, por detrás, la coroides, y la unión de ambos, un engrosamiento que se conoce con el nombre de cuerpo ciliar.

3. La capa interna, *túnica nerviosa* es la retina, que se continúa por delante con la capa profunda del cuerpo ciliar y del iris.

La **córnea** es la porción anterior clara y transparente de la capa externa del globo ocular. Es la superficie refractante mayor del ojo y la más sensible del cuerpo, dada la abundancia de fibras nerviosas que contiene. Su función fisiológica principal es mantener la superficie del ojo lisa y transparente, mientras protege el contenido intraocular. Se continúa con la esclerótica. Tanto por delante como por detrás se encuentra la córnea bañada por líquidos, que le proporcionarán los elementos nutrientes para el metabolismo corneal dado que no tiene vasos sanguíneos. La lágrima humedece el epitelio corneal o cara anterior y el humor acuoso hacen posible la nutrición desde la cara posterior o endotelial (**Bueno y Toro, 1994**).

La **esclerótica o esclera**, constituye el esqueleto del globo ocular. Está compuesta de haces de tejido conjuntivo y fibras elásticas que le dan una consistencia fuerte, permitiéndole mantener la forma del ojo a pesar de alcanzar un espesor máximo de 1 mm. En su parte delantera presenta las inserciones de los músculos extrínsecos del ojo, y en el polo posterior, la salida del nervio óptico, la vena central de la retina y accede al interior del ojo la arteria central de la retina.

La **coroides** constituye la mayor parte de la región uveal. Se sitúa entre la esclerótica y la retina. Se compone principalmente de vasos sanguíneos que le confieren su color pardusco. Tiene como función primaria nutrir la retina, el cuerpo vítreo y el cristalino.

La **retina** es la capa más interna del ojo, situada entre la coroides y el cuerpo vítreo. Es una estructura compleja, con numerosos tipos de células y una disposición anatómica en diez estratos o capas. En las más externas están los elementos celulares encargados de la transformación de la energía luminosa en energía bioeléctrica (fotorreceptores), mientras que las más internas están encargadas de la transmisión de dicha energía, conduciendo el estímulo visual hacia el cerebro y representando el primer escalón de la vía óptica.

La retina presenta una extensión avascular central, la **mácula lútea**, en cuyo centro se encuentra una pequeña depresión, la fovea central. Provista de una gran concentración de conos, y casi sin bastones constituye la zona de máxima agudeza visual. A unos 3 mm hacia el lado interno del polo posterior del ojo, se encuentra la cabeza del nervio óptico (papila), zona constituida por fibras nerviosas sin poder visual, motivo por el cual se llama también punto ciego.

El **iris** es una membrana situada detrás de la córnea e inmediatamente delante del cristalino. Es llamativo al observador por ser la parte que da el color que caracteriza a nuestros ojos. Es de color variable, de forma circular y está perforada en su centro por una abertura también circular (pupila), cuyo tamaño varía por la acción del músculo esfínter y dilatador de la pupila que, de manera refleja, controlan la cantidad de luz que entra en el ojo.

La coroides se continua hacia delante con el **cuerpo ciliar** que contiene el músculo ciliar, responsable del proceso de la acomodación o enfoque del cristalino. Presenta unas protuberancias denominadas, procesos ciliares, en extremo vasculares, especializadas en la producción del humor acuoso necesario en el mantenimiento de la anatomía y fisiología del segmento anterior del ojo. (córnea, iris y cristalino). El **humor acuoso** es un líquido cuya composición se asemeja a la del plasma con supresión de casi todas las proteínas. Contribuye al mantenimiento de la presión intraocular, y facilita el metabolismo del cristalino, y de la córnea que carecen de vasos. Secretado por el cuerpo ciliar fluye en la cámara posterior entre el iris y el cristalino, desde aquí pasa a la cámara anterior a través de la pupila.

Introducción

El **crystalino** es una lente, un órgano encapsulado, de forma lenticular, transparente, biconvexo, formado por una serie de laminillas concéntricas. Suspendido de los procesos ciliares por filamentos es una esfera hueca de células epiteliales. La función del cristalino, junto con la córnea consiste en enfocar los rayos de manera que formen la imagen sobre la mácula.

El **cuerpo vítreo** es una masa transparente, incolora, de consistencia blanda, que ocupa la cavidad posterior del globo ocular. Situado entre el cristalino, el cuerpo ciliar y la retina, constituye el volumen más amplio del ojo. Carente de vasos, se nutre de los tejidos próximos: coroides, cuerpo ciliar y retina (**Bueno y Toro, 1994**).

1.5.2. Córnea

La córnea es un tejido avascular y transparente estratificada en 3 capas celulares y dos interfaces: epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio (Figura 12). Su estructura es relativamente simple comparada a otras partes del cuerpo (**Oyster, 1999**). Los tipos de células que la constituyen son células epiteliales, fibroblastos corneales conocidos como queratocitos y células endoteliales. Estos componentes interactúan entre ellos para mantener la integridad y funcionalidad del tejido. La córnea es alimentada por la película lagrimal que cubre su superficie anterior y por el humor acuoso que baña su superficie posterior.

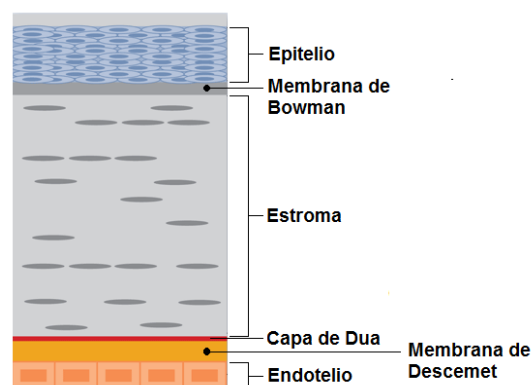


Figura 12. Capas e interfaces de la córnea

La córnea de un humano adulto mide 11-12 mm en su diámetro horizontal y 9-11 mm en el vertical. Su espesor es de 0.5 mm en el centro y se incrementa gradualmente hacia la periferia donde alcanza hasta 0.7mm. La forma de la superficie anterior es convexa siendo su curvatura mayor en la periferia que en el centro (geometría esférica). El radio de curvatura ronda aproximadamente 7.5-8.00 mm en el área central de la córnea (3 mm) donde la superficie es casi esférica. Las propiedades de la córnea vienen determinadas por su transparencia, la homogeneidad de su superficie y su contorno, e índice refractivo. La característica más importante de la córnea es su transparencia (**Oyster, 1999**).

El **epitelio corneal**, consiste en 5-7 capas de células epiteliales escamosas estratificadas y no queratinizadas dispuestas unas encima de otras, con un espesor central de aproximadamente 50 micras y constante por toda la superficie corneal. Esta capa representa un 10% del espesor total de la córnea. La córnea presenta 3 tipos de células epiteliales: superficiales, intermedias y basales. El epitelio junto con la película lagrimal contribuye al mantenimiento de la homogeneidad óptica de la superficie corneal. Otro importante papel del epitelio es proporcionar una barrera a agentes biológicos externos y productos químicos. Dado que el epitelio es la barrera externa de la córnea es susceptible de lesión por trauma o infección microbiana. El epitelio corneal y conjuntival conforman conjuntamente la superficie ocular anterior. Aunque sus características difieren entre sí, ambos proporcionan un sistema de biodefensa de la superficie anterior del ojo (**Sack, et al. 2001**).

La **capa de Bowman** es la parte más anterior del estroma corneal y está situada detrás de la lámina basal del epitelio. Mide unas 12 micras de espesor; se reconoce en secciones histológicas por su carencia de fibroblastos y aparente estructura oscura, además es reconocible por microscopía electrónica y confocal. Esta estructura acelular no es una membrana sino el lugar de unión de las fibras de colágeno y proteoglicanos y en ella las fibras de colágeno no siempre corren paralelas a la superficie corneal perdiéndose la estructura laminar regular. Esta capa no se regenera después de una lesión sin embargo incluso en su ausencia se forma un epitelio normal.

Introducción

El **estroma corneal** constituye el 90% del espesor de la córnea y es un sándwich entre dos capas, el epitelio y el endotelio. El estroma corneal consiste de una matriz extracelular formado por fibroblastos (queratocitos) y fibras nerviosas. Los componentes celulares ocupan solo un 2-3% del volumen total del estroma. El colágeno constituye más del 70% del espesor de la córnea. El colágeno es una proteína fibrosa que se encuentra en todo el cuerpo siendo el componente principal de todos los tejidos conectivos, tendones, ligamentos, piel y de la capa externa del ojo, entre otros. Las uniones entre las moléculas de colágeno es una variable que afecta a la fuerza de todo el tejido. Las fibras forman unas 300 láminas de colágeno dispuestas unas encima de otra y representan el 90% del espesor y volumen de la córnea (Nishida, 2005).

La **membrana de Descemet**, también conocida como lamina elástica posterior, es una estructura acelular situada entre el endotelio y el estroma de la córnea. Posee un grosor de entre 10 y 15 μm y está compuesta principalmente por fibras de colágeno, lo que le confiere una gran elasticidad y resistencia.

El **endotelio corneal** es una monocapa celular de morfología hexagonal, regular, situada en la superficie corneal posterior y que se encuentra en contacto directo con el humor acuoso de la cámara anterior. En sección transversal, las células presentan un aspecto cuboidal siendo el hexágono la forma dominante, probablemente porque permite cubrir completamente el plano endotelial, manteniendo el perímetro celular total y el espacio intercelular de forma mínima. La célula endotelial humana mide 5 μm y 18 μm de espesor y amplitud, respectivamente y presenta un núcleo redondeado de unas 7 μm de diámetro (Hogan, et al. 1971). La función más importante del endotelio es regular el contenido de agua en el estroma corneal.

También hay otra estructura llamada **Capa de Dua**, es una capa de la córnea humana, que se propuso su existencia en el 2013 (Dua, et al. 2013). Mide sólo 15 micrómetros de espesor y está situado entre el estroma de la córnea y la membrana de Descemet y es la sexta capa descubierta de la córnea. A pesar de su delgadez, la capa es muy resistente e impermeable al aire. Esta capa separa la última fila de queratocitos en la córnea y puede

estar relacionada con enfermedades como la hidropesía aguda, Descematocele y distrofias pre-Descemet.

1.5.3. Permeación Ocular

La penetración de fármacos al interior del ojo tras su administración por vía tópica ocular es uno de los retos más interesantes a los que se enfrentan la investigación farmacéutica. El objetivo es conseguir atravesar las barreras protectoras del ojo sin dañar las estructuras oculares. A diferencia de otros, los epitelios de la superficie ocular no son zonas preparadas para la absorción, por lo que el tiempo de residencia de una formulación convencional se reduce a menos de dos minutos. A esto hay que añadir las pérdidas generadas por la absorción sistémica del fármaco a través de la conjuntiva y el conducto nasolacrimal. Se estima que el porcentaje de sustancia activa capaz de alcanzar el segmento anterior del ojo está comprendido entre el 1-5% de la dosis total administrada. Por esta razón, aunque el fármaco sea capaz de llegar a humor acuoso su difusión al segmento posterior resulta insignificante, en la mayoría de los casos (**Andrés-Guerrero y Herrero-Vanrell, 2008**).

Existen distintas rutas para llegar a los tejidos oculares, que pueden seleccionarse según el tejido diana. De forma genérica, para el segmento anterior se utiliza preferentemente la vía tópica ocular, mientras que para el segmento posterior se usa normalmente la vía intravitrea (Fig. 13) (**Lorenzo, et al. 2008**). La penetración de los fármacos cuando se administran por vía tópica ocular se puede llevar a cabo a través de la córnea (vía transcorneal) o a través de la conjuntiva y esclera (vía conjuntival/escleral). Se sabe que la mayoría de las sustancias activas que se emplean por vía tópica se absorben empleando la ruta transcorneal. Este hecho explica que, durante mucho tiempo, se pensara en la conjuntiva únicamente como una vía de eliminación. Hoy en día se sabe que hay sustancias capaces de atravesar la conjuntiva llegando a alcanzar, en ciertas ocasiones, el segmento posterior.

Introducción

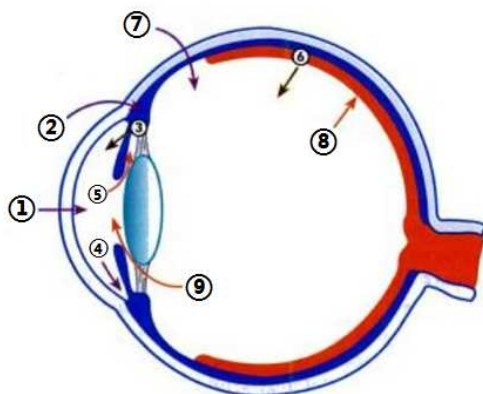


Figura 13. Vías oculares de entrada y eliminación de los fármacos. 1: vía transcorneal, 2: vía transconjuntival/transescleral, 3: barrera hematoacuosa, 4: vía trabecular, 5: eliminación por barrera hematoacuosa, 6: barrera hematorretiniana, 7: vía intravítrea, 8: eliminación por barrera hematorretiniana, 9: eliminación desde el vítreo hacia la ruta anterior.

- *Vía transcorneal*

El paso del medicamento a través de la córnea depende, además de la estructura e integridad corneal, de las propiedades fisicoquímicas del fármaco y de su formulación, esencialmente, del coeficiente de partición octanol/agua, relacionado con el grado de lipofilia del principio activo (**Schoenwald y Ward, 1978**) y del peso molecular que informa sobre el tamaño molecular. Teniendo en cuenta las características histológicas de la córnea que, a efectos prácticos, se puede equiparar a una estructura formada por tres zonas de diferente polaridad: lipófila (epitelio), hidrófila (estroma) y lipófila (endotelio), la penetración de cualquier fármaco administrado localmente vendrá condicionada, por tanto, por su coeficiente de reparto, que además de evaluar la cantidad de medicamento que se distribuye entre las dos fases, determina la contribución de cada una de las capas de la córnea en la resistencia que opone dicha estructura a la penetración transcorneal de los fármacos. El epitelio corneal proporciona la máxima resistencia al paso de los fármacos. Los principios activos penetran esta capa bien por difusión a través de las células (ruta transcelular) o bien a través de los espacios de las mismas en lo que se conoce como ruta paracelular. El epitelio lipófilo, actúa a modo de barrera para el 90% de fármacos hidrófilos y 10% en el caso de fármacos lipófilos. La ruta paracelular predomina para los fármacos

hidrófilos o iones de bajo peso molecular, mientras que la ruta intercelular predomina para fármacos lipófilos (Schoenwald y Stewart, 1979; Prausnitz y Noonan, 1998).

- Vía conjuntival/escleral

La conjuntiva es una membrana mucosa que recubre aproximadamente el 80% de la superficie ocular. Está formada por una porción bulbar que cubre la parte anterior del globo, excepto la córnea, y dos porciones palpebrales en las caras posteriores de los párpados superior e inferior. El epitelio conjuntival está compuesto por una serie de capas de células epiteliales estratificadas (de 5 a 15 capas) y se encuentra recubierto por microvellosidades. La conjuntiva bulbar está recubierta por la película lacrimal y contribuye a la formación de esta última mediante la secreción de electrolitos, mucus y glicoproteínas. Al igual que la córnea, el paso a través de la conjuntiva se puede llevar a cabo por la vía transcelular o paracelular. Si nos centramos en las propiedades generales de las sustancias activas, el tamaño molecular es el factor limitante de la ruta paracelular tanto de la córnea como de la conjuntiva. Las rutas paracelulares fueron descritas hace algunos años en conejos empleando polietilenglicoles de distintos pesos moleculares (de 200 a 1000 Da). Se seleccionaron dichos agentes ya que sus características resultan comunes a péptidos y oligonucleótidos (hidrofilia, capacidad de formar puentes de hidrógeno y tamaño molecular). Por otro lado, las células epiteliales de la conjuntiva presentan las mismas uniones intercelulares que caracterizan al epitelio corneal conocidas como «tight junctions», aunque la conjuntiva es más permeable al paso de moléculas hidrofílicas.

La vía subconjuntival también se presenta como alternativa a las inyecciones intravítreas que resultan más agresivas para el paciente. Esta vía persigue incrementar la concentración intraocular de fármaco disminuyendo su frecuencia de administración. Con este fin se han desarrollado implantes subconjuntivales y nano- y micropartículas. La iontoforesis es una técnica según la cual se consigue que los fármacos penetren la membrana de forma ionizada mediante la aplicación de una corriente eléctrica, por lo que se restringe a sustancias activas capaces de ionizarse. Hoy en día las rutas de acceso que ofrece la conjuntiva están en estudio (ruta paracelular, transcelular, transporte activo o endocitosis) (Andrés-Guerrero y Herrero-Vanrell, 2008).

1.6. Sistemas de Administración Tópica

La administración tópica de fármacos se realiza a través de la piel y las mucosas. La característica de esta vía es fundamentalmente el efecto a nivel local, no interesando la absorción de los principios activos. Los sistemas de administración tópica que se utilizaron en esta tesis, fueron las nanopartículas poliméricas para administración oftálmica y nanoemulsiones para aplicación dérmica.

1.6.1. Nanoemulsiones (NEm)

Las nanoemulsiones son dispersiones coloidales translucidas de dos líquidos inmiscibles estabilizadas por un tensioactivo, con un tamaño de gota comprendido entre los 20 y 200 nm en donde uno de los dos líquidos es disperso en forma de pequeñas gotas en el otro (**Becher, 2001**). Este pequeño tamaño de gota hace que la nanoemulsión posea una elevada estabilidad cinética, frente a la sedimentación, floculación y coalescencia. Sin embargo, a pesar de su elevada estabilidad cinética, son termodinámicamente inestables, siendo necesaria la aportación de energía para su formación (**Guglielmini, 2008; Solans, et al. 2005**).

Al mezclar soluciones acuosas y oleosas en presencia de tensioactivos, pueden dar diferentes tipos de emulsiones. Emulsiones simples como: *emulsión agua en aceite* (W/O), que consiste en gotas de agua dispersas en una fase oleosa o *emulsión aceite en agua* (O/W), que consiste en gotas de aceite dispersas en una fase acuosa. Así como también doble o múltiples emulsiones, como: *emulsión aceite en agua en aceite* (O₁/W/O₂), que consiste en una fase continua de aceite en cuyo seno se encuentran dispersas gotas de agua, lo que a su vez forman una fase continua en la cual se encuentran dispersas gotas de aceite; *emulsión agua en aceite en agua* (W₁/O/W₂), que consiste en una fase continua de agua conteniendo dispersas gotas de aceite, lo que a su vez forman una fase continua en la cual se encuentran dispersas gotas de agua (Fig. 14) (**Nielloud y Marti-Mestres, 2000; Bhatt y Madhav, 2011**).

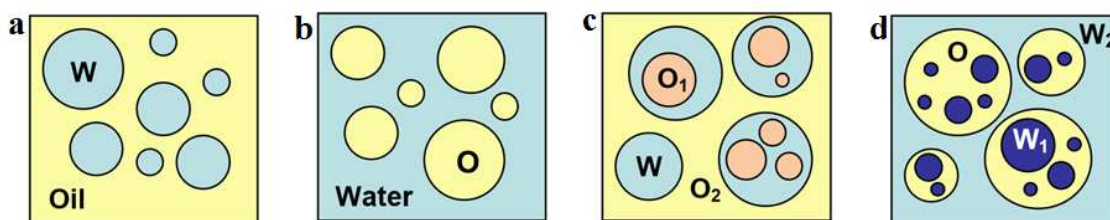


Figura 14. Tipos de emulsiones, a) W/O; b) O/W; c) O₁/W/O₂; d) W₁/O/W₂

1.6.1.1. Métodos de preparación

En función de la fuente utilizada para suministrar esta energía podemos distinguir dos métodos de preparación:

- *Métodos de alta energía:* utiliza homogenización de alta presión, ultrasonidos entre otros, que rompen las gotas de la emulsión. La adición de tensioactivo permite disminuir la energía necesaria para la formación de la nanoemulsión. No obstante, el tensioactivo también puede producir coalescencia de las gotas recién formadas debido a la colisión entre ellas (**Guglielmini, 2008**). El tamaño de partícula obtenido dependerá del homogenizador empleado, así como del tiempo y temperatura utilizado durante la preparación y de los propios componentes de la fórmula. Este método de preparación permite tener un mayor control sobre el tamaño de gota y una mayor variedad de ingredientes disponibles (**Ravi y Padma, 2011**).

- *Métodos de baja energía:* también llamados métodos de condensación. Estos aprovechan la energía contenida en el sistema para formar gotas de pequeño tamaño (**Sole, et al. 2010**). La emulsificación se lleva a cabo cambiando los parámetros que afectan al balance hidrolipofílico del sistema, como la temperatura y composición, por este motivo la selección de los excipientes a utilizar es un paso crítico (**Izquierdo, et al. 2005**). Así se pueden distinguir dos procedimientos: a temperatura constante (variando la composición) o bien a composición constante (variando la temperatura). Este último método también es conocido como método de la temperatura de inversión de fases, siendo el método de baja energía más utilizado (**Solans, et al. 2005**).

1.6.1.2. Componentes de las nanoemulsiones

Los excipientes utilizados para la preparación de las nanoemulsiones deben ser seguros, no tóxicos y no irritantes, según los que aparecen en la lista de componentes generalmente reconocidos como seguros (Generally Regarded As Safe, GRAS). Un punto crítico es la elección del tensioactivo ya que suelen ser irritantes y se encuentran en altas concentraciones en la formulación para poder estabilizar el sistema coloidal.

Para la elaboración de las nanoemulsiones, en primer lugar se selecciona la fase oleosa que es la responsable de la solubilización de fármacos hidrófobos. En este caso es conveniente seleccionar el aceite en el cual el fármaco presenta una mayor solubilidad, realizando un screening de aceites, posteriormente se selecciona el tensioactivo. Con el fin de racionalizar el comportamiento de los tensioactivos se determina su balance hidrolipofílico (HLB). Este tiene en cuenta la contribución relativa del fragmento hidrófilo e hidrófobo en la molécula del tensioactivo. Los tensioactivos con HLB altos (8-18) se consideran solubles en agua, y favorecen la formación de emulsiones de fase externa acuosa. Los tensioactivos de bajo HLB (3-6) se consideran lipófilos y favorecen la formación de emulsiones de fase externa oleosa. Los co-tensioactivos, son tensioactivos generalmente alcoholes o ésteres alcohólicos de cadena corta, que se añaden con el fin de reducir aún más la tensión interfacial, facilitando la emulsificación del sistema (**Devarajan y Ravichandran, 2011**). La adición de un co-tensioactivo, generalmente aumenta la estabilidad del sistema y la solubilidad del compuesto en el mismo.

En general, se eligen tensioactivos no iónicos (ésteres de glicerol, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos), por su buena tolerabilidad biológica así como por su habilidad para formar nanoemulsiones independientemente del pH y a la concentración de electrolitos en la formula (**Djordjevic, et al. 2004**). También se pueden encontrar tensioactivos aniónicos (ácidos carboxílicos, sulfonatos, etc.) y catiónicos (aminas y sales de amonio cuaternario, etc.) (**Devarajan y Ravichandran, 2011**).

Normalmente las nanoemulsiones contienen grandes cantidades de tensioactivos. Esto hace que posean una muy baja tensión interfacial, facilitando la obtención de tamaños de gotas nanométricos que asegura una excelente superficie de contacto entre la piel y el vehículo (**Kreilgaard, 2002**). Algunos ejemplos de los componentes de las nanoemulsiones se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Componentes de las nanoemulsiones.

Componentes de las Nanoemulsiones	
Fase Oleosa	Labrafac [®] , migliol [®] , vaselina líquida, aceite de castor, aceite de jojoba, triacetin, sefsol, miristato de isopropilo, aceite de oliva, aceite de cacahuete, etc.
Fase Acuosa	Agua, propilenglicol, etc.
Tensioactivos	Labrasol [®] , labrafil [®] , Plurol oleique [®] , polisorbato 80; 85, etc.
Co-tensioactivos	Transcutol-p [®] , plurol-oleique [®] , labrasol [®] , etc.

Las principales ventajas de las nanoemulsiones son:

1. Presentan una mayor área de superficie y energía libre por lo cual se convierten en un sistema de transporte eficaz.
2. No muestran los problemas de formación de crema inherente, floculación, coalescencia y sedimentación.
3. Pueden ser formuladas en una variedad de formulaciones, tales como espumas, cremas, líquidos y aerosoles.
4. No son tóxicas ni irritantes por lo tanto pueden ser fácilmente aplicadas a la piel y a las membranas mucosas.
5. Se pueden administrar por vía oral si la formulación contiene agentes tensioactivos que son biocompatibles.

Introducción

6. No dañan a las células sanas de humanos y animales, por lo tanto, son adecuadas para fines terapéuticos humanos y veterinarios.

7. Debido a su pequeño tamaño, las nanoemulsiones pueden penetrar a través de la superficie rugosa de la piel y esto mejora la penetración de los principios activos.

1.6.2. Nanopartículas poliméricas (NPs)

La utilización de nanopartículas es una importante área de la investigación en el campo de la liberación de fármacos, ya que estos sistemas permiten dirigir una amplia variedad de moléculas a los distintos tejidos liberándolos de manera sostenida en el tiempo. Además, el uso de nanopartículas minimiza la degradación del principio activo, incrementa su semivida en el interior del órgano a tratar y disminuye su toxicidad. El término nanopartícula engloba las nanocápsulas y nanoesferas. Las nanocápsulas (NCs) son sistemas vesiculares en los que el fármaco se localiza en el interior de la partícula, generalmente disuelto en un vehículo oleoso. Las nanoesferas (NEs), en cambio, son sistemas de tipo matricial donde el fármaco se suele encontrar incorporado en el interior de la matriz (Fig. 15) (Rocha Formiga, et al. 2009).

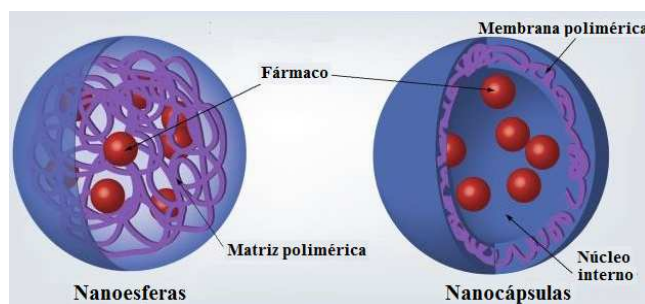


Figura 15. Sistemas nanoparticulares

Una gran variedad de fármacos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos, se pueden administrar utilizando vectores nanoparticulados. Además pueden ser formuladas para que su liberación sea dirigida a determinados tejidos u órganos, como por ejemplo al cerebro, pulmones, hígado, bazo, sistema linfático, etc. Por lo tanto, las ventajas de este tipo de nanopartículas formuladas con poliésteres son las de ofrecer una protección al principio

activo en las condiciones biológicas y permitir una liberación sostenida en el tiempo evitando así administraciones repetidas, lo que conlleva una mayor comodidad para el paciente.

Entre las distintas moléculas encapsuladas en nanopartículas formuladas con poliésteres se encuentran fármacos antitumorales, antígenos, péptidos y proteínas, genes, etc. para el tratamiento y prevención de distintas enfermedades

La producción de nanopartículas tiene muchas variables independientes. Un parámetro clave es el tensioactivo. Una amplia gama de moléculas sintéticas y naturales con diferentes propiedades, se ha propuesto para la preparación de nanopartículas. Como ejemplo de emulsionantes naturales se pueden citar dipalmitoil- fosfatidilcolina, bromuro de didodecil dimetil amonio, y como tensioactivos el Pluronic F68 y Pluronic F108. Con respecto al polímero de las nanopartículas, cabe mencionar que el polímero utilizado para formular las nanopartículas también afecta de manera importante a la estructura, propiedades y aplicaciones de las mismas, de forma que no existe un polímero único para todos los fármacos. Dentro de los polímeros sintéticos destacan los poliésteres debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Los más utilizados son el ácido láctico (PLA) y los copolímeros formados por unidades monoméricas de ácido láctico y glicólico (PLGA) (Fig. 16), ya que han sido aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para elaborar sistemas para la administración de sustancias activas por vía parenteral. Además, modificando el peso molecular, su grado de hidrofilia y la proporción de cada uno de los polímeros se puede controlar la velocidad de degradación de los mismos, el grado de encapsulación y el de liberación del fármaco. Otros polímeros empleados para la obtención de nanopartículas son la poli- ϵ -caprolactona, el poli- β -hidroxibutirato y el ácido β -l-málico.

Introducción

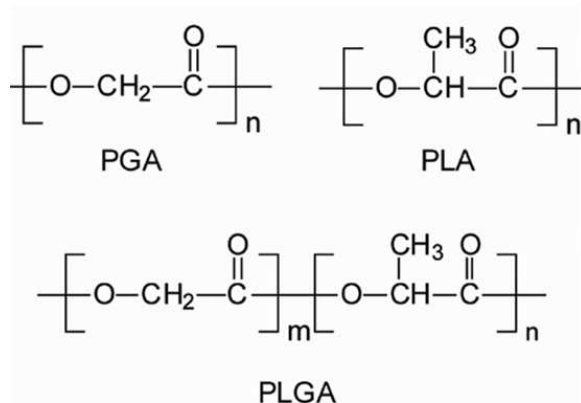


Figura 16. Estructura química del ácido poli-láctico (PLA), ácido poli.glicólico (PGA) y ácido poli (*D,L*-láctico-co-glicólico) (PLGA).

El L-PLA y el PLGA son compuestos que corresponden respectivamente al homopolímero lineal del ácido poli-L-láctico y a copolímeros lineales del *D,L* ácido láctico y glicólico, los cuales se pueden encontrar en proporciones monoméricas variables. La copolimerización del PLGA puede ser llevada a cabo por dos rutas distintas de síntesis: 1) policondensación del ácido láctico y del ácido glicólico a temperatura superior a 120 °C, o por debajo de esta temperatura en presencia de catalizadores, obteniéndose así PLGA de bajo peso molecular ($\text{PM} < 10.000 \text{ Da}$); 2) polimerización vía apertura de los dímeros cíclicos de ambos ácidos, resultando en copolímeros de alta masa y mejores propiedades mecánicas. Por otro lado, el peso molecular de PLA/PLGA es un parámetro que influye en la homogeneidad de la muestra. En general, polímeros de elevado peso molecular dan lugar a sistemas nanoparticulados con un bajo índice de polidispersión.

Las nanopartículas biodegradables de PLGA han sido utilizadas como vectores para la liberación controlada de proteínas, péptidos, vacunas, genes, factores de crecimiento, etc. El PLGA presenta ventajas y desventajas como biomaterial para la encapsulación de macromoléculas terapéuticas. La degradación del PLA/PLGA, que ocurre por hidrólisis no enzimática, puede dar lugar a una acumulación de sus monómeros ácidos, lo que resulta en la reducción del pH local y consecuente desnaturalización de proteínas encapsuladas. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la ausencia de toxicidad de sus productos de degradación y su modulable velocidad de degradación hacen del PLGA el poliéster más

utilizado en formulaciones nanoparticuladas de aplicación terapéutica. Otra importante ventaja del PLGA sobre el L-PLA, es que al presentar una velocidad de degradación más rápida, la probabilidad de que ocurran reacciones adversas debido a fragmentos cristalinos liberados por estos últimos, es menor.

1.6.2.1. Métodos de preparación

Durante las últimas décadas, se han desarrollado varias técnicas para la formulación de nanopartículas. Su fabricación ha evolucionado principalmente en tres aspectos: 1) búsqueda de componentes menos tóxicos; 2) simplificación del proceso para fabricación a nivel industrial; y 3) optimización de las técnicas en cuanto a rendimiento y eficacia de encapsulación.

Según el mecanismo de formación de las nanoesferas se pueden clasificar los métodos de elaboración en dos tipos:

a) Métodos basados en la polimerización: Consisten en la polimerización de monómeros en un medio en que el polímero resultante es insoluble. Según la solubilidad del monómero en el medio de polimerización el mecanismo de formación será diferente: monómero solubilizado o monómero dispersado. Ejemplos de estos métodos son: emulsión polimerización y polimerización micelar.

b) Métodos basados en la precipitación: Consisten en la precipitación de macromoléculas al modificar las características fisicoquímicas del medio en que se encuentran disueltas (pH, temperatura o solventes). Se pueden agrupar en tres tipos: desolvatación, desnaturalización y desplazamiento del solvente.

El método de desplazamiento de solvente, método utilizado en este trabajo para la elaboración de las nanopartículas, es el más utilizado para formar nanopartículas poliméricas a partir de poliésteres y se basa en la emulsificación de una solución orgánica que contiene el polímero en una solución acuosa de un agente tensioactivo o estabilizante

Introducción

seguida de la evaporación del disolvente orgánico. El polímero se disuelve en un disolvente apropiado (p. ej. acetona, acetato de etilo, cloroformo, diclorometano). La fase interna de la emulsión se añade sobre la fase externa acuosa, en la que se disuelve un agente tensioactivo que proporciona estabilidad a la emulsión. La emulsificación tiene lugar mediante agitación por cizalladura para reducir el tamaño de la gotícula de la emulsión (directamente relacionada con el tamaño final de las nanopartículas. A este proceso de emulsificación le sigue la evaporación del disolvente orgánico, que provoca la precipitación del polímero y la formación de las nanopartículas (Fig. 17) (Venier-Julienne y Benoit, 1996; Rocha Formiga, et al. 2009).

