



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Optimización del proceso de liofilización de sistemas nanoestructurados de flurbiprofeno para uso oftálmico y su influencia en el comportamiento biofarmacéutico

Gladys Rosario Ramos Yacasi

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.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA
Y FÍSICOQUÍMICA

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN DE
SISTEMAS NANOESTRUCTURADOS DE FLURBIPROFENO
PARA USO OFTÁLMICO Y SU INFLUENCIA EN EL
COMPORTAMIENTO BIOFARMACÉUTICO**

GLADYS ROSARIO RAMOS YACASI, 2017



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA Y
FISICOQUÍMICA

PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y CONTROL
DE MEDICAMENTOS

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN DE SISTEMAS
NANOESTRUCTURADOS DE FLURBIPROFENO PARA USO
OFTÁLMICO Y SU INFLUENCIA EN EL COMPORTAMIENTO
BIOFARMACÉUTICO**

Memoria presentada por **Gladys Rosario Ramos Yacasi** para optar al título de doctor
por la Universidad de Barcelona.

Directoras

Dra. María Luisa García López. Dra. Ana Cristina Calpena Campmany.

Doctoranda

Gladys Rosario Ramos Yacasi

Tutora

Dra. María Luisa García López

GLADYS ROSARIO RAMOS YACASI, 2017

A mis abuelos

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las Dras. María Luisa García López y Ana Cristina Calpena Campmany, por haber confiado en mí para la realización de esta investigación, por su valiosa dirección y apoyo y, además, por haberme facilitado el uso de las instalaciones y el equipo de investigación sin los cuales hubiera sido muy difícil la realización de este trabajo. Les agradezco no sólo por haberme brindado una excelente formación a nivel científico y profesional, sino también por todas sus enseñanzas a nivel personal. Asimismo, agradezco a la Dra. Calpena por su calidez humana, por su ayuda ante todas las dificultades que se han presentado y por sus inestimables consejos, siempre ha estado dispuesta a dedicarme su tiempo y su conocimiento. Se lo agradezco de corazón.

A las Dras. María Antonia Egea y Marta Espina por toda la inestimable ayuda y entregada durante mi estancia, por su buena disposición a contestar mis dudas. Igualmente, agradecer a la Dra. Elisabeth González por su orientación y empuje brindado a esta tesis en sus inicios.

A los Dres. Juan Barange, Saša Nikolić, Lyda Halbaut Bellowa y Álvaro Gimeno por su desinteresada colaboración, consejos y por todo el apoyo dado durante las distintas fases de esta investigación. A la empresa Reig Jofré Group por haberme facilitado los equipos de liofilización para realizar algunas determinaciones que formaron parte de este trabajo.

A mis compañeros y amigos de doctorado de la Universidad de Barcelona, a los más antiguos que ya no están en el departamento y a los nuevos que me ayudaron directa e indirectamente: Guadalupe Abrego, Helen Alvarado, Elena Sánchez, Mireia Mallandrich, Berenice Andrade, Amanda Cano, David Limón, Roberto González y Marta Ariza, por sus consejos y colaboración, por disfrutar conmigo lindos momentos. Quiero expresar mi agradecimiento especial a Alexander Parra y Marcelle Abreu quienes fueron compañeros y amigos siempre generosos y

dispuestos como pocos, desde el primer momento en compartir su tiempo, brindarme amistad y apoyo en los tiempos difíciles, lo que ha permitido considerarlos como amigos con los que siempre se puede contar. A mis amigos de otros departamentos Liliana Cerda, Liliana Lalaleo, Diego Hidalgo, Maryury Brown, Jonás Silva, Alberto Sáez, Silvia Calle, Carlos Pedraz y Susan Medina por su compañerismo, simpatía, por nuestras entretenidas reuniones y risas, por su amistad de todos estos años, sin duda uno de los mejores regalos que me dejó la Universidad de Barcelona. A mis mejores amigas de Arequipa, Gloria, Judith, Milagros, Ornella, Betty, Paola y Marisol de quienes siempre he recibido palabras de aliento. A mis tíos Walter y Erika por los inolvidables momentos de convivencia, en los que me sentí como en casa. Mi más infinito agradecimiento a mi tío Roger, tu constante apoyo ha sido fundamental estando lejos de casa.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mis padres, Francio y Dora, por haberme enseñado que siempre se puede salir adelante a pesar de las circunstancias, por su amor incondicional, por su ejemplo de lucha y honestidad; a mis hermanos Michael y Liz por su tenacidad, inteligencia y superación. Sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible llevar a cabo este duro logro ¡Gracias por apoyarme a pesar de mis locuras!

Todas las personas que han sido referidas aquí, ayudaron en el desarrollo de esta Tesis doctoral. Algunos directamente trabajando conmigo en el laboratorio, y otros, originando vivencias únicas. A todos ellos, y a otros tantos, muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| Índice general..... | 13 |
| Abreviaturas y acrónimos..... | 17 |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN | |
| | |
| 1.1. PENETRACIÓN DE FÁRMACOS POR VÍA TÓPICA A TRAVÉS DE BARRERAS BIOLÓGICAS | |
| 1.1.1. Características anatomofisiológicas de la vía ocular | 22 |
| | |
| 1.2. FARMACOTERAPIA ANTIINFLAMATORIA OCULAR | |
| 1.2.1. Mecanismos de la inflamación | 31 |
| 1.2.2. Mecanismo de acción de los fármacos no esteroideos (AINEs) en la inflamación ocular..... | 32 |
| 1.2.3. Flurbiprofeno | 34 |
| | |
| 1.3. SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS | |
| 1.3.1. Nanopartículas poliméricas | 38 |
| 1.3.2. Caracterización de las nanopartículas | 39 |
| 1.3.3. Nanopartículas de P&ECL..... | 41 |
| 1.3.3.1. Características fisicoquímicas | 42 |
| 1.3.3.2. Mecanismos de biodegradación de P&ECL..... | 43 |
| 1.3.4. Métodos de preparación de nanopartículas de P&ECL..... | 45 |
| 1.3.4.1. Nanoprecipitación o desplazamiento del disolvente.. | 45 |
| 1.3.4.2. Salting out..... | 46 |
| 1.3.4.3. Difusión del disolvente..... | 48 |

| | | |
|---|---|-----|
| 1.3.4.4. | Evaporación del disolvente..... | 49 |
| 1.3.5. | Estabilización a largo plazo de las nanopartículas..... | 50 |
| 1.4. LIOFILIZACIÓN | | |
| 1.4.1. | Beneficios de la liofilización | 57 |
| 1.4.2. | Proceso de la liofilización | 58 |
| 1.4.2.1. | Congelación | 59 |
| 1.4.2.2. | Secado primario | 60 |
| 1.4.2.3. | Secado secundario | 62 |
| 1.4.3. | Almacenamiento del producto | 63 |
| 2. OBJETIVOS | | |
| 3. RESULTADOS | | |
| 3.1. ARTÍCULO 1. Freeze-drying optimization of polymeric nanoparticles for ocular Flurbiprofen delivery: effect of protectant agents and critical process parameters on long-term stability..... | | |
| | | 77 |
| 3.2. ARTÍCULO 2. Influence of freeze-drying and γ -irradiation in preclinical studies of flurbiprofen polymeric nanoparticles for ocular delivery using d-(+)-trehalose and polyethylene glycol..... | | |
| | | 97 |
| 4. DISCUSIÓN | | |
| | | 115 |
| 5. CONCLUSIONES | | |
| | | 139 |
| 6. REFERENCIAS | | |
| | | 145 |

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|-------------------|---|
| AFM : | Microscopía de fuerzas atómicas |
| AINEs : | Antiinflamatorios no esteroideos |
| ANOVA : | Análisis de varianza |
| BS : | Radiación retrodispersada |
| COX : | Ciclooxigenasa |
| DSC : | Calorimetría diferencial de barrido |
| EE : | Eficiencia de encapsulación |
| FB : | Flurbiprofeno |
| FDA : | Food and Drug Administration |
| FTIR : | Espectrometría infrarroja con Transformada de Fourier |
| HET-CAM : | Prueba de la membrana corioalantoidea de embrión de pollo |
| HPLC : | Cromatografía líquida de alta resolución |
| LD : | Difracción laser |
| NP _s : | Nanopartículas |
| PBS : | Solución amortiguadora de pH de fosfato |
| PεCL : | Poli-epsilon-caprolactona |
| PCS : | Espectroscopia de correlación fotónica |
| PEG : | Polietilenglicol 3350 |
| PEO : | Óxido de polietileno |
| PG : | Prostaglandina |
| PI : | Índice de polidispersión |
| PLGA : | Ácido poli-láctico-co-glicólico |
| PM : | Peso molecular |
| PVA : | Alcohol polivinílico |

| | |
|-------------------|--|
| P188 : | Poloxamer 188 (Lutrol ® F68) |
| RESOLV : | Expansión rápida de una solución supercrítica en un disolvente líquido |
| RESS : | Expansión rápida de la solución supercrítica |
| SEM : | Microscopía electrónica de barrido |
| T _{co} : | Temperatura de colapso |
| TEM : | Microscopía electrónica de transmisión |
| T _{eu} : | Temperatura eutéctica |
| T _g : | Temperatura de transición vítrea |
| TRE : | d - (+) trehalosa |
| XPS : | Espectroscopia de fotoelectrones generado por rayos X |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PENETRACIÓN DE FÁRMACOS A TRAVÉS DE BARRERAS BIOLÓGICAS