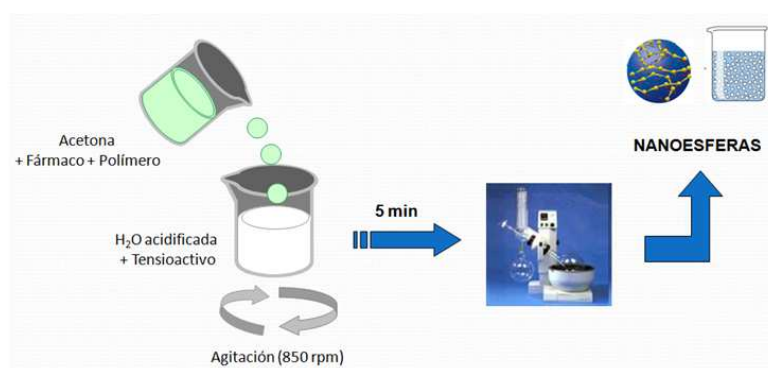


Figura 17. Método de desplazamiento del solvente

1.6.2.2. Caracterización de Nanopartículas

La importancia de las técnicas de caracterización de nanopartículas se justifica por la necesidad de adecuar la formulación a una aplicación terapéutica específica. El tamaño y la distribución granulométrica, la morfología, las propiedades de superficie, la eficiencia de encapsulación, el contenido en principio activo y el perfil de liberación del fármaco encapsulado son los principales parámetros que deben ser caracterizados una vez obtenidas las nanopartículas. En la tabla 4 se pueden observar las diferentes técnicas para la caracterización de estos sistemas.

Tabla 4. Técnicas utilizadas para la caracterización de nanopartículas

Parámetro	Técnica
Tamaño de partícula	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), Espectroscopía de Correlación Fotónica (PCS)
Carga superficial	Electroforesis, anemometría laser doppler
Eficiencia de encapsulación	Espectrofotometría-ultravioleta, Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)
Cristalinidad	Difractometría de Rayos X (XRD), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)
Análisis elemental	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (H-NMR), Espectrofotometría Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR)

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVES

Currently, non-toxic and biodegradable colloidal systems are of great importance in research, especially in the field of drug delivery, as these systems can direct a wide variety of molecules to various tissues where they are steadily released modulating their pharmacological activity. Another advantage of these systems is their small particle size or drop, which means that the drug reaches the target organ without affecting other organs, reducing their toxicity and preventing drug degradation.

For these above considerations, the main objective of this work is to develop controlled release systems (PLGA polymeric nanoparticles and nanoemulsions) loaded natural and synthetic compounds of pentacyclic triterpenes type (oleanolic and ursolic acid) with anti-inflammatory and cytotoxic activity for topical application (ocular and dermal).

The project will fulfill these partial objectives:

- Prepare a synthetic mixture of these pentacyclic triterpenes with the pure compounds to the same proportion as the natural mixture.
- Develop and validate an analytical method by high-performance liquid chromatography (HPLC) to quantify the compounds.
- Design, optimize and characterize nanostructured colloidal systems such as nanoemulsions and polymer nanoparticles loaded with natural and synthetic mixture of compounds triterpenoids.
- Study the kinetic profile of such formulations in “*in vitro*” studies with artificial membranes.
- Study the ability of transdermal in human skin and transcorneal in rabbit corneas penetration of these compounds in “*ex vivo*” studies of permeation.

Objetives

- Determine potential toxic and irritating effects of these compounds on contact with the skin or eye, performing in vivo ocular and dermal irritation tests (by the Draize test) and in vitro eye irritation assay by the method of Hen's Egg Test Chorioallantoic Membrane (HET-CAM).
- Analyze the anti-inflammatory efficacy of the compounds in "in vivo" models of topical inflammation.
- Evaluate the cytotoxic activity of OA/UA in nanoemulsions in murine melanoma cell lines (B16).

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

Los resultados derivados de la realización de este trabajo de investigación han dado lugar a cuatro artículos publicados en revistas científicas, los cuales se presentan a continuación acompañados de un breve resumen.

Artículo 1. Alvarado, H.L., Abrego, G., Garduño-Ramírez, M.L., Clares, B., García, M.L., Calpena, A.C., 2015. Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the quantification of ursolic/oleanic acids mixture isolated from *Plumeria obtusa*. *J. Chromatogr. B.* 983–984, 111–116.

Artículo 2. Alvarado, H.L., Abrego, G., Garduño-Ramírez, M.L., Clares, B., Calpena, A.C., García, M.L., 2015. Design and optimization of oleanolic/ursolic acid-loaded nanoplateforms for ocular anti-inflammatory applications. *Nanomedicine: NBM.* 11, 521-530.

Artículo 3. Alvarado, H.L., Abrego, G., Souto, E.B., Garduño-Ramírez, M.L., Clares, B., García, M.L., Calpena, A.C., 2015. Nanoemulsions for dermal controlled release of oleanolic and ursolic acids: in vitro, ex vivo and in vivo characterization. *Colloids Surf. B.* 130, 40–47.

Artículo 4. Alvarado, H.L., Abrego, G., Garduño-Ramírez, M.L., Clares, B., Calpena, A.C., García, M.L. Anticarcinogenic activity of natural pentacyclic triterpenes isolated from *Plumeria obtusa* against B16 melanoma cell line. *J. Nanomater.* (Artículo sometido).

Artículo 1.

Alvarado, H.L., Abrego, G., Garduño-Ramírez, M.L., Clares, B., García, M.L., Calpena, A.C.

Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the quantification of ursolic/oleanic acids mixture isolated from *Plumeria obtusa*.

Journal of Chromatography B. 983–984 (2015) 111–116.

3.1. Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the quantification of ursolic/oleanic acids mixture isolated from *Plumeria obtusa*.

Resumen

En este trabajo se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para la cuantificación de la mezcla natural y sintética de los compuestos triterpenoides, ácido oleanólico y ácido ursólico.

La mezcla natural de OA/UA fue extraída a partir del extracto metanólico de las hojas de *P. obtusa*, recolectadas en Calakmul, Campeche, México. A partir de la mezcla natural, se preparó una mezcla sintética con los compuestos puros a la misma proporción de la mezcla natural ($10.6 \pm 0.89\%$ OA y $89.4 \pm 0.86\%$ UA).

La validación del método desarrollado se llevo a cabo de acuerdo con las directrices de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH), evaluando la linealidad, selectividad, sensibilidad, exactitud y precisión. Se desarrollo un método lineal, selectivo, exacto y preciso en el rango de concentración de $3.62 - 116 \mu\text{g/mL}$ para la mezcla natural y de $6.25 - 200 \mu\text{g/mL}$ para la sintética, obteniendo ecuaciones de regresión $y = 6230.7x - 5553$, $r^2 = 0.9999$ y $y = 6196.2x - 2345.9$, $r^2 = 0.9999$ para la mezcla natural y sintética, respectivamente. Los límites de cuantificación calculados fueron de $2.81 \pm 0.65 \mu\text{g/mL}$ y $4.14 \pm 2.07 \mu\text{g/mL}$ y límites de detección de $0.93 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$ y $1.37 \pm 0.68 \mu\text{g/mL}$ para la mezcla natural y sintética respectivamente.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

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

Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the quantification of ursolic/oleanic acids mixture isolated from *Plumeria obtusa*

Helen L. Alvarado^{a,b}, Guadalupe Abrego^{a,b}, María L. Garduño-Ramírez^c, Beatriz Clares^{d,*},
María L. García^b, Ana C. Calpena^a

^a Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII Av. s/n, Barcelona 08028, Spain

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

^c Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad No. 1001, Col Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^d Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus de Cartuja St. s/n, Granada 18071, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 August 2014

Accepted 9 January 2015

Available online 15 January 2015

Keywords:

Oleanolic acid

Ursolic acid

HPLC

Validation

Skin permeation studies

Nanoparticles

ABSTRACT

Oleanolic acid (OA) and ursolic acid (UA) are ubiquitous pentacyclic triterpenes compounds in plants. These triterpenoids exhibit unique, important biological and pharmacological activities. For the investigation and development of topical drug delivery systems of triterpenoids in *Plumeria obtusa* is essential an adequate detection and quantification method for its application in skin permeation studies. The aim of this study was to develop a HPLC method for the determination of OA/UA from leaves of *P. obtusa*. Results showed that it was sensitive, repeatable, selective, accurate and precise. The detection limit was $0.93 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$ and the quantification limit $2.81 \pm 0.65 \mu\text{g/mL}$. Determination coefficients were higher than 0.999 for concentrations between 3.62 and $116 \mu\text{g/mL}$. The intra and inter-day precision (relative standard deviation) was less than 1.50% and accuracy in terms of relative error ranged between -1.45 and 1.39%. The proposed HPLC method presented advantageous performance characteristics and it can be considered suitable for the evaluation of OA/UA in *ex vivo* permeation studies.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pentacyclic triterpenes are terpenes of 30 carbons, an important kind of natural products present in many medicinal plants which are similar in their biogenesis to steroids in the cyclization of squalene and its pleiotropic actions. A large number of these compounds have been reported to be important pharmacological agents [1]. Based on their carbon skeleton pentacyclic triterpenes are divided into various subgroups: gammaceranes, hopanes, lupanes, oleananes, ursanes, etc. [2].

The triterpenoids used for this research have oleanane and ursane base structure: oleanolic acid (OA) (3β -3-hydroxy-olean-12-en-28-oic acid) and its isomer ursolic acid (UA) (3β -3-hydroxy-urs-12-en-28-oic acid) (Fig. 1), both with molecular formula: $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ and molecular weight of 456.7 g/mol. These triterpene acids are found in food (olive oil, olives, grapes), medicinal herbs and other natural plants in the form of free acid or aglycones for

triterpenoid saponins [3]. These exhibit unique, important biological and pharmacological activities, including anti-inflammatory, antimicrobial, antiviral, cytotoxic and cardiovascular effects [4–8]. Besides, OA and UA are also utilized in the preparation of food supplements because are an integral part of the human diet. Furthermore, they are important ingredients in cosmetic formulations. Thus, according to their wide range of applications these triterpenoids are of high commercial value. They have been isolated from many plant species for their benefits [9].

Plants of genus *Plumeria* (*Apocynaceae*) have their origin from Central America and reputed medicinal properties [10]. Concretely, the investigation and development of drug delivery systems for the application of potential anti-inflammatory properties of triterpenoids in *Plumeria obtusa* was an aim in our research group. Based on this premise, an adequate detection and quantification method for these compounds and its application in skin permeation studies performed in vertical Franz diffusion cells was an essential condition.

For these purposes, a part of our efforts was devoted to develop and validate a high performance liquid chromatography (HPLC) analytical method for the determination of OA/UA in: (i) a natural

* Corresponding author. Tel.: +34 958 243904; fax: +34 958 248958.
E-mail address: beatrizclares@ugr.es (B. Clares).

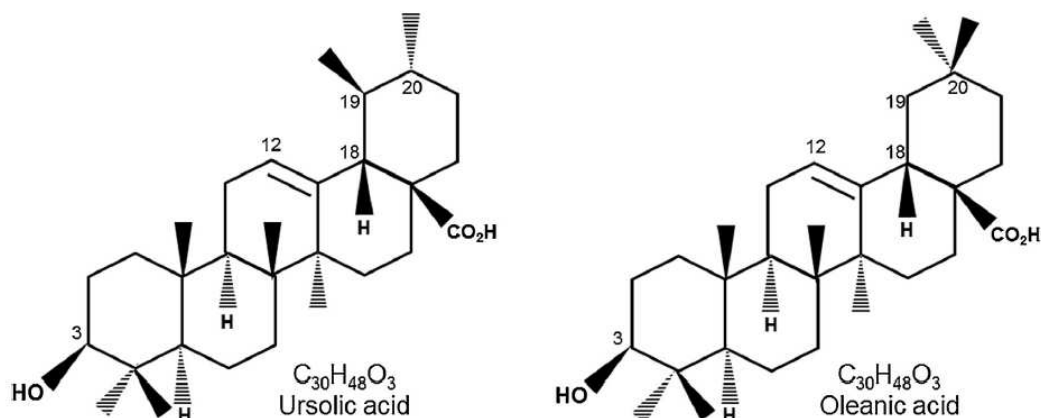


Fig. 1. Chemical structures of ursolic and oleanolic acids.

mixture of OA/UA (NM-OA/UA) extracted from the leaves of *P. obtusa*, and (ii) an equivalent synthetic mixture (SM-OA/UA). Finally, this method has been utilized to determine the concentration of OA/UA in *ex vivo* percutaneous permeation studies through human skin when loaded in nanoparticles (NPs).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

The reference compounds, OA (>97%), UA (>90%) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). PLGA (Resomer® RG 756 S) was obtained from Boehringer (Ingelheim, Germany) with a molecular weight of 98,000 Da and lactide/glycolide 75/25 molar ratio. Poloxamer 188 (Lutrol® F68, P188) was supplied by BASF (Barcelona, Spain). The purified water used in all experiments was obtained from a MilliQ® Plus System lab supplied. All other chemicals and reagents used in this study were of analytical or HPLC grade (Fisher Scientific, Leicestershire, UK).

2.2. Plant material

Leaves of *P. obtusa* L. var. *sericifolia* (C. Wright ex Griseb.) Woodson (Apocynaceae) were collected in Calakmul, Campeche, Mexico. The first collect of the plant was realized in 1997. From this collection a herbarium specimen was prepared and deposited at the National Herbarium, Institute of Biology, MEXU, UNAM, with registration number Martinez 27824-A.

2.3. Isolation of the pentacyclic triterpenes

The leaves were dried at room temperature in the shade. Then, dried leaves were pulverized and extracted with methanol by maceration at room temperature (100 g of dried vegetable material, extracted three times with 1000 mL of methanol each time). Once the extractions were performed the solvent was removed under reduced pressure to obtain the corresponding residues [11,12]. Methanolic extract of *P. obtusa* (30 g) was then adsorbed by the same amount of silica gel HF₂₅₄ and mounted on silica gel column (700 g) eluting with mixtures of hexane/ethyl acetate of increasing polarity. Several fractions of 400–500 mL were obtained. Among these, the POLHC-10A fraction was concentrated and rechromatographed on silica gel eluted with 50:50 hexane/ethyl acetate gave a 303.3 mg white amorphous powder precipitate with a

melting point of 248–260 °C and retention factor (Rf) of 0.63 (6:4 hexane:acetone).

2.4. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy

¹H NMR spectra of natural mixture was measured on a Varian Mercury 200 MHz (4, 7 T) spectrometer with a direct detection broad band probe with two RF channels ¹H-¹⁹F/¹⁵N-³¹P (5 mm) with a 75 W high band linear amplifier and 125 W low band amplifier. Shim: 14 channels. A mixture of (1:1 v/v) of deuterated chloroform (CDCl₃) and deuterated dimethylsulfoxide (DMSO-d₆) was used as solvent and tetramethylsilane (TMS) as internal reference.

2.5. Elaboration of synthetic mixture

Adequate amounts of OA and UA were weighed to obtain a final concentration equivalent to NM-OA/UA. Once elaborated, SM-OA/UA was analyzed by HPLC method to determine the proportion of each triterpene acid present in the mixture assuring its equivalence with the natural sample.

2.6. Sample preparation

The NPs including NM-OA/UA and SM-OA/UA were elaborated by the solvent displacement technique [13]. Briefly, an organic solution of PLGA in acetone (75:25) containing the mixture (1 mg/mL) was poured under moderate stirring into 10 mL of an aqueous solution adjusted to pH 5.5 of 10 mg/mL of poloxamer 188. Acetone was then evaporated and the volume of NPs dispersion was concentrated to 10 mL under reduced pressure (Büchi R-114, Flawil, Switzerland).

Samples were obtained from the receptor chamber of Franz diffusion cells at different times after *ex vivo* human skin permeation studies described below.

2.7. Standard solutions for calibration curves

Standard stock solutions of NM-OA/UA and SM-OA/UA were prepared daily by dissolving the appropriate amount of each in ethanol–water (7:3; v/v) to obtain a final concentration of 1.0 mg/mL. From these solutions standard stocks of 3.62, 7.25, 14.5, 29, 58 and 116 µg/mL for NM-OA/UA with a purity of 58%, and 6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200 µg/mL for SM-OA/UA were elaborated with the same solvent.

2.8. Instrumentation and chromatographic conditions

The HPLC system consisted of a Waters® 515 HPLC Pump, a 717 Plus autosampler and a 2487 dual λ absorbance detector (Waters, Milford, MA, USA). The analytical column was Kromasil 100 C₁₈ column (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m, Teknokroma). The compounds were detected at a wavelength of 210 nm with a flow rate of 1.0 mL/min. In order to select the best mobile phase, several phases with organic solvents such as acetonitrile, methanol, tetrahydrofuran, and aqueous phases as water, ammonium acetate buffer 0.2% and acetic acid as pH regulator were tested at different rates. Finally, the mobile phase acetonitrile–water (85:15 v/v) was chosen as it offered the best peak resolution. The injection volume was 10 μ L. All determinations were performed at room temperature and isocratic conditions of elution. The approximate retention time for the samples was 15 min.

2.9. Analytical method validation

Validation of the developed method was carried out as per the International Conference on Harmonization guidelines (ICH) [14] and included an evaluation of the following characteristics: linearity, selectivity, sensitivity, accuracy and precision.

2.9.1. Linearity and range

The linearity of the present method was evaluated by constructing the calibration curves at six concentration levels in the range of 3.62–116 μ g/mL for NM-OA/UA and 6.25–200 μ g/mL for SM-OA/UA. The calibration curves were validated interday ($n=6$) by different analysts and developed by plotting the instrument measurements *versus* the corresponding drug concentrations. The least squares fit method was employed to statistically evaluate the results for linearity by a regression line and the corresponding slope, y -intercept and determination coefficients (r^2). The regression equation was calculated: $y = bx + a$, where x is the concentration, y area of the chromatographic peaks, b is the value of the slope and a the y -intercept. Furthermore, linearity was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) test to compare peak areas *versus* nominal concentrations of each standard. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$. The least square linear regression analysis and mathematical determinations were performed by the Prism®, V. 3.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

2.9.2. Selectivity

To test the selectivity of the analytical method a blank sample (ethanol–water; 7:3; v/v) permeated through the skin membrane and samples for each test compound (NM-OA/UA and SM-OA/UA) from the receptor compartment of the Franz diffusion cells were analyzed. In the blank sample peaks should not appear at the retention time of the compounds.

2.9.3. Sensitivity

Sensitivity of the method was determined with respect to limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). LOD provides information on minimum level at which the drug was reliably detected by the analysis of samples with known concentrations of OA/UA and LOQ, in the same way, established the minimum level at which OA/UA was quantified with acceptable accuracy and precision. Both parameters, LOD and LOQ were determined based on the standard deviation of the response and the slope of the calibration curve using the formula:

$$\text{LOD or LOQ} = k \times \frac{SD_{Sa}}{Sb} \quad (1)$$

where k is the a factor related to the level of confidence. Its value is 3.3 for LOD and 10 for LOQ, SD_{Sa} is the standard deviation of the intercept and Sb is the slope.

2.9.4. Accuracy

Accuracy of the method was evaluated carrying the recovery study at three different known concentrations levels of OA/AU corresponding to 3.62, 29 and 116 μ g/mL for NM-OA/UA and 6.25, 50 and 200 μ g/mL for SM-OA/UA. Then accuracy of the method was evaluated carrying out the recovery study at those three levels in six replicates and expressed as relative error (RE, %). The method is considered accurate if RE is within $\pm 2\%$.

2.9.5. Precision: Repeatability and intermediate precision

The precision was determined by the intraday repeatability. For this, the same sample (NM-OA/UA and SM-OA/UA) at three levels: low, medium and high concentration were analyzed during the same day by the same analyst (while keeping the operating conditions identical) in six replicates. Furthermore, instrumental repeatability was assayed by analyzing the same sample (116 μ g/mL for NM-OA/UA and 200 μ g/mL for SM-OA/UA) repeatedly 7 times consecutively. Finally, the intermediate precision (interday) was assessed by sample analyzing at these three levels with six replicates of each sample over six days by different analysts. The data obtained were used to calculate mean and relative standard deviation (RSD, %). The method is considered precise, if RSD is within $\pm 2\%$.

2.10. Applicability of the method

The analytical methodology was carried out for the determination of OA/UA present in natural and synthetic mixtures in skin permeation studies conducted in vertical amber glass Franz-type diffusion cells (FDC 400, Crown Glass, Somerville, NY, USA) with an effective diffusional area of 2.54 cm² and 13 mL of receptor chamber capacity in order to obtain the concentration/time profiles of OA/UA. Human skin from abdominal plastic surgery of healthy patients was used as permeation membrane. Skin was cut into 400 μ m thick and mounted between the donor and receptor compartment of Franz diffusion cell avoiding bubbles formation with stratum corneum side facing the donor compartment and the dermis facing the receptor medium receiver compartment, ethanol–water (7:3 v/v) [15]. NM-OA/UA or SM-OA/UA samples were applied to the donor compartment and sealed with Parafilm® immediately to prevent liquid evaporation. Temperature was kept at 32 ± 0.5 °C to mimic *in vivo* conditions by a circulating-water jacket and stirred with a magnetic rotor at a speed of 700 rpm. Aliquots of 300 μ L were withdrawn at regular time intervals (up to 48 h) and replaced with the same volume of receptor medium after each collection with great care to avoid trapping air beneath the dermis.

The cumulative amount of OA/UA permeated through excised human skin was calculated, at each time point, from the concentration of OA/UA in the receiving medium and plotted as a function of time. The slope and intercept of the linear portion of the plot was derived by regression using the Prism®, v. 3.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

OA/UA flux (J , μ g/cm²/h) through the skin, was calculated from the slope of linear portion of the cumulative amounts permeated through the human skin per unit surface area *versus* time plot.

The permeability coefficient (Kp , cm/h) was obtained by dividing the flux (J) by the initial drug concentration (C_0) in the donor compartment, and it assumed that under sink conditions the drug

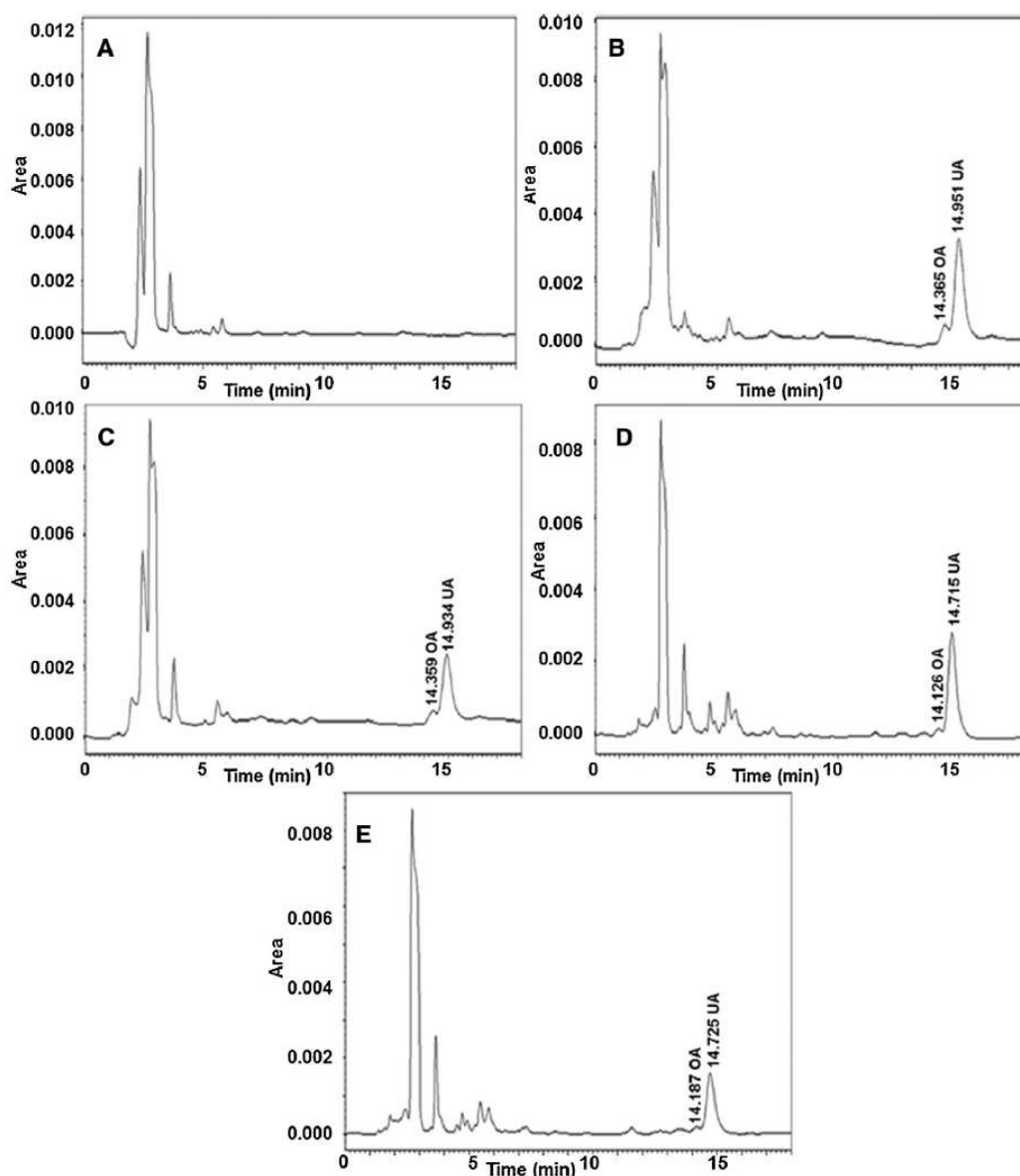


Fig. 2. HPLC chromatograms. (A) Blank sample; (B) NM-OA/UA; (C) SM-OA/UA from the receptor compartment of Franz diffusion cells; (D) NM-OA/UA and (E) SM-OA/UA retained in the skin.

concentration in the receiver compartment is negligible compared to that in the donor compartment.

$$Kp = \frac{J}{C_0} \quad (2)$$

At the end of the permeation study, the amounts of OA/UA remaining on the skin were quantified. The skin was removed from the Franz cells, cleaned with gauze soaked in a 0.05% solution of dodecyl sulphate and washed in distilled water. The permeation areas of the skin were cut and weighed. OA/UA contained in the skin was extracted with ethanol–water (7:3 v/v) for 20 min under sonication in an ultrasound bath. The resulting solutions were centrifuged (1500 rpm) for 10 min and OA/UA levels (expressed as $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{g}$) were measured by HPLC yielding the amount of OA/UA retained in the skin [16].

3. Results and discussion

3.1. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy

The ^1H NMR spectrum obtained from the isolated substance from the fraction POLHC-10A showed the characteristic signals for the vinyl hydrogen present in C-12, as well as, the signals of the proton H-3 α distinctive of hydroxylated triterpenes in C-3. Furthermore, the signal corresponding to the allylic H-18 as a double signal (3.3 and 2.6 ppm for OA and UA, respectively) permits to deduce that the basic skeleton of this triterpene is the oleanane type as is the case of OA. At high field, signals of methyls and methylenes were observed. It was possible to observe the signals corresponding to the proton of the positions H-19 and H-20 corresponding to the UA that comprise the chemical structures of this mixture of molecules. Additionally, the signals present in one-dimensional NMR

Table 1
Precision and accuracy of HPLC method for determination of OA/UA.

	NM-OA/UA				SM-OA/UA			
	Level ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	RE (%)	Level ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	RE (%)
Intra-day ($n=6$)	3.62	3.68	1.08	-1.45	6.25	6.35	0.36	-1.53
	29	28.59	0.42	1.39	50	50.01	0.21	-0.03
	116	116.17	0.18	-0.15	200	199.30	0.64	0.35
Inter-day ($n=6$)	3.62	3.66	0.60	-0.83	6.25	6.31	0.50	-1.03
	29	28.77	1.46	0.79	50	50.44	0.66	-0.87
	116	116.40	0.32	-0.35	200	200.44	0.33	-0.22

NM-OA/UA—natural mixture of oleanolic and ursolic acids; SM-OA/UA—synthetic mixture of oleanolic and ursolic acids; RSD—relative standard deviation; RE—relative error.

Table 2
Median parameters and rank (minimum–maximum, $n=3$) calculated after permeation studies through human skin of NM-OA/UA and SM-OA/UA loaded in NPs vehicles. J is the flux, K_p is the permeability coefficient, Q_{48} is the amount of OA/UA permeated after 48 h, and Q_s is the amount of OA/UA retained in the skin.

	J ($\mu\text{g/h/cm}^2$)	$K_p \times 10^{-4}$ (cm/h)	Q_{48} (μg)	Q_s ($\mu\text{g/cm}^2/\text{g}$)
NM-OA/UA NPs	0.16 (0.11–0.16)	4.39 (2.93–4.56)	56.88 (45.95–66.73)	128.07 (104.04–138.91)
SM-OA/UA NPs	0.29 (0.25–0.29)	2.90 (2.46–2.91)	135.60 (127.75–144.04)	173.93 (124.34–273.75)
P value	0.0083*	0.1547	0.0019*	0.2759

* Significant differences, $P < 0.05$.

spectrum of proton for fraction POLHC-10A with spectroscopic data for OA and UA were compared. Results confirmed that this fraction contained a natural mixture of both compounds [17,18].

3.2. Elaboration of synthetic mixture

In order to determine the proportions in which UA and OA are in the natural mixture various samples of different concentrations were analyzed by HPLC to achieve separation of each of these triterpenes. The percentages were calculated as the average of the truncated areas of different natural samples, and resulted in $10.6 \pm 0.89\%$ OA and $89.4 \pm 0.86\%$ UA. Thus the same proportion was utilized for the SM-OA/UA elaboration.

3.3. Analytical method validation

The quantitative determination of OA/UA in the receptor side of diffusion cells required specific methods, since this kind of samples are usually contaminated with skin endogenous compounds. Moreover, diffusion cells provides little sample volumes and therefore, the analytical method has to show enough sensitivity.

Method validation has evolved rapidly over the last half century for being a neglected area of many scientific disciplines into a widely recognized process used to confirm that an analytical procedure employed for a specific test is appropriate for its intended use [19].

The linearity of an analytical procedure is its ability within a definite range to obtain results directly proportional to the concentrations (amount) of the analyte in the sample [14]. The linearity of HPLC method was determined by preparing 6 calibration curves of NM-OA/UA for the concentration range 3.62–116 $\mu\text{g/mL}$ and SM-OA/UA for the concentration range 6.25–200 $\mu\text{g/mL}$ (Supplementary data). The regression equation and determination coefficients determined for the calibration curves were $[y=6230.7x - 5553]$ ($r^2 = 0.9999$) and $[y=6196.2x - 2345.9]$ ($r^2 = 0.9999$) for NM-OA/UA and SM-OA/UA, respectively. No statistically differences were observed after ANOVA test in calibration curves of NM-OA/UA and SM-OA/UA with P values of 1.00 and 0.57, respectively.

Selectivity is the ability of an analytical method for measuring simultaneously and/or separately identifying the analytes of interest unequivocally in the presence of other chemicals that may be present in the sample. Fig. 2 shows chromatograms of the blank, NM-OA/UA and SM-OA/UA collected from the receptor compartment of Franz diffusion cells and retained in the skin

after permeation studies. No peaks that could interfere with the measurements of the studied components were observed. The triterpenoid acids peaks appeared at 14.3 and 14.9 min in NM-OA/UA and SM-OA/UA, respectively.

The LOQ is defined as the minimum concentration at which the analyte could be quantified with acceptable accuracy and precision. Based on the standard deviation of the response and the slope of the calibration curve LOQ values were $2.81 \pm 0.65 \mu\text{g/mL}$ and $4.14 \pm 2.07 \mu\text{g/mL}$ (confidence level of 10), and LOD values were $0.93 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$ and $1.37 \pm 0.68 \mu\text{g/mL}$ (confidence level of 3.3) for NM-OA/UA and SM-OA/UA, respectively.

Accuracy is calculated as the percentage of recovery. Table 1 illustrates the RE, which ranged between -1.53 and 1.39% and thus in the pre-established rank of $\pm 2\%$.

The precision of this method was determined by repeatability within-day using three different concentrations of the OA/UA. Every concentration was analyzed in six replicates. Also, intermediate precision between days was evaluated using these three different concentrations. The results obtained are presented in Table 1, values in both cases were less than 1.50% (RSD) confirming satisfactory results. The instrumental repeatability was 0.56% and 1.36% RSD for NM-OA/UA and SM-OA/UA, respectively.

3.4. Application of the method

Ex vivo human skin is the tool recommended by regulators to provide information about potential risk from topical exposure to chemicals [20]. The assessment of the skin permeation is one of the main steps in the initial design and later in the evaluation and optimization of dermal or transdermal drug delivery systems [21].