En las últimas décadas, la búsqueda de sistemas capaces de superar las barreras biológicas ha sido la principal fuerza motriz para el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas. Aunque estas barreras que los activos necesitan atravesar para alcanzar el tejido diana se conocen desde hace mucho tiempo en una forma genérica, su composición específica y comportamiento biológico ha sido limitado hasta hace poco. Afortunadamente, los importantes avances realizados en las últimas décadas en el campo de la biología celular y molecular han permitido profundizar en el conocimiento de la naturaleza y el comportamiento mecánico de estas barreras [1].

Los sistemas de administración de fármacos están diseñados para interactuar con estas barreras y facilitar el paso del principio activo al lugar de acción. La influencia de las barreras biológicas sobre la biodisponibilidad de los principios activos es importante en la eficacia de un tratamiento ya que el fármaco debe alcanzar una concentración terapéutica en el lugar adecuado y mantenerse en el órgano diana el tiempo necesario para ejercer su acción, entendiendo por tal el medio en el cual un fármaco está en posición de interactuar con sus receptores para realizar su efecto biológico sin que intervengan barreras de difusión. Para alcanzar esta concentración adecuada en el lugar de acción es preciso que el fármaco pueda: penetrar en el organismo a favor de los procesos de absorción, llegar al plasma y distribuirse por los tejidos a favor de los procesos de distribución. Pero el fármaco, tan pronto como penetra en el organismo, está sometido a los procesos de eliminación que comprenden dos mecanismos: eliminación por las vías naturales (orina, bilis, saliva, etc.) y metabolismo o biotransformación enzimática [2].

Asimismo, el paso de fármacos a través de dichas barreras está condicionado por las características fisicoquímicas de la sustancia, en particular, del tamaño, el peso molecular, el grado de ionización (carga eléctrica) y su liposolubilidad. La mayoría

de los principios activos son ácidos o bases orgánicas débiles que en medio acuoso están ionizados. La fracción no ionizada suele ser liposoluble y difunde fácilmente a través de las membranas celulares. La forma ionizada no puede penetrar en las membranas fácilmente, debido a su baja liposolubilidad y elevada resistencia eléctrica (resultante de la carga de la molécula y de los grupos con carga eléctrica de la superficie de la membrana). Así, una sustancia pequeña, poco ionizada y muy liposoluble atraviesa rápidamente las membranas celulares.

Finalmente, es necesario considerar la forma farmacéutica en la que se presenta el medicamento como medio facilitador de la biodisponibilidad. La absorción no es la misma para una tableta que para una cápsula o para una preparación de liberación prolongada. En este último caso, el principio activo está incluido en una matriz de la que se libera lentamente.

1.1.1. Características anatomofisiológicas de la vía ocular

La aplicación del fármaco en la superficie ocular (vía tópica) es el tratamiento de elección en procesos patológicos superficiales y/o internos del ojo para la administración de fármacos no sólo por tratarse de un método no invasivo, sino porque, presenta, además, otras ventajas tales como menor coste, mayor seguridad y mejor aceptación por parte de los pacientes debido a su fácil aplicación.

El ojo es el órgano encargado de producir el complejo fenómeno de la visión. Para tal fin requiere cierta independencia del medio que lo rodea, logrando mantener sus estructuras inalteradas para una correcta visión. Sin embargo, esta particularidad lo convierte en un órgano de difícil acceso para las formas farmacéuticas tradicionales tópicas tales como soluciones, suspensiones y ungüentos que no presentan suficiente efectividad terapéutica debido a la baja biodisponibilidad de los fármacos que está vinculada principalmente a la estructura anatómica y fisiológica de la vía ocular [3].

Los *procesos fisiológicos* del ojo reducen en gran medida la biodisponibilidad de los fármacos en la superficie ocular, limitando su absorción y favoreciendo la eliminación del mismo.

La *lágrima* forma sobre la superficie anterior del globo ocular la película lagrimal. Esta película lagrimal cumple distintas funciones en el sistema ocular: *óptica*, regularizando la superficie corneal; *metabólica*, aportando oxígeno a los tejidos; *mecánica*, lubricando los tejidos para evitar el daño por el roce y eliminando residuos (como vehículo) y cuerpos extraños de la superficie anterior; y *defensiva*, presentando un pH bajo y moléculas de distinta naturaleza química (lisozima, Ig A, lactotransferrina) para mantener un ambiente antibacteriano y otras funciones tales como humectante nasal y fotoabsorbente. Todo ello hace que la película lagrimal sea la primera barrera protectora frente a agentes externos que afecta a la biodisponibilidad de los fármacos, tanto desde un punto de vista cuantitativo como cualitativo [4–6].

En condiciones normales, el volumen de la lágrima en un adulto es alrededor de 7-10 μL y la secreción lagrimal basal es de 1.2 $\mu\text{L}/\text{min}$, mientras que el saco lagrimal tiene una capacidad de almacenamiento de 30 μL [7]. El volumen de una gota de una forma de dosificación convencional oscila entre 40 y 50 μL , por lo que después de la instilación del fármaco en el ojo, éste es diluido por la formación activa de lágrimas reflejas, cuyo volumen varía entre 3 a 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ y que fluyen hacia la superficie ocular produciendo en pocos segundos, el parpadeo. Esto impulsa al líquido lagrimal hacia los puntos lagrimales y, a través de ellos, todo el exceso de volumen pasará de la superficie ocular a los canalículos lagrimales favoreciendo el drenaje del fármaco (Figura 1) [8]. El volumen de las lágrimas reflejas varía de acuerdo con las propiedades irritantes del fármaco y/o de la formulación administrada.

Asimismo, el fármaco se puede unir a las *proteínas* presentes en el fluido lagrimal, lo que disminuye la cantidad de principio activo disponible para ser absorbido y, por tanto, reduce su biodisponibilidad. Este efecto es más importante en determinados procesos patológicos oculares de etiología inflamatoria, vírica o alérgica que

inducen a un aumento de las proteínas lagrimales. Por otra parte, la acción de pH del ácido carbónico y los ácidos orgánicos débiles presentes en la lágrima facilitan la ionización del fármaco [9].

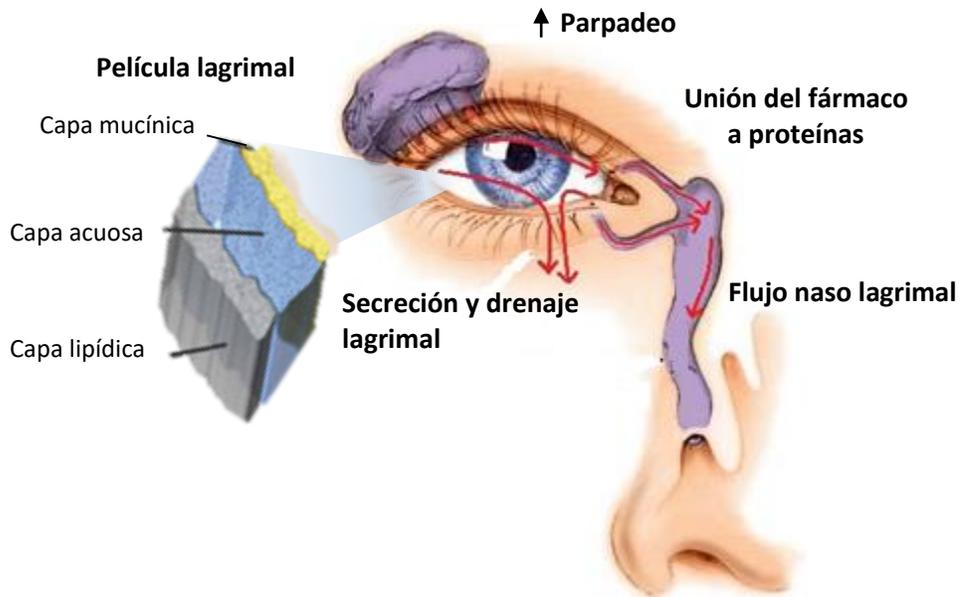


Figura 1. Barreras fisiológicas oculares para los fármacos administrados por vía tópica

Las especiales *características anatómicas* del aparato ocular constituyen otro de los factores determinantes del paso del fármaco a los tejidos intraoculares (Figura 2). Al establecer la farmacocinética de una forma farmacéutica de administración ocular, además de sus características fisicoquímicas, se debe tener en cuenta la zona ocular objeto de tratamiento (localizada a nivel precorneal, corneal o postcorneal) y las diferentes barreras que debe atravesar el fármaco (fluido lagrimal, córnea, barrera hemato acuosa, barrera hemato lagrimal) hasta alcanzar el órgano diana. Desde el punto de vista terapéutico, estas barreras fisiológicas de protección actúan desfavorablemente en el momento de la aplicación de una forma medicamentosa con fines terapéuticos, lo que dificulta que se alcance una

concentración terapéutica eficaz de principio activo en un lugar determinado del interior del globo ocular.

El fármaco instilado en la superficie ocular, que no fue eliminado por los procesos fisiológicos del ojo puede ser absorbido en el área pre-corneal a través de la esclerótica y/o conjuntiva.

La *conjuntiva* es una membrana mucosa y transparente que cubre la superficie anterior del globo ocular y la superficie interior de los párpados (Figura 2) [10]. El tejido conjuntival se compone de dos o tres capas de células epiteliales. También contiene células caliciformes mucosas que son las responsables de la secreción de la mucina necesaria para la estabilidad de la película lagrimal y la transparencia corneal [11]. Debido a la gran área superficial y la elevada vascularización de la conjuntiva, los fármacos aplicados tópicamente desaparecen rápidamente en la circulación de la sangre, lo que conlleva la distribución sistémica del fármaco [12]. La conjuntiva es más permeable a macromoléculas hidrófilas por vía paracelular que la córnea [13].

La fracción del fármaco que logra escapar a las barreras conjuntivales se extiende a través de la esclerótica, que se origina en el limbo y se prolonga posteriormente a lo largo del resto del globo ocular. La *esclerótica* es una capa protectora opaca, rígida, que varía en espesor y se compone principalmente de fibras de colágeno y proteoglicanos embebidos en una matriz extracelular. La ruta transescleral ofrece muchas ventajas sobre la ruta corneal tales como: una amplia área superficial (17 cm²) lo que representa un depósito potencial de fármaco, un alto grado de hidratación (70 %) que lleva a mejorar la difusión de moléculas hidrófilas, es inactiva metabólicamente y relativamente muy permeable a las macromoléculas. La esclerótica es aproximadamente 10 veces más permeable que la córnea y al menos la mitad de permeable que la conjuntiva. Estudios recientes han demostrado que la esclerótica es permeable a moléculas de peso molecular elevado (70-150 kDa), aparte de ello es importante considerar la carga del fármaco, ya que las moléculas de fármaco cargados positivamente presentan una mala permeabilidad a través de la esclerótica, presumiblemente debido a su unión a la matriz de proteoglicano

cargado negativamente. Todo ello convierte a la esclerótica en una nueva posibilidad en el transporte de fármacos a estructuras oculares posteriores, asociándolos a diferentes sistemas de liberación controlada, que minimicen los posibles efectos adversos [14–16].

Las barreras precorneales, el limitado tiempo de contacto del fármaco con la córnea y su dilución al mezclarse con el fluido lagrimal, se consideran las razones más importantes para el bajo porcentaje del fármaco absorbido ocularmente. El porcentaje de fármaco que supera estas barreras alcanza el área corneal que puede penetrar a través de dos mecanismos: paracelular (a través de los espacios intercelulares) y/o transcelular (a través de los espacios intracelulares) [17].

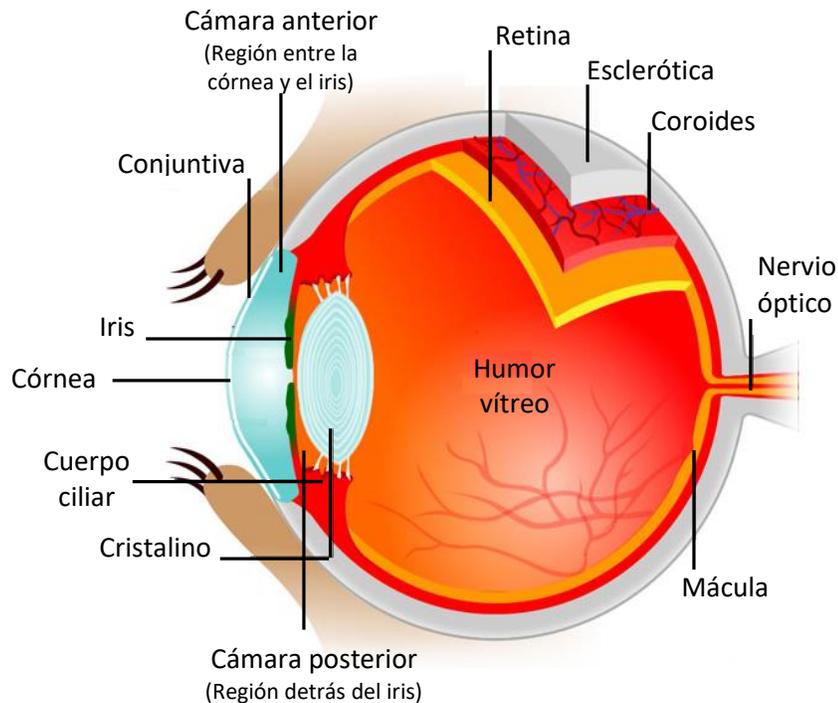


Figura 2. Estructuras que componen el ojo

La *córnea* es un tejido transparente, avascular, en forma de disco que cubre aproximadamente el 15 % del área de la superficie del ojo. Además de su función como superficie refractiva, actúa a modo de barrera físicamente resistente y químicamente impermeable entre el ojo y el medio que lo rodea [18]. La *córnea* se compone de cinco capas, de la capa exterior hacia la interior son: epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio (Figura 3) [19,20].

El epitelio corneal, de naturaleza lipoidea, contiene el 90 % de las células totales de la *córnea* y plantea una resistencia significativa para la permeación de fármacos hidrófilos administrados por vía tópica. Además, las células epiteliales de la superficie de la *córnea* se unen entre sí mediante desmosomas y están rodeados por membranas unidas estrechamente (zonula occludens), que confieren al epitelio una gran estabilidad. La presencia de estos complejos de unión estrecha retarda la penetración de fármaco de la película de lagrimal en los espacios intercelulares del epitelio, y en las capas internas de la *córnea*. Las células endoteliales interiores, que presentan mácula adherens, son más permeables. 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 (ruta paracelular). La ruta paracelular predomina para los fármacos hidrófilos o iones de bajo peso molecular, mientras que la ruta transcelular predomina para fármacos lipófilos [21].

La membrana basal del epitelio corneal está en contacto con la membrana de Bowman, que consiste en un tejido delgado (8-14 μm), fibroso y en gran parte acelular, compuesto de fibras de colágeno embebidas en una sustancia mucoproteica.

El estroma corneal, la capa intermedia que constituye un 85-90 % del espesor corneal, se compone de una matriz extracelular y consiste en una disposición laminar de fibrillas de colágeno, sustancia mucoproteica y fibroblastos corneales (queratocitos) [22]. Tiene un elevado contenido en agua, por lo que representa una barrera significativa a la penetración de moléculas de fármacos lipófilos. La

membrana de Descemet es una estructura acelular muy fina que separa el estroma del endotelio y regula el estado de hidratación del estroma [20].

La capa más interna de la córnea es el endotelio, una monocapa de células con forma hexagonal que desempeña un papel crítico en la regulación del transporte de fluidos y solutos entre el humor acuoso y el estroma corneal. Además, las uniones endoteliales de la córnea presentan filtraciones que facilitan el paso de macromoléculas entre el humor acuoso y el estroma [23,24]. En contraste con el epitelio corneal las células del endotelio no se regeneran; de forma que cuando se produce la muerte celular en la capa del endotelio, las células adyacentes se aplanan y se agrandan en volumen cubriendo el espacio ocupado por la célula muerta [25].