In spite of reported studies dealing with quantification of OA and UA by HPLC in plants [22], to date none of these have applicability for the quantification of OA/UA after *ex vivo* skin permeation or retained in the skin, possibly due to skin endogenous compounds interference. The application of this method has been demonstrated for the OA/UA quantification in human skin layers and in the receptor compartment of the diffusion cells after *ex vivo* percutaneous studies. The amount of OA/UA found in the receptor compartment during a percutaneous permeation experiment after the topical application of NM-OA/UA and SM-OA/AU loaded NPs is represented in Fig. 3. During the experiment, the amount of OA/UA in the receptor medium increased with time. Table 2 shows median values of permeation parameters obtained in the steady state range

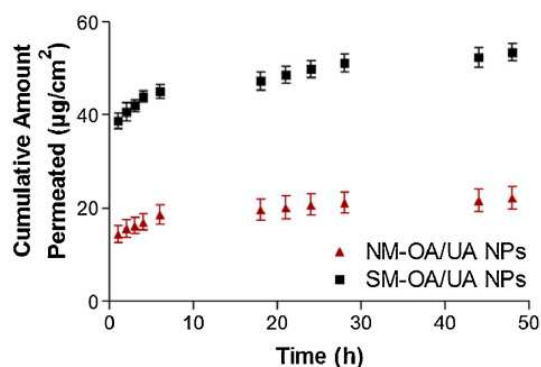


Fig. 3. Permeated amount of OA/UA through human skin from NM-OA/UA and SM-OA/UA loaded NPs.

of the curve and OA/UA amounts remaining in the skin after 48 h. Statistically significant differences were observed for J values and OA/UA retained in the skin after 48 h in favor of SM-OA/UA.

4. Conclusion

A simple and optimal method for the optimal detection and quantification of pentacyclic triterpenes OA/UA isolated from the leaves of *P. obtusa* was performed. Based on the reported results, it could be concluded that the developed method has demonstrated the proper linearity, selectivity, sensibility, accuracy and precision within the range of concentration from 3.62 to 116 µg/mL for NM-OA/UA and 6.25 to 200 µg/mL for SM-OA/UA. This method was successfully used to quantify OA/UA in skin permeation studies where passive diffusion was employed.

Acknowledgement

The authors wish to acknowledge the sponsorship of the project (MAT2011-26994) of the Ministry of Science and Innovation of Spain 26994.

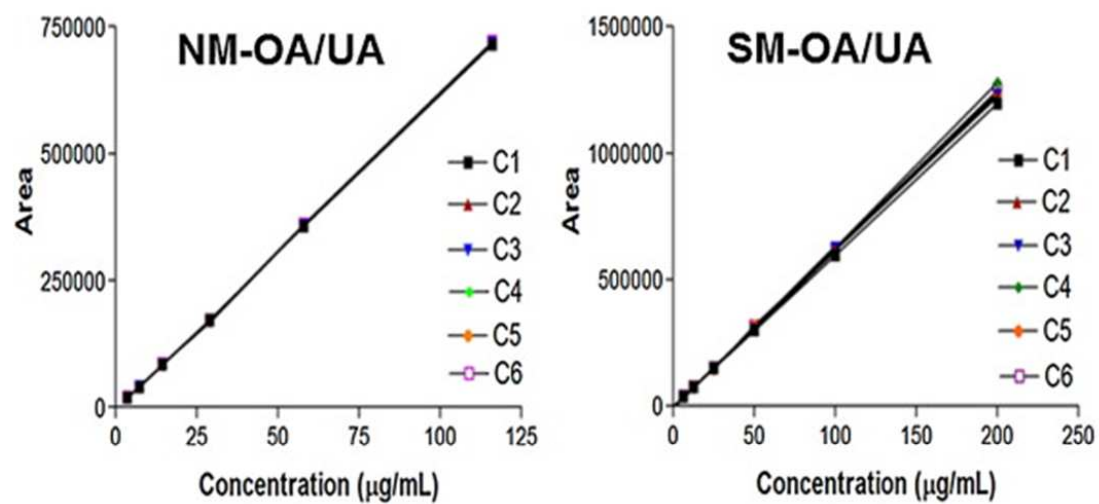
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.01.009>.

References

- [1] M.N. Laszczyk, Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy, *Planta Med.* 75 (2009) 1549–1560.
- [2] H. Sheng, H. Sun, Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases, *Nat. Prod. Rep.* 28 (3) (2011) 543–593.
- [3] L.O. Somova, A. Nadar, P. Rammanan, F.O. Shode, Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension, *Phytomedicine* 10 (2003) 115–121.
- [4] J. Liu, Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives, *J. Ethnopharmacol.* 100 (2005) 92–94.
- [5] X. Wang, X.L. Ye, R. Liu, H.L. Chen, H. Bai, X. Liang, X.D. Zhang, Z. Wang, W.L. Li, C.X. Hai, Antioxidant activities of oleanolic acid in vitro: possible role of Nrf2 and MAP kinases, *Chem. Biol. Interact.* 184 (2010) 328–337.
- [6] W.X. Yang, S.M. Li, L. Wu, Y.L. Li, L. Feng, Y.H. Shen, J. Tian, J.M. Tang, N. Wang, Y. Liu, W.D. Zhang, Abiesatrines A–J: anti-inflammatory and antitumor triterpenoids from *Abies georgei* Orr, *Org. Biomol. Chem.* 8 (2010) 2609–2616.
- [7] M.H. Shyu, T.C. Kao, G.C. Yen, Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in HuH7 human hepatocellular carcinoma cells through a mitochondrial-dependent pathway and down regulation of XIAP, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 6110–6118.
- [8] F. Aparecida Resende, C.A. de Andrade Barcala, M.C. da Silva Faria, F.H. Cato, W.R. Cunha, D.C. Tavares, Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice, *Life Sci.* 79 (2006) 1268–1273.
- [9] M. Zaccagna, F. Cateni, M. Faudale, S. Sosa, R. Della Loggia, Rapid HPLC analysis for quantitative determination of the two isomeric triterpenic acids, oleanolic acid and ursolic acid, *J. Pharm. Sci.* 77 (2009) 79–86.
- [10] B.S. Siddiqui, F. Ilyas, M. Rasheed, S. Begum, Chemical constituents of leaves and stem bark of *Plumeria obtusa*, *Phytochemistry* 65 (2004) 2077–2084.
- [11] L.I. Hernández Chávez, Estudio Químico y Evaluación Farmacológica de la Actividad Antidiabética de las Hojas de *Plumeria obtusa*, Especie Empleada en la Medicina Tradicional Mexicana para los Síntomas de la Diabetes Mellitus, Colima, Mexico, 2004.
- [12] J.M. Narvaez-Mastache, M.L. Garduño-Ramírez, L. Alvarez, G. Delgado, Antihyperglycemic activity and chemical constituents of *Eysenhardtia platycarpa*, *J. Nat. Prod.* 69 (2006) 1687–1691.
- [13] J. Araujo, E. Vega, C. Lopes, M.A. Egea, M.L. Garcia, E.B. Souto, Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 72 (2009) 48–56.
- [14] EMA, Committee for Medicinal Products for Human Use, Guideline on Bioanalytical Method Validation, European Medicines Agency, London, 2011 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf (accessed 03.08.14).
- [15] V. Domínguez-Villegas, V. Domínguez-Villegas, M.L. Garcia, A. Calpena, B. Clares-Naveros, M.L. Garduño-Ramírez, Anti-inflammatory, antioxidant and cytotoxicity activities of methanolic extract and prenylated flavanones isolated from leaves of *Eysenhardtia platycarpa*, *Nat. Prod. Commun.* 8 (2013) 177–180.
- [16] F. Fernández Campos, A.C. Calpena Campmany, G. Rodríguez Delgado, O. López Serrano, B. Clares Naveros, Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: ultrastructural effects and release studies, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 3739–3752.
- [17] A.R. Gohari, S. Saeidnia, A. Hadjiakhoondi, M. Abdoullahi, M. Nezafati, Isolation and quantitative analysis of oleanolic acid from *Satureja mutica* Fisch. & C. A. Mey, *J. Med. Plants* 8 (2009) 65–69.
- [18] M.G. Silva, I.G. Vieira, F.N. Mendes, I.L. Albuquerque, R.N. dos Santos, F.O. Silva, S.M. Morais, Variation of ursolic acid content in eight *Ocimum* species from northeastern Brazil, *Molecules* 13 (2008) 2482–2487.
- [19] P. Araujo, Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 2224–2234.
- [20] FDA, Nonsterile semisolid dosage forms, Scale-up and post-approval changes: Chemistry, manufacturing and controls, in: *In-Vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation*, 1997 <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070930.pdf> (accessed 12.08.14).
- [21] B. Godin, E. Toutou, Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models, *Adv. Drug Delivery Rev.* 59 (2007) 1152–1161.
- [22] C. Zhou, K. Chen, C. Sun, Q. Chen, W. Zhang, X. Li, Determination of oleanolic acid, ursolic acid and amygdalin in the flower of *Eriobotrya japonica* Lindl. by HPLC, *Biomed. Chromatogr.* 21 (2007) 755–761.

Supplementary data



Helen L. Alvarado, Guadalupe Abrego, María L. Garduño-Ramírez, Beatriz Clares, María L. García, Ana C. Calpen...

Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the quantification of ursolic/oleanic acids mixture isolated from *Plumeria obtusa*

Journal of Chromatography B, Volumes 983–984, 2015, 111 - 116

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.01.009>

Artículo 2.

Alvarado, H.L., Abrego, G., Garduño-Ramírez, M.L., Clares, B., Calpena, A.C., Garcia, M.L.

Design and optimization of oleanolic/ursolic acid-loaded nanoplateforms for ocular anti-inflammatory applications.

Nanomedicine: Nanotechnology Biology and Medicine. 11 (2015) 521-530.

3.2. Design and optimization of oleanolic/ursolic acid-loaded nanoplatfforms for ocular anti-inflammatory applications.

Resumen

Se diseñaron y optimizaron nanopartículas poliméricas de PLGA cargadas con la mezcla natural y sintética de OA/UA para administración oftálmica, por medio de la técnica de desplazamiento de solvente.

Se realizó un diseño factorial central rotatorio compuesto ($2^3 + \text{star}$), evaluando 3 factores: concentración de OA/UA, concentración del tensioactivo (poloxamer, p188) y el valor de pH de la fase acuosa a 5 niveles diferentes. Se obtuvieron formulaciones con valores de tamaño de partícula entre 204.4 ± 1.18 y 234.8 ± 1.27 nm; potencial zeta entre -7.60 ± 0.78 a -38.3 ± 0.81 mV; índice de polidispersidad entre 0.047 ± 0.014 y 0.104 ± 0.025 y eficiencia de encapsulación de 54.55 ± 3.09 a $80.15 \pm 0.62\%$. Se encontró que en el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad ningún factor o interacción entre ellos, modifica estas respuestas. Mientras que el potencial zeta se ve afectado por la interacción entre la cantidad de P188 y el pH. La eficiencia de encapsulación se ve afectada por la cantidad de OA/UA y la interacción entre la cantidad de P188 y el pH. La formulación seleccionada para seguir los estudios posteriores fue: 1.0 mg/mL de OA/UA, 10.0 mg/mL P188 y valor pH de 5.5 para la fase acuosa.

Los termogramas del DSC mostraron que las mezclas natural y sintética exhiben un pico de fusión a los 264.14 °C y 285.42 °C respectivamente. El PLGA mostró un evento térmico a los 52.74 °C, correspondiente a la temperatura de transición vítrea (Tg) del polímero, mientras que el P188 mostro un pico a los 53.63 °C. Se pudo observar al analizar las nanopartículas cargadas con las mezclas, que el pico exhibido por los compuestos desaparece, sugiriendo ausencia de fármaco cristalino libre. Mientras que hay un incremento en la Tg del polímero y tensioactivo con picos a los 102.26 °C y 102.76 °C, también encontrándose este evento en el termograma de las nanopartículas blancas, ésto

Resultados

podría ser debido a la interacción entre el polímero y el tensioactivo durante la evaporación del solvente al preparar estas formulaciones.

Estas formulaciones presentaron una viscosidad baja y un comportamiento Newtoniano, apropiado para estos sistemas. En los estudios de estabilidad física, no se encontró variación en los perfiles de retrodispersión (BS), considerando a las formulaciones desarrolladas, sistemas estables. Los compuestos mostraron una cinética de liberación ajustada a la ecuación de Weibull, indicando un mecanismo de liberación complejo. De acuerdo a los valores del estudio de permeación corneal, el fármaco ejerce un efecto local en la córnea, ya que hay mayor cantidad de fármaco retenida en esta área, que con respecto a la permeada.

Se evaluó la tolerancia ocular sin encontrar signos de irritación, esto fue reafirmado al realizar el ensayo de Draize, donde tampoco se detectaron signos de toxicidad o irritación ocular en el conejo. También se analizó la actividad antiinflamatoria en conejos, en el cual se vió una disminución en la inflamación ocular causada por la instilación de solución de araquidonato sódico. Encontrándose que después de los 150 minutos las nanopartículas de la mezcla natural mostraron un mayor efecto antiinflamatorio que las nanopartículas de la mezcla sintética.

Se desarrolló una formulación eficiente con adecuadas propiedades físicas y estabilidad física óptima. El fármaco encapsulado fue liberándose a una velocidad constante, teniendo la capacidad de permanecer más tiempo en la córnea, prolongando así el efecto deseado, viéndose además que las nanopartículas de la mezcla natural mostraron mayor acción.



ELSEVIER



CrossMark

Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine
11 (2015) 521–530



nanomedjournal.com

Design and optimization of oleanolic/ursolic acid-loaded nanoplatforms for ocular anti-inflammatory applications

Helen L. Alvarado, PhD^a, Guadalupe Abrego, PhD^a, María L. Garduño-Ramirez, PhD^b, Beatriz Clares, PhD^{c,*}, Ana C. Calpena, PhD^d, María L. García, PhD^a

^aDepartment of Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^bCentro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México

^cDepartment of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain

^dDepartment of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Received 21 May 2014; accepted 15 January 2015

Abstract

Oleanolic acid (OA) and ursolic acid (UA) are ubiquitous pentacyclic triterpenes compounds in plants with great interest as anti-inflammatory therapeutics. The aim of this study was the design and optimization of polymeric nanoparticles (NPs) loaded with natural and synthetic mixtures (NM, SM) of these drugs for ophthalmic administration. A 2³ + star central rotatable composite design was employed to perform the experiments. Results showed optimal and stable formulations with suitable physicochemical properties (mean diameter < 225 nm), homogeneous distribution (polydispersity index ~ 0.1), negatively charged surface (~ -27 mV) and high entrapment efficiency (~ 77%). Release and corneal permeation studies showed that NM release was faster than SM. Amounts of drug retained in the corneal tissue were also higher for NM. *In vitro* and *in vivo* tests showed no signs of irritation or toxicity and successful *in vivo* anti-inflammatory efficacy for both formulations, being NM-OA/UA NPs the most effective.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Key words: Oleanolic acid; Ursolic acid; PLGA nanoparticles; Ocular administration; Anti-inflammatory efficacy

Background

Oleanolic acid (OA) and its isomer ursolic acid (UA) belong to the pentacyclic triterpenes class of compounds. They are widely distributed in the plant kingdom and have been frequently isolated as isomeric mixtures.¹ These molecules having a skeleton of lupano, oleanane and ursane are primarily respon-

sible for the anti-inflammatory activity of a variety of medicinal plants² by the inhibition of enzymes involved in the production of eicosanoids such as cyclooxygenase and phospholipase A2, and avoiding the release of cytokines, histamine, serotonin, and some interaction with serine/threonine kinases.³ Furthermore, OA/UA has been shown to display numerous biological properties including anti-inflammatory,⁴ anticancerous,⁵ antifungal, hepatoprotective,⁶ antioxidant,⁷ antimicrobial, antiallergic and antiviral activity among others.⁸

Ocular drug delivery is one of the most interesting and challenging endeavors faced by the pharmaceutical scientist because the development of novel delivery systems for ocular instillation is currently a demand.^{9,10} Ocular inflammation is one of the most common complication after eye surgery.¹¹ Due to the complex structure of the eye the major challenge in ocular medication is the ability to maintain a therapeutic level of the drug at the site of action for prolonged duration.¹² Generally ocular efficacy is closely related to ocular drug bioavailability, which may be enhanced by increasing corneal drug penetration.¹³

Sources of support: The authors wish to acknowledge the sponsorship of the MAT2011 (Ministry of Science and Innovation, Spain), Grant 26994.

Financial disclosure: The authors have no financial, personal or other relationships with other people or organizations within five years of the beginning of the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. The authors declared that no competing interests exist.

*Corresponding author at: Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de la Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain.

E-mail address: beatrizclares@ugr.es (B. Clares).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.01.004>

1549-9634/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Resultados

522

H.L. Alvarado et al / *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 11 (2015) 521–530

Table 1
Factors and coded levels of experimental design.

Variable	Symbol	Coded variable level				
		Lowest	Low	Center	High	Highest
		$-\alpha$	-1	0	$+1$	$+\alpha$
Amount OA/UA (mg/mL)	X_1	0.495	0.7	1.0	1.3	1.504
Amount P188 (mg/mL)	X_2	6.64	8	10	12	13.36
pH of aqueous phase	X_3	4.66	5	5.5	6	6.34

Several approaches have been proposed but nanoparticles (NPs) represent promising drug carriers for ophthalmic applications,¹⁴ providing ease of application just like eye drop solutions with the added advantage of lower frequency of application and extended duration on the extraocular portion.¹⁵

The best known class of biodegradable polymers for sustained drug delivery is poly(DL-lactide-co-glycolide) acid (PLGA). PLGA is a biocompatible polymer, which is hydrolytically degraded into nontoxic oligomers and monomers, lactic acid and glycolic acid.¹³ PLGA provides an appropriate particle size and a narrow size range, ensuring low irritation, adequate bioavailability and compatibility with ocular tissues.¹⁶

The main aim of this study was the design and optimization of PLGA NPs to vehiculate these natural triterpene compounds in a controlled delivery system for ophthalmic administration. For this purpose, the response surface methodology (RSM) approach was used to investigate the simple effect and the interaction of different operating conditions, such as amount OA/UA, amount of surfactant and pH of the aqueous phase. Central composite rotatable design (CCRD) was used because it requires many few tests and has been shown to be sufficient to describe the majority of the process responses.¹⁷

Since the major drawback of those natural compounds is the limited amount present in plants another objective was the development of a synthetic mixture (SM) of OA/UA. Moreover, cumulative release mechanism and permeation capability, as well as, ocular tolerance of the optimized NPs were evaluated. Finally, anti-inflammatory efficacy was also analyzed.

Methods

Chemicals and reagents

Reference compounds OA ($\geq 97\%$) and UA ($\geq 90\%$) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). PLGA (Resomer® RG756S) was obtained from Boehringer (Ingelheim, Germany) with a molecular weight of 98,000 Da and lactide/glycolide 75:25 molar ratio. Poloxamer 188 (Lutrol® F68, P188) was supplied by BASF (Barcelona, Spain). Transcutol® P was provided by Gattefossé (Saint Priest Cedex, France). The purified water used was obtained from a MilliQ® Plus System lab supplied. All other chemicals and reagents were of analytical or high performance liquid chromatography (HPLC) grade (Fisher Scientific, Leicestershire, UK).

Plant material: isolation of the pentacyclic triterpenes

Ten grams of methanolic extract from leaves of *Plumeria obtusa* was adsorbed on 10 g of silica gel HF₂₅₄ using methanol as

solvent and bringing to dryness. The isolation process was conducted by column chromatography using silica gel HF₂₅₄ (300 g) as support and placed in a Buchner funnel 12 cm diameter and 8 cm high with Wheaton filter paper grade 1 under reduced pressure using a vacuum pump. Once the funnel was packed the fractionation was performed using an eluent system of increasing polarity starting with 100% hexane. The polarity increased by increasing proportions of 10% ethyl acetate up to 100%. Finally the column was eluted with 100% methanol to afford different fractions (500 mL each one), which were concentrated by rotary evaporation. To determine approximately the proportions in which UA/OA was in the NM, various samples at different concentrations were analyzed by HPLC resulting in 10%-12% OA and 88%-90% UA. Thus, similar rate was utilized for the elaboration of the SM.

Experimental factorial design

In order to optimize the preparation of formulations of OA/UA-PLGA NPs a $2^3 + \text{star}$ CCRD was constructed with a combination of three factors (independent variables); amount of OA/UA (X_1), amount of surfactant (X_2) and pH of the aqueous phase (X_3) at five different levels coded as $-\alpha$, -1 , 0 , 1 , and $+\alpha$ based on preliminary trials and literature research. The value for alpha (1.68) was calculated to fulfill the rotatability in the design. Physicochemical properties of the produced NPs were the dependent variables: average size (Z-ave, Y_1), polydispersity index (PI, Y_2), zeta potential (ZP, Y_3) and encapsulation efficiency (EE, Y_4). The coded and actual values of the variables are presented in Table 1. According to the CCRD matrix generated by Statgraphics® Plus 5.1 software (Statpoint Technologies, Inc. Warrenton, VA, USA), a total of 16 experiments were required, including 8 factorial points, 6 axial points and 2 replicated center points for estimation of the pure error sum of squares (Table 2). To estimate an interaction between two factors, one has to estimate the effect of the first at the lowest level of the second subtracting it from the effect of the first one at the highest level of the second one. An interaction between two factors is symbolized as factor1:factor2. The studied experimental responses were the results of the individual influence and the interactions of the three independent variables. To identify the significance of the effects and interactions between them analysis of variance (ANOVA) was performed for each parameter. P value less than 0.05 was considered to be statistically significant.

Preparation of PLGA-NPs

NPs loaded with NM and SM of OA/UA were prepared by the solvent displacement technique employed by Fessi et al.¹⁸

Table 2

Coded and actual values of the three experimental factors according to the matrix designed by $2^3 +$ star central composite rotatable factorial design.

		Coded levels of factors			Measured responses			
		OA/UA (mg/mL)	P188 (mg/mL)	pH	Z-Ave (nm) \pm SD	PI \pm SD	ZP (mV) \pm SD	EE (%) \pm SD
Factorial points	F1	1.3	12.0	6.0	206.5 \pm 0.25	0.067 \pm 0.023	- 7.60 \pm 0.78	55.44 \pm 2.98
	F2	1.3	12.0	5.0	222.1 \pm 2.25	0.060 \pm 0.014	- 35.0 \pm 0.72	66.72 \pm 3.67
	F3	1.3	8.0	6.0	224.3 \pm 1.00	0.082 \pm 0.033	- 29.8 \pm 0.61	66.77 \pm 1.73
	F4	1.3	8.0	5.0	219.9 \pm 1.08	0.065 \pm 0.007	- 34.0 \pm 0.50	54.55 \pm 3.09
	F5	0.7	12.0	6.0	213.3 \pm 1.60	0.055 \pm 0.017	- 15.6 \pm 0.78	67.41 \pm 2.07
	F6	0.7	12.0	5.0	228.7 \pm 1.06	0.066 \pm 0.011	- 38.3 \pm 0.81	80.15 \pm 0.62
	F7	0.7	8.0	6.0	218.0 \pm 0.87	0.062 \pm 0.018	- 32.6 \pm 1.14	68.83 \pm 1.50
Axial points	F8	0.7	8.0	5.0	219.2 \pm 1.21	0.059 \pm 0.016	- 32.4 \pm 0.97	70.79 \pm 0.57
	F9	1.504	10.0	5.5	219.1 \pm 1.60	0.100 \pm 0.016	- 25.0 \pm 0.65	60.74 \pm 2.54
	F10	0.495	10.0	5.5	207.0 \pm 0.96	0.047 \pm 0.013	- 28.2 \pm 0.40	78.47 \pm 0.73
	F11	1.0	13.36	5.5	204.4 \pm 1.18	0.078 \pm 0.008	- 27.2 \pm 0.36	73.19 \pm 0.40
	F12	1.0	6.63	5.5	223.2 \pm 2.78	0.068 \pm 0.035	- 26.2 \pm 0.72	74.52 \pm 0.35
	F13	1.0	10.0	6.3	213.9 \pm 2.69	0.047 \pm 0.014	- 29.0 \pm 0.50	62.54 \pm 1.29
	F14	1.0	10.0	4.6	234.8 \pm 1.27	0.104 \pm 0.025	- 27.7 \pm 0.75	75.65 \pm 1.04
Center points	F15	1.0	10.0	5.5	213.7 \pm 2.95	0.077 \pm 0.027	- 28.7 \pm 0.78	76.75 \pm 0.81
	F16	1.0	10.0	5.5	214.9 \pm 3.41	0.081 \pm 0.013	- 27.7 \pm 0.62	71.63 \pm 0.76

Coded values of the three factors: OA/UA amount (OA–UA), P188 amount (P188) and pH values of aqueous phase (pH) and measured responses: average size (Z-ave), polydispersity index (PI), zeta potential (ZP) and entrapment efficiency (EE).

Briefly, an organic solution 90 mg PLGA in 5 mL of acetone containing the drug (0.495–1.504 mg/mL) was poured under moderate stirring into 10 mL of an aqueous solution adjusted to the desired pH value (4.65–6.34) from 6.64 to 13.36 mg/mL of P188. Acetone was then evaporated and the volume of NPs dispersion was concentrated to 10 mL under reduced pressure.

Physicochemical characterization

The Z-ave, PI, and ZP were determined by dynamic light scattering (DLS) with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) at 25 °C after appropriate dilution with ultra-purified water. Values are reported as the mean \pm standard deviation (SD) of three replicates.

The analysis of transmission electron microscopy (TEM) of the NPs was performed on a Tecnai Spirit instrument (FEI Co., Hillsboro, OR, USA) using 18,500 \times magnification. The sample preparation was performed by of the technique of negative staining using uranyl acetate solution 2%.

The EE of OA/UA in NPs was determined by measuring the concentration of non-entrapped drug in the dispersion medium. The formulation was diluted in water MilliQ (1:20) and put through filtration/centrifugation (Heraeus® Multifuge 3L-R, Fisher Scientific, Madrid, Spain) at 3000 rpm for 20 min at room temperature. The fraction of non-entrapped drug that passed through the filter was determined by HPLC. The EE was calculated using the following equation:

$$EE(\%) = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

where W_0 and W_1 are the total amounts of OA/UA and free drug in the filtrate, respectively.

Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC analysis was performed using a DSC30 device (Mettler-Toledo, Barcelona, Spain). Samples were heated from 4 °C to 300 °C at a rate of 10 °C/min under a nitrogen atmosphere (50 mL/min). Data were evaluated from the peak areas using the Mettler STARe V 9.01 DB software.

Rheological studies

Rheological properties of NPs were evaluated at 25 °C using a rotational rheometer HAAKE Rheostress 1 (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) equipped with a parallel plate geometry set-up with a fixed lower plate and an upper plate (Haake PP60 Ti, 6 cm diameter). Viscosity curves and flow curves were recorded for 3 min during the ramp-up period from 0 to 100 s⁻¹, 1 min at 100 s⁻¹ (constant share rate period) and finally 3 min during the ramp-down period from 100 to 0 s⁻¹. All determinations were performed in triplicate.

Stability studies

Physical stability of NPs was evaluated by the Turbiscan Lab® Expert (Formulation, France) to detect and determine destabilization phenomena (coalescence, flocculation, sedimentation, creaming, etc). The detection head scanned the entire height of the sample cell acquiring transmission (T) and backscattering (BS) each 40 μ m. Readings were taken at 0, 7, 15 and 30 days after the preparation at 25 °C.

The storage stability of OA/UA-loaded NPs at 4 °C and room temperature was also studied. The initial Z-ave, PI, ZP and EE of the formulations were measured immediately and after 15, 30, 90, and 180 days.

Release studies

The OA/UA release from the NPs was performed in amber glass Franz-type diffusion cells (FDC-400, Crown Glass Co.

Resultados

524

H.L. Alvarado et al / *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 11 (2015) 521–530

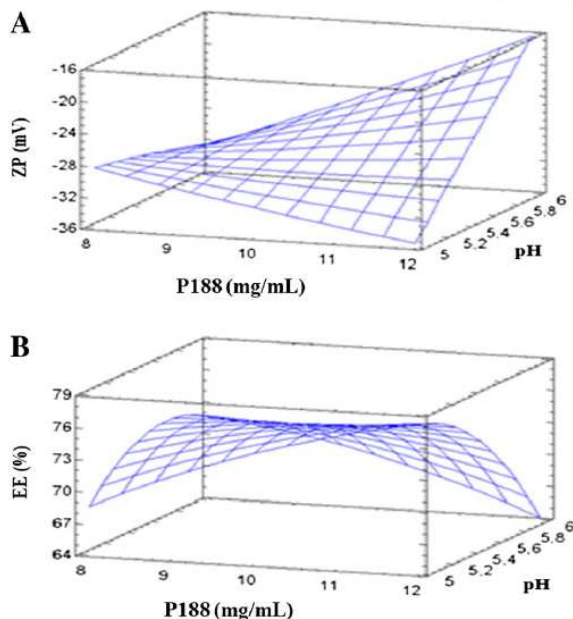


Figure 1. Surface response chart of: (A) the effect of the interaction between P188 and pH on zeta potential, and (B) the effect of the interaction between P188 and pH on entrapment efficiency.

Inc., Somerville, NJ, USA) with dialysis cellulose membranes (MWCO 12–14 kDa, Iberlabo, Madrid, Spain) between the donor and the receptor compartment (13 mL ethanol/water; 7:3; v/v) with 2.54 cm² diffusional area keeping sink conditions in the whole experiment at 32 ± 0.5 °C under continuous stirring. Three hundred μL samples were withdrawn at selected time intervals for 72 h and replaced with the same volume of fresh receptor medium. The concentration of released drug was measured in triplicate by HPLC. Values are reported as the mean ± SD.

Five different kinetic models (zero order, first order, Higuchi, Weibull and Korsmeyer–Peppas functions) were used to fit the experimental data obtained from drug release experiments. A nonlinear least-squares regression was performed using the WinNonLin® V. 3.3 software (Pharsight Co., Sunnyvale, CA, USA). The coefficient of determination (r^2) and the Akaike's information criterion (AIC) as a measure of goodness of fit based on maximum likelihood were used to select the model that best fitted experimental results.

Corneal permeation studies

The corneal permeation study was addressed using Franz diffusion cells as described previously. Excised corneas of male New Zealand albino rabbits from *in vivo* studies were used as permeation membranes. Animals were anesthetized with ketamine (25 mg/kg i.v.) and xylazine (0.1 mg/kg i.v.) and euthanized by an overdose of pentobarbital. The cornea was excised immediately and kept in Hank's solution. Fresh cornea was mounted between the donor and receptor compartment of the cell with the epithelial side facing the donor compartment. A constant temperature of 32 ± 0.5 °C was maintained throughout

the 6 h study. The corneal area available for diffusion was 0.64 cm². Transcutol® P was used as receptor medium assuring sink conditions and the cornea intactness.¹⁹ Osmolality of the sample was previously adjusted with glucose (310 mOsm/kg) since irritation associated with the instillation of hypo- or hypertonic suspensions may cause reflex tearing or blinking reflex.²⁰ Samples (1000 μL) were withdrawn from the receiver compartment at predetermined intervals: The removed volume was immediately replaced with the same volume of fresh receptor medium. Samples were analyzed in triplicate by HPLC. The apparent corneal permeability coefficients (P_{app} , cm · s⁻¹) were calculated according to the following equation:

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \times \frac{1}{A \times C_0 \times 60} \quad (2)$$

where $\Delta Q/\Delta t$ (μg/min) is the flux across the corneal tissue, A is the exposed corneal surface area (cm²), C_0 (μg/cm³) is the initial amount of OA/UA in the donor compartment and 60 is taken as the factor to convert min into s. The flux across the cornea was obtained from the slope of the regression line obtained from the linear part of the curve between the amount permeated (Q) vs time plot.²¹

At the end of the permeation study, the amount of formulation remaining on the cornea was eliminated. The cornea was removed from the cell and cleaned with gauze soaked in a 0.05% solution of sodium lauryl sulfate and washed in distilled water. The permeation area of the cornea was then excised and weighed. The OA/UA content was extracted with an aliquot of ethanol/water (7:3, v/v) by ultrasonication for 15 min and then analyzed by HPLC.

To determine the wet corneal weight, W_a , each corneal sample was carefully removed from the scleral ring and weighed. It was then desiccated at 80–100 °C for 6 h to determine the corresponding dry corneal weight, W_b . The percentage corneal hydration level (HL%) was defined as:

$$HL(\%) = \left(1 - \frac{W_b}{W_a}\right) \times 100 \quad (3)$$

HPLC analysis

The HPLC method was validated according to International Conference on Harmonization guidelines. The system consisted of a Waters® 515 HPLC Pump with 717 Plus autosampler and a 2487 dual λ absorbance detector (Waters, Milford, MA, USA). The analytical column was a Kromasil® 100 C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, Teknokroma, Barcelona, Spain). The compounds were detected at λ = 210 nm. Flow rate was 1.0 mL/min and acetonitrile/water ratio was 85:15 (v/v) during the mobile phase. The injection volume was 10 μL.