Por lo tanto, las capas de la córnea, en particular el epitelio y el estroma, son considerados como los principales obstáculos para la administración de fármacos oculares. Cada capa corneal ofrece una polaridad diferente: lipófila (epitelio), hidrófila (estroma) y lipófila (endotelio) y una posible estructura que limita la velocidad de penetración del fármaco [26].

El paso del medicamento a través de la córnea depende, además de la estructura e integridad corneal, del peso molecular (PM) relacionado con el tamaño molecular y de las propiedades fisicoquímicas del fármaco y de la forma farmacéutica, esencialmente, del coeficiente de partición octanol/agua, relacionado con el grado de lipofilia del principio activo [21]. Por ello, es vital entender que el activo debe ser de carácter anfipático con el fin de penetrar a través de estas capas [27].

En comparación con la córnea, la absorción del fármaco en la conjuntiva se considera no productiva debido a la presencia de los capilares sanguíneos y linfáticos, que puede causar pérdida significativa de fármaco en la circulación sistémica lo que reduce la biodisponibilidad ocular [28].

El fármaco que fue absorbido a través de la córnea puede ser distribuido en los tejidos circundantes (cuerpo ciliar, iris, cristalino) y/o puede ser eliminado a través del humor acuoso.

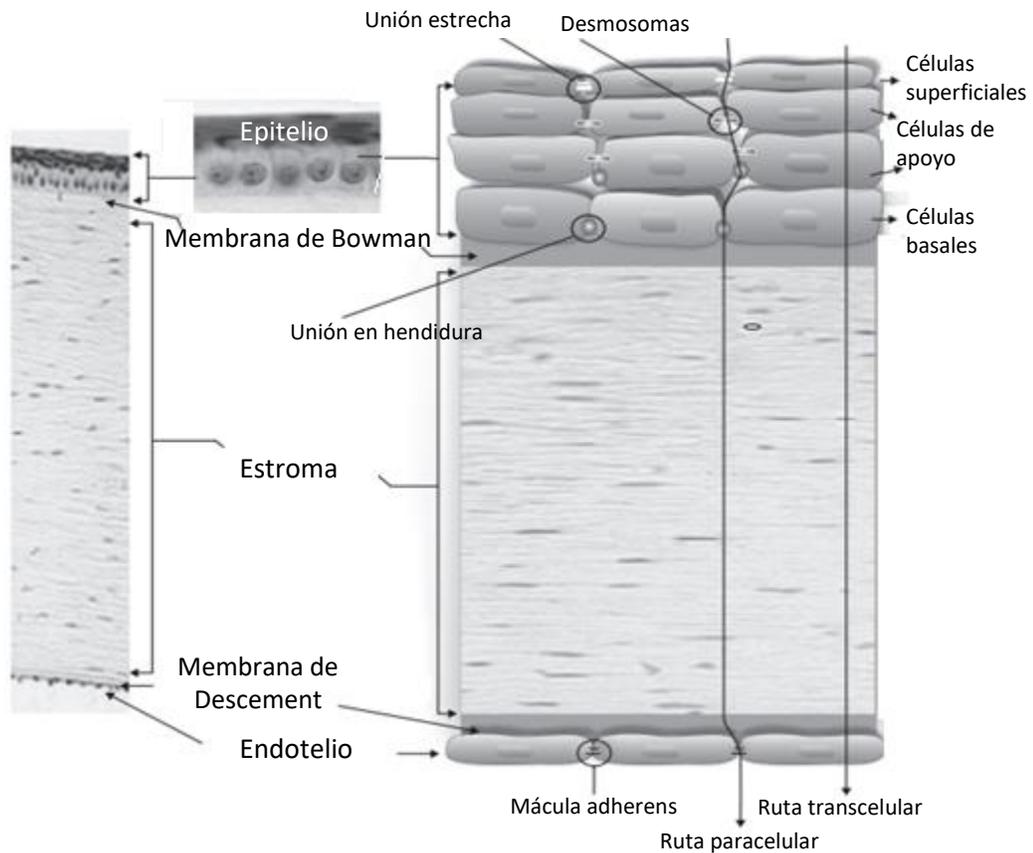


Figura 3. Estructura de la córnea y su organización celular de varias capas de transporte limitativo [29].

El humor acuoso es una sustancia gelatinosa situada en la "cámara anterior del ojo" que se encuentra inmediatamente detrás de la córnea y delante del cristalino. El humor acuoso es secretado continuamente en el cuerpo ciliar y fluye hacia la cámara anterior a través de la pupila a una velocidad de flujo de aproximadamente 2-5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Este fluido lleva nutrientes y oxígeno a los tejidos vasculares del ojo y facilita la eliminación de la materia de desecho de los tejidos circundantes. El fármaco que alcanza la cámara anterior puede interactuar con la melanina del iris y reducir su biodisponibilidad. De esta forma, el iris pigmentado actúa a modo de reservorio de los fármacos liberándolos lentamente, incrementando así la duración

de la acción. Estas diferencias son mayores cuanto más lipofílicos sean los fármacos. Por otro lado, el fármaco también puede sufrir un proceso de metabolización por las enzimas presentes en el iris o cuerpo ciliar, tales como esterasas y el citocromo P-450 reductasa y, en consecuencia, disminuir la respuesta farmacológica [27].

La Figura 4 muestra un resumen de las barreras fisiológicas y anatómicas que impiden que el fármaco administrado tópicamente alcance a los tejidos intraoculares.

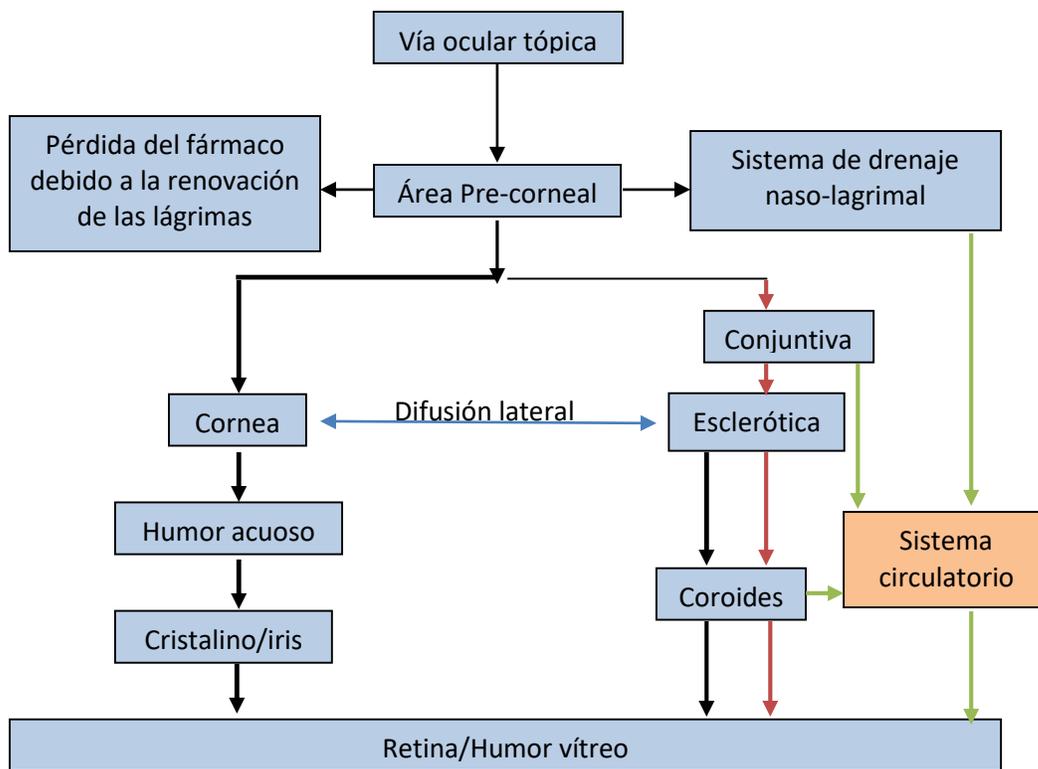


Figura 4. Vías generales de penetración ocular de fármacos aplicados tópicamente. Flechas negras gruesas = vía transcorneal; flechas rojas = Vía transconjuntival / transescleral; flechas verdes = vía de retorno sistémico; flecha azul = difusión lateral (difusión transcorneal y vía uvea/esclera) [30].

1.2. FARMACOTERAPIA ANTIINFLAMATORIA OCULAR

1.2.1. Mecanismos de la inflamación

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva para aislar y destruir el agente desencadenante, así como para reparar el tejido dañado.