In vitro ocular irritation test

To evaluate the potential ocular irritation of the formulations the Hen's Egg Test Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) test method was used. For this purpose 6 chicken eggs with 10-day-old were utilized for each formulation and 2 eggs for controls (treated with NaOH 0.1 N as positive control and NaCl

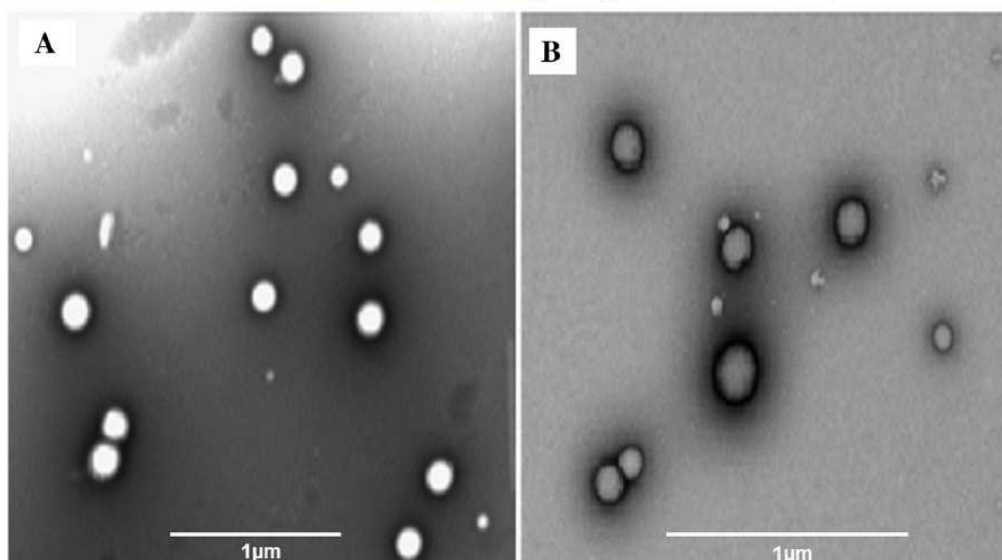


Figure 2. Transmission electron microscopy analysis of: (A) NM-OA/UA NPs, and (B) SM-OA/UA NPs.

0.9% as negative control). NPs were added to the CAM and left in contact for 5 min. The measured effects were the onset of: hemorrhage (bleeding from the vessels), vascular lysis (blood vessel disintegration) and coagulation (intra- and extra-vascular protein denaturation). The ocular irritation index (OII) was calculated by the expression:

$$\text{OII} = \frac{(301-h) \times 5}{300} + \frac{(301-l) \times 7}{300} + \frac{(301-c) \times 9}{300} \quad (4)$$

where h , l and c are times (s) of the beginning of hemorrhage, lysis and coagulation, respectively. The following classification was used: $\text{OII} \leq 0.9$ slightly irritating; $0.9 < \text{OII} \leq 4.9$ moderately irritating, $4.9 < \text{OII} \leq 8.9$ irritating and $8.9 < \text{OII} \leq 21$ severely irritating.

In vivo studies

New Zealand male albino rabbits (4.10 to 4.40 kg, St. Feliu de Codines, Barcelona, Spain) were housed in plastic cages with a 12 h light/dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. Animals were acclimatized to temperature and humidity in controlled facilities for at least 7 days before the experiment. All rabbits were accustomed to handling (30 min per day for 3 days) and to the testing equipment. These studies were performed according to the association for research in vision and ophthalmology resolution of the use of animals in research and approved by the animal research ethical committee of the University of Barcelona according to the regulations of the Spanish Government (Law 32/2007 of 7 November 2007, and Royal Decree 1201/2005 of 10 October) with necessary humane care.

Draize test

In vivo eye irritation was evaluated by the Draize eye test. A single instillation of 50 μL of each sample was instilled in one eye using the untreated contralateral eye as a control. Readings

were made 1 h after the test substance was applied, then after 1, 2, 3, 4, and 7 days. The method provided an overall scoring system for grading the severity of ocular lesions involving the cornea (opacity), iris (inflammation degree), and conjunctiva (congestion, swelling, and discharge). The draize score was determined by visual assessment of changes in these ocular structures. The mean total score (MTS) was calculated as follows:

$$\text{MTS} = \sum \frac{x_1(n)}{5} + \sum \frac{x_2(n)}{2} + \sum \frac{x_3(n)}{5} \quad (5)$$

where $x_1(n)$, $x_2(n)$, and $x_3(n)$ are the cornea, conjunctiva, and iris scores, respectively, being n the number of rabbits included in the assay.

Anti-inflammatory effect

The anti-inflammatory efficacy of OA/UA NPs was tested in animals by instillation of a single dose of 50 μL of each formulation of NPs or 0.9% (w/v) isotonic saline solution (control) in the conjunctival sac of the left eye. The contralateral eye was used as untreated control. After 30 min, 50 μL of 0.5% (w/v) sodium arachidonate solution (SAS) in PBS (pH 7.4) was instilled in the left eye. Inflammation was quantified 30, 60, 90, 120 and 150 min after instillation of SAS. Ocular changes were graded according the MTS as described previously.²²

Results

Optimization and characterization of NPs

Z-ave of formulations ranged between 204.4 ± 1.18 and 234.8 ± 1.27 nm (Table 2). The values of the effects and interactions were also calculated. In case of positive values, a higher Z-ave is expected, whereas a decrease in Z-ave will be

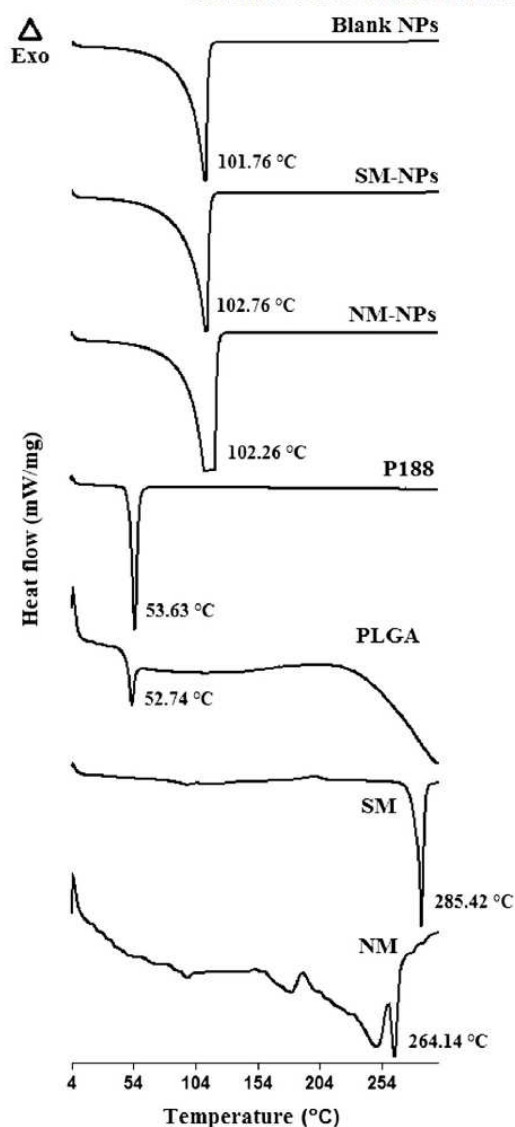


Figure 3. DSC curves of NM, SM, PLGA, P188, blank NPs, NM-OA/UA NPs and SM-OA/UA NPs.

observed with negative values. The variable amount of OA/UA provided a positive effect on the Z-ave (2.043 ± 4.45 nm). Conversely, the amount of P188 and pH provided negative effects (-6.212 ± 4.45 and -9.219 ± 4.45 nm, respectively). ZP values ranged from -7.60 ± 0.78 to -38.3 ± 0.81 mV (Table 2). EE values varied from 54.55 ± 3.09 to 80.15 ± 0.62 (Table 2). The significant effects and interactions after ANOVA analysis for each factor demonstrated the significance ($P < 0.05$) of main effects and interactions with amount of OA/UA (negative effect -10.77) and the interaction between pH and the amount of P188 (negative effect -8.57) suggesting an inversely proportional relationship in both cases. The response surface graphs based on ANOVA results are shown in Figure 1. Based on the results obtained in the CCRD the formulation composed of 1.0 mg/mL of OA/UA, 10.0 mg/mL of surfactant

(P188) and the aqueous phase with a pH value of 5.5 was selected to continue the study. These exhibited Z-ave of 222.75 ± 2.19 nm, PI 0.091 ± 0.022 , ZP of -27.30 ± 1.63 mV and EE of $76.55 \pm 3.92\%$ for SM-OA/UA NPs, and Z-ave of 211.80 ± 1.83 nm, PI 0.100 ± 0.026 , ZP -26.90 ± 0.27 mV and EE $78.45 \pm 2.40\%$ for NM-OA/UA NPs. TEM images of NPs are shown in Figure 2. It can be observed the spherical shape of the particles with a size around 200 nm, suitable for ophthalmic application, in line with DLS results.

DSC analysis

The DSC curves of the formulations, NM, SM, PLGA and P188 are shown in Figure 3. As can be observed NM and SM exhibited melting peaks at 264.14 °C and 285.42 °C respectively. PLGA thermogram displayed a thermal event at 52.74 °C corresponding to the polymer glass transition temperature (Tg), while P188 showed a peak at 53.63 °C. When NPs were analyzed an increment in Tg for the polymer and surfactant in all formulations appeared with peaks at 101.76 °C, 102.76 °C and 102.26 °C for blank-NPs, SM-OA/UA NPs and NM-OA/UA NPs, respectively.

Rheological studies

Flow and viscosity curves of NPs are provided as supplementary material. In both cases curves presented nearly constant viscosity values with an increasing shear rate indicating a Newtonian behavior. Viscosity values at 100 s⁻¹ were 2.5 ± 0.5 and 1.3 ± 0.08 mPa · s for SM-OA/UA NPs and NM-OA/UA NPs, respectively.

Stability studies

BS profiles of SM-OA/UA NPs and NM-OA/UA NPs for different days at 25 °C are provided as supplementary material. The left side of the profile (bottom of the vial) and along the vial hardly shows any variation. However, the final right side (top of the vial) shows a slight variation. As shown Table 3, data obtained from Turbiscan Lab® analysis were in agreement with those obtained from DLS. Equally, no significant variation on Z-ave, PI, ZP, EE or visual appearance was observed in NPs stored at 4 °C or 25 °C over time.

Release study and kinetic evaluation

Figure 4, A shows the OA/UA release profiles from the NM-OA/UA NPs and SM-OA/UA NPs. The NM reached the 75% of drug release after 40 h, but SM spent 72 h to reach this rate. Since 15 until 40 h the release rates were significantly different, being the NM-OA/UA NPs the most suitable. Within the first hours no significant burst effect was observed. Table 4 shows the kinetics and model fitting parameters. On the base of the lowest AIC and r^2 closest to one the model that best explains statistically the process of release of OA/UA from NPs was Weibull.

Corneal permeation studies

As illustrated in Figure 4, B after 6 h the amount of drug permeated through the corneal tissue was similar between

Table 3

Influence of temperature (°C) and time storage period (days) on Z-ave (nm), PI, ZP (mV) and EE (%) of NM-OA/UA and SM-OA/UA loaded PLGA NPs.

Time	Temp.	SM-NPs				NM-NPs			
		Z-ave ± SD	PI ± SD	ZP ± SD	EE ± SD	Z-ave ± SD	PI ± SD	ZP ± SD	EE ± SD
0	4	222.0 ± 0.57	0.080 ± 0.01	-27.3 ± 1.63	78.05 ± 1.40	210.6 ± 2.89	0.098 ± 0.04	-25.1 ± 1.56	77.44 ± 0.82
	25	222.0 ± 0.57	0.080 ± 0.01	-27.3 ± 1.63	78.05 ± 1.40	210.6 ± 2.89	0.098 ± 0.04	-25.1 ± 1.56	77.44 ± 0.82
15	4	220.7 ± 1.88	0.078 ± 0.01	-25.4 ± 0.95	76.32 ± 0.58	213.9 ± 1.82	0.097 ± 0.02	-26.7 ± 1.53	75.03 ± 1.96
	25	218.6 ± 2.21	0.089 ± 0.03	-26.2 ± 2.54	75.35 ± 2.44	215.6 ± 2.22	0.098 ± 0.01	-24.7 ± 0.87	73.80 ± 1.22
30	4	221.5 ± 1.99	0.080 ± 0.03	-26.8 ± 0.53	76.02 ± 1.03	215.3 ± 2.70	0.097 ± 0.01	-24.7 ± 0.98	73.12 ± 3.67
	25	227.9 ± 1.53	0.088 ± 0.01	-29.0 ± 1.96	73.74 ± 1.76	218.8 ± 2.05	0.085 ± 0.02	-24.5 ± 2.13	73.42 ± 1.05
90	4	225.9 ± 1.02	0.083 ± 0.04	-26.6 ± 0.44	74.11 ± 0.23	222.1 ± 3.64	0.099 ± 0.02	-25.6 ± 1.02	70.78 ± 1.04
	25	228.1 ± 2.59	0.089 ± 0.03	-23.7 ± 2.53	70.15 ± 2.00	226.1 ± 3.99	0.100 ± 0.02	-25.0 ± 2.47	70.55 ± 0.76
180	4	227.5 ± 0.68	0.084 ± 0.01	-25.2 ± 1.60	73.77 ± 0.89	222.6 ± 3.61	0.098 ± 0.03	-23.7 ± 0.43	68.03 ± 1.95
	25	230.7 ± 1.69	0.090 ± 0.02	-24.0 ± 0.66	68.04 ± 2.00	228.9 ± 2.35	0.112 ± 0.02	-23.1 ± 2.70	65.12 ± 4.34

mixtures, 22% and 24% of the initial amount of OA/UA for SM and NM loaded NPs, respectively. At the end of the study amounts of drug retained in the cornea were 1.74 ± 0.38 and 2.63 ± 0.27 mg/cm² · g, corresponding to 43% and 51% of the initial amount (SM-OA/UA and NM-OA/UA loaded NPs, respectively). The P_{app} values were similar, 3.74 ± 0.19 and 3.36 ± 0.49 cm · s⁻¹. However, flux values were different, 42.08 ± 2.97 and 35.72 ± 3.45 µg/h · cm² (SM-OA/UA and NM-OA/UA loaded NPs, respectively).

In vitro ocular irritation test

After applying the NPs of NM-OA/UA and SM-OA/UA directly on the CAM of chicken embryos no signs of ocular irritation were observed within the 5 min that are required to detect any signs of irritation as hemorrhage, vascular lysis or coagulation. An OII of 0.07 was obtained.

Draize test

Values of MTS were 0 in all cases confirming the results observed in the *in vitro* HET-CAM test. Then, NPs were classified as non-irritating and safe for ophthalmic administration.

Anti-inflammatory efficacy

As seen in Figure 5 during the first 120 min no statistically significant differences were observed between NM-OA/UA NPs and SM-OA/UA NPs. After 90 min both types of NPs exhibited significant differences when compared with SAS. Finally, after 150 min, NM-OA/UA NPs exhibited statistically higher anti-inflammatory effect than SM-OA/UA NPs.

Discussion

Screening and optimization by RSM are considered as the two major applications of design-of-experiment approach in pharmaceutical sciences. PLGA, approved by the US food and drug administration has been extensively used for controlled drug delivery systems because of its biocompatibility and

biodegradability.²¹ P188 was chosen as surfactant to stabilize particulate systems in aqueous suspension due to its non-ionic character. It does not induce strong ocular irritancy and is accepted by the regulatory authorities for ocular administration.²³

Morphometrical properties (Z-ave and PI) and the physical stability of colloidal systems are considered as the limiting parameters in the development of drug delivery systems for topical ocular application to avoid corneal irritation and to control the residence time at the eye surface. Concretely, Z-ave should not exceed 10 µm, since larger sizes could produce a scratching feeling.²⁴ Results indicated no significant effect of variables and interactions in Z-ave ($P > 0.05$). Most of formulations showed low PI values (monodispersed systems) oscillating from 0.047 ± 0.013 to 0.104 ± 0.025 (Table 2). No statistically significant effects were also observed between variables and their interactions in PI ($P > 0.05$).

ZP is other important physicochemical parameter since it influences the long-term physical stability, as well as, the potential mucoadhesive properties. High ZP values, either positively or negatively charged, tend to stabilize particle suspensions due to electrostatic repulsion between particles with the same electrical charge avoiding aggregation. The negative charge of PLGA NPs has been previously reported due to the ionization of carboxylic-end groups of polymer on their surface.²⁵ ANOVA results showed that the interaction between the amount of P188 and pH had a significant effect ($P < 0.05$) in ZP values. Values of the coefficients of ANOVA analysis are related to the effect of these variables on the response. A positive sign indicates a synergistic effect while a negative term indicates an antagonistic effect upon the response. The larger coefficient means that the independent variable has more potent influence on the response.

From DSC curves of NM-OA/UA NPs and SM-OA/UA NPs, it was observed that the melting peak of the trieripene mixtures totally disappeared suggesting the absence of free crystalline drug in NPs. The polymer may inhibit the drug crystallization during NPs formation.²¹ However, there was an increment in Tg of PLGA and P188. This was also observed in blank NPs. It might be due to the interaction between the polymer and the surfactant during solvent evaporation in the elaboration stage of

Resultados

528

H.L. Alvarado et al / Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 11 (2015) 521–530

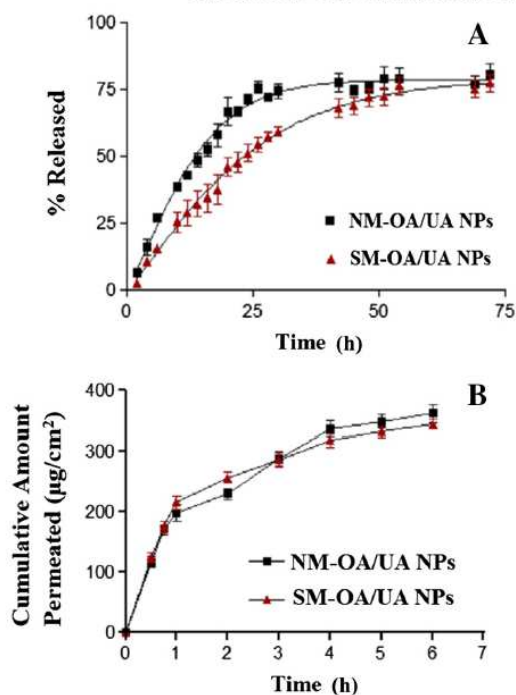


Figure 4. *In vitro* release profiles NM-OA/UA NPs and SM-OA/UA NPs (A), and *ex vivo* permeated profiles of NM-OA/UA NPs and SM-OA/UA NPs (B).

NPs since the mobility of the PLGA chains in their glassy state depends on the interaction of the polymer with others components of the formulation, such as drugs, additives or surfactants.²⁶

The obtained low viscosity values allow for sterile filtration and easy dispensing as eye drops, while the Newtonian behavior ensures that blinking should have no effect on viscosity.²⁷

One of the most important parameters to evaluate colloidal systems is their long term physical stability, since it controls the validity and the required storage conditions. No variation of particle size occurs when the BS profile is within the interval $\pm 2\%$, variations greater than 10% either as positive or negative value are representative of instability. Both SM-OA/UA NPs and NM-OA/UA NPs exhibited a continuous BS signal in that interval. Thus it could be considered that optimized formulations were stable systems. The slight variation occurred at the top of the vial could be due to the meniscus of the sample in contact with the wall.

In the drug-carrier system design the evaluation of the rate at which the drug is released from the vehicle is particularly important. It can be used as quality control data to predict *in vivo* behavior or to study the structure and release mechanisms. Weibull has been typically considered as an empirical equation, in which, the value of the exponent β (a dimensionless shape parameter) is an indicator of the mechanism of diffusion release. On the use of the Weibull function for the discernment of drug

release mechanisms β value higher than 1 is an indication that the drug transport followed a complex release mechanism.²⁸ Our results showed $\beta = 1.35 \pm 0.25$ (CV = 6.04%) and 1.28 ± 0.09 (CV = 7.22%) for SM and NM, respectively, described as a sigmoid curve indicative of complex release mechanism; the rate of release does not change monotonically. T_d is the dissolution time and represents the time interval necessary to dissolve or release 63.2% of drug. In our case, T_d values were 22.34 ± 7.67 and 13.49 ± 1.52 h (SM and NM, respectively). The difference could be explained by the presence of other substances in the NM that would act as promoters.

According to permeation data, it can be assumed that the drug would exert a local action on the cornea because most of this is retained in this area. Therefore, a powerful effect would be expected for NM. HL is a parameter frequently used to evaluate damage of the tissue. The normal cornea has an HL of 76%–80%.²⁹ HL values of 3%–7% above the normal value are indicative of epithelium or endothelium damage. Percentages of HL are maintained within the accepted range 78.79%–81.35% for NM-OA/UA NPs and SM-OA/UA NPs, respectively, assuring that the OA/UA or the Transcutol® P did not cause any damage to the corneal tissue.

The evaluation of the ocular tolerability is mandatory requirement. In our case, the OII of 0.07 confirmed that NPs did not exert irritation. This was further re-enforced by *in vivo* assay. The application of both types of NPs on the rabbit eyes showed no sign of toxicity or irritation to the external ocular tissues. NPs are well suited for use on damaged or inflamed eyes because they are based on biocompatible materials.¹³

The anti-inflammatory activity in rabbits of NPs exhibited a decrease in the ocular inflammation caused by instillation of SAS. After 150 min, NM-OA/UA NPs exhibited statistically higher anti-inflammatory effect than SM-OA/UA NPs. It may be due mainly to the greater retained amount of triterpenes provided by NM-OA/UA NPs on the cornea, resulting in a reservoir effect of the drug and promoting the continuity of the pharmacological action.

In summary, to accomplish the demand for efficient ocular drug delivery systems this study reports an approach on the use of a CCRD design for the optimization of PLGA NPs containing SM or NM of OA/UA elaborated by solvent displacement method. These formulations exhibited good stability properties due to low Z-ave and PI values, with negative ZP, even upon storage after 6 months at both specified conditions. Both types of NPs exhibited Newtonian behavior and low viscosity allowing sterile filtration and easy administration. Triterpenes were release from optimized nanoplatforms in a sustained manner following a complex mechanism being the NM-OA/UA NPs the most suitable. Concerning the corneal permeation from NPs, the encapsulated drug was delivered at a constant rate with enhanced accumulation into the ocular tissue creating a reservoir able to prolong the ocular residence time and more powerful effect of the NM. Eye-irritating effects were neither observed *in vitro* nor *in vivo* Draize test. Finally, *in vivo* studies suggested that optimized OA/UA loaded NPs can be expected to gain considerable attention for ocular anti-inflammatory treatment.

Table 4
Parameters, coefficient of determination and AIC for kinetics models.

Model	Parameters	Formulations		
		NM-OA/UA NPs	SM-OA/UA NPs	
Zero order	$Q_t = K_0 t + Q_\infty$	K_0	-1.00E-05	-4E-06
		Q_∞	60.05	48.28
		r^2	0.6341	0.8570
		AIC	197.10	198.75
First order	$Q_t = Q_\infty(1 - e^{-K_f \cdot t})$	K_f	-2.00E-05	-1.2E-05
		r^2	0.7491	0.9457
		AIC	242.51	234.91
Higuchi	$Q_t = K_{H1} t^{1/2}$	K_{H1}	9.97	11.30
		r^2	0.8073	0.9591
		AIC	162.51	131.60
		K_k	18.22	7.93
Korsmeyer–Peppas	$Q_t = K_k t^n$	n	0.38	0.55
		r^2	0.8534	0.9137
		AIC	158.38	137.00
		β	1.28	1.35
Weibull	$Q_t = Q_\infty[1 - e^{-(t/t_d)^{\beta}}]$	T_d	13.49	22.34
		r^2	0.9099	0.9618
		AIC	104.05	86.87

Q_t = cumulative percentage of drug release at time t ; Q_∞ = maximum amount of dissolved drug; K_0 , K_f , K_{H1} , K_k = release rate constants; t = time in hours; β = shape parameter; t_d = dissolution time; r^2 = determination coefficient; AIC = Akaike's information criterion.

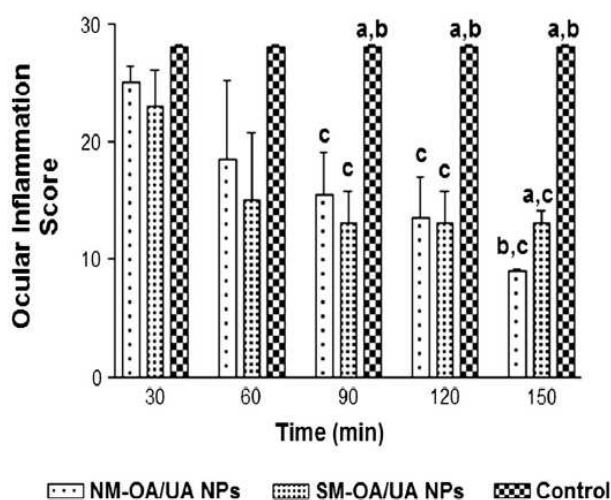


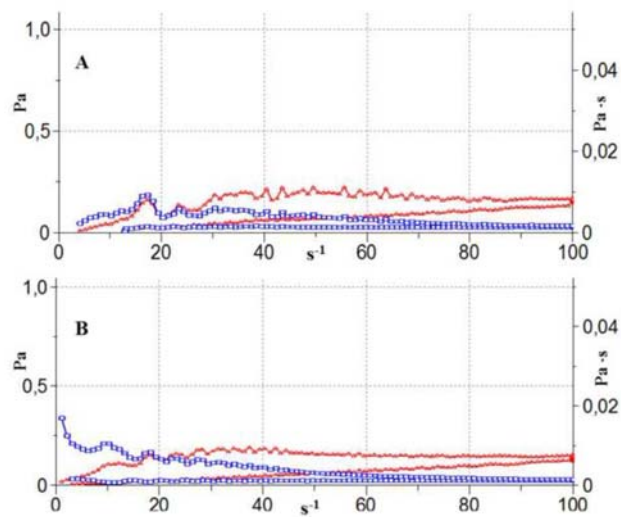
Figure 5. Anti-inflammatory efficacy of NPs after SAS induced inflammation in the rabbit eye. Mean \pm SD ($n = 3$). Statistically significant differences $P < 0.05$ regarding ^aNM-OA/UA NPs, ^bSM-OA/UA NPs and ^ccontrol (SAS).

References

- Vasconcelos MA, Royo VA, Ferreira DS, Crotti AE, Andrade e Silva ML, Carvalho JC, et al. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). *Z Naturforsch C* 2006;61:477-82.
- Laszczyk M. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Med* 2009;75:1549-60.
- Kwon T, Lee B, Chung SH, Kim D, Lee Y. Bull, synthesis and NO production inhibitory activities of ursolic acid and oleanolic acid derivatives. *Korean Chem Soc* 2009;30:119-23.
- Liu J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *J Ethnopharmacol* 2005;100:92-4.
- Hsu H, Yangb J, Linb C. Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. *Cancer Lett* 1997;3:7-13.
- Yim TK, Wu WK, Pak WF, Ko KM. Hepatoprotective action of an oleanolic acid-enriched extract of *Ligustrum lucidum* fruits is mediated through an enhancement on hepatic glutathione regeneration capacity in mice. *Phytother Res* 2001;15:589-92.
- Senthil S, Chandramohan G, Pugalendi KV. Isomers (oleanolic and ursolic acids) differ in their protective effect against isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. *Int J Cardiol* 2007;119:131-3.

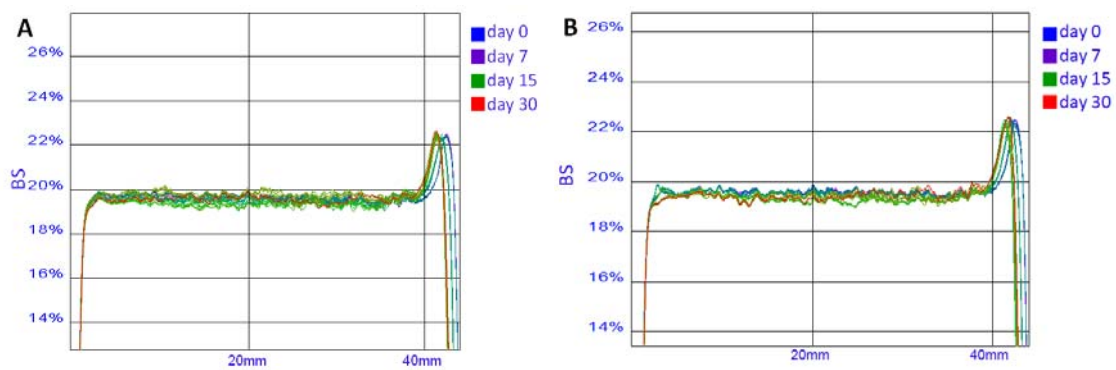
8. Resende F, Mattos C, da Silva M, Hibary F, Cunha W, Tavares D. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice. *Life Sci* 2006;**79**:1268-73.
9. Araújo J, Gonzalez E, Egea MA, Garcia ML, Souto EB. Nanomedicines for ocular NSAIDs: safety on drug delivery. *Nanomedicine* 2009;**5**:394-401.
10. Holden CA, Tyagi P, Thakur A, Kadam R, Jadhav G, Kompella UB, et al. Polyamidoamine dendrimer hydrogel for enhanced delivery of anti-glaucoma drugs. *Nanomedicine* 2012;**8**:776-83.
11. Karalezli A, Borazan M, Akova YA. Intracameral triamcinolone acetonide to control postoperative inflammation following cataract surgery with pharmacoemulsification. *Acta Ophthalmol* 2008;**86**:183-7.
12. Agnihotri SM, Vavia PR. Diclofenac-loaded biopolymeric nanosuspensions for ophthalmic application. *Nanomedicine* 2009;**5**:90-5.
13. Gupta H, Aqil M, Khar RK, Ali A, Bhatnagar A, Mittal G. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomedicine* 2010;**6**:324-33.
14. Das S, Suresh PK, Desmukh R. Design of Eudragit RL 100 nanoparticles by nanoprecipitation method for ocular drug delivery. *Nanomedicine* 2010;**6**:318-23.
15. Nagarwal RC, Kant S, Singh PN, Maiti P, Pandit JK. Polymeric nanoparticulate system: a potential approach for ocular drug delivery. *J Control Release* 2009;**136**:2-13.
16. Araujo J, Vega E, Lopes C, Egea MA, Garcia ML, Souto EB. Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 2009;**72**:48-56.
17. Gonzalez-Mira E, Egea MA, Souto EB, Calpena AC, Garcia ML. Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for ocular delivery. *Nanotechnology* 2011;**22**:1-15 [045101].
18. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm* 1989;**55**:R1-4.
19. Liu Z, Li J, Nie S, Guo H, Pan W. Effects of Transcutol P on the corneal permeability of drugs and evaluation of its ocular irritation of rabbit eyes. *J Pharm Pharmacol* 2006;**58**:45-50.
20. Thomas ML, Szeto VR, Gan CM, Polse KA. Sequential staining: the effects of sodium fluorescein, osmolality, and pH on human corneal epithelium. *Optom Vis Sci* 1997;**74**:207-10.
21. Vega E, Gamisans F, Garcia ML, Chauvet A, Lacoulonche F, Egea MA. PLGA nanospheres for the ocular delivery of flurbiprofen: drug release and interactions. *J Pharm Sci* 2008;**97**:5306-17.
22. Wilhelmus KR. The Draize eye test. *Surv Ophthalmol* 2001;**45**:493-515.
23. McLain VC. Safety assessment of poloxamers 101, 105, 108, 122, 123, 124, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 212, 215, 217, 231, 234, 235, 237, 238, 282, 284, 288, 331, 333, 334, 335, 338, 401, 402, 403, and 407, poloxamer 105 benzoate, and poloxamer 182 dibenzoate as used in cosmetics. *Int J Toxicol* 2008;**27**:93-128.
24. Zimmer A, Kreurer J. Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 1995;**16**:61-73.
25. Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illum L, Davis SS. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J Control Release* 1999;**57**:171-85.
26. Bouissou C, Rouse JJ, Prince R, Van der Walle F. The influence of surfactant on PLGA microsphere glass transition and water sorption: remodeling the surface morphology to attenuate the burst release. *Pharm Res* 2006;**23**:1295-305.
27. Fialho SL, da Silva-Cunha A. New vehicle based on a microemulsion for topical ocular administration of dexamethasone. *Clin Experiment Ophthalmol* 2004;**32**:626-32.
28. Papadopoulou V, Kosmidis K, Vlachou M, Macheras P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *Int J Pharm* 2006;**309**:44-50.
29. Maurice DM, Riley MV. Ocular pharmacokinetics. In: Gragmore CN, editor. *Biochemistry of the eye*. London: Academic Press; 1970. p. 6-16.

Supplementary data



Rheograms showing the shear stress (Pa) and the viscosity ($Pa \cdot s$) of: (A) NM-OA/UA NPs, and (B) SM-OA/UA NPs.

Resultados



Backscattering (BS) profiles of: A) NPs of NM-OA/UA and B) NPs of SM-OA/UA as a function of sample height (nm) analyzed during 24 hours.

Artículo 3.

Alvarado, H.L., Abrego, G., Souto, E.B., Garduño-Ramírez, M.L., Clares, B., García, M.L.,
Calpena, A.C.

Nanoemulsions for dermal controlled release of oleanolic and ursolic acids: in vitro, ex vivo
and in vivo characterization.

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 130 (2015) 40–47.

3.3. Nanoemulsions for dermal controlled release of oleanolic and ursolic acids: in vitro, ex vivo and in vivo characterization.