En su forma aguda, la inflamación se caracteriza por enrojecimiento, edema, presencia de dolor y pérdida de la capacidad funcional. Aunque se trata de un mecanismo de defensa frente a estímulos lesivos, en ocasiones las células del propio organismo son destruidas por el proceso inflamatorio. Esta posibilidad es especialmente importante en el caso del ojo, ya que algunas estructuras, sobre todo las más delicadas, pueden resultar afectadas por la formación de cicatrices. Una inflamación ocular grave puede incluso desencadenar pérdidas de visión, lo que pone de manifiesto la importancia de limitar el proceso en lo posible.

La activación de la enzima fosfolipasa A₂, como respuesta a diversos estímulos (biológicos, físicos, químicos, traumáticos, vasculares o inmunitarios), hidroliza los fosfolípidos de la membrana, liberando ácido araquidónico y produciendo a su vez diversos mediadores (eicosanoides) como las prostaglandinas, los leucotrienos y los tromboxanos. La producción de cada mediador bioquímico depende de la acción de otras enzimas sobre el propio ácido araquidónico. Por ejemplo, la ciclooxigenasa (COX) que genera la prostaglandina (PG) H₂, que estimula la formación de varios prostanoides, incluidas diversas PGs (PGI₂, PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}) y tromboxano A₂. Mientras que la lipooxigenasa produce leucotrienos, lipoxinas y otros productos (Figura 5) [31].

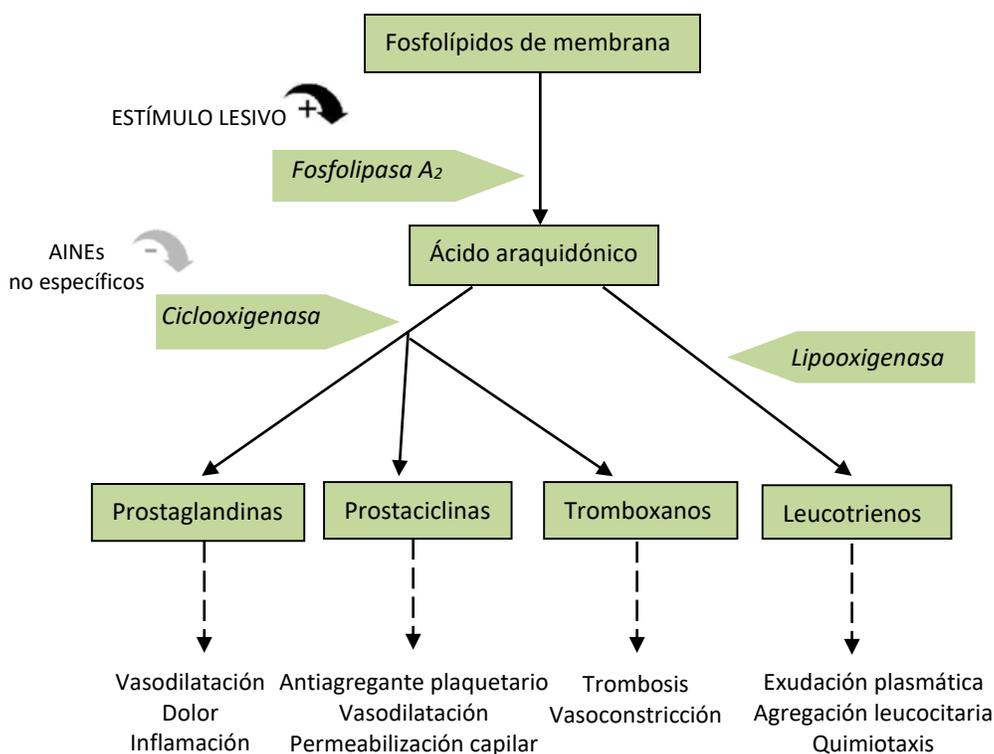


Figura 5. Mecanismo de la inflamación y lugar de acción de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (+: activación; -: inhibición).

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) constituyen un grupo químicamente heterogéneo de fármacos ampliamente utilizados en el tratamiento tópico de procesos inflamatorios, que a su acción antiinflamatoria, que radica en la inhibición reversible de la COX en sus isoformas COX-1 y COX-2, se asocia un efecto analgésico y antipirético [32].

1.2.2. Mecanismo de acción de los fármacos no esteroideos (AINEs) en la inflamación ocular

Los corticosteroides se han utilizado como fármacos de elección en el tratamiento inespecífico de la inflamación ocular pero los efectos adversos que presentan tras

administración tópica continuada (cataratas subcapsulares posteriores, elevación de la presión intraocular o favorecer la replicación viral en casos de herpes simple oftálmico) ha planteado la posibilidad de incrementar el uso de otros fármacos como los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) [33]. La actividad antiinflamatoria de estos agentes radica en la inhibición reversible de la actividad de la enzima ciclooxigenasa (COX) de ácidos grasos en sus isoformas COX-1 y COX-2, impidiendo la formación de prostaglandinas y tromboxanos, sustancias mediadoras de la inflamación [34].

La COX-1 es una enzima constitutiva que se expresa en la mucosa gastrointestinal normal y en las plaquetas. Tiene una función de mantenimiento en el cuerpo, de modo que participa en la hemostasis de los tejidos y es responsable de la producción de prostaglandinas. Por otra parte, la COX-2 es inducida en células inflamatorias cuando son lesionadas, infectadas o activadas, por ejemplo; las citosinas inflamatorias, como la interleucina y el factor de necrosis tumoral. Así la isoforma COX-2 es responsable principalmente, de la producción de los mediadores de la inflamación de la familia de los prostanoides. Sobre la COX-2, los agentes específicos producen una inhibición reversible dependiente del tiempo.

Los AINEs tópicos se clasifican según la estructura química en seis grupos: indoles, ácidos fenilacéticos, ácidos fenilalanóicos, salicilatos, fenamatos y pirazolonas. Los salicilatos, fenamatos y pirazolonas se consideran demasiado tóxicos para ser utilizados en el ojo [35].

La administración por vía tópica ocular de los AINEs se emplea en cirugía de cataratas, en la prevención y tratamiento del edema macular cistoide y para el tratamiento a corto y largo plazo de la conjuntivitis alérgica. Sin embargo, la administración tópica de AINEs en patologías oftálmicas es limitada, debido a la baja solubilidad en agua de estos compuestos. Entre los AINEs comercializados para uso oftálmico se encuentran la indometacina, ketorolaco, flurbiprofeno, suprofen, diclofenaco, pranoprofeno, bromfenac y nepafenac. Este último es un profármaco que tras su administración oftálmica, penetra a través de la córnea y es convertido por las hidrolasas del tejido ocular en amfenaco, su forma activa [36].

1.2.3. Flurbiprofeno

El flurbiprofeno (FB) es un AINE, derivado del ácido propiónico perteneciente a la familia del ácido 2-fenilpropiónico y utilizado en clínica en su forma racémica [37]. Su estructura química contiene un átomo de flúor y recibe las siguientes denominaciones: Acido 2-fluoro-metil-4-fenilacético, Acido 2-(2-fluoro-4-bifenil) propiónico o Acido 2-fluoro-metil (1,1'-bifenil)-4-acético. Su fórmula empírica es $C_{15}H_{13}FO_2$ y el PM 244,25 Da (Figura 6).

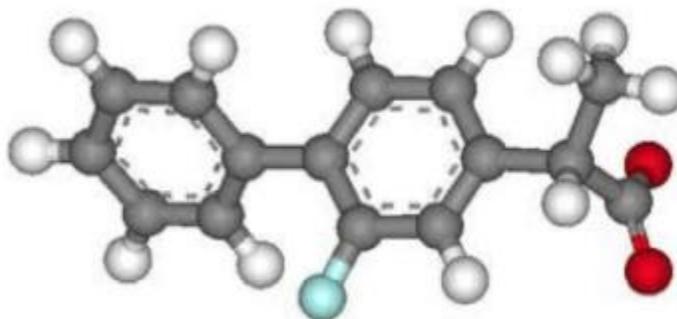


Figura 6. Estructura molecular del flurbiprofeno

El FB es un polvo cristalino blanco o ligeramente amarillento con un punto de fusión de 114-117 °C y pKa en agua a 25 °C es de 4.22. Es prácticamente insoluble en agua a pH inferior a 5 y fácilmente soluble en la mayoría de disolventes polares. A pH ácido se presenta en forma de ácido libre, mientras que a pH alcalino lo hace en forma de sal. [38].