Resumen

Se desarrollaron y caracterizaron nanoemulsiones conteniendo mezcla natural y sintética de triterpenos pentacíclicos antiinflamatorios para administración dérmica. Para el desarrollo de las nanoemulsiones se construyó un diagrama pseudo-ternario de fases, donde en primer lugar se probó la solubilidad de los compuestos triterpenoides en diferentes aceites, tensioactivos y co-tensioactivos. Fueron seleccionados los que presentaron mejor solubilidad, no tóxicos o irritantes y de mayor y fácil accesibilidad, estos fueron el aceite de castor como fase oleosa; labrasol como tensioactivo; transcutool-p como co-tensioactivo y propilenglicol como fase acuosa. La fase oleosa, fase acuosa y S_{mix} (mezcla de tensioactivo/co-tensioactivo) son los componentes de cada lado del diagrama. Se probaron 6 diferentes ratios de S_{mix} , por cada diagrama se elaboraron 9 diferentes combinaciones del aceite y un ratio específico de S_{mix} . Los diagramas de fase oleosa, acuosa y S_{mix} se desarrollaron usando el método de titulación acuosa. Se seleccionó la nanoemulsión con las mejores propiedades físicas (tamaño de gota pequeño y bajo índice de polidispersidad). La formulación seleccionada a seguir con los ensayos fue la que estaba formada por 20% de aceite de castor, 20% propilenglicol, 59.80% de S_{mix} con ratio 4:1 (47.82% de labrasol y 11.96% de transcutool-p) y 0.2% de las mezclas de OA/UA.

Se obtuvieron valores de tamaño de gota entre 200.95 y 590.54 nm e índice de polidispersidad entre 0.252 a 0.734 para la mezcla natural y valores de tamaño de gota entre 139.70 y 450.89 nm e índice de polidispersidad entre 0.185 a 0.664 para la mezcla sintética. Se pudo observar que el tamaño de gota se vio afectado por la concentración de la fase oleosa, donde al incrementar el porcentaje de aceite, aumentaba el tamaño; por otro lado, la concentración de S_{mix} tuvo el efecto contrario, donde al incrementar el porcentaje de S_{mix} , el tamaño de gota disminuyó, el índice de polidispersidad tuvo los mismos efectos que en el tamaño de gota en ambas mezclas. Las nanoemulsiones mostraron valores bajos de viscosidad y un comportamiento Newtoniano en ambas formulaciones.

Resultados

Con respecto a la estabilidad física, no hay presencia de cambios en los perfiles de transmitancia. Los compuestos mostraron un perfil cinético de liberación ajustado al modelo de Korsmeyer-Peppas, donde el parámetro “n” de esta ecuación nos indicó que hay una difusión no Fickiana o anómala. Se puede observar que no hay cambios significativos entre ambas mezclas.

En el estudio de permeación se pudo apreciar que hay diferencias a las primeras 4 horas del estudio entre ambas formulaciones, donde hay mayor cantidad permeada de la mezcla sintética en comparación con la mezcla natural, esto puede ser atribuido a la afinidad de los triterpenos con los componentes de la nanoemulsión. La cantidad retenida en la piel fue mayor que en capas más profundas, demostrando que los sistemas son apropiados para un efecto local. Se evaluó el ensayo de irritación dérmica primaria en el torso de conejos, donde se obtuvieron valores considerando los productos no tóxicos y seguros para aplicación dérmica. También se evaluó la actividad antiinflamatoria en oreja de ratón donde se observó que la mezcla natural mostró una inhibición del $76.19 \pm 1.59\%$, más del doble que la mezcla sintética ($33.86 \pm 1.83\%$), esto puede ser a que hay más cantidad retenida en la oreja de ratón de la mezcla natural y a su vez esta mezcla puede tener más componentes con actividad antiinflamatoria que potencien el efecto.



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

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

Nanoemulsions for dermal controlled release of oleanolic and ursolic acids: In vitro, ex vivo and in vivo characterization



H.L. Alvarado^{a,b}, G. Abrego^{a,b}, E.B. Souto^{c,d,*}, M.L. Garduño-Ramirez^e,
B. Clares^f, M.L. García^b, A.C. Calpena^{a,**}

^a Department of Biopharmacy and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

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

^c Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra (FFUC), Pólo das Ciências da Saúde, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra, Portugal

^d Center for Neuroscience and Cell Biology & Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences (CNC-IBILI), University of Coimbra,

Pólo das Ciências da Saúde, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra, Portugal

^e Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad No. 1001, Col Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^f Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2015

Received in revised form 24 March 2015

Accepted 31 March 2015

Available online 7 April 2015

Keywords:

Oleanolic acid

Ursolic acid

Nanoemulsion

Topical administration

Anti-inflammatory activity

ABSTRACT

The aim of the present study was to design and optimize a nanoemulsion for dermal administration of mixtures of natural or synthetic pentacyclic triterpenes with recognized anti-inflammatory activity. The composition of the developed nanoemulsions was obtained from pseudo-ternary phase diagrams, composed of castor oil as the oil phase, labrasol as the surfactant, transcutoil-P as co-surfactant and propylene glycol as the aqueous phase. Different ratios of surfactant/co-surfactant mixture (S_{mix}) (4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 and 1:4) were produced, and S_{mix} 4:1 was chosen based on the greater area of optimal nanoemulsion conditions. Two different nanoemulsions of mean droplet size below 600 nm were produced, loading mixtures of natural or synthetic pentacyclic triterpenes, respectively. The viscosity of nanoemulsion containing natural pentacyclic triterpenes was 51.97 ± 4.57 mPa s and that loaded with synthetic mixtures was 55.33 ± 0.28 mPa s. The studies of release and skin permeation were performed using Franz diffusion cells, adjusting the release kinetics of both formulations to Korsmeyer-Peppas model. No significant differences in permeation parameters between the two nanoemulsions were observed. The amount of drug retained in the skin was higher than the amount of drug that has permeated, favoring a local action. The results of the in vivo tests demonstrated that the developed formulations were not toxic and not irritant to the skin. The formulation loading a mixture of natural triterpenes showed greater ability to inhibit inflammation than that loading the synthetic mixture. The findings clearly corroborate the added value of o/w nanoemulsions for dermal delivery of pentacyclic triterpenes.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pentacyclic triterpenes are an important class of natural products with recognized anti-carcinogenic and anti-inflammatory activity, figuring in many medicinal plants [1–3]. These compounds

are similar in their biogenesis to steroids, in the cyclization of squalene and in their pleiotropic actions. The molecules having the skeleton of lupane, oleanane and ursane, are primarily responsible for the anti-inflammatory activity of a variety of species of medicinal plants [1,3,4]. Several mechanisms by which these triterpenes exhibit anti-inflammatory activity may be involved, being notable the inhibition of enzymes involved in the production of eicosanoids, such as cyclooxygenase (COX1 and COX2) and phospholipase A2 (PLA2), inhibiting the release of cytokines, histamine, serotonin, and some interaction with serine/threonine kinases [5,6].

Pentacyclic triterpenes bearing oleanane and ursane based structures, i.e. oleanolic acid (OA) and its isomer ursolic acid (UA), are found in food, in medicinal herbs and in various other natural plants in the form of free acid or aglycones for triterpenoid

* Corresponding author at: Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra (FFUC), Pólo das Ciências da Saúde, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra, Portugal. Tel.: +351 239 488 400; fax: +351 239 488 503.

** Corresponding author. Tel.: +34 93 4024560; fax: +34 93 4024563.

E-mail addresses: ebsouto@ff.uc.pt (E.B. Souto), anacalpena@ub.edu (A.C. Calpena).

saponins [7,8]. These triterpenoids have similar chemical structure and their therapeutic and biological interest relies on their anti-inflammatory, anti-cancerous, anti-fungal, hepatoprotective, anti-oxidant, anti-microbial, anti-allergic, and anti-viral activities [9–17]. Given these diverse biological effects, pentacyclic triterpenes, such as OA and UA, have been exploited for a range of biomedical applications, in particular, for topical administration.

We report a new approach to deliver OA and UA formulated in nanoemulsions specifically designed for cutaneous drug delivery. The main objectives of this work included: (i) the design, development, optimization and characterization of nanoemulsions with mixtures of natural or synthetic anti-inflammatory triterpenes for topical administration; (ii) the description of the release kinetics and permeation mechanism of developed nanoemulsions; and (iii) the analysis of the anti-inflammatory activity of the loaded triterpenes.

Nanoemulsions are emulsified systems that have a very small drop size, less than 1 μm (typically is in the range 20–200 nm), and with low polydispersity. Such properties provide them with a high kinetic stability, being transparent or translucent to the naked eye. Since nanoemulsions are thermodynamically unstable systems and cannot be formed spontaneously, they require energy input for production. The energy can be provided by methods of dispersion (brute force) or by physicochemical methods (condensation or low energy). Due to their properties, nanoemulsions are of great interest for chemical, pharmaceutical, cosmetic, and food industries. The pharmaceutical field is of great interest because nanoemulsions can be tailored for the delivery of a set of drugs [18,19]. Due to their small size, nanoemulsions can penetrate through the rough surface of the skin enhancing the skin penetration of the drugs. The skin administration may therefore be an advantage circumventing the chemical/enzymatic degradation from the gut and the first pass metabolism upon oral administration.

2. Material and methods

2.1. Plant material

Leaves of *Plumeria obtusa* L. var. *sericifolia* (C. Wright ex Griseb.) Woodson (Apocynaceae), were collected in Calakmul, Campeche, Mexico. The first collect of the plant was carried out in 1997. From this collection a herbarium specimen was prepared, and kept at the National Herbarium, Institute of Biology, MEXU, UNAM, with registration number: Martinez 27824-A.

2.2. Preparation of methanolic extract and insulation of the pentacyclic triterpenes

The methanolic extract was obtained by maceration. Briefly, the leaves were dried at room temperature in the shade, followed by their pulverization and extraction with methanol by maceration, three times (1000 g of dried vegetable material per 1000 mL of methanol), at room temperature. Once obtained the extractions, the solvent was removed under reduced pressure for the preparation of the corresponding residues [20]. Methanolic extract of *P. obtusa* (30 g) were adsorbed by the same amount of silica gel HF₂₅₄, the extract was mounted on a column packed with 700 g of the same silica. The column was eluted with a system of increasing polarity, using mixtures of hexane/ethyl acetate and obtaining fractions of 1 L. The fraction POLHC-10A was obtained by chromatography elution from 50:50 hexane/ethyl acetate. A mass (303.3 mg) of white amorphous powder with a melting point of 248–260 °C and a retention factor, R_f of 0.63 (6:4, hexane: acetone) was isolated. The obtained natural mixture (NM-OA/UA) was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) method to determine the

composition of each triterpene acids present in the sample, in order to develop a synthetic mixture (SM-OA/UA) of OA and UA, both purchased from Sigma–Aldrich (Madrid, Spain).

2.3. Chemicals and reagents

The reference compounds, OA ($\geq 97\%$), UA ($\geq 90\%$), castor oil and polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween[®] 80) were purchased from Sigma–Aldrich Chemie (Madrid, Spain). Caprylocaproyl macrogol-8 glycerides EP (Labrasol[®]), highly purified diethylene glycol monoethyl ether EP/NF (Transcutol[®] P), medium-chain triglycerides EP (Labrafac[™] Lipophile), lauroyl macrogol-6 glycerides EP (Labrafil[®]) and polyglyceryl-3 dioleate (Plurol[®] Oleique) were a gift from Gattefossé (Saint-Priest Cedex, France). Propylene glycol was obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Caprylic/capric triglycerides (Miglyol[®] 812) supplied by Roig Farma-Fagron (Tarrasa, Spain). The purified water used in all experiments was obtained from a MilliQ Plus System, lab supplied. All other chemicals and reagents used in the study were of analytical or HPLC-grade (Fisher Chemical, UK).

2.4. Chromatography conditions and instruments

HPLC system consisted of a Waters[®] 515 HPLC Pump, a 717 Plus Autosampler and a 2487 Dual λ Absorbance Detector (Waters, Milford, MA, USA). The analytical column was Kromasil 100 C₁₈ column (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm , Teknokroma). The compounds were detected at a wavelength of 210 nm with an eluent flow rate of 1.0 mL/min with acetonitrile–water (85:15 v/v) as mobile phase. The injection volume was 10 μL . All the determinations were performed at ambient temperature and at isocratic conditions of elution. The calibration curve was prepared with a concentration range from 3.62 to 116 $\mu\text{g/mL}$ for NM-OA/UA and 6.25 to 200 $\mu\text{g/mL}$ for SM-OA/UA [21].

2.5. Pseudo-ternary phase diagram

2.5.1. Determination of oleanolic and ursolic acids solubility

The solubility of OA/UA in various oils (castor oil, labrafac, Miglyol and vaseline), surfactants (labrafil, labrasol and tween-80) and co-surfactants (transcutol-P and plurol oleique) was determined by dissolving an excess amount of OA/UA in 2 mL of each of the selected oils, surfactants and co-surfactants in 5 mL stoppered vials and mixed using a vortex mixer. The vials were then kept at $37 \pm 1.0^\circ\text{C}$ in a shaking water bath for 72 h to reach to equilibrium. The equilibrated samples were removed from the shaker and filtrated/centrifuged at 3000 rpm for 15 min, using an Ultra-15 centrifugal filter with ultracel-100 membrane (Amicon[®] Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). The filtrates were diluted with a hydroalcoholic mixture (ethanol–water, 7:3 v/v) and OA/UA solubility was subsequently quantified by HPLC.

2.5.2. Construction of pseudo-ternary phase diagram

The establishment of pseudo-ternary phase diagrams can determine the area of the existence of a nanoemulsion. From the results of the solubility studies, components with highest solubility, non-toxic, non-irritant to the skin and higher and easy accessibility, have been selected. Pseudo-ternary phase diagrams of S_{mix} , oil phase and aqueous phase (free of drug) were plotted, each of them representing a side of the triangle. S_{mix} were mixed at different mass ratios (4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 and 1:4). For a detailed study of the phase diagram, these ratios were chosen, increasing concentration of surfactant with respect to co-surfactant and increasing concentration of co-surfactant with respect to surfactant. For each phase diagram, nine different combinations of oil and a specific S_{mix} ratio were mixed in individual glass vials, using different weight ratios

(1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, and 9:1), to cover the maximum ratios for the study to define the boundaries of phase precisely formed in the phase diagrams. Pseudo ternary phase diagrams of oil, S_{mix} and aqueous phase were developed using the aqueous titration method. Slow titration with aqueous phase was performed for each mass ratio of oil and S_{mix} and visual observations were made for transparent and flowable nanoemulsions.

2.5.3. Selection of the nanoemulsion formulation

From the obtained pseudo-ternary phase diagrams, a formulation has been selected based on optimized physical parameters (i.e. smaller droplet size and polydispersity index) to load 0.2% (w/w) of drug.

2.6. Mean droplet size and polydispersity index analysis

The mean droplet size and the polydispersity index (width of size distribution) of the nanoemulsions were determined by dynamic light scattering (DLS) in a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). The samples were measured directly without previous dilution. All measurements were carried out at 25 °C at a 90° angle, using disposable polystyrene cells. Values were obtained by the mean and standard deviation of three measurements for each formulation.

2.7. Transmission electron microscopy analysis

The analysis of transmission electron microscopy (TEM) of the nanoemulsions was performed in a JEOL JEM-1010 electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). The sample preparation (without previous dilution) was performed by the technique of negative staining using uranyl acetate solution 2%. The grids were dried for 24 h for later reading.

2.8. Rheological studies

The viscosity of the formulations (20 g) was determined without dilution at 25 °C in a Thermo Scientific, Haake Rheo Stress 1 rheometer (Haake, Karlsruhe, Germany) with cone rotor C60/2-Ti (60 mm diameter, 2° angle). The shear rate ramp program included the ramp-up period from 0 to 100 s⁻¹ in 3 min at a constant shear rate period of 100 s⁻¹ during 1 min, and the ramp-down period from 100 to 0 s⁻¹ in 3 min. The software used for the calculations was Haake RheoWin® Data Manager V 3.3. The measurements were performed in duplicate.

2.9. Stability studies

The long-term physical stability of the nanoemulsions was evaluated using the Turbiscan Lab® Expert (Formulation, France) technique, which uses multiple light scattering measurement to detect and determine destabilization phenomena suffering concentrated dispersions over time. Each sample (20 mL) was placed in a cylindrical glass tube. The detection head was composed of a pulsed near-infrared light source ($\lambda_{\text{IR}} = 880 \text{ nm}$) and two synchronous detectors: transmission (T) for transparent/translucent samples and backscattering (BS) for opaque samples. The T detector receives the light which crosses the sample (at 180° from the incident beam), while the BS detector receives the light scattered backwards by the sample (at 45° from the incident beam) [22,23]. Readings were taken at 1, 7, 15 and 30 days after the preparation of the formulations, at room temperature for 24 h. The storage stability of OA/UA nanoemulsions were divided in two sample sets and stored at room temperature (25 °C) and under refrigerator

conditions (4 °C), respectively. The droplet size and polydispersity index were monitored for 24 h and after 15, 30, 60 days.

2.10. In vitro release studies

The release studies of OA/UA from nanoemulsion were performed in amber glass Franz-type diffusion cells (FDC-400) of 18 mm diameter, supplied by the firm Crown Glass Co. Inc. (Somerville, NJ, USA), based on the model proposed by Franz [24]. In this study a dialysis membrane (Dialysis Tubing – Visking Code DTV12000.03.000, Size 3, Inf Day 20/32" – 15.9 mm, MWCO – 12–14,000 Da, Liverpool Road, London, UK) as diffusion membrane, which was soaked in the receptor medium for 24 h before mounting. The active diffusion area was 2.54 cm². The receptor compartment was filled with the receptor medium (ethanol–water 7:3, v/v), the OA/UA nanoemulsions (0.5 mL) were placed in the donor compartment. The temperature was kept at 32 ± 0.5 °C and under sink conditions throughout the experiment for 72 h. For quantification of OA/UA released, samples of 300 µL were withdrawn from the receptor chamber at predetermined time intervals and then analyzed by HPLC method. The study was carried out in triplicate for each formulation.

2.10.1. Kinetic statistical treatment

To describe the OA/UA release kinetics, different mathematical models have been used, namely, the empirical models (zero order, first order, Higuchi) and the semi-empirical model (Korsmeyer-Peppas). A nonlinear least-squares regression was performed using the WinNonLin® software (WinNonlin® Professional edition version 3.3; Pharsight Corporation, Sunnyvale, CA). To select the model that best fits the release of OA/UA, the coefficient of determination (r^2) and a discrimination models parameter, the akaike information criterion (AIC), which is a measure of the best fit based on maximum likelihood. When comparing several models for a given set of data, the model associated with the smallest value of AIC was regarded as giving the best fit out of that set of models. The AIC is calculated by the equation:

$$\text{AIC} = n \times \ln(\text{WSSR}) + 2 \times p \quad (1)$$

where n is the number of dissolution data points (Q/t), p is the number of the parameters of the model and WSSR is the weighed sum of square of residues [25].

2.11. Ex vivo skin permeation studies

The skin permeation studies were carried out using Franz diffusion cells as was described in Section 2.10. Human skin from the abdominal region from lipectomy surpluses from plastic surgery (Hospital of Barcelona, SCIAS, Barcelona, Spain) was used as permeation membrane, which were cut with an electric dermatome (Model GA 630, Aesculap, Tuttlingen, Germany) into 0.4 mm thick pieces, starting from the stratum corneum [26]. Skin samples were placed between the donor and receptor compartment of the cell. The formulation (0.7 mL) was placed onto the donor compartment in contact with the outer surface of the skin. The permeation area was 2.54 cm². The specifications set for the release study (i.e. temperature and sink conditions), were kept the same as described for the release assay. Samples (300 µL) were withdrawn from the receptor chamber at predetermined time intervals for a period of 48 h, and analyzed by HPLC. Each formulation was tested in triplicate.

2.11.1. Determination of the amount of OA/UA retained in the skin

At the end of the permeation study, the amount of formulation remaining onto the skin was eliminated and the skin was

removed from the cell, and cleaned with gauze soaked in a 0.05% solution of sodium lauryl sulfate, and washed with distilled water [27]. The permeation area was then excised and weighed, and the retained OA/UA content was extracted with an aliquot (2 mL) of ethanol–water (7:3) by ultrasonication for 15 min and then analyzed by HPLC.

2.11.2. Skin permeation parameters

From the cumulative permeated amounts (Q_t) of OA/UA, the values of permeation parameters, namely, flux (J) and the permeability coefficient (K_p) through the stratum corneum under stationary conditions were estimated and calculated using the following equations:

$$J = \frac{Q}{(t \cdot A)} \quad (2)$$

$$J = K_p C_0 \quad (3)$$

where flux (J) is the mass quantity (Q) transferred per unit area (A) and per unit time (t), K_p is the permeability coefficient, and C_0 is the initial drug concentration in the donor compartment or concentration gradient of OA/UA through the membrane.

2.12. Primary dermal irritation studies (PDI): In vivo Draize skin test

The primary dermal irritation (PDI) study was performed according to the Draize method described in the Journal Official de la Republique Française of 24 October 1984 [28], using adult male New Zealand albino rabbits weighing between 1.9 and 2.1 kg (San Bernardo Farm, Spain). Ethical approval for the handling of experimental animals was obtained from the Institutional Animal Ethical Committee (IAEC) of the University of Barcelona. The dorsal area of the trunk was shaved with electric shaver 24 h before the beginning of the assay. The animals chosen were screened for a fully healthy skin. On the left side of the shaved area of the animal, three scarifications of 2.5 cm in length were made with a lancet, having a separation of 0.3 cm between them. Then 0.5 mL of each nanoemulsion was applied on each side, covering the site with hydrophilic gauze and a polyethylene film (Parafilm®) and fixed with hypoallergenic sticking plaster. After exposure for 24 h, the test substance was removed and the exposed skin was scored for the formation of edema (graded 0–4) and erythema and eschar formation (graded 0–4). Scoring was repeated 72 h later. The individual primary dermal irritation index (PDII) was determined for each rabbit by adding the edema and erythema scores at 24 and 72 h and dividing the result by 4. PDII is the average value of individual indices of each rabbit. According to the value obtained of PDII, products are classified as: “non-irritating” (PDII < 0.5), “slightly irritating” (0.5 < PDII < 2), “moderately irritating” (2 < PDII < 5), and “severely irritating” (PDII > 5). Three animals were used for each formulation.

2.13. In vivo anti-inflammatory activity

Anti-inflammatory activity of the OA/UA was evaluated using a topical inflammation model following the previously described protocol [29], using TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) to induce mouse ear inflammation. Groups of six adult male Wistar CD-1 mice with a body weight ranging from 20 to 25 g were used for each formulation. Edema was induced by topical application of 2.5 µg per ear of TPA dissolved in ethanol. Nanoemulsions of natural (NM-OA/UA NEm) or synthetic (SM-OA/UA NEm) mixture of OA/UA (50 µL/ear) (100 µg per 1 cm²), OA, UA standard and indomethacin as standard drug reference (1 mg/ear) were applied to both sides of the right ear such as TPA. The ear swelling was measured before

TPA application and 4 h after, and the edema was expressed as the increase in thickness [30].

3. Results and discussion

3.1. Pseudo-ternary phase diagram

Following the results of the solubility test of the selected triterpenes (Table 1), castor oil (oil phase), labrasol (surfactant), transcuto-P (co-surfactant) and propylene glycol (aqueous phase) have been chosen. Various ratios of S_{mix} (labrasol:transcuto-P) were tested (4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 and 1:4, w/w) (Fig. 1).

The selected optimal formulation – a mixture of 4 parts of labrasol by 1 part of transcuto-P (S_{mix} 4:1) –, was based on the diagram depicting the larger nanoemulsion region (gray area). From this diagram, several points were taken, covering the entire gray area, and the drug was added up to 0.2% (w/w). Table 2 summarizes the composition and the size parameters of the developed nanoemulsion formulations. For both NM-OA/UA NEm and SM-OA/UA NEm, the formulations number 10 was selected for further studies because of the smallest droplet size and polydispersity index. The final composition was 20% of propylene glycol, 20% of castor oil, 59.80% of S_{mix} with ratio 4:1 (47.84% of labrasol with 11.96% of transcuto-P) and OA/UA mixtures to 0.2%.

3.2. Characterization of nanoemulsion

Both nanoemulsions (NM-OA/UA NEm and SM-OA/UA NEm) showed a monophasic appearance, were optically transparent and slightly yellowish in color. The determination of droplet size of nanoemulsion was performed with the DLS, sometimes referred as photon correlation spectroscopy (PCS), which is a non-invasive, well established technique for measuring the size of molecules and particles typically in the submicron region. It analyzes the fluctuations in light scattering due to Brownian motion of the particles. The NM-OA/UA NEm showed a droplet size in the range between 200.95 and 590.54 nm and a polydispersity index between 0.252 and 0.734. The SM-OA/UA NEm showed a droplet size in the range between 139.70 and 450.89 nm and a polydispersity index between 0.185 and 0.664. This droplet size was attributed to the high molar mass of the triterpene compounds (456.7 g/mol), besides its complex structure and affinity these compounds to the components of the nanoemulsion. As shown in Table 2, the droplet size was affected by the concentration of the oil phase (castor oil), where the increase of the percentage of the oil, induced the increase of the mean droplet size. On the other hand, the concentration of surfactant/co-surfactant (labrasol/transcuto-P) had the opposite effect, i.e. when increasing the percentage of S_{mix} , decreased the droplet size. The polydispersity index had the same effect as the droplet size in both NM-OA/UA NEm and SM-OA/UA NEm. The droplet shape analyzed by TEM was in agreement with the results obtained by PCS (Supplementary material).

The low values of viscosity are the main feature of nanoemulsions since they influence the long-term stability of the emulsified nanodroplets, as well as the efficient drug release. The viscosity measured at shear rate of 100 s⁻¹ were 51.97 ± 4.57 and 55.33 ± 0.28 mPa s for NM-OA/UA NEm and SM-OA/UA NEm, respectively. Both formulations followed a Newtonian behavior (data not shown).

3.3. Stability studies

To evaluate the long-term physical stability of the nanoemulsions multiple light scattering measurements were carried out using Turbiscan to detect and determine destabilization phenomena e.g. coalescence, flocculation, sedimentation, or

Table 1
Solubility (mg/mL) of oleanolic and ursolic acids in different media ($n = 3$).

Component	Solubility (mg/mL)	Component	Solubility (mg/mL)
<i>Oil (P-value 0.0027)</i>		<i>Surfactant (P-value 0.0034)</i>	
Castor oil	16.83 ± 2.89	Labrasol	6.99 ± 1.03
Migliol	10.68 ± 1.43	Labrafil	3.44 ± 0.76
Labrafac	11.89 ± 0.99	Tween-80	6.21 ± 0.45
Vaseline	8.10 ± 1.56		
<i>Aqueous</i>		<i>Co-Surfactant (P-value 0.0023)</i>	
Water	0.0	Plurol oleico	5.58 ± 1.22
Propylene glycol	6.59 ± 2.71	Transcutol-P	16.12 ± 2.33

Significant differences ($p < 0.05$).

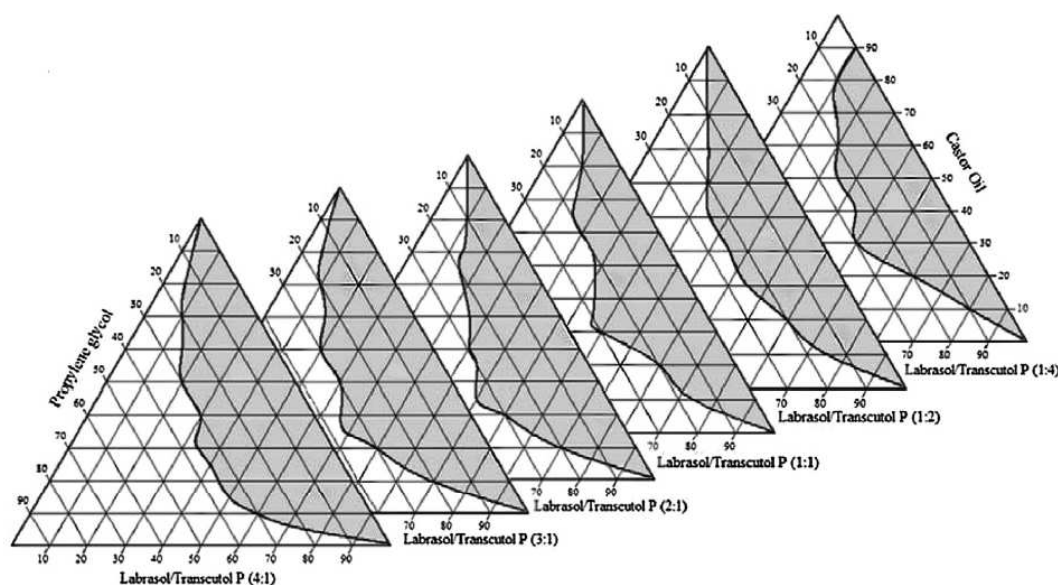


Fig. 1. Pseudo-ternary phase diagrams of castor oil–labrasol/transcutol P–propylene glycol formulations. Gray area stands for the nanoemulsion region at different S_{mix} .

creaming. The phenomenon of sedimentation (migration of the particles) occurs when there is a transmittance decrease versus time at the bottom of the sample. When this change occurs on the top of the sample, it is because the sample suffers a creaming process. When a transmittance decrease versus time is observed over the whole height of the sample, it is due to the droplet size variation (flocculation or coalescence) [31]. From the recorded transmission profiles of the nanoemulsions 1, 7, 15 and 30 days after production (data not shown), there is no presence of such phenomena (creaming, flocculation, or coalescence). The slight changes in the bottom and on the top are attributed to the meniscus that the samples form in contact with the glass. In parallel with these

studies, the droplet size of the nanoemulsions was monitored by dynamic light scattering analysis in different days following storage at 4 and 25 °C (Table 3). During the storage time at both temperatures the droplet size and the polydispersity index increased, but changes were less pronounced for the samples stored at 4 °C.

3.4. Release studies

Fig. 2 (top) shows the profiles of the percentage released of OA/UA over time of both nanoemulsions. After 75 h 47.22% and 44.40% of OA/UA were released from the NM-OA/UA NEm and SM-OA/UA NEm, respectively. The profiles of both formulations

Table 2
Composition, droplet size, polydispersity index (PI) of the developed nanoemulsion formulations.

F	%OP	%AP	%S _{mix} (4:1)	%OA/UA	NM-OA/UA NEm		SM-OA/UA NEm	
					Droplet size (nm)	PI	Droplet Size (nm)	PI
1	70	10	19.80	0.20	591 ± 32	0.73 ± 0.23	451 ± 26	0.66 ± 0.19
2	60	20	19.80	0.20	476 ± 27	0.58 ± 0.09	376 ± 22	0.47 ± 0.15
3	60	10	29.80	0.20	396 ± 32	0.49 ± 0.03	308 ± 32	0.39 ± 0.27
4	50	20	29.80	0.20	369 ± 28	0.50 ± 0.11	241 ± 20	0.34 ± 0.11
5	50	10	39.80	0.20	323 ± 23	0.44 ± 0.13	213 ± 24	0.30 ± 0.12
6	40	20	39.80	0.20	299 ± 24	0.39 ± 0.04	194 ± 41	0.29 ± 0.20
7	40	10	49.80	0.20	265 ± 17	0.30 ± 0.20	158 ± 10	0.21 ± 0.16
8	30	30	39.80	0.20	282 ± 23	0.39 ± 0.19	179 ± 18	0.25 ± 0.10
9	30	20	49.80	0.20	257 ± 19	0.27 ± 0.12	154 ± 30	0.21 ± 0.04
10	20	20	59.80	0.20	201 ± 21	0.25 ± 0.05	140 ± 47	0.19 ± 0.01

Abbreviations: F, formulation; OP, oil phase; AP, aqueous phase; S_{mix} = surfactant/co-surfactant mixture. Mean ± SD, $n = 3$.

Table 3
Influence of temperature and storage on physicochemical characterization of OA/UA nanoemulsions.

Time (days)	Temp (°C)	NM-OA/UA NEM		SM-OA/UA NEM	
		Droplet size (nm) ± SD	PI ± SD	Droplet size (nm) ± SD	PI ± SD
1	4	199 ± 21	0.25 ± 0.05	140 ± 47	0.19 ± 0.01
	25	199 ± 21	0.25 ± 0.05	140 ± 47	0.19 ± 0.01
15	4	206 ± 10*	0.25 ± 0.03	141 ± 22	0.19 ± 0.04
	25	231 ± 12	0.26 ± 0.09	152 ± 32	0.20 ± 0.01
30	4	212 ± 19*	0.26 ± 0.02	156 ± 12	0.20 ± 0.02
	25	241 ± 15	0.29 ± 0.04	190 ± 32	0.23 ± 0.04
60	4	221 ± 14	0.28 ± 0.10	172 ± 23	0.22 ± 0.03
	25	258 ± 18	0.33 ± 0.07	210 ± 40	0.25 ± 0.04

Mean ± SD, n = 3.

* Significant differences with respect a SM-OA/UA NEM (p < 0.05).

followed the same pattern during the first 45 h, after which the extent of release was higher for NM-OA/UA NEM than for SM-OA/UA NEM. To describe the release kinetics and diffusion behavior of OA/UA from the nanoemulsions, four kinetic models (first order, zero order, Higuchi and Korsmeyer Peppas) were used. The best model that presented the lowest value of AIC (discriminatory parameter) has been chosen. AIC values and the kinetic parameters of all models for the two formulations are shown in Table 4. For both NM-OA/UA NEM and SM-OA/UA NEM the best kinetic fit was described by Korsmeyer-Peppas model, also confirmed by the coefficient of determination, r² (highest value). The parameter “n” in the Korsmeyer-Peppas equation is related to the mechanism of release of the drug, i.e. if the exponent n < 0.43, then the drug release mechanism is Fickian diffusion, if 0.43 < n < 0.85, then it is non-Fickian or anomalous diffusion and an exponent value is 0.85 or greater is indicative of Case-II Transport or typical zero-order release [25,32], in this case both mixtures give a value of n of 0.77, so their release mechanism followed a non-Fickian or anomalous diffusion.