El FB es un mezcla racémica de los enantiómeros (+)S y (-)R. Se ha determinado que el enantiómero S inhibe la síntesis de prostaglandinas y tiene una actividad antiinflamatoria y analgésica, mientras que el enantiómero R no inhibe la síntesis de prostaglandinas y únicamente tiene actividad analgésica. El fármaco es un potente antagonista de la síntesis de PGs [39]. Inactiva la COX, evitando así, tanto la formación de productos mediadores en la inflamación *in situ*, como la liberación de enzimas lisosomiales y la producción de superóxidos. Este fármaco reduce la

actividad de la COX, así como también la de la lipooxigenasa y la prostaglandin sintetasa. De ahí, sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas [40].

El FB se absorbe bien por vía oral. La absorción en el tracto intestinal alcanza concentraciones máximas de fármaco a los 60-90 minutos después de su administración. Una vez absorbido pasa a la sangre, asociándose entre un 90-99 % a las proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina y posteriormente se metaboliza en el hígado. El FB y sus metabolitos se excretan principalmente como glucurónido y sulfato conjugados.

En cuanto a la cinética de eliminación, sigue un modelo bicompartimental, siendo la vida media final en plasma de 4-6 horas. La excreción del fármaco se produce esencialmente en el riñón, entre un 20-25 % sin metabolizar, un 40-47 % como 4'-hidroxiflurbiprofeno, un 5 % como 3',4'-dihidroxiflurbiprofeno y un 20-30 % como 3'-hidroxi 4'-metoxiflurbiprofeno. Aproximadamente el 95 % de la dosis diaria es excretada en orina dentro de las 24 horas.

Debido a sus propiedades antiinflamatorias, el FB se utiliza en el tratamiento de numerosas patologías tanto a nivel ocular como sistémico [41].

El colirio comercializado (Ocufen®) contiene una concentración de principio activo de 0.03 %. Para la inhibición de la miosis intraoperatoria, se debe administrar una dosis de 4 a 6 gotas en el ojo, aplicando una gota cada 30 minutos empezando de 2 a 3 horas antes de la cirugía. En el tratamiento de la inflamación inducida tras trabeculoplastia con láser o cualquier otro procedimiento quirúrgico en el ojo, la dosis óptima es de una gota cada 4 horas instilada en el saco conjuntival durante una semana, iniciando 24 horas después de la cirugía.

El FB no se metaboliza dentro del ojo, sino que se absorbe intraocularmente y el 74% alcanza circulación sistémica. Se han detectado concentraciones de 176-213 ng/mL en humor acuoso humano después de la administración del fármaco (1 gota cada 15 minutos) 1 hora antes de la cirugía. Los niveles máximos se alcanzan a los 90 minutos de la instilación, disminuyendo lentamente, lo que permite mantener

unos niveles sustanciales de principio activo durante más de 2 horas después de la última dosis.

La semivida de distribución ocular del principio activo es de 15 minutos mientras que la sistémica es de 12 minutos. La semivida de eliminación del fármaco del humor acuoso es de 93 minutos y la del plasma de 74 minutos. La semivida de eliminación en el humor acuoso se acerca al tiempo de renovación del humor acuoso en el conejo, lo cual sería un indicativo de que el drenaje es la ruta principal de eliminación.

Estudios de biodisponibilidad ocular de FB, realizados tras administración de una única dosis de (0.1 %) o de múltiples dosis de menor concentración (tres dosis de una solución FB del 0.03 %, cada media hora) pusieron de relieve que, aunque en ambos casos indujo niveles en el ojo bastante elevados para prevenir la síntesis prostaglandinas, el empleo de una sola gota de solución más concentrada es más favorable que la administración en instilaciones repetidas, posiblemente debido a que induce menor irritación ocular y por tanto menor estímulo de la lagrimación refleja [42].

1.3. SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

Tras la administración de dosis únicas de fármacos por vías tradicionales, la concentración del principio activo en el organismo aumenta hasta un valor máximo, para luego disminuir debido a la excreción o a su metabolización (Figura 7). Para conseguir y mantener un nivel terapéutico del activo durante un amplio período de tiempo, se requiere la administración de dosis sucesivas del mismo, que complican la farmacodinamia. Se debe tener en cuenta que la concentración del principio activo debe estar por debajo de la mínima tóxica y alcance las terapéuticas mínimas [43]. No obstante, se produce una sobredosificación e infradosificación del fármaco, cuando solo se necesita una acción local [44].

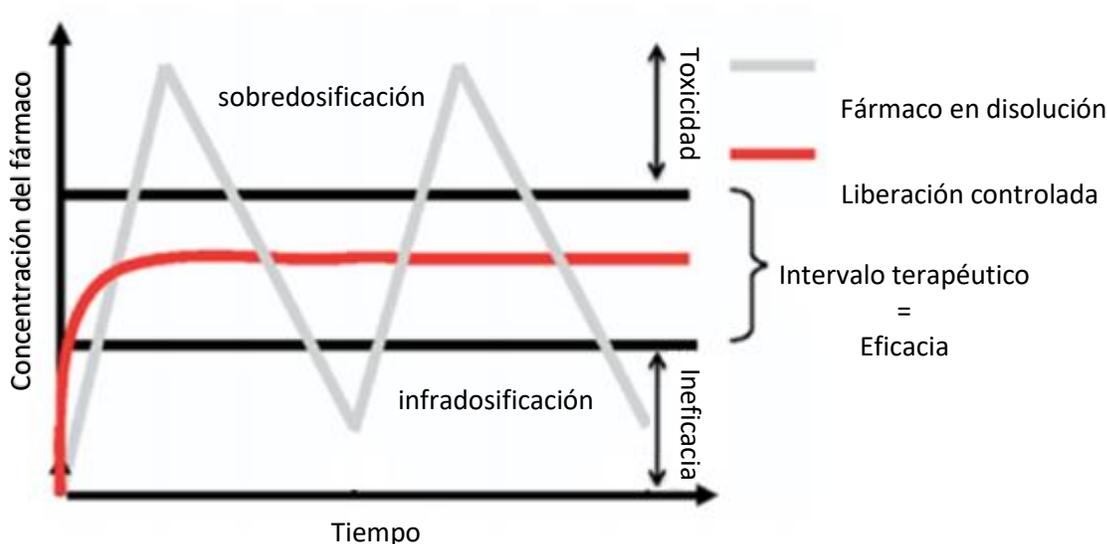


Figura 7. Perfil hipotético de la concentración plasmática de un fármaco tras la administración consecutiva de dosis múltiples de un sistema convencional comparado con el perfil ideal de concentración de fármaco requerido para un tratamiento.

Por ello los avances científicos han permitido desarrollar formas farmacéuticas de liberación modificada o controlada. Estos dispositivos mejoran el perfil farmacocinético e incluso reducen los efectos adversos, facilitando el cumplimiento de la pauta posológica.

De acuerdo con la Real Farmacopea Española 3ª Ed. (2005), las formas farmacéuticas de liberación controlada son aquellas en las que la velocidad y el lugar de la liberación de la sustancia o sustancias activas difieren del de la forma farmacéutica de liberación convencional, administrada por la misma vía [45]. Algunos de los sistemas nanoestructurados más comúnmente usados para la vía tópica son los liposomas, nanoemulsiones, nanopartículas (poliméricas y lipídicas) [46].

La administración de fármacos por vía ocular es un problema difícil y es un tema de interés para los científicos que trabajan en áreas multidisciplinares relacionadas con los ojos que incluyen el área química, bioquímica, farmacéutica, médica, clínica y toxicológica.

1.3.1. Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas se han investigado como sistemas de administración de fármacos durante varias décadas debido a su capacidad para transportar una amplia variedad de fármacos y permitir su liberación durante un período prolongado de tiempo. Las nanopartículas son esferas coloidales poliméricas de tamaño submicrónico (10-1000 nm) que pueden mantener un agente activo dentro de la matriz polimérica o mantener al agente activo adsorbido y/o conjugado en la parte exterior de la partícula. Estos sistemas vesiculares, frecuentemente se utilizan para vehicular fármacos que, por su naturaleza lipófila, son escasamente solubles en el agua o completamente insolubles en medio acuoso [47,48].

Las nanoesferas son sistemas con una estructura matricial, es decir, partículas cuya masa entera es sólida y el activo puede ser adsorbido en la superficie de la esfera o encapsulado en el interior de la partícula. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares, que actúan como una especie de depósito, en el que el fármaco se encuentra atrapado en una cavidad que consta de un núcleo oleoso rodeado de una cubierta de material sólido [49]. Una representación esquemática de las nanopartículas se muestra en la Figura 8.