Independent parameters were also determined, namely, the mean dissolution time (MDT) – defined as the mean residence time of a drug in the formulation – and the dissolution efficiency (DE) [33]. MDT is a useful parameter to characterize the drug release rate from a dosage form. The values for the MDT were 32.71 ± 0.88 h and 32.41 ± 1.86 h for NM-OA/UA NEM and SM-OA/UA NEM, respectively, without significant differences (p-value 0.83). The DE was

56.71 ± 1.17% for NM-OA/UA NEM and 56.78 ± 2.48% for SM-OA/UA NEM, without significant differences (p-value 0.82).

3.5. Skin permeation studies

The skin penetration of a drug to provide local effect on the skin is a complex process involving three major steps, namely, (i) the release of the drug from the vehicle, (ii) penetration into the stratum corneum, and (iii) partitioning from stratum corneum to target sites in epidermis and dermis [34]. To study the ability of penetration of OA/UA through the human skin, an ex vivo permeation study was carried out. Table 5 shows the permeation parameters of both formulations; flux (J) and the permeability coefficient (K_p) under stationary conditions and infinite dose, were calculated with the early hours of the study, because after 10 h the flow begins to soften, which it can be seen in the permeation profile of the cumulative amounts of drug per unit area (µg/cm²) vs time (Fig. 2, down). The permeation profiles are different in the first 4 h of the study, showing that there is higher amount permeated from the synthetic mixture compared to the natural mixture. This result has been attributed to the affinity of the triterpenes with the components of the formulation and molecular conformation, slowing or faster the permeation of the triterpenes from nanoemulsions. The amount of OA/UA retained onto the skin (A_S (µg cm⁻² g⁻¹)) was higher than that determined in deeper layers of the skin, demonstrating that the systems were suitable for

Table 4
Parameters, coefficient of determination and AIC for kinetic models of nanoemulsions.

Model	Parameters	Unit	Value (mean ± SD)	
			NM-OA/UA NEM	SM-OA/UA NEM
Zero order	$Q_t = K_0 \cdot t + Q_\infty$	K_0	% h ⁻¹	2E-06 ± 1E-07*
		Q_∞	%	24.11 ± 7.04
		r ²	–	0.9776
		AIC	–	124.50
First order	$Q_t = Q_\infty(1 - e^{-K_f t})$	K_f	h ⁻¹	1.1E-05 ± 1E-06
		Q_∞	%	31.0 ± 0.1
		r ²	–	0.9938
		AIC	–	144.64
Higuchi	$Q_t = K_H t^{1/2}$	K_H	% h ^{-1/2}	6.39 ± 0.17*
		r ²	–	0.9968
		AIC	–	54.65
Korsmeyer-Peppas	$Q_t = K_k t^n$	K_k	% h ⁻ⁿ	1.69 ± 0.18
		n	–	0.77 ± 0.03
		r ²	–	0.9977
		AIC	–	49.73

Abbreviations: Q_t, cumulative percentage amount of drug release at time t; Q_∞, maximum percentage of amount of dissolved drug; K₀, K_f, K_H, K_k, release rate constants; t, time in hours; n, diffusional release; r², determination coefficient; AIC, akaike information criterion. Data, mean ± SD, n = 3.

* Significant differences with respect a SM-OA/UA NEM (p < 0.05).

Table 5
Permeation parameters of nanoemulsions.

	J ($\mu\text{g h}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	$K_p \times 10^3$ (cm h^{-1})	A_5 ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{g}^{-1}$)	% A_{48}
NM-OA/UA NEm	1.35 (1.23–2.91)	0.67 (0.61–1.45)	576.60 (490.88–580.98)	6.89 (6.41–7.39)
SM-OA/UA NEm	2.97 (2.66–3.05)	1.48 (1.33–1.52)	424.69 (416.07–546.99)	5.72 (4.96–6.24)
P-value	0.1949	0.1938	0.1898	0.0744

Abbreviations: J , flux; K_p , permeability constant; A_5 , amount of OA/UA retained in skin; A_{48} , amount of OA/UA permeated at 48 h. Median (min – max), $n = 3$.

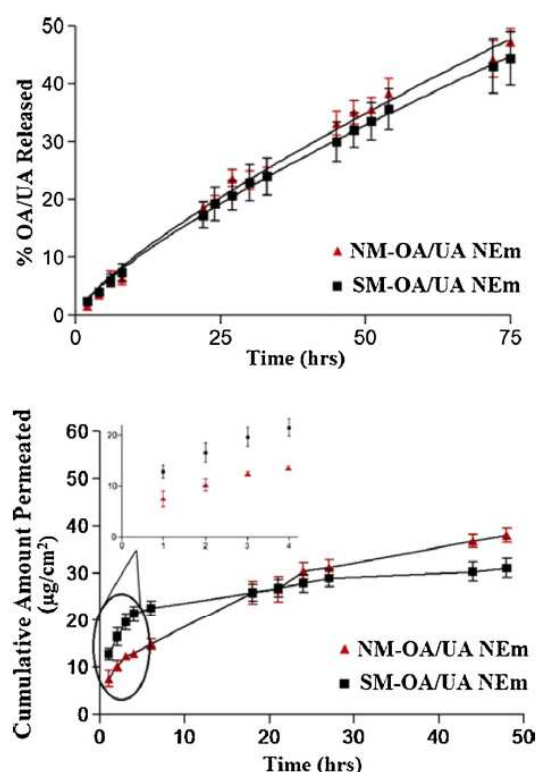


Fig. 2. In vitro release profiles of OA/UA from NM-OA/UA NEm and SM-OA/UA NEm fitted to the Korsmeyer-Peppas mode ($n = 3$) (top) and ex vivo permeated profiles of OA/UA from NM-OA/UA NEm and SM-OA/UA NEm ($n = 3$) (down).

a local effect. A nonparametric test with Welch's correction was used for statistical analysis with significant differences. No significant differences between the two formulations were found ($p > 0.05$).

3.6. Primary dermal irritation studies (PDI): In vivo Draize skin test

The purpose of primary dermal irritation (PDI) test is to determine the cutaneous harmful effects that a product has when in contact with skin. The primary dermal irritation index (PDII) of both NM-OA/UA NEm and SM-OA/UA NEm was 0.5 and 0.25, respectively. According to the classification of "Journal Officiel de la Republique Française" of 24 October 1984, these products are considered "non-irritating" and safe for dermal application. Free nanoemulsion was also tested, recording a PDII value of 0, which means that none of its components is irritating to the skin.

3.7. In vivo anti-inflammatory activity

Fig. 3 shows the percentages of inhibition of inflammation of NM-OA/UA NEm and SM-OA/UA NEm, OA, UA and indomethacin (IN) as reference drug. NM-OA/UA NEm had a greater inhibition

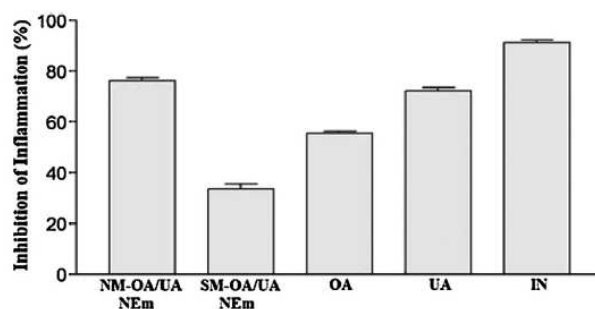


Fig. 3. Anti-inflammatory activity in mice ear of NM-OA/UA NEm, SM-OA/UA NEm, OA, UA and indomethacin (mean \pm SD, $n = 6$). All samples showed significant differences ($p < 0.05$).

of inflammation (76.19 ± 1.59), more than doubled compared to SM-OA/UA NEm (33.86 ± 1.83). This was attributed to the higher retention onto the skin in comparison to SM-OA/UA NEm. In the first 4 h of study permeation (response-time assessed in the in vivo assay), less amount was permeated from NM-OA/UA NEm; therefore, a greater amount was retained for longer in the ear of the mouse, with improved local effect. In addition, NM-OA/UA NEm might have more components with anti-inflammatory activity which enhances the effect of oleanolic and ursolic acid of the mixture [35]. Significant differences between all the compounds were found ($p < 0.05$).

4. Conclusions

With the construction of pseudo-ternary phase diagrams optimized nanoemulsions have been developed encapsulating natural (NM-OA/UA NEm) or synthetic (SM-OA/UA NEm) mixtures of pentacyclic triterpenes with anti-inflammatory activity for topical application. The systems showed adequate physical properties (i.e. small droplet size and low viscosity), which remained stable for at least 1 month without destabilization phenomena. Both formulations showed similar release profile, which followed Korsmeyer-Peppas kinetic model. The nanoemulsions demonstrated high capacity for penetration into the skin, but NM-OA/UA NEm showed a greater anti-inflammatory effect than SM-OA/UA NEm. The results reported in this work clearly demonstrate the suitability of developed nanoemulsions for a local anti-inflammatory effect upon topical administration.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the sponsorship of the project (MAT2011-26994) of the Ministry of Science and Innovation of Spain; Gattefossé by provide the materials used and the kind help of Dr. Lyda Halbaut Bellowa from the department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona for their valuable technical assistance in conducting the rheology assays. The authors also acknowledge the Portuguese Science and Technology Foundation (FCT), and European funds (FEDER/COMPETE) under the reference PTDC/SAU-FAR/113100/2009.

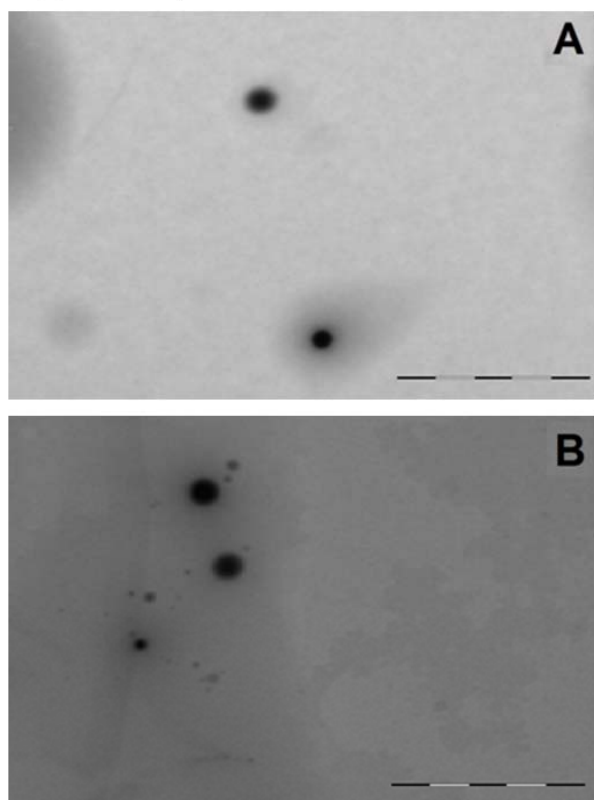
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.062>.

References

- [1] T.L. Serafim, F.S. Carvalho, T.C. Bernardo, G.C. Pereira, E. Perkins, J. Holy, D.A. Krasutsky, O.N. Kolomitsyna, P.A. Krasutsky, P.J. Oliveira, New derivatives of lupane triterpenoids disturb breast cancer mitochondria and induce cell death, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 6270–6287.
- [2] C. Soica, C. Trandafirescu, C. Danciu, D. Muntean, C. Dehelean, G. Simu, New improved drug delivery technologies for pentacyclic triterpenes: a review, *Protein Pept. Lett.* 21 (2014) 1137–1145.
- [3] M.K. Shanmugam, X. Dai, A.P. Kumar, B.K. Tan, G. Sethi, A. Bishayee, Oleoanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical evidence, *Cancer Lett.* 346 (2014) 206–216.
- [4] L.L. Zang, B.N. Wu, Y. Lin, J. Wang, L. Fu, Z.Y. Tang, Research progress of ursolic acid's anti-tumor actions, *Chin. J. Integr. Med.* 20 (2014) 72–79.
- [5] A. Stenholm, U. Goransson, L. Bohlin, Bioassay-guided supercritical fluid extraction of cyclooxygenase-2 inhibiting substances in *Plantago major* L., *Phytochem. Anal.* 24 (2013) 176–183.
- [6] T. Ringbom, L. Segura, Y. Noreen, P. Perera, L. Bohlin, Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis, *J. Nat. Prod.* 61 (1998) 1212–1215.
- [7] L.O. Somova, A. Nadar, P. Rammanan, F.O. Shode, Cardiovascular antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleoanolic and ursolic acids in experimental hypertension, *Phytomedicine* 10 (2003) 115–121.
- [8] S. Rungsimakan, M.G. Rowan, Terpenoids, flavonoids and caffeic acid derivatives from *Salvia viridis* L. var. Blue Jeans, *Phytochemistry* (2014).
- [9] Z. Ovesna, A. Vachalkova, K. Horvathova, D. Tothova, Pentacyclic triterpenoid acids: new chemoprotective compounds. Minireview, *Neoplasma* 51 (2004) 327–333.
- [10] R. Seebaluck, A. Gurib-Fakim, F. Mahomoodally, Medicinal plants from the genus *Acalypha* (Euphorbiaceae) – a review of their ethnopharmacology and phytochemistry, *J. Ethnopharmacol.* 159 C (2015) 137–157.
- [11] J.J. Patel, S.R. Acharya, N.S. Acharya, *Clerodendrum serratum* (L.) Moon. – a review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological activities, *J. Ethnopharmacol.* 154 (2014) 268–285.
- [12] N.K. Singh, V.P. Singh, Anticancer activity of the roots of *Ichnocarpus frutescens* R. Br. and isolated triterpenes, *Pak. J. Pharm. Sci.* 27 (2014) 187–191.
- [13] M.H. Shyu, T.C. Kao, G.C. Yen, Oleoanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in HuH7 human hepatocellular carcinoma cells through a mitochondrial-dependent pathway and downregulation of XIAP, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 6110–6118.
- [14] M.R. Garcia-Risco, E. Vazquez, J. Sheldon, E. Steinmann, N. Riebesehl, T. Fornari, G. Reglero, Supercritical fluid extraction of heather (*Calluna vulgaris*) and evaluation of anti-hepatitis C virus activity of the extracts, *Virus Res.* (2014).
- [15] C.H. Zhao, J. Xu, Y.Q. Zhang, L.X. Zhao, B. Feng, Inhibition of human enterovirus 71 replication by pentacyclic triterpenes and their novel synthetic derivatives, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 62 (2014) 764–771.
- [16] S. Zielinska, A. Matkowski, Phytochemistry and bioactivity of aromatic and medicinal plants from the genus *Agastache* (Lamiaceae), *Phytochem. Rev.* 13 (2014) 391–416.
- [17] L. Kong, S. Li, Q. Liao, Y. Zhang, R. Sun, X. Zhu, Q. Zhang, J. Wang, X. Wu, X. Fang, Y. Zhu, Oleoanolic acid and ursolic acid: novel hepatitis C virus antivirals that inhibit NSSB activity, *Antiviral Res.* 98 (2013) 44–53.
- [18] K.R. Pawar, R.J. Babu, Lipid materials for topical and transdermal delivery of nanoemulsions, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 31 (2014) 429–458.
- [19] S. Gupta, R. Bansal, N. Jindal, A. Jindal, Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological treatments, *Indian Dermatol. Online J.* 4 (2013) 267–272.
- [20] J.M. Narvaez-Mastache, M.L. Garduno-Ramirez, L. Alvarez, G. Delgado, Antihyperglycemic activity and chemical constituents of *Eysenhardtia platycarpa*, *J. Nat. Prod.* 69 (2006) 1687–1691.
- [21] H.L. Alvarado, G. Abrego, M.L. Garduno-Ramirez, B. Clares, M.L. Garcia, A.C. Calpena, Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the quantification of ursolic/oleoanolic acids mixture isolated from *Plumeria obtusa*, *J. Chromatogr. B* 983 (984) (2015) 111–116.
- [22] G. Abrego, H.L. Alvarado, M.A. Egea, E. Gonzalez-Mira, A.C. Calpena, M.L. Garcia, Design of nanosuspensions and freeze-dried PLGA nanoparticles as a novel approach for ophthalmic delivery of pranoprofen, *J. Pharm. Sci.* 103 (2014) 3153–3164.
- [23] C. Lemarchand, P. Couvreur, C. Vauthier, D. Costantini, R. Gref, Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan, *Int. J. Pharm.* 254 (2003) 77–82.
- [24] T.J. Franz, Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data, *J. Invest. Dermatol.* 64 (1975) 190–195.
- [25] S. Jose, J.F. Fangueiro, J. Smitha, T.A. Cinu, A.J. Chacko, K. Premaletha, E.B. Souto, Predictive modeling of insulin release profile from cross-linked chitosan microspheres, *Eur. J. Med. Chem.* 60 (2013) 249–253.
- [26] E. Escribano, A.C. Calpena, J. Queral, R. Obach, J. Domenech, Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula, *Eur. J. Pharm. Sci.* 19 (2003) 203–210.
- [27] F. Fernandez Campos, A.C. Calpena Campmany, G. Rodriguez Delgado, O. Lopez Serrano, B. Clares Naveros, Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: ultrastructural effects and release studies, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 3739–3752.
- [28] J.H. Draize, G. Woodward, H.O. Calvery, Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82 (1944) 377–390.
- [29] G. Qadeer, N.H. Rama, M.L. Garduno-Ramirez, Synthesis anti-inflammatory activity of fluorinated isocoumarins and 3,4-dihydroisocoumarins, *J. Fluor. Chem.* 128 (2007) 641–646.
- [30] V. Dominguez-Villegas, M.L. Garcia, A. Calpena, B. Clares-Naveros, M.L. Garduno-Ramirez, Anti-inflammatory, antioxidant and cytotoxicity activities of methanolic extract and prenylated flavanones isolated from leaves of *Eysenhardtia platycarpa*, *Nat. Prod. Commun.* 8 (2013) 177–180.
- [31] E. Gonzalez-Mira, M.A. Egea, M.L. Garcia, F.B. Souto, Design and ocular tolerance of flurbiprofen loaded ultrasound-engineered NLC, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 81 (2010) 412–421.
- [32] N.A. Peppas, I. Commentary on an exponential model for the analysis of drug delivery: original research article: a simple equation for description of solute release: I II. Fickian and non-Fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs, 1987, *J. Control. Release* 190 (2014) 31–32.
- [33] A.M. Villar, B.C. Naveros, A.C. Campmany, M.A. Trenchs, C.B. Rocabert, L.H. Bellows, Design and optimization of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for enhanced dissolution of gemfibrozil, *Int. J. Pharm.* 431 (2012) 161–175.
- [34] E. Vega, M.A. Egea, M.L. Garduno-Ramirez, M.L. Garcia, E. Sanchez, M. Espina, A.C. Calpena, Flurbiprofen PLGA-PEG nanospheres: role of hydroxy-beta-cyclodextrin on ex vivo human skin permeation and in vivo topical anti-inflammatory efficacy, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 110 (2013) 339–346.
- [35] B.S. Siddiqui, F. Ilyas, M. Rasheed, S. Begum, Chemical constituents of leaves and stem bark of *Plumeria obtusa*, *Phytochemistry* 65 (2004) 2077–2084.

Supplementary Material



Transmission electron microscopy of A) NM-OA/UA NEm and B) SM-OA/UA NEm. Bars means 1 μm

Artículo 4.

Alvarado, H.L., Abrego, G., Garduño-Ramírez, M.L., Clares, B., Calpena, A.C., García, M.L.

Anticarcinogenic activity of natural pentacyclic triterpenes isolated from *Plumeria obtusa*
against B16 melanoma cell line.

Artículo sometido a: Journal of Nanomaterials

3.4. Anticarcinogenic activity of natural pentacyclic triterpenes isolated from *Plumeria obtusa* against B16 melanoma cell line.

Resumen

En este trabajo se evaluó la actividad anticancerígena de la mezcla natural de los triterpenos OA/UA vehiculizada en nanoemulsiones, en la línea celular de melanoma murino B16. Estos triterpenos tienen muchas actividades farmacológicas entre ellas antiinflamatoria, anticancerígena, antifúngica, antioxidante, etc. En estudios previos se han reportado que OA/UA tienen efectos notables antitumorales y actividad citotóxica en varios tipos de líneas celulares como cáncer de colon, pecho, hepático, cervical, gástrico, pulmonar, etc. Estos compuestos además de atacar a las células tumorales por inducción de apoptosis, también modulan el entorno del tumor presentando efectos antioxidantes, antiangiogénicos, antiinflamatorios, así como la mejora en la diferenciación celular. La eficacia de cada compuesto individual puede diferir con respecto a las diversas actividades, por lo que la combinación de estas sustancias podría tener un beneficio con el fin de tratar el cáncer desde diferentes ángulos en las estrategias modernas de cáncer. A pesar de que se han estudiado diversas líneas celulares, hay muy pocos estudios sobre estos triterpenos que actúen sobre la línea celular de melanoma, el cáncer de piel más agresivo, que se origina en los melanocitos, en el estrato basal de la epidermis.

Este ensayo se realizó con el método de tinción de sulforodamina B (SRB). Las células se mantuvieron en medio de cultivo DMEM con antibióticos y suero de bovino fetal, bajo las condiciones de 37 °C a una atmósfera del 5% de CO₂. La nanoemulsión de la mezcla natural, la mezcla natural pura y la nanoemulsión blanca, se ensayaron en 6 diferentes concentraciones (1, 5, 10, 20, 30 y 40 µM) a dos tiempos de exposición (48 y 72 horas).

Se observó que a las 48 horas de exposición, la mezcla natural pura no mostró cambios significativos en la viabilidad celular en las primeras concentraciones, sin embargo a partir de los 30 µM hay una disminución en la viabilidad (3%). La nanoemulsión de la mezcla natural no mostró cambio en la primera concentración de 1 µM, pero a los 5 µM

Resultados

hay una reducción hasta del 38% en la supervivencia celular y a partir de los 10 μM , una disminución hasta un 4%. Se pudo observar también que la nanoemulsión blanca presenta una acción anticancerígena a partir de los 5 μM . Ejerciendo una acción sinérgica a los componentes, esto puede ser debido a los componentes de la formulación, en especial al aceite de castor, el cual ha sido altamente usado en tratamiento de fármacos oncológicos como medio de administración, además de presentar un efecto supresor sobre algunos tumores, aunque hay muy poca evidencia científica de esta acción. A las 72 horas de exposición se pudo observar un comportamiento similar al visto a las 48 horas.

Anticarcinogenic activity of natural pentacyclic triterpenes isolated from *Plumeria obtusa* against B16 melanoma cell line.

Authors

H.L. Alvarado^{a,b}, G. Abrego^{a,b}, M.L. Garduño-Ramírez^c, B. Clares^d, A.C. Calpena^a, M.L. García^b

^a Department of Biopharmacy and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

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

^c Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad No. 1001, Col Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México

^d Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071, Granada, Spain

Resultados

Abstract

The aim of this present work was to study the anticarcinogenic activity of these triterpene compounds isolated from the plant *Plumeria obtusa* from nanostructured emulsions on B16 murine melanoma cell line. The assay was performed using the sulforhodamine-B (SRB) method. Cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium with antibiotics and fetal bovine serum under conditions of 37 °C and an atmosphere of 5% CO₂. NM-OA/UA NEm, NM-OA/UA in DMSO and blank NEm, were tested in 6 different concentrations (1, 5, 10, 20, 30 and 40 µM) at two exposure times (48 and 72 hours). It was observed that after 48 hours exposure, NM-OA/UA showed no significant change in cell survival in the first concentrations, however from 30 µM there is a decrease in cell survival. NM-OA/UA NEm showed no changes in the first concentration of 1 µM, but at 5 µM there is a reduction of up to 38% of survival and from 10 µM a decrease up to 4%. Also, it was observed that blank nanoemulsion has an anticancer action from the concentration of 5 µM. Exerting a synergistic action to the triterpenoid components, this may be due to the components of the formulation, especially castor oil, which has been highly used in treatment of cancer drugs as an excipient, in addition to having a suppressive effect on some tumors. After 72 hours of exposure was observed a similar behavior that seen at 48 hours.

Keywords

Oleanolic acid; ursolic acid; nanoemulsion; melanoma; sulforhodamine-B method.

1. Introduction

The pentacyclic triterpenes are an important class of natural products present in many medicinal plants, which are similar in their biogenesis to steroids in the cyclization of squalene, widely studied due to its multiple pharmacological activities [1]. The pentacyclic triterpenes used for this research have oleanane and ursane base structures which are oleanolic acid (OA) (3β -3-hydroxy-olean-12-en-28-oic acid) and its isomer ursolic acid (UA) (3β -3-hydroxy-urs-12-en-28-oic acid), these compounds found in food, medicinal herbs and various other natural plants in the form of free acid or aglycones for triterpenoid saponins [2]. These triterpenoids are of interest as therapeutics and their biological activities are rather similar considering the closeness of their chemical structures, including antiinflammatory, anticancerous, antifungal, hepatoprotective, antioxidant, antimicrobial, activity, among others [3]. Previous studies have shown that these triterpenes has marked anti-tumor effects and cytotoxic activity toward various types of cancer cell lines *in vitro*, as human colon carcinoma (HCT15) [4], breast carcinoma (MCF-7), human hepatic carcinoma cells (HepG2) [5], human cervical carcinoma cells (HeLa) [6], human gastric cancer cells (BGC-823), human neuroblastoma cells (SH-SY5Y), human embryonic lung fibroblast (HELFL) [7], leukemia carcinoma (HL-60), human erythroleukemia (K562) [8,9], human lung cancer cells (A549, H3255) [10, 11], human liver cancer cell (HepG2, Hep3B, Huh7 and HA22T) [12], etc. These compounds besides targeting tumour cells by induction of apoptosis, they also modulate the tumour environment displaying antiangiogenic, anti-inflammatory as well as antioxidant effects and enhancing cell differentiation. The efficacy of each single compound might differ with respect to the various activities, so the combination of these substances might have a benefit in order to treat cancer from different angles in modern cancer strategies [13]. Despite being extensively studied on various cell lines, there are very few studies of these triterpenes acting on melanoma cell line, the most dangerous form of skin cancer, these cancerous growths develop when unrepaired DNA damage to skin cells (most often caused by ultraviolet radiation from sunshine or tanning beds) triggers mutations (genetic defects) that lead the skin cells to multiply rapidly and form malignant tumors. These tumors originate in the pigment-producing melanocytes in the basal layer of the epidermis [14]. In accordance with American Cancer Society the

Resultados

melanoma accounts for less than 2% of all skin cancer cases, but the vast majority of skin cancer deaths. Melanoma incidence rates have been increasing for at least 30 years. From 2006 to 2010, incidence rates among whites increased by 2.7% per year and an estimated 76,100 new cases of melanoma will be diagnosed in 2014 with an estimated 9,710 deaths [15]. A panel of treatments ranges from surgeries to immunotherapies but without efficient results on metastases appearing in latter stages of the most aggressive cancers [16]. Therefore the aim of this work is to study the anticarcinogenic activity of these triterpene compounds isolated from the plant *Plumeria obtusa* from nanostructured emulsions on B16 murine melanoma cell line.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

The reference compounds, OA ($\geq 97\%$), UA ($\geq 90\%$) and castor oil were purchased from Sigma-Aldrich Chemie (Madrid, Spain). Caprylocaproyl macrogol-8 glycerides EP (Labrasol[®]), highly purified diethylene glycol monoethyl ether EP/NF (Transcutol[®] P) were a gift from Gattefossé (Saint-Priest Cedex, France). Propylene glycol was obtained from Panreac (Barcelona, Spain). The purified water used in all experiments was obtained from a MilliQ Plus System, lab supplied. All other chemicals and reagent used in the study were of analytical or HPLC-grade (Fisher Chemical, UK).

2.2. Plant material and insulation of the pentacyclic triterpenes

Natural mixture (NM-OA/UA) was isolated from the methanol extract of leaves of *P. obtusa* L. var. *sericifolia* (C. Wright ex Griseb.) Woodson (Apocynaceae), collected in Calakmul, Campeche, Mexico [17], by the process of column chromatography under reduced pressure, eluted with a system of increasing polarity (mixtures of hexane/ethyl acetate). Fraction POLHC-10A was obtained in a system chromatography elution from 50:50 hexane/ethyl acetate, 303.3 mg were isolated as a white amorphous powder, with a

melting point of 248-260 °C and a retention factor, Rf of 0.63 (6:4, hexane: acetone), with a purity of 58%.

2.3. Preparation of nanoemulsion

To select the composition and determine the area of the existence of a nanoemulsion (NEm), the construction of a pseudo-ternary phase diagram was performed. It was selected from several oil, aqueous phases, surfactants and co-surfactants, those with better characteristics for formulation, such as highest solubility of the triterpenic components, not be toxic or irritating to the skin, among others. Castor oil as the oil phase, Labrasol as the surfactant, Transcutol-P as co-surfactant and propylene glycol as the aqueous phase were chosen. Various ratios of the combination of surfactant/co-surfactant (S_{mix}) (4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 and 1:4 w/w) were tested. Then nine different combinations of oil and a specific S_{mix} ratio were mixed thoroughly in different weight ratios (1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 and 9:1 w/w) in different glass vials, to covered the maximum ratios for the study to delineate the boundaries of phase precisely formed in the phase diagrams. Pseudo ternary phase diagrams of oil, S_{mix} and aqueous phase were developed using the aqueous titration method. The diagram of the mixture of 4 parts of labrasol by 1 part of transcutol-p (S_{mix} 4:1) was the one which had higher area of nanoemulsion. From this diagram several points were taken, selecting the one that presented the best physicochemical characteristics. The nanoemulsion chosen consisted of 20% of propylene glycol, 20% of castor oil, 59.80% of S_{mix} with ratio 4:1 (47.84% of labrasol with 11.96% of transcutol-P) and 0.2% of NM-OA/UA (Fig. 1) [18].

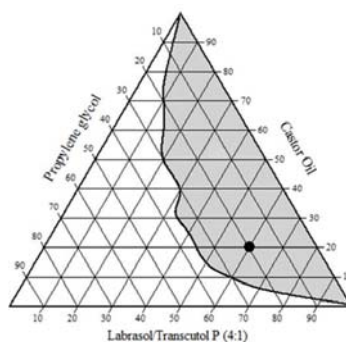


Figure 1. Pseudo-ternary phase diagram of Castor oil–Labrasol/Transcutol P–Propylene glycol formulations. Regions in grey color indicate the nanoemulsion region.

Resultados

2.4. Droplet size measurement

Droplet size measurement and polydispersity index (width of size distribution) of the nanoemulsion were determined through dynamic light scattering (DLS), a non-invasive, well established technique for measuring the size of molecules and particles typically in the submicron region, which analyzes the fluctuations in light scattering due to Brownian motion of the particles, a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) was used for this purpose. The samples were measured directly without previous dilution. All measurements were carried out at 25°C at a 90° angle, using disposable polystyrene cells. Values were obtained by the mean and standard deviation of 3 measurements for each formulation.

2.5. Rheological studies

The viscosity of the formulation (20 g) was determined as such without dilution at 25°C using Thermo Scientific, Haake Rheo Stress 1 rheometer (Haake, Kalsruhe, Germany) with cone rotor C60/2-Ti (60 mm diameter, 2° angle). The shear rate ramp program included: ramp-up period: from 0 to 100 s⁻¹ in 3 min; constant shear rate period: 100 s⁻¹ during 1 min; ramp-down period: from 100 to 0 s⁻¹ in 3 min. The software used for the calculations was Haake RheoWin[®] Data Manager V 3.3. The measurements were performed in duplicate.

2.6. Stability studies

To evaluate the long-term physical stability of the nanoemulsion was employed the equipment Turbiscan Lab[®] Expert (Formulation, France) technique which uses multiple light scattering measurement to detect and determine destabilization phenomena suffering concentrated dispersions over time. The sample (20 mL) was placed in a cylindric glass tube. The detection head was composed of a pulsed near-infrared light source ($\lambda_{IR} = 880$ nm) and two synchronous detectors: transmission (T) for transparent/translucent samples and backscattering (BS) for opaque samples. The T detector receives the light which crosses the sample (at 180° from the incident beam), while the BS detector receives the

light scattered backwards by the sample (at 45° from the incident beam) [19, 20]. Readings were taken at 1, 7, 15 and 30 days after the preparation of the formulation at room temperature for 24 hours.

2.7. In vitro proliferation studies

NM-OA/UA and nanoemulsion loaded with natural mixture (NM-OA/UA NEm) were tested in B16 melanoma cell line (American Type Culture Collection, USA). Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma–Aldrich Chemical Co., USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin). When the culture reached confluence, cells were seeded in 96-well plates (5×10^3 cells per well) and incubated for 24 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Afterwards, nanoemulsion and free compound were added in a concentration range between 1–40 μM, and cells were incubated for 48 and 72 h. Control culture represented cells without treatment. In addition, cultures with blank nanoemulsion (Blank-NEm) and DMSO were used as an internal control. Cytotoxicity was determined using the sulforhodamine-B (SRB) method. Briefly, the cells were fixed with 10% trichloroacetic acid for 20 min at 4°C and washed three times with water. After 24 hours cells were stained for 30 min at room temperature with 0.4% SRB dissolved in 1% acetic acid and then washed three times with 1% acetic acid. The plates were air-dried and the dye was solubilized with 300 μl/well of 10 mM Tris base (pH 10.5) for 10 min on a shaker. The optical density of each well was measured spectrophotometrically using a Titertekmultiscan colorimeter (Flow, Irvine, California) at 492 nm.