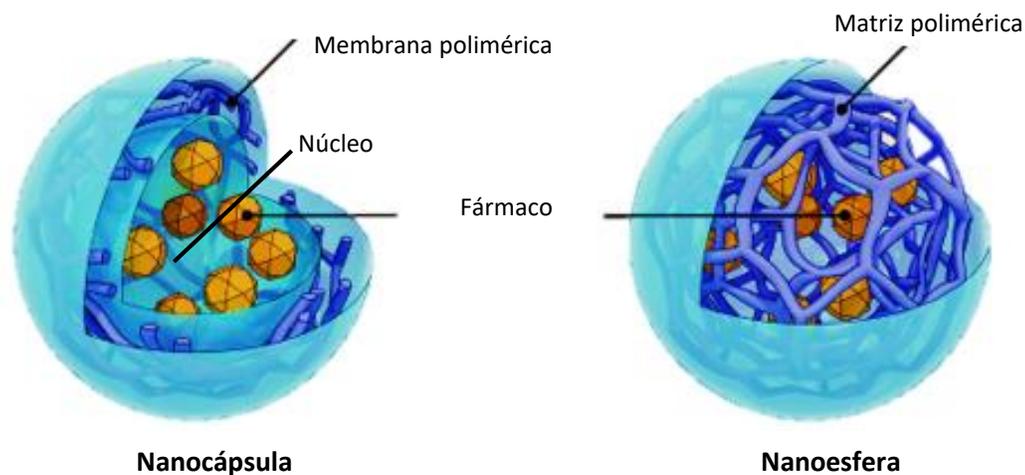


Figura 8. Clasificación de las nanopartículas poliméricas.

1.3.2. Caracterización de las nanopartículas

Las propiedades superficiales y características fisicoquímicas de las nanopartículas deben ser caracterizadas durante su elaboración ya que se asocian con el comportamiento *in vitro/in vivo* y permiten adecuar la formulación a una aplicación terapéutica específica.

El tamaño de partícula en las formulaciones destinadas a instilación ocular no debe exceder a las 10 micras para evitar una sensación de malestar en el ojo [50]. También se debe tener en cuenta que cuanto más pequeñas sean las nanopartículas, mayor es el área superficial lo que incrementa su adhesividad a las superficies. Un contacto más estrecho entre las partículas cargadas de fármaco y la membrana biológica puede permitir una penetración del fármaco más eficiente en el tejido [51]. Teniendo en cuenta el reducido tamaño de las nanopartículas, el diámetro medio debe ser evaluado a través de métodos altamente sensibles tales como: espectroscopia de correlación de fotones (PCS), difracción laser (LD) y microscopia electrónica. De ellas las técnicas de PCS y LD se utilizan habitualmente para una determinación rápida del tamaño de partícula y su distribución [52].

Existen otras técnicas que además de proporcionar información con respecto al diámetro medio facilitan datos relacionados con la forma de las partículas, dentro de ellas se encuentra la microscopía electrónica de transmisión (TEM), de barrido (SEM) y la microscopía de fuerza atómica (AFM) [53].

El potencial zeta proporciona información sobre la carga superficial de las partículas que puede influir tanto en la estabilidad física como en la mucoadhesión de las mismas con las membranas celulares. La formación de agregados suele ocurrir cuando las fuerzas de van der Waals son dominantes, lo que resulta en una reducción de los valores del potencial zeta y la pérdida de estabilidad del sistema. Para efectuar esta determinación se emplean técnicas electroforéticas o anemometría laser doppler, empleando la ecuación de Helmholtz Smoluchowski [54].

La determinación de la eficiencia de encapsulación es particularmente compleja debido al pequeño tamaño de estos, lo que dificulta la separación de la fracción de fármaco libre de la fracción asociada. Para ello es necesario implementar y validar un proceso apropiado de extracción del fármaco atrapado, ya sea de manera directa (rompiendo las nanopartículas) o indirecta (fármaco no encapsulado en la fase continua). En ambos casos es necesario realizar ultracentrifugación para separar las nanopartículas de la fase continua. Una vez cuantificada la muestra, es posible determinar la eficiencia de encapsulación en términos porcentuales que define la relación entre la cantidad de fármaco encapsulado y aquel que fue añadido durante la elaboración de las nanopartículas. Existen diferentes técnicas analíticas que permiten cuantificar la concentración del fármaco como HPLC o espectrofotometría ultravioleta [55].

El peso molecular del polímero condiciona el tamaño de partícula, la eficiencia de asociación del fármaco al polímero y la velocidad de degradación de este último, de forma que afecta a la liberación del fármaco de estos sistemas [56].

La interacción principio activo/polímero, así como el estado físico en que se encuentra la molécula activa una vez encapsulada puede determinarse empleando técnicas como espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X, espectroscopia de fotoelectrones generado por rayos X (XPS) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Esta última también permite evaluar el comportamiento térmico de los componentes de las nanopartículas después de ser sometidas a las condiciones del proceso de elaboración [57].

La evaluación del perfil de liberación del fármaco desde la matriz, se puede producir a través de la difusión, erosión del polímero o una combinación de ambos mecanismos (Figura 9) [58]. La liberación del fármaco a partir de las nanopartículas puede ser determinada *in vitro*, por diálisis empleando membranas de difusión o celdas de difusión de Franz (donante y receptor) con membranas artificiales o biológicas a un pH fisiológico, en condiciones Sink. La cinética de liberación (% de activo liberado con el tiempo), permite comprender los mecanismos involucrados en la cesión de la molécula encapsulada. [52,59].

Si la difusión del fármaco es más rápida que la degradación de la matriz, el mecanismo de liberación del fármaco se produce principalmente por difusión. Así mismo existe una liberación del fármaco atrapado en la capa superficial de la matriz polimérica que se disuelve instantáneamente al entrar en contacto con el medio. Esto provoca el llamado efecto estallido (*burst effect*) [60]. A partir de los datos *in vitro*, es posible planificar estudios *in vivo*, en animales de experimentación

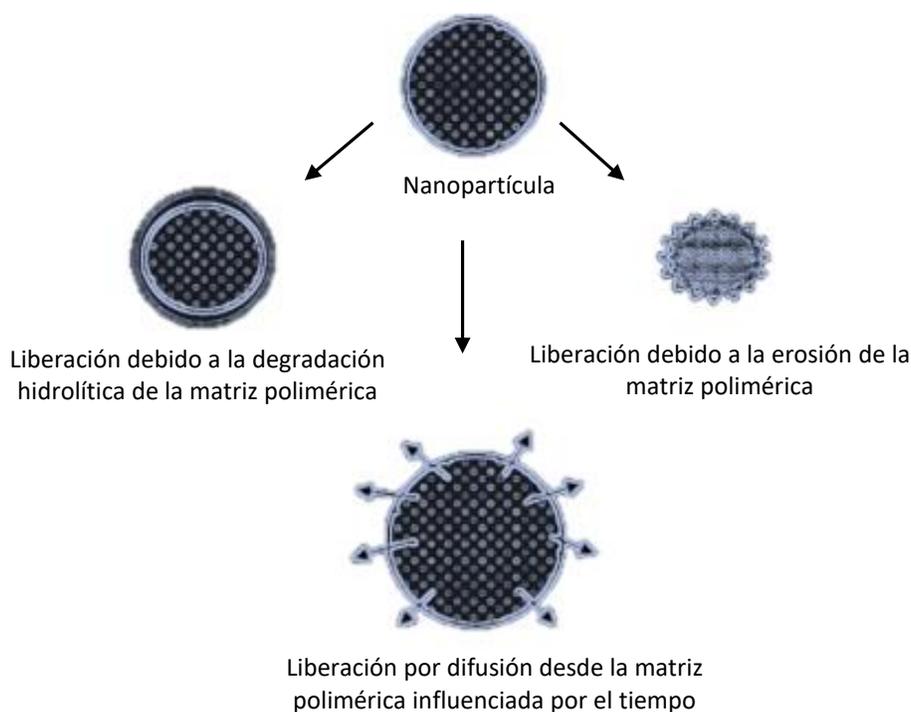


Figura 9. Mecanismos de liberación de fármacos a partir nanopartículas poliméricas

1.3.3. Nanopartículas de PCL

Las nanopartículas poliméricas se han utilizado para muchas vías de administración para aumentar la eficacia y especificidad de fármacos nuevos y ya existentes. De acuerdo con esta perspectiva, los polímeros biodegradables son de interés

primordial debido a su mayor ventaja que es la eliminación de metabolitos del polímero fuera del cuerpo por los procesos biológicos innatos [61]. La mayoría de los trabajos de investigación se han dirigido al poli (ácido láctico), poli (ácido glicólico), poli (PLGA) co-polímeros (láctico-co-glicólico). El éxito de estos polímeros para aplicaciones farmacéuticas ha dado lugar además a la evaluación de los poliésteres alifáticos tales como poli- ϵ -caprolactona (P ϵ CL). Entre los criterios que más influyen en la elección de los polímeros para la obtención de sistemas de nanopartículas de liberación controlada están incluidos: la biodisponibilidad, la biocompatibilidad, el control de la degradación y la facilidad de producción del polímero. Así mismo, la naturaleza del polímero y sus propiedades fisicoquímicas influyen significativamente en el tamaño de las nanopartículas y en su perfil de liberación [62].