2.8. Statistical analysis

The SPSS Statistics v20.0.0 software package (SPSS, USA) was used in the statistical analysis. Data were reported as mean ± standard deviation (SD) for six replicates ($n = 6$) and subjected to analysis of variance (ANOVA). Differences among means were determined by the Tukey's Multiple Comparison Test with significance defined at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Characterization of nanoemulsion

NM-OA/UA NEm showed a monophasic appearance, optically transparent and slightly yellowish in color, with spherical droplets (Fig. 2). The determination of droplet size of nanoemulsion was performed with the DLS technique. Obtaining a droplet size of 198.95 ± 21.34 nm and polydispersity index 0.252 ± 0.053 . The nanoemulsion had low viscosity, main feature of this type of formulation, as this property is very important for stability and efficient drug release, the value of viscosity at 100 s^{-1} was $51.97 \pm 4.57 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, presenting a Newtonian fluid behavior. Fig. 3 shown the spectra of shear stress (Pa), and the viscosity ($\text{Pa}\cdot\text{s}$).



Figure 2. Nanoemulsion of NM-OA/UA

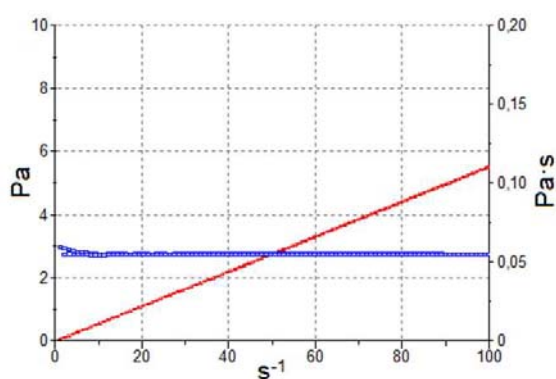


Figure 3. Rheogram of NM-OA/UA NEm, showing the shear stress (Pa) (red line) and the viscosity ($\text{Pa}\cdot\text{s}$) (blue line).

3.2. Stability studies

To evaluate the long-term physical stability of the nanoemulsion was employed the technique of multiple light scattering measurement to detect and determine destabilization phenomena like coalescence, flocculation, sedimentation, creaming, etc. The phenomenon of sedimentation (migration of the particles) occurs when there a transmittance decrease vs. time at the bottom of the sample. When this change occurs in the top, it is because the sample suffers a creaming process. When a transmittance decrease vs. time is observed over the whole height of the sample, is due to the droplet size variation (flocculation or coalescence process) [21]. Fig. 4 shows the transmission profile of the nanoemulsion, at 1, 7, 15 and 30 days postproduction. The left side of the profile corresponds to the bottom of the vial, whereas the right side corresponds to the sample behaviour on the top of the vial. As can be seen in the profile, there is no presence of such phenomena, the slight changes in the bottom and top is due by the meniscus that the sample forms in contact with the glass.

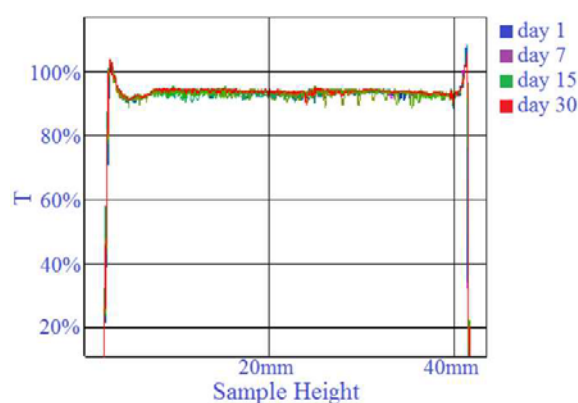


Figure 4. Transmission (T) profile of NM-OA/UA NEm.

3.3. *In vitro* proliferation studies on B-16 melanoma cell line

The effect of NM-OA/UA, NM-OA/UA NEm on B16 melanoma cell line at 48 and 72 hours of exposure are presented in Figure 5. As shown in graph of 48 hours of exposure, the NM-OA/UA shows no significant statistical changes in cell viability in the first concentrations (1-20 μM), however at 30 μM there is a decrease to 3% of cell survival. The

Resultados

NM-OA/UA NEm not present changes to the concentration of 1 μM , but at 5 μM there is a reduction of 38% and from 10 μM a decrease of 4% cell survival. The formulation showing a better action with respect to the free compound. Although one can observe that the blank nanoemulsion also has an effect on the cell line, decreasing the viability from 5 μM from 47 to 3%, exerting a synergistic action with the natural compounds, this may be due to the components of the formulation mainly to castor oil, which has been highly used as a way to deliver chemotherapy drugs to cancerous tumors and has a suppressive effect on some tumors [22, 23], although there is a few scientific evidence to support this action.

At 72 hours of exposure it can observe a similar behavior at 48 hours. DMSO studies indicated no cytotoxicity at the used concentrations and times, indicating no interference of the solubilizing agent.

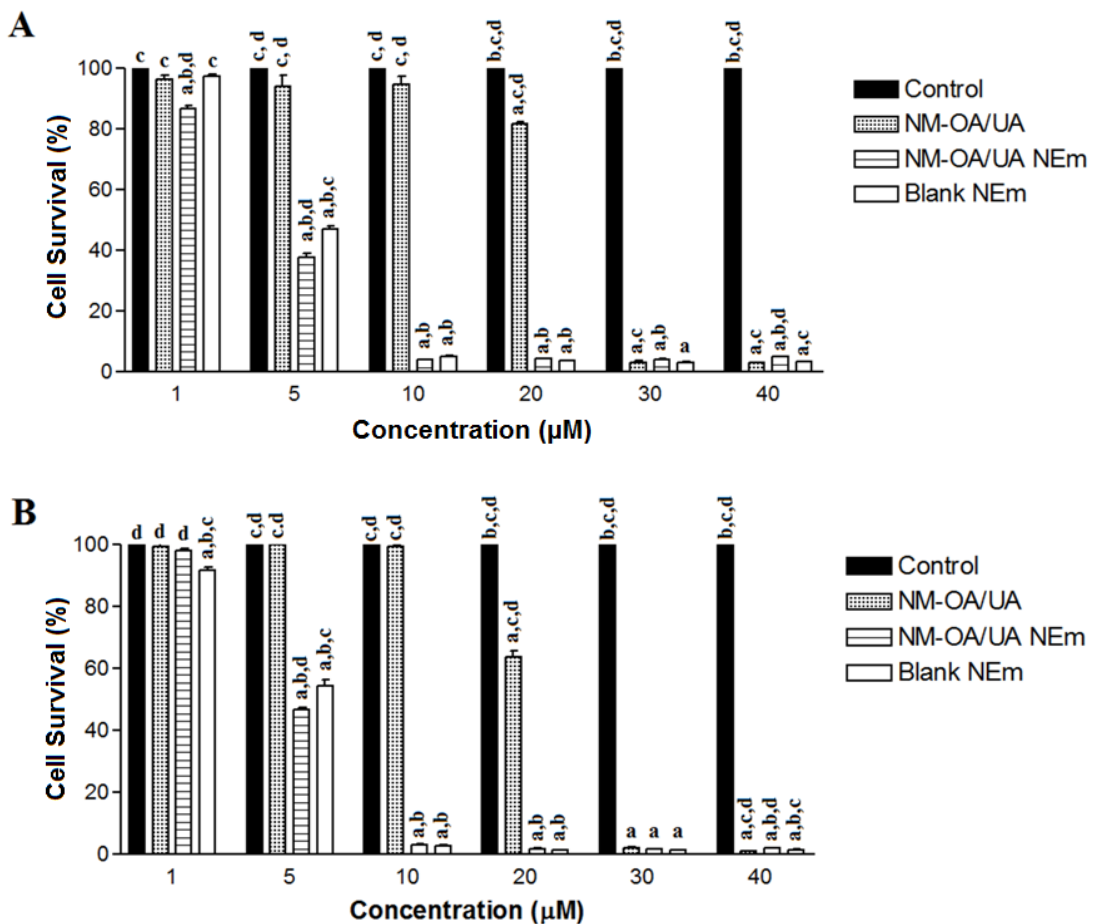


Figure 5. Effect of NM-OA/UA, NM-OA/UA NEm and blank NEm on B-16 murino melanoma cells viability (n = 6) after 48 h (A) and 72 h (B) of exposure. p < 0.05 for a: control, b: NM-OA/UA, c: NM-OA/UA NEm and d: blank NEm.

These natural triterpene compounds were shown to have anticarcinogenic activity against B16 murine melanoma cell line, with an IC₅₀ between 20 and 30 µM, however to be incorporated into the nanoemulsion, there is a better action at lower concentrations, obtaining an IC₅₀ between 5 and 10 µM for the formulation.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the sponsorship of the project (MAT2011-26994) of the Ministry of Science and Innovation of Spain; Gattefossé by provide the materials used.

References

1. M. Martelanc, I. Vovk, B. Simonovska, Separation and identification of some common isomeric plant triterpenoids, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 6662–6670.
2. L.O. Somova, A. Nadar, P. Rammanan, F.O. Shode, Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension, *J. Phytomedicine*, 10 (2003) 115–121.
3. J. Liu, Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid, *J. Ethnopharmacol.* 49 (1995) 57–68.
4. J. Li, W. Guo, Q. Yang, Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15, *World J. Gastroenterol.* 8 (2002) 493–495.
5. T. Akihisa, S. Kamo, T. Uchiyama, H. Akazawa, N. Banno, Y. Taguchi, K. Yasukawa, Cytotoxic activity of *Perilla frutescens* var. *japonica* leaf extract is due to high concentrations of oleanolic and ursolic acids, *J. Nat. Med.* 60 (2006) 331–333.
6. P. Srivastava, N. Kasoju, U. Bora, R. Chaturvedi, Accumulation of betulinic, oleanolic, and ursolic acids in *in vitro* cell cultures of *Lantana camara* L. and their

Resultados

- significant cytotoxic effects on HeLa cell lines, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15 (2010) 1038–1046.
7. J.W. Shao, Y.C. Dai, J.P. Xue, J.C. Wang, F.P. Lin, Y.H. Guo, *In vitro* and *in vivo* anticancer activity evaluation of ursolic acid derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 2652–2661.
 8. Z. Ovesná, K. Kozics, D. Slameňová, Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells, *Mutat. Res.* 600 (2006) 131–137.
 9. J. Fernandes, R. Oliveira Castilho, M. Rangel da Costa, K. Wagner-Souza, M.A. Coelho Kaplan, C. Rocha Gattass, Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines, *Cancer Lett.* 190 (2003) 165–169.
 10. C.R. Liao, Y.H. Kuo, Y.L. Ho, C.Y. Wang, C.S. Yang, C.W. Lin, Y.S. Chang, Studies on cytotoxic constituents from the leaves of *Elaeagnus oldhamii* maxim. in non-small cell lung cancer A549 cells, *Molecules*, 19 (2014) 9515–9534.
 11. C.Y. Huang, C.Y. Lin, C.W. Tsai, M.C. Yin, Inhibition of cell proliferation, invasion and migration by ursolic acid in human lung cancer cell lines, *Toxicol. In Vitro*, 25 (2011) 1274–1280.
 12. S.L. Yan, C.Y. Huang, S.T. Wu, M.C. Yin, Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines, *Toxicol. In Vitro* 24 (2010) 842–848.
 13. M. Laszczyk, Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy, *Planta Med.* 75 (2009) 1549–1560.
 14. Skin cancer foundation. Available online: <http://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma> (accessed on February 2015).
 15. American Cancer Society[®]. Cancer facts and figures 2014, (2014) 20–21. Available from: <http://www.cancer.org>.
 16. L. Gibot, S. Chabaud, S. Bouhout, S. Bolduc, F.A. Auger, V.J. Moulin, Anticancer properties of chitosan on human melanoma are cell line dependent, *Int. J. Biol. Macromolec.* 72 (2015) 370–379.
 17. L.I. Hernández Chávez, Estudio químico y evaluación farmacológica de la actividad antidiabética de las hojas de *Plumeria obtusa*, especie empleada en la medicina

- tradicional mexicana para los síntomas de la Diabetes Mellitus, Colima, México, 2004.
18. H.L. Alvarado, G. Abrego, E.B. Souto, M.L. Garduño-Ramírez, B. Clares, M.L. García, A.C. Calpena, Nanoemulsions for dermal controlled release of oleanolic and ursolic acids: in vitro, ex vivo and in vivo characterization. *Colloids Surf. B.* 130 (2015) 40–47.
 19. C. Lemarchand, P. Couvreur, C. Vauthier, D. Costantini, R. Gref, Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan, *Int. J. Pharm.* 254 (2003) 77-82.
 20. G. Abrego, H.L. Alvarado, M.A. Egea, E. González-Mira, A.C. Calpena, M.L. García, Design of nanosuspensions and freeze-dried PLGA nanoparticles as a novel approach for ophthalmic delivery of pranoprofen, *J. Pharm. Sci.*, 103 (2014) 3153-3164.
 21. E. Gonzalez-Mira, M.A. Egea, M.L. Garcia, E.B. Souto, Design and ocular tolerance of flurbiprofen loaded ultrasound-engineered NLC, *Colloids and Surf., B*, 81 (2010) 412-421.
 22. American Cancer Society[®]. Available online: <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/complementaryandalternative/complementary/manualhealingandphysicaltouch/castor-oil> (accessed on March 2015).
 23. Final report on the safety assessment of ricinus communis (castor) seed oil, hydrogenated castor oil, glyceryl ricinoleate, glyceryl ricinoleate se, ricinoleic acid, potassium ricinoleate, sodium ricinoleate, zinc ricinoleate, cetyl ricinoleate, ethyl ricinoleate, glycol ricinoleate, isopropyl ricinoleate, methyl ricinoleate, and octyldodecyl ricinoleate, *Int. J. Toxicol.*, 26 (2007) 31-77.

4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

El presente trabajo trata sobre el diseño, optimización y caracterización de sistemas nanoestructurados de liberación prolongada, tales como nanopartículas poliméricas (NPs) y nanoemulsiones (NEm), conteniendo mezclas natural y sintética de triterpenos pentacíclicos, ácido oleanólico (OA) y ácido ursólico (UA), con actividad antiinflamatoria, para administración ocular y dérmica.

El ácido oleanólico y su isómero el ácido ursólico son triterpenos pentacíclicos que existen ampliamente en las plantas naturales en forma de ácido libre o aglicona de saponinas triterpenoides y constituyen una parte integral de la dieta humana. Estos compuestos triterpenoides son de gran interés como agentes terapéuticos y sus actividades biológicas son bastantes similares por la proximidad de sus estructuras químicas, exhibiendo actividad antiinflamatoria, anticancerígena, antioxidante, hepatoprotectora, antimicrobiana, etc., lo que los convierte en candidatos idóneos para su utilización en medicina (Liu, 1995).

La mezcla natural (NM-OA/UA) con que se trabajó, se aisló del extracto metanólico de las hojas de la planta de *Plumeria obtusa* (recolectadas en Calakmul, Campeche, México), por medio del proceso de cromatografía en columna a presión reducida, empleando sílica gel FH₂₅₄ como soporte de la cromatografía. A partir de las proporciones de cada ácido triterpenoide de esta mezcla, se realizó una mezcla sintética (SM-OA/UA) con los componentes individuales, para la evaluación y comparación de ambas. Los porcentajes se calcularon como la media de las superficies truncadas de diferentes muestras naturales, resultando en $10.6 \pm 0.89\%$ de OA y $89.4 \pm 0.86\%$ de UA.

Para la cuantificación de estos compuestos, se desarrolló y validó un método por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). El equipo y las condiciones cromatográficas que se utilizaron fueron: columna analítica Kromasil C₁₈ 100 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm, Teknokroma), fase móvil de acetonitrilo-agua (85:15 v/v), a un flujo de 1.0 mL/min, con un volumen de inyección de 10 µL. Los compuestos se detectaron a una longitud de onda de

Discusión

210 nm, realizando las determinaciones a temperatura ambiente y en régimen de flujo isocrático. Los picos de los compuestos aparecieron aproximadamente a los 14.3 minutos para el OA y a los 14.9 minutos para el UA (Figura 2, artículo 1). Las curvas de calibración ensayadas fueron preparadas a partir de la solución madre de 1.0 mg/mL, disolviendo la cantidad apropiada de los compuestos en etanol-agua (7:3 v/v), a partir de ésta se realizaron las siguientes disoluciones, 3.62, 7.25, 14.5, 29, 58 y 116 µg/mL para NM-OA/UA y 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/mL para SM-OA/UA. La validación del método desarrollado se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH), evaluando la linealidad, selectividad, sensibilidad, exactitud y precisión. La linealidad se determinó preparando 6 curvas de calibración, obteniéndose ecuaciones de regresión $y = 6230.7x - 5553$, $r^2 = 0.9999$ e $y = 6196.2x - 2345.9$, $r^2 = 0.9999$ para NM-OA/UA y SM-OA/UA respectivamente. La exactitud y precisión del método se realizó intra-día e inter-día, consiguiendo valores dentro del rango establecido ($\pm 2\%$) (Tabla 1, artículo 1). Se obtuvieron límites de cuantificación de 2.81 ± 0.65 µg/mL y 4.14 ± 2.07 µg/mL y límites de detección de 0.93 ± 0.21 µg/mL y 1.37 ± 0.68 µg/mL para NM-OA/UA y SM-OA/UA, respectivamente.

Las NPs desarrolladas se elaboraron a partir de copolímeros de PLGA con ratio molar de 75/25, por el método de desplazamiento de solvente (Fessi, et al. 1989), esta técnica consiste en la emulsificación de una solución orgánica que contiene el polímero y fármaco disueltos en acetona añadiéndose a una fase acuosa que contiene el tensioactivo, el cual proporciona estabilidad al sistema, bajo agitación magnética, seguida de la evaporación del disolvente orgánico mediante presión reducida (Rocha Formiga, et al. 2009). Para la optimización de estas nanopartículas se realizó un diseño factorial rotatorio central compuesto ($2^3 + \text{star}$), donde se evaluaron tres factores: la concentración de OA/UA, concentración del tensioactivo (Poloxamer, P188) y el valor de pH de la fase acuosa a 5 diferentes niveles, con el fin de evaluar el efecto de estas variables, así como posibles interacciones entre ellas en el tamaño de partícula, índice de polidispersidad (PI), potencial zeta (ZP) y eficiencia de encapsulación (EE) (Tabla 2, artículo 2). Con el análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 5) se pudo observar que ninguno de estos factores tuvo efecto significativo sobre el tamaño de partícula y PI. Obteniéndose tamaños entre $204.4 \pm$

1.18 y 234.8 ± 1.27 nm, y valores de PI entre 0.047 ± 0.013 y 0.104 ± 0.025 , estos resultados de PI inferiores a 0.1 indican un sistema monodisperso. Mientras que el ZP se vio afectado por la interacción entre la concentración del poloxamer con el pH de la fase acuosa, dando un efecto positivo (+11.53 mV), donde se pudo observar que al incrementar la concentración del P188 a valores bajos de pH, el valor de ZP disminuyó (Figura 1A, artículo 2). Los valores de ZP oscilaron entre -38.3 ± 0.81 y -7.60 ± 0.78 mV. La eficiencia de encapsulación se vio afectada por la concentración del fármaco, que presentó un efecto negativo (-10.76%), y por la interacción entre la concentración del poloxamer con el pH (-8.57%), donde al incrementar la concentración del P188 a valores de pH bajos, la EE aumentaba (Figura 1B, artículo 2), se obtuvieron valores de EE entre 54.55 ± 3.09 y $80.15 \pm 0.62\%$. La formulación que se seleccionó para seguir con los estudios fue con los valores centrales: 1.0 mg/mL de OA/UA, 10.0 mg/mL de P188 y valor pH de 5.5 para la fase acuosa.

Tabla 5. Análisis estadístico de ANOVA de tamaño de partícula, PI, ZP y EE del diseño factorial

Factores evaluados y sus interacciones	Valor de <i>p</i>			
	Tamaño de partícula	PI	ZP	EE
A: cOA/UA	0.6623	0.2834	0.4702	0.0040*
B: cP188	0.2122	0.9763	0.2351	0.7009
C: pH	0.0837	0.4669	0.0666	0.0696
AB	0.4141	0.8079	0.5902	0.5885
AC	0.8241	0.6984	0.6267	0.2550
BC	0.1918	0.7707	0.0409*	0.0329*

* Diferencias significativas valor de $p < 0.05$

Para la determinación del tamaño de partícula, PI, se empleó la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) o conocida también como espectroscopía de correlación de fotones (PCS), dichos resultados fueron corroborados por la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Figura 2, artículo 2), donde se observó la forma esférica de las

Discusión

partículas con un tamaño alrededor de 200 nm en ambas mezclas de triterpenos, tamaño adecuado para la aplicación ocular.

Los termogramas de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Figura 3, artículo 2) mostraron que NM-OA/UA y SM-OA/UA exhibieron un pico de fusión a los 264.14 °C y 285.42 °C respectivamente. El termograma del PLGA mostró un evento térmico a los 52.74 °C, correspondiente a la temperatura de transición vítrea (T_g) del polímero, mientras que el P188 mostró un pico a los 53.63 °C. Se pudo observar al analizar las nanopartículas cargadas con las mezclas, que el pico exhibido por los compuestos desaparece, sugiriendo ausencia de fármaco cristalino libre. Se constató, así mismo, que hay un incremento en la T_g del polímero y tensioactivo con picos a los 102.26 °C y 102.76 °C, encontrándose también este evento en el termograma de las nanopartículas blancas. Esto podría ser debido a la interacción entre el polímero y el tensioactivo durante la evaporación del solvente al preparar estas formulaciones, ya que la movilidad de las cadenas del PLGA en su estado vítreo depende de la interacción del polímero con los otros componentes de la formulación, tales como los fármacos, aditivos o tensioactivos (**Bouissou, et al. 2006**).

Para el desarrollo de las nanoemulsiones se construyó un diagrama pseudo-ternario de fases, para determinar el área existente de la NEm, donde en primer lugar se probó la solubilidad de los compuestos triterpenoides en diferentes aceites, tensioactivos y co-tensioactivos (Tabla 1, artículo 3). Fueron seleccionados los que presentaron mayor solubilidad, no tóxicos o irritantes para la piel y de mayor y fácil accesibilidad, estos fueron el aceite de castor como fase oleosa; labrasol como tensioactivo; transcitol-p como co-tensioactivo y propilenglicol como fase acuosa, evitando el uso de agua, debido a la insolubilidad de los compuestos en esta. Conformando estas tres fases cada lado del diagrama. Se probaron diferentes ratios de S_{mix} (mezcla del tensioactivo:co-tensioactivo) (4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 y 1:4 p/p) (Figura 1, artículo 3). Por cada diagrama se elaboraron 9 diferentes combinaciones del aceite y un ratio específico de S_{mix} (1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, y 9:1 p/p). Los diagramas de fase oleosa, acuosa y S_{mix} se desarrollaron usando el método de titulación acuosa. Para seleccionar la NEm adecuada, se eligió el diagrama que presentó mayor área de existencia de la NEm, el cual fue el diagrama con ratio de S_{mix} 4:1

(4 partes de labrasol por 1 de transcutool-p), se tomaron varios puntos de este diagrama y se evaluó su apariencia física, el tamaño de gota y el PI (Tabla 2, artículo 3), seleccionando la formulación con apariencia monofásica, menor tamaño de gota y menor PI. La formulación seleccionada para con los ensayos posteriores fue la que estaba formada por 20% de aceite de castor, 20% propilenglicol, 59.80% de S_{mix} con ratio 4:1 (47.82% de labrasol y 11.96% de transcutool-p) y 0.2% de las mezclas de OA/UA.

Ambas NEm (NM-OA/UA NEm y SM-OA/UA NEm) mostraron una apariencia monofásica, ópticamente transparentes y ligeramente de color amarillo. El tamaño de gota y PI se determinó al igual que en las NPs con DLS, se obtuvieron valores de tamaño de gota entre 200.95 y 590.54 nm e índice de polidispersidad entre 0.252 a 0.734 para NM-OA/UA NEm y tamaños de gota entre 139,70 y 450.89 nm e índice de polidispersidad entre 0.185 a 0.664 para SM-OA/UA NEm. Este tamaño de gota se atribuyó a la alta masa molar de los compuestos triterpénicos (456,7 g/mol), además de su estructura compleja y afinidad de estos compuestos a los componentes de la nanoemulsión. Se pudo observar que el tamaño de gota se vio afectado por la concentración de la fase oleosa, donde al incrementar el porcentaje de aceite, aumentaba el tamaño de gota; por otro lado, la concentración de S_{mix} tuvo el efecto contrario, disminuyendo el tamaño de gota al incrementar el porcentaje de S_{mix} . El índice de polidispersidad tuvo los mismos efectos que en el tamaño de gota en ambas mezclas (Tabla 2, artículo 3). Al igual que en las NPs, el tamaño obtenido por la técnica de PCS se corroboró con el TEM, donde se pudo observar la similitud en los valores obtenidos.

Las formulaciones se sometieron a un estudio de viscosidad, ya que este parámetro influye en la estabilidad a largo plazo de las partículas y gotas (**Eros y Thaleb, 1994**), así como en la liberación eficaz del fármaco. Los valores de viscosidad a 100 s^{-1} fueron 2.5 ± 0.5 y 1.3 ± 0.08 mPa·s para SM-OA/UA NPs y NM-OA/UA NPs respectivamente, presentando un comportamiento Newtoniano. Estos valores bajos de viscosidad obtenidos permiten una filtración estéril y una fácil dispensación como gotas para los ojos, mientras que el comportamiento Newtoniano asegura que el parpadeo no debe tener ningún efecto sobre la viscosidad (**Fialho y da Silva-Cunha, 2004**). Para las NEm, los valores obtenidos

Discusión

fueron 51.97 ± 4.57 y $55.33 \pm 0,28$ mPa·s para NM-OA/UA NEm y SM-OA/UA NEm, respectivamente, ambas siguiendo un comportamiento Newtoniano también. Valores bajos de viscosidad son una principal característica de las NEm (**Solans, et al. 2005**). Los valores de viscosidad de las NEm son mayores en comparación a los de las NPs, debido a los componentes de la NEm, especialmente la fase oleosa.

Uno de los parámetros más importantes a evaluar en los sistemas coloidales es su estabilidad física a largo plazo, ya que controla la validez y las condiciones de almacenamiento requeridas. Para evaluar la estabilidad se utilizó el TurbiscanLab[®], analizador óptico usado para evaluar fenómenos de desestabilización (coalescencia, floculación, sedimentación, cremado, etc.) antes que el ojo humano y que otros métodos clásicos como la microscopía, espectroscopía y análisis de tamaño de partícula puedan detectarlos. Se considera que es un instrumento capaz de predecir la estabilidad a largo plazo. Este tiene dos detectores sincrónicos: de transmisión (T) para muestras transparentes/translúcidos como en el caso de las NEm y de retrodispersión o backscattering (BS) para las muestras opacas, para las NPs. Cuando se produce el fenómeno de sedimentación (migración de las partículas) la señal de transmisión o retrodispersión decrece en el tiempo en la parte baja de la muestra (lado izquierdo del perfil). Cuando este cambio ocurre en la parte superior de la muestra (lado derecho del perfil), se produce el fenómeno de cremado o creaming. Cuando la transmitancia o retrodispersión decrece en el tiempo a lo largo de toda la muestra, es debido a la variación del tamaño de partícula o gota (floculación o coalescencia) (**González-Mira, et al. 2011**). Si las señales presentan una desviación menor o igual a $\pm 2\%$, puede considerarse que no habrá diferencias significativas del tamaño de partícula o gota, mientras que variaciones mayores de un $\pm 10\%$ indican inestabilidad de las formulaciones. Se realizaron mediciones a los 0, 7, 15 y 30 días después de la elaboración, para las NPs y 1, 7, 15 y 30 días para las NEm, en ninguna de las formulaciones se presentó algún cambio significativo en los perfiles de barrido de BS y T, exhibiendo una señal continua a lo largo de la muestra. Las ligeras variaciones que se pueden observar en la parte superior de la muestra para las NPs y NEm, y en la parte inferior para las NEm, se atribuyen a los meniscos que forman las

muestras al estar en contacto con las paredes del vial. Por lo que las formulaciones optimizadas se consideran sistemas estables.

En paralelo también se evaluó la estabilidad de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C) y temperatura de refrigeración (4°C) por 180 días a las NPs y por 60 días a las NEm, midiendo sus características físicas. Para las NPs se pudo observar que no hubo cambios significativos en los valores de tamaño de partícula, ZP, PI y EE (Tabla 3, artículo 2). En el caso de las NEm se pudo observar un incremento tanto del tamaño de gota como del PI, encontrándose diferencias significativas entre ambas mezclas a los 15 y 30 días del estudio (Tabla 3, artículo 3), pero no mostrando cambios significativos desde que se prepararon hasta los 60 días en las muestras almacenadas a 4 °C.

En estos tipos de sistemas, la evaluación de la velocidad a la que el fármaco se libera desde el vehículo es particularmente importante. Se puede utilizar como datos de control de calidad para predecir su comportamiento *in vivo* o para estudiar la estructura y los mecanismos de liberación. Para los estudios de liberación, se analizó, previamente, la solubilidad de las mezclas en el medio receptor (etanol:agua, 7:3 v/v) con el fin de comprobar que se cumplan las condiciones *sink* durante todo el experimento. Esto permite asegurar que la concentración máxima que puede encontrarse en el medio receptor a lo largo del experimento sea inferior a un 20% de la concentración de saturación de las mezclas triterpenoides en el medio, garantizando que la liberación de los compuestos no se verá limitada por la solubilidad del medio. Para conocer el perfil cinético de liberación de OA/UA se llevó a cabo un estudio *in vitro* de césion en células de difusión de Franz (**Franz, 1975**), empleando membrana de diálisis artificial con peso molecular de corte, MWCO entre 12-14 KDa, ésta permite el paso del fármaco pero impide el paso de las partículas o gotas de las formulaciones, ya que éstas son mayores que el tamaño de poro estimado para estas membranas de 2.4 nm (**Venkateswarlu y Manjunath, 2004**); el área de difusión fue de 2.54 cm². Para describir el mecanismo de liberación de OA/UA, se usaron diferentes modelos matemáticos (orden zero, primer orden, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Weibull). Para seleccionar el modelo que mejor explique la liberación, se utilizó un parámetro de discriminación de modelos, el Criterio de Información de Akaike (AIC), que

Discusión

realiza el mejor ajuste de los datos en función de la máxima verosimilitud. Al comparar varios modelos para un determinado conjunto de datos, el modelo asociado con el menor valor de AIC, es el que se escoge como mejor modelo de ajuste matemático (**Posada y Rosero Noguera, 2007**). A su vez, también se utilizó el coeficiente de determinación (r^2), donde el mejor modelo es el que tuvo mayor valor.

Con respecto a la liberación de OA/UA de las NPs, se pudo observar que en las primeras horas del estudio (Figura 4, artículo 2) hubo diferencias significativas entre los perfiles de liberación de las dos mezclas, donde NM-OA/UA NPs tiene una mayor liberación (75% después de 40 horas) en comparación con SM-OA/UA NPs (75% hasta las 72 horas), después de las 40 horas, ambas mezclas mostraron perfiles similares. Mientras que la liberación de OA/UA a partir de las NEm fue más lenta, donde alcanzaron un 47.22% y 44.40% de NM-OA/UA NEm y SM-OA/UA NEm respectivamente hasta las 72 horas (Figura 2, artículo 3). De acuerdo con los valores de AIC y r^2 (Tabla 4, artículo 2) el modelo que mejor ajuste estadístico tuvieron las NPs fue la ecuación de Weibull, en ambas mezclas. Weibull se ha considerado típicamente como una ecuación empírica, en el que, el valor del parámetro β (parámetro de forma adimensional) es un indicador de mecanismo de liberación de difusión. La función de Weibull ayuda para al discernimiento de los mecanismos de liberación de los fármacos, las estimaciones para valores de $\beta \leq 0.75$ indican una difusión Fickiana, mientras que un mecanismo combinado (difusión Fickiana y una liberación inmediata seguida de una liberación sostenida) se asocia con valores de $0.75 < \beta < 1$. Para los valores de β mayores que 1, el transporte de los fármacos sigue un mecanismo de liberación complejo (**Papadopoulou, et al. 2006**). Los resultados obtenidos mostraron valores de $\beta = 1.35 \pm 0.25$ y 1.28 ± 0.09 para SM-OA/UA NPs y NM-OA/UA NPs, respectivamente, que se describe como una curva sigmoidea, indicativo del mecanismo de liberación complejo; la velocidad de liberación no cambia monótonamente. Otro parámetro de esta ecuación es el tiempo de disolución (T_d) que representa el intervalo de tiempo necesario para disolver o liberar el 63,2% del fármaco. En este caso, los valores de T_d fueron 22.34 ± 7.67 y 13.49 ± 1.52 h (SM-OA/UA NPs y NM-OA/UA NPs respectivamente). Esta diferencia podría explicarse por la posible presencia de otras sustancias en la mezcla natural que podrían actuar como promotores.

Para las NEm el mejor ajuste se obtuvo con la ecuación de Korsmeyer-Peppas (Tabla 4, artículo 3). El parámetro " n " en la ecuación de Korsmeyer-Peppas está relacionado con el mecanismo de liberación del fármaco, es decir, si el exponente $n < 0.43$, entonces el mecanismo de liberación del fármaco es difusión Fickiana, si $0.43 < n < 0.85$, se considera difusión no-Fickiana o anómala y un valor de n de 0.85 o superior es indicativo de transporte caso-II o liberación típica de orden cero (Jose, et al. 2013; Peppas, 2014). Ambas nanoemulsiones, NM-OA/UA NEm y SM-OA/UA NEm, mostraron valores de n de 0.77, por lo que siguen un mecanismo de liberación es difusión no Fickiana o anómala.

También se evaluaron parámetros independientes del modelo cinético, como el tiempo de disolución media (MDT), definido como el tiempo medio de residencia de un fármaco en la formulación, y la eficiencia de disolución (DE) (Villar, et al. 2012). MDT es un parámetro útil para caracterizar la tasa de liberación del fármaco desde una forma de dosificación. En la tabla 6 se pueden observar los parámetros amodelísticos de las NPs y NEm, donde no hay diferencias estadísticas significativos ($p > 0.05$) entre las mezclas.

Tabla 6. Parámetros amodelísticos

Parámetro	Nanopartículas			Nanoemulsiones		
	NM-OA/UA	SM-OA/UA	p	NM-OA/UA	SM-OA/UA	p
MDT (h)	14.11 ± 2.39	20.36 ± 4.33	0.12	32.71 ± 0.88	32.41 ± 1.86	0.83
DE (%)	80.41 ± 3.32	71.72 ± 6.02	0.12	56.71 ± 1.17	56.78 ± 2.48	0.82

Para determinar la capacidad de penetración de estos compuestos a través de la piel y de la córnea, se realizaron estudios “*ex vivo*” de permeación, usando nuevamente las células de difusión de Franz, estos estudios son indicativos de la disponibilidad tópica o sistémica de los fármacos, proporcionando información sobre la permanencia del fármaco en el órgano a tratar. Para evaluar la capacidad de penetración corneal de OA/UA de las NPs, se emplearon como membrana biológica, córneas de conejos. Durante las 6 horas del estudio ambas mezclas mostraron un perfil de permeación similar (Figura 4.B, artículo 2), obteniéndose un 22% y 24% de cantidad permeada para SM-OA/UA NPs y NM-OA/UA NPs respectivamente. Al finalizar el estudio se determinó la cantidad de OA/UA retenido

Discusión

en la córnea, de acuerdo con estos datos, se puede asumir que estos compuestos ejercen una acción local sobre la córnea debido a que la mayor parte de estos quedó retenida en esta área, donde se obtuvo $1.74 \pm 0.38 \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{g}$, correspondiente a un 43% de la cantidad inicial para SM-OA/UA NPs, y $2,63 \pm 0,27 \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{g}$, esto representa al 51% de la cantidad inicial para NM-OA/UA NPs. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de permeación (coeficiente de permeabilidad aparente, P_{app} y flujo) entre las dos NPs. También se determinó el nivel de hidratación corneal, para evaluar posibles daños que el fármaco o medio receptor pudieran provocar en las córneas, obteniendo valores dentro del rango normal de hidratación, asegurando que OA/UA o el transcutol-p (usado en el estudio como medio receptor) no causaron ningún daño al tejido corneal.

En los estudios de permeación de piel humana, los perfiles de permeación (Figura 2, artículo 3) mostraron diferencias en las primeras 4 horas del estudio, donde hay una mayor cantidad permeada de SM-OA/UA NEm en comparación con la mezcla natural. Esto puede ser atribuido a la afinidad de los triterpenos con los componentes de la NEm y a la conformación molecular, haciendo más lenta o más rápida la permeación de los triterpenos de las nanoemulsiones. A partir de ese tiempo del estudio (condiciones estacionarias) se calcularon los parámetros de permeación (K_p y J) (Tabla 5, artículo 3), los cuales no mostraron diferencias significativas entre ambas NEm. Al finalizar el estudio también se calcularon las cantidades de OA/UA retenidas en la piel, siendo igual que en el caso del estudio de permeación corneal, donde hay mayor cantidad de OA/UA retenida que la cantidad permeada, asumiendo un efecto local. NM-OA/UA NEm tuvo más cantidad retenida ($576.60 \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{g}$) con respecto a SM-OA/UA NEm ($424.69 \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{g}$), sin embargo no hay diferencias significativas entre ellas ($p = 0.1898$).

Se determinó la irritación ocular potencial de las NPs con la técnica “*in vitro*” de HET-CAM, en la que se probaron las NPs en la membrana corioalantoidea de huevos de gallinas, detectándose la aparición de hemorragias (sangrado de los vasos), lisis vascular (desintegración de los vasos sanguíneos) y coagulación (desnaturalización de las proteínas intra y extra-vascular) (Steiling, et al. 1999; Tavaszi y Budai, 2007). Después de haberse

aplicado las NPs, no se mostró ningún signo de irritación ocular dentro de los 5 minutos que esta técnica requiere para la detección de estos signos, obteniéndose un índice de irritación ocular (OII) de 0.07, para ambas mezclas. También se evaluó la irritación y toxicidad in vivo por el ensayo de Draize (**Draize, et al. 1944**) realizado en ojos de conejos. Este ensayo se determinó por la evaluación visual de los cambios en las estructuras oculares: en la córnea (opacidad), iris (grado de inflamación) y en la conjuntiva (congestión, hinchazón y supuración) (**Kay y Calandra, 1962**) donde se obtuvieron valores de MTS de 0, en ambas mezclas, confirmando con los resultados del HET-CAM, que estos sistemas son no irritantes y seguros para la administración ocular.

Para determinar los posibles efectos nocivos cutáneos que OA/UA podría tener cuando se pone en contacto con la piel, se realizó la prueba de irritación dérmica primaria, según el método de Draize (**Draize, et al, 1944; Vega, et al, 2013**). Esta prueba se realizó aplicando las NEm en el área dorsal de conejos albinos. El índice de irritación dérmica primaria obtenida para las NEm fueron 0.5 y 0.25, para NM-OA/UA NEm y SM-OA/UA NEm respectivamente, que de acuerdo a la clasificación de “Journal Officiel de la Republique Française del 24 Octubre de 1984”, los compuestos se consideran no irritantes y seguros para aplicación dérmica. También se probó la NEm blanca, obteniendo un índice de 0, lo que indicó que ningún componente de la formulación es irritante para la piel.

La eficacia antiinflamatoria ocular in vivo de las NPs en la prevención de los procesos inflamatorios secundarios a una agresión de carácter químico inducida por ácido araquidónico, se puso de manifiesto observando la respuesta inflamatoria a nivel de iris y conjuntiva ocular. Las NM-OA/UA NPs y SM-OA/UA NPs mostraron una disminución significativa de la inflamación, donde desde los 90 minutos del estudio se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control (Figura 5, artículo 2). Durante los primeros 120 minutos de ensayo no se detectaron diferencias significativas entre ambas mezclas, pero a los 150 minutos, NM-OA/UA NPs exhibió una mayor acción que la mezcla sintética. Esto podría deberse a que la mezcla natural se retiene en mayor cantidad en la córnea que la mezcla sintética, resultando en un efecto reservorio, haciendo que la acción farmacológica dure por más tiempo.

Discusión

La capacidad antiinflamatoria dérmica *in vivo* de los compuestos en NEm, se llevó a cabo en un modelo de inflamación tópica inducida por la administración de 13-Acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA) en oreja de ratón (**Della Loggia, et al, 1994; Qadeer, et al, 2007**). Los resultados mostraron que NM-OA/UA NEm tuvo una mayor inhibición de la inflamación ($76.19 \pm 1.59\%$) en comparación con SM-OA/UA NEm (33.86 ± 1.83), ésto puede ser atribuido a que hay mayor cantidad de NM-OA/UA retenida en la oreja del ratón que la SM-OA/UA. Las mediaciones que se hacen en este estudio son 4 horas después de la aplicación del TPA, y como se pudo observar en el estudio de permeación dérmica de las NEm a las primeras 4 horas, hay menos cantidad permeada de la mezcla natural, por lo tanto hay mayor cantidad retenida en el área, ejerciendo mayor acción local antiinflamatoria que la mezcla sintética. Además que es posible que la mezcla natural puede tener más componentes con actividad antiinflamatoria que mejore el efecto del OA/UA (**Siddiqui, et al. 2004**).

La incorporación de estos compuestos triterpenoides a NPs y NEm, desarrollaron sistemas coloidales con características físicas adecuadas, óptimos perfiles de liberación y permeación y una eficiente actividad antiinflamatoria, para aplicación tópica (dérmica y ocular) para terapia antiinflamatoria. A lo largo de todos los estudios se pudo observar que ambas mezclas mostraron mayoritariamente resultados similares en caracterización, estabilidad, liberación, sin embargo se pudo determinar que la NM-OA/UA mostró mayor acción farmacológica *in vivo* con respecto que SM-OA/UA.

Además de presentar actividad antiinflamatoria estos triterpenos son altamente utilizados en terapia oncológica, mostrando notables efectos anti-tumorales y actividad citotóxica en varios líneas celulares *in vitro* de cáncer, como en cáncer de hígado (HepG2, Hep3B, Huh7 y HA22T) (**Yan, et al. 2010**), carcinoma cervical humano (HeLa) (**Srivastava, et al. 2010**) y cáncer de pulmón (A549, H3255) (**Huang, et al. 2011**), entre otras. A pesar de ser estudiados ampliamente en diversas líneas celulares, hay muy pocos estudios sobre estos triterpenos que actúan en la línea celular de melanoma, la forma más peligrosa del cáncer de piel, por lo que también se estudio la actividad anticancerígena de NM-OA/UA NEm y NM-OA/UA, en la línea celular de melanoma murino B16. Este

ensayo se realizó por el método de tinción de sulforodamina B (SRB). La NM-OA/UA NEm, NM-OA/UA y la NEm blanca, se ensayaron en 6 diferentes concentraciones (1, 5, 10, 20, 30 y 40 μM) a dos tiempos de exposición (48 y 72 horas). Se observó que a las 48 horas de exposición, NM-OA/UA no mostró cambios significativos en la viabilidad celular en las primeras concentraciones (1-20 μM), sin embargo a partir de los 30 μM hay una disminución en la supervivencia celular (3%). La NM-OA/UA NEm no mostró cambios en la primera concentración de 1 μM , pero a los 5 μM hay una reducción hasta del 38% en la viabilidad y a partir de los 10 μM , una disminución hasta un 4%. Se pudo observar también que la NEm blanca presenta una acción anticancerígena a partir de los 5 μM . Ejerciendo una acción sinérgica con los compuestos triterpenoides, esto puede ser debido a los ingredientes de la formulación, en especial al aceite de castor, el cual de acuerdo a la Sociedad Americana de Cáncer ha sido altamente usado en tratamiento de fármacos oncológicos como medio de administración, además de presentar un efecto supresor sobre algunos tumores, aunque hay muy poca evidencia científica de esta acción. A las 72 horas de exposición se pudo observar un comportamiento similar al visto a las 48 horas.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONS

Based on the results, the following conclusions can be established:

1. It has been validated an analytical method by high-performance liquid chromatography for quantification of OA/UA, being linear, selective, accurate and precise in the concentration range of 3.62 - 116 $\mu\text{g/mL}$ for NM-OA/UA and 6.25 - 200 $\mu\text{g/mL}$ for SM-OA/UA, with limits of quantitation of $2.81 \pm 0.65 \mu\text{g/mL}$ and $4.14 \pm 2.07 \mu\text{g/mL}$ for NM-OA/UA and SM-OA/UA respectively.
2. The solvent displacement technique has developed PLGA polymeric nanoparticles loaded with natural and synthetic mixture of OA/UA, optimized by a factorial central composite design. The selected formulation was composed of 1.0 mg/mL OA/UA, 10.0 mg/mL P188 and aqueous phase with pH 5.5, obtained values of particle size around 200 nm, a surface charge of -27 mV and encapsulation between 76-78%.
3. By constructing pseudo-ternary phase diagrams, it has been designed and optimized nanoemulsions containing natural and synthetic mixture of OA/UA, with a final composition of 20% castor oil, 20% propylene glycol, 59.80% of S_{mix} with ratio 4:1 (47.84% labrasol and 11.96% transcuto1-p) and mixtures of triterpenoids 0.2%, with monophasic appearance, small droplet size (~ 200 nm) and polydispersity index around 0.2.
4. The images of transmission electron microscopy of the optimized formulations show particle sizes and drops around 200 nm and a spherical shape.
5. The kinetic profile of both mixtures encapsulated in NPs, it fits to the Weibull function, which follows a complex release mechanism.

Conclusions

6. NM-OA/UA NEm and SM-OA/UA NEm release, follows a kinetic model of Korsmeyer-Peppas equation with a release mechanism of non-Fickian or anomalous diffusion.
7. The corneal permeation of both mixtures in NPs, highlights greater amount retained on the cornea that permeated amount, being slightly higher in the natural mixture.
8. The skin permeation ability of the nanoemulsions of both mixtures, also shows that there is a greater amount retained in the skin that a permeated amount. The permeation profile showed that at the first 4 hours of study there is a greater permeated amount of SM-OA/UA NEM that of the natural mixture.
9. The results of in vitro and in vivo assays of ocular and dermal tolerance, indicate that the optimized formulations showed an optimal tolerance, being safe for topical application.
10. Both mixtures in NPs and NEM, exhibit effective inhibition of local inflammation, this effect being more marked in natural mixture formulations, which it is more retained in the contact area.
11. The nanoemulsion of the natural mixture shown anticarcinogenic activity in B16 murine melanoma cell line, from lower concentrations (5 μ M) than the pure compound (30 μ M). Blank-NEM also has anticarcinogenic activity from 5 μ M, which might be due to castor oil, which enhances the action of the pure natural compound.

6. BIBLIOGRAFÍA

A

American Cancer Society[®]. Cancer facts and figures 2014, (2014) 20–21. Available from: <http://www.cancer.org>.

Andrés-Guerrero, V., Herrero-Vanrell, R., 2008. Absorción de fármacos por vía tópica. Papel de la conjuntiva. Arch. Soc. Esp. Oftalmol. 83, 683-686.

Aulton, M.E., 2004. La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. 2ª ed. Elsevier (España), pp. 524-527.

B

Barry, B.W., 1983. Properties that influence percutaneous absorption. Dermatological formulations percutaneous absorption. Ed. Marcel Dekker, New York, pp. 160-172.

Barry, B.W., 2001. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. Eur. J. Pharma. Sci. 14(2), 101-114.

Becher, P., 2001. Emulsions: Theory and practice. 3ª ed., Oxford University Press Inc. New York, pp. 3-10.

Bhatt, P., Madhav, S., 2011. A detailed review on nanoemulsion drug delivery system. IJPSR. 2(9), 2292-2298.

Bouissou, C., Rouse, J.J., Prince, R., Van der Walle, F., 2006. The influence of surfactant on PLGA microsphere glass transition and water sorption: remodeling the surface morphology to attenuate the burst release. Pharm. Res. 23, 1295-1305.

Bueno, M., Toro, S., 1994. Visión normal en Deficiencia visual: aspectos psicoevolutivos y educativos. Ed. Aljibe, Málaga (España). pp. 13-26.

Bibliografía

Bulliard, J.L., Cox, B., Elwood, J.M., 1994. Latitude gradients in melanoma incidence and mortality in the non-Maori population of New Zealand. *Cancer Causes Control*. 5(3), 234-240.

D

Delgado, A., Minguillon, C., Joglar, J., 2003. *Introducción a la química terapéutica*. 2^a ed., Ed. Díaz de Santos, S.A. Madrid, (España). pp. 13-27.

Della Loggia, R., Tubaro, A., Sosa, S., Becker, H., Saar, S., Isaac, O., 1994. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Me*. 60(6), 516-520.

Devarajan, V., Ravichandran, V., 2011. Nanoemulsions: as modified drug delivery tool *Pharmacie Globale (IJCP)*. 4(1), 1-6.

Djordjevic, L., Primorac, M., Stupar, M., Krajisnik, D., 2004. Characterization of caprylocaproyl macroglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. *Int. J. Pharm.* 271(1-2), 11-19.

Domínguez-Villegas, V., García, M.L., Calpena, A., Clares-Naveros, B., Garduño-Ramírez, M.L., 2013. Anti-inflammatory, antioxidant and cytotoxicity activities of methanolic extract and prenylated flavanones isolated from leaves of *Eysehhardtia platycarpa*. *Nat. Prod. Commun.* 8, 177-180.

Draize, J.H., Woodward, G., Calvery, H.O., 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82, 377-390.

Dua, H.S., Faraj, L.A., Said, D.G., Gray, T., Lowe, J., 2013. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology*. 120(9), 1778-1785.

E

Elias, J.A., Gustilo, K., Baeder, W., Freundlich, B. 1987. Synergistic stimulation of fibroblast prostaglandin production by recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 138, 3812-3816.

Elias, P.M., Cooper, E.R., Korc, A., Brown, B.E., 1981. Percutaneous transport in relation to stratum corneum structure and lipid composition. *J. Invest. Dermatol.*, 76(4), 297-301.

Elias, P.M., 1983. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Invest. Dermatol.*, 80, Supp, 44s-49s.

Eros, Y., Thaleb, A., 1994. Rheological studies of creams. *Acta Pharm. Hung.* 64(3), 101-103.

Eschenmoser, A., Ruzicka, L., Jeger, O., Arigoni, D., 1955. Zur kenntnis der triterpene. 190. Mitteilung. eine stereochemische interpretation der biogenetischen isoprenregel bei den triterpenen. *Helv. Chim. Acta.*, 38(7), 1890-1904.

Espinos, D., López, A., Calvo, E., 2004. Bases farmacológicas y tratamiento de la inflamación. Monografía XV: Nuevos avances en medicamentos. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. pp. 237-286.

F

Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., Benita, S., 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55, R1-R4.

Fialho, S.L., da Silva-Cunha, A., 2004. New vehicle based on a microemulsion for topical ocular administration of dexamethasone. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 32, 626-632.

Bibliografía

Fontay, S., Grare, M., Mayer, J., Finance, C., Duval, R., 2008. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectives indexes. *J. Ethnopharmacol.* 120, 272-276.

Franz, T.J., 1975. In vitro vs in vivo percutaneous absorption: on the relevance of in vitro data. *J. Invest. Dermatol.* 64, 190-195.

G

Gautam, R., Jachak, S.M., 2009. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Med. Res. Rev.* 29, 767-820.

Gómez, H.A., González, K.N., Medina J.D., 2011. Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 10(3), 182-217.

González-Mira, E., Egea, M.A., Souto, E.B., Calpena, A.C., García, M.L., 2011. Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for ocular delivery. *Nanotechnology.* 22, 1-15.

Guglielmini, G., 2008. Nanostructured novel carrier for topical application. *Clin. Dermatol.* 26(4), 341-346.

Gupta, M.B., Bhalla, T.N., Gupta, G.P., Mitra, C.R., Bhargava, K.P., 1969. Antiinflammatory activity of natural products (I) triterpenoids. *Eur. J. Pharmacol.* 6, 67-70.

H

Higuchi, C.T., Sannomiya, M., Pavan, F.R., Leite, S.R., Sato, D.N., Franzblau, S.G., Sacramento, L.V., Vilegas, W., Leite, C.Q., 2008. Byrsonima fagifolia niedenzu apolar compounds with antitubercular activity. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2011, 1-5.

Hogan, M.I., Alvarado, J.A., Weddell, J.S., 1971. Histology of the human eye. Philadelphia. WB Saunders. pp. 102-103.

Hsu, H., Yangb, J., Linb, C., 1997. Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. *Cancer Lett.* 3, 7-13.

Huang, C.Y., Lin, C.Y., Tsai, C.W., Yin, M.C., 2011. Inhibition of cell proliferation, invasion and migration by ursolic acid in human lung cancer cell lines. *Toxicol. In Vitro.* 25, 1274-1280.

I

Ishida, M., Okubo, T., Koshimizu, K., Daito, H., Tokuda, H., Kin, T., Yamamoto, T., Yamazaki, N., 1990. Topical preparations containing ursolic acid and/or oleanolic acid for prevention of skin cancer. *Chemical Abstract.* 113, 12173y.

Izquierdo, P., Feng, J., Esquena, J., 2005. The influence of surfactant mixing ratio on nanoemulsion formation by the PIT method. *J. Colloid Interface Sci.* 285(1), 388-394.

J

Jang, H.K., Kim, J.K., Nam, J.I., So, U.K., Oh, C.H., Jeon, H., 2011. Antioxidant and anti-inflammatory effects of the methanolic extracts of *Potentilla chinensis*. *Oriental Pharm. Exp. Med.* 11, 137-142.

Jose, S., Fanguero, J.F., Smitha, J., Cinu, T.A., Chacko, A.J., Premaletha, K., Souto, E.B., 2013. Predictive modeling of insulin release profile from cross-linked chitosan microspheres, *Eur. J. Med. Chem.* 60, 249-253.

K

Kay, J.H., Calandra, J.K., 1962. Interpretation of eye irritation test. *J. Soc. Cosm. Chem.* 13, 281-289.

Bibliografía

Kreilgaard, M., 2002. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 Suppl 1, s77-s98.

Kwon, T.H., Lee, B., Chung, S.H., Kim, D.H., Lee, Y.S., 2009. Synthesis and NO Production inhibitory activities of ursolic acid and oleanolic acid derivatives. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 30(1), 119-123.

L

Lampe, M.A., Burlingame, A.L., Whitney, J., Williams, M.L., Brown, B.E., Roitman, E., Elias, P.M., 1983. Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J. Lipid. Res.*, 24(2), 120-130.

Lee Stock, E., Roth, S.I., Kim, E., Kay Walsh, M., Thamman, R., 1990. The effect of platelet-activating factor (PAF), histamine and ethanol on vascular permeability of the guinea pigconjunctiva. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31, 987-992.

Li, J., Du, J., Liu, D., Cheng, B., Fang, F., Weng, L., Wang, C., Ling, C., 2014. Ginsenoside Rh1 potentiates dexamethasone's anti-inflammatory effects for chronic inflammatory disease by reversing dexamethasone-induced resistance. *Arthritis Res. Ther.* 16(3), 1-11.

Liu, J., 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid, *J. Ethnopharmacol.* 49, 57-68.

Liu, J., 2005. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. *J. Ethnopharmacol.* 100, 92-94.

Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J.C., Moro, M.A., Portoles, A., 2008. *Velázquez Farmacología básica y clínica*, 18ª ed. Edit. Medica Panamericana. Madrid, (España). pp. 1033-1035.

M

MacKee, G.M., Hermann, F., Baer, R.L., Sulzberger, M.B., 1943. Demonstrating the presence of sulfonamides in the tissues. *Science*, 98, 65-68.

Mahato, S.B., Sarkar, S.K., Poddar, G., 1988. Triterpenoid saponins. *Phytochemistry*. 27, 3037-3067.

Martín-Aragón, S., De las Heras, B., Sanchez-Reus, M., Benedi, J., 2001. Pharmacological modification of endogenous antioxidant enzymes by ursolic acid on tetrachlorideinduced liver damage in rats and primary cultures of rat hepatocytes. *Exp. Toxic. Pathol.* 53, 199-206.

Miller, A.J., Mihm, M.C., 2006. Mechanisms of disease, melanoma. *N. Engl. J. Med.* 355, 51-65.

Moilanen, E., Kirkkola, A.L., Kankaanranta, H, Nieminen, M.M., Vapaatalo, H., 1993. Interactions between synthesis of platelet-activating factor and leukotriene B4 in isolated polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation*. 17, 705-714.

Montagna, W., 1974, *The structure and function of skin*, 3^a ed, Academic Press, New York. pp. 1-17.

Muto, Y., Ninomiya, M., Fujiki, H., 1990. Present status research on cancer chemoprevention in Japan. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 20, 219-224.

N

Nakanishi, K., Goto, T., Ito, S., Natori, S., Nozoe, S., 1944. *Natural product chemistry*, Vol. 3, Kodansha Scientific Ltd., University Science Books (Japón). pp. 105-221.

Bibliografia

Nielloud, F., Marti-Mestres G., 2000. Formulation concepts for the emulsion maker, Pharmaceutical emulsions and suspensions. Vol. 105, Ed. Marcel Dekker, Inc. New York-Basel. pp. 19-39.

Nishida, T., 2005. Cornea; Krachmer, J.H., Mannis, M.J., Holland, E.J., Ed. Elsevier Mosby, St. Louis, MO, (EEUU). pp. 3-26.

O

Ovesna, Z., Vachalkova, A., Horvathova, K., Tothova, D., 2004. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds. Neoplasma. 51, 327-333.

Owens, B., 2014. Melanoma. Nature. 515(7527), s109.

Oyster, C.W., 1999. The human eye: structure and function. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts. pp. 325-378.

P

Papadopoulou, V., Kosmidis, K., Vlachou, M., Macheras, P., 2006. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. Int. J. Pharm. 309, 44-50.

Park, E.K., Choo, M.K., Han, M.J., Kim, D.H., 2004. Ginsenoside Rh1 possesses antiallergic and anti-inflammatory activities. Int. Arch. Allergy Immunol. 133, 113-120.

Peppas, N.A., 2014. 1. Commentary on an exponential model for the analysis of drug delivery: original research article: a simple equation for description of soluterelease: I II. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs, 1987, J. Control. Release 190, 31-32.

Pérez Ruiz, A., Rodríguez Calzadilla, A., Sanjurjo Gómez, V., Padrón Chacón, R., 1997. El papel de óxido nítrico en la hemodinámica, hemostasia e inflamación. *Rev. Cubana Estomatol.* 34 (2), 84-86.

Phillips, D.R., Rasbery, J.M., Bartel, B., Matsuda, S.P.T., 2006. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 9(3), 305-314.

Posada, S.L., Rosero Noguera, R., 2007. Comparación de modelos matemáticos: una aplicación en la evaluación de alimentos para animales. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 20, 141-148.

Prausnithz, M.R., Noonan, J.S., 1998. Permeability of cornea, sclera and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye. *J. Pharm. Sci.* 87, 1479-1488.

Q

Qadeer, G., Rama, N.H., Garduño-Ramírez, M.L., 2007. Synthesis anti-inflammatory activity of fluorinated isocoumarins and 3,4-dihydroisocoumarins. *J. Fluor. Chem.* 128, 641-646.

R

Ramachandran, S., Prasad, N.R., 2008. Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. *Chem. Biol. Interact.* 176, 99-107.

Ravi, T.P.U., Padma, T., 2011. Nanoemulsions for drug delivery through different routes. *Research in Biotechnology.* 2(3), 1-13.

Ritschel, W.A., Hussain, A.S., 1988. The principles of permeation substances across the skin. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 10(1), 39-56.

Bibliografía

Rocha Formiga, F., Ansorena, E., Estella-Hermoso De Mendoza, A., Imbuluzqueta, E., González, D., Blanco Prieto, M.J., 2009. Nanosistemas a base de poliésteres, Monografía XXVIII: Nanotecnología farmacéutica. Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid, (España), pp. 41-101.

S

Sack, R.A., Nunes, I., Beaton, A., Morris, C., 2001. Host-defense mechanism of the ocular surface. *Biosci. Rep.* 21(4), 463-480.

Senthil, S., Chandramohan, G., Pugalendi, K.V., 2007. Isomers (oleanolic and ursolic acids) differ in their protective effect against isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. *Int. J. Cardiol.* 3, 119-131.

Setty, A.R., Sigal, L.H., 2005. Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of action, efficacy, and side effects. *Seminars Arthritis Rheum.* 34, 773-784.

Shai, L.J., McGaw, L.J., Aderogba, M.A., Mdee, L.K., Eloff, J.N., 2008. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentate* (Burm.f) C.A. Sm. leaves. *J. Ethnopharmacol.* 119, 238-244.

Schoenwald, R.D., Ward, R.L., 1978. Relationship between steroid permeability across excised rabbit cornea and octanol-water partition coefficient. *J. Pharm. Sci.*, 67, 786-788.

Schoenwald, R.D., Stewart, P., 1979. Effect of particle size on ophthalmic bioavailability of dexamethasone suspensions in rabbits. *J. Pharm. Sci.*, 69, 391-394.

Siddiqui, B.S., Ilyas, F., Rasheed, M., Begum, S., 2004. Chemical constituents of leaves and stem bark of *Plumeria obtusa*. *Phytochemistry.* 65, 2077-2084.

Silvester, J., Liacini, A., Li, W., Dehnade, F., Zafarullah, M., 2001. *Tripterygium wilfordii* Hook F extract suppresses proinflammatory citoquine-induced expression of matrix metalloproteinase genes in articular chondrocytes by inhibiting activating protein-1 and nuclear factor-kB activities. *Mol. Pharmacol.* 59, 1196-1205.

Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., Garcia-Celma, M.J., 2005. Nano-emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 10, 102-110.

Sole, I., Pey, C.M., Maestro, A., González, C., Porras, M., Solans, C., Gutiérrez, G.M., 2010. Nano-emulsions prepared by the phase inversion composition method: preparation variables and scale up. *J. Colloid Interface Sci.* 344(2), 417-423.

Srivastava, P., Kasoju, N., Bora, U., Chaturvedi, R., 2010. Accumulation of betulinic, oleanolic, and ursolic acids in *in vitro* cell cultures of *Lantana camara* L. and their significant cytotoxic effects on HeLa cell lines. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15, 1038-1046.

Steiling, W., Bracher, M., Courtellemont, P., de Silva, O., 1999. The HET-CAM, a useful *in vitro* assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. *Toxicol. In Vitro.* 13, 375-384.

T

Tanachatchairatana, T., Bremner, J.B., Chokchaisiri, R., Suksamrarn, A., 2008. Antimycobacterial activity of cinnamate-based esters of the triterpenes betulinic, oleanolic and ursolic acids. *Chem. Pharm. Bull.* 56, 194-198.

Tao, X., Lipsky, P.E., 2000. The Chinese anti-inflammatory and immunosuppressive herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook F. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 26, 29-50.

Tavaszi, J., Budai, P., 2007. The use of HET-CAM test in detecting the ocular irritation. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 72, 137-141.

Bibliografía

Torres-Santos, E.C., Lopes, D., Oliveira, R.R., Carauta, J.P., Falcao, C.A., Kaplan, M.A., Rossi-Bergmann, B., 2004. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine*. 11, 114-120.

Tsai, S.J., Yin, M.C., 2008. Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells. *J. Food Sci.* 73, 174-178.

V

Vega, E., Egea, M.A., Garduño-Ramírez, M.L., García, M.L., Sánchez, E., Espina, M., Calpena, A.C., 2013. Flurbiprofen PLGA-PEG nanospheres: role of hydroxy-beta-cyclodextrin on ex vivo human skin permeation and in vivo topical anti-inflammatory efficacy. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 110, 339-346.

Venier-Julienne, M.C., Benoit, J.P., 1996. Preparation, purification and morphology of polymeric nanoparticles as drug carriers. *Pharm. Acta Helv.* 71(2), 121-128.

Venkateswarlu, V., Manjunath, K., 2004. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapina solid lipid nanoparticles. *J. Control. Release.* 95, 627-638.

Villar, A.M., Naveros, B.C., Campmany, A.C., Trenchs, M.A., Rocabert, C.B., Bellowa, L.H., 2012. Design and optimization of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for enhanced dissolution of gemfibrozil. *Int. J. Pharm.* 431, 161-175.

W

Walters, K.A., 2002. Dermatological and transdermal formulations, drugs and the pharmaceutical sciences. Vol. 119, 1^a ed. Informa Healthcare Inc. (EEUU). pp. 1-40.

Wang, Q., Kuang, H., Su, Y., Sun, Y., Feng, J., Guo, R., Chan, K., 2013. Naturally derived anti-inflammatory compounds from Chinese medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 146, 9-39.

Wertz, P.W., 1996. The nature of the epidermal barrier: biochemical aspect. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 18(3), 283-294.

Williams, A.C., Barry, B.W., 1992. Skin absorption enhancers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 9, 305-353.

Williams, P.L., Warwick, R., 1992. *Gray Anatomia*, Tomo II, 36^a ed. Ed. Churchill Livingstone. pp. 1521-1579.

Y

Yan, S.L., Huang, C.Y., Wu, S.T., Yin, M.C., 2010. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines. *Toxicol. In Vitro.* 24, 842-848.

Yasunori, M., Kenji, S., Hideshi, N., 1994. The transdermal drug delivery systems and transcutaneous absorption. *Acta Derm. Venereol. Suppl. Stockh.* 74, 15-17.

Yin, M.C., Chan, K.C., 2007. Nonenzymatic antioxidative and antiglycative effects of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7177-7181.

Z

Zacchigna, M., Cateni, F., Faudale, M., Sosa, S., Della Loggia, R., 2009. Rapid HPLC analysis for quantitative determination of the two isomeric triterpenic acids, oleanolic acid and ursolic acid, *J. Pharm. Sci.* 77, 79-86.