Además, en comparación con los polímeros naturales, estos polímeros sintéticos presentan una elevada reproducibilidad, se formulan fácilmente mediante procedimientos sencillos y permiten el control y la predicción de la cinética de degradación [61]. Microesferas, nanopartículas, películas, fibras, micelas etc. de P ϵ CL, han sido estudiadas para la administración de fármacos y/o la aplicación de ingeniería de tejidos.

1.3.3.1. Características fisicoquímicas

La poli- ϵ -caprolactona es un poliéster semi-cristalino, biodegradable y biocompatible con una temperatura de transición vítrea de -60 °C y punto de fusión que oscila entre +59 y +64 °C, dependiendo de la naturaleza cristalina de la P ϵ CL. El peso molecular promedio en distintas P ϵ CL puede variar entre 10.000 a 42.500 M_n. Existen varios mecanismos (aniónicos, catiónicos, coordinación y radical) que pueden afectar la polimerización de P ϵ CL. Cada método se ve afectado por el PM, la distribución del PM, la composición del grupo final y la estructura química de los copolímeros [63].

El polímero es no tóxico y no mutagénico. Su velocidad de degradación es lenta, más lenta que cualquier otro poliéster biodegradable lo que hace que este polímero sea adecuado para la administración de fármacos en terapia crónica. Siendo la P&CL un polímero hidrofóbico y de degradación lenta se le considera como un vehículo adecuado para atrapar fármacos lipofílicos. Por otra parte, la P&CL es considerablemente más económica que otros polímeros tales como poli-glicólido, poliláctico y sus copolímeros [64].

La P&CL es soluble en cloroformo, benceno, tolueno, y diclorometano entre otros. Tiene una baja solubilidad en acetona, 2-butanona, acetato de etilo, dimetilformamida y acetonitrilo y es insoluble en alcohol, éter de petróleo y éter dietílico.

1.3.3.2. Mecanismos de biodegradación de P&CL

El término biopolímero generalmente se relaciona con biodegradable que necesariamente no se traduce en ser bio-reabsorbible, es decir, se degrada y se aleja de su sitio de acción *in vivo*, pero no necesariamente es eliminado del cuerpo. En contraste, el término bio-reabsorbibilidad se traduce como la eliminación total de los materiales extraños iniciales y la degradación de la carga de los productos por subproductos (compuestos de bajo peso molecular) que no tienen efectos secundarios residuales [65].

Las PCLs pueden ser biodegradadas por organismos vivos al aire libre (bacterias y hongos), pero no son biodegradables en los animales y humanos debido a la falta de enzimas apropiadas [66]. Esto no quiere decir que no sean bioreabsorbibles, sino más bien, que el proceso lleva mucho más tiempo, dependiendo primero de la degradación hidrolítica.

En una primera etapa la biodegradación de P&CL se produce por hidrólisis de sus enlaces éster. Este tipo de reacción permite la degradación del polímero, disminuyendo el peso molecular de los mismos. En las formulaciones de P&CL, esta

disociación no enzimática comienza en las regiones amorfas de grupos carbonilos finales de las cadenas poliméricas fragmentadas.

La permeabilidad al agua en la formulación es el paso limitante de la velocidad para esta fragmentación no enzimática. La longitud de estos fragmentos internos depende del peso molecular del polímero inicial. La pérdida de peso de la formulación se inicia cuando los fragmentos de P&ECL producidos son lo suficientemente pequeños para ser difundidos a través de la matriz polimérica media. La longitud crítica o el peso molecular para propiciar la difusión de los fragmentos de P&ECL es $< 5000 M_n$. Este proceso se acompaña generalmente por la erosión superficial enzimática caracterizada por ranuras y grietas en la superficie. En una segunda etapa en la que el polímero tiene un peso molecular y cristalinidad bajos, sufren fagocitosis o solubilización en los fluidos corporales y seguidamente los productos derivados pasan al ciclo de Krebs para terminar el proceso de degradación. La lipasa es capaz de intensificar la velocidad de degradación de P&ECL, reduciéndolos a oligómeros y monómeros dentro de 3-4 semanas [65]. El esquema de la degradación de P&ECL se refleja en la Figura 10.

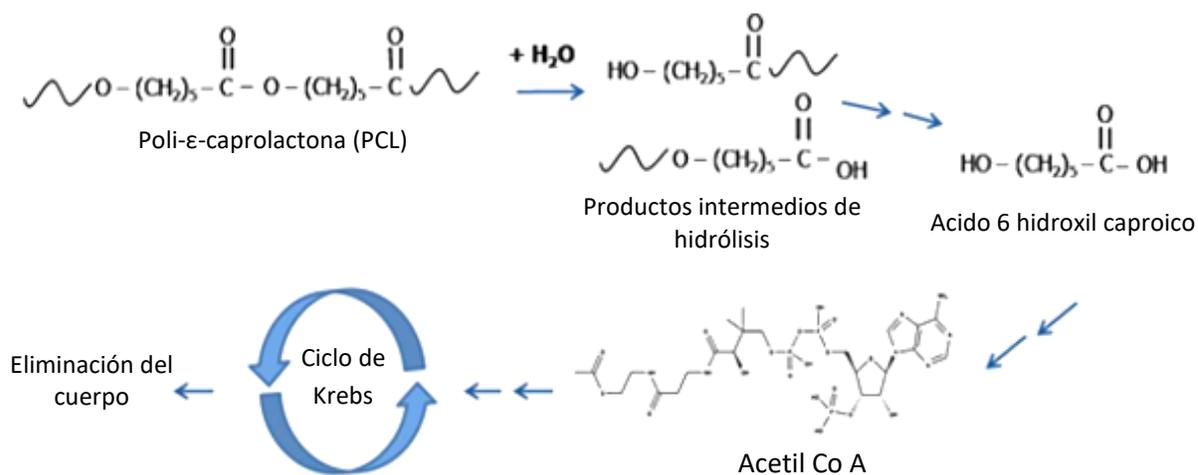


Figura 10. Degradación de P&ECL mediante productos intermedios que se eliminan a través del ciclo de Krebs

Chen et al. [67] reportaron que la presencia de lipasa inicia la degradación de microesferas de PCL, por hidrólisis enzimática en la superficie, en tan sólo 3 semanas. Sin embargo, en ausencia de lipasa no había ninguna señal de la degradación, incluso después de 9 semanas. En general se ha demostrado que la biodegradación de las nanopartículas poliméricas depende de la naturaleza del esqueleto del polímero, la hidrofobicidad, la cristalinidad, la longitud del polímero, la presencia o ausencia del enzima y parámetros del producto tales como el tamaño de las partículas, la porosidad de su superficie, el proceso de fabricación y la geometría [61,67].

1.3.4. Métodos de preparación de nanopartículas de PCL

1.3.4.1. Nanoprecipitación o desplazamiento del disolvente

Implica la interacción de dos medios, un medio orgánico en donde el polímero y el fármaco se solubilizan en un solvente orgánico (etanol, acetona, hexano, cloruro de metileno o dioxano) que es parcialmente miscible en agua y fácil de evaporar. Por esta razón, la acetona es el disolvente de polímero más frecuentemente empleado en este método. Esta solución orgánica se adiciona gota a gota sobre un medio acuoso en presencia o ausencia de un estabilizante (polivinil alcohol, polisorbato o poloxamer). El medio orgánico (polímero hidrofóbico y el fármaco) al entrar en contacto con el medio acuoso, provoca la insolubilización del polímero, el cual precipita [47,68].

Las nanopartículas se forman instantáneamente por una rápida difusión del disolvente al medio acuoso, bajo agitación magnética, conduciendo a la formación de una suspensión coloidal (Figura 11). Posteriormente, el disolvente se elimina a presión reducida. La formación instantánea de las partículas es atribuida a las turbulencias interfaciales entre las fases líquidas generadas durante el desplazamiento del disolvente [69].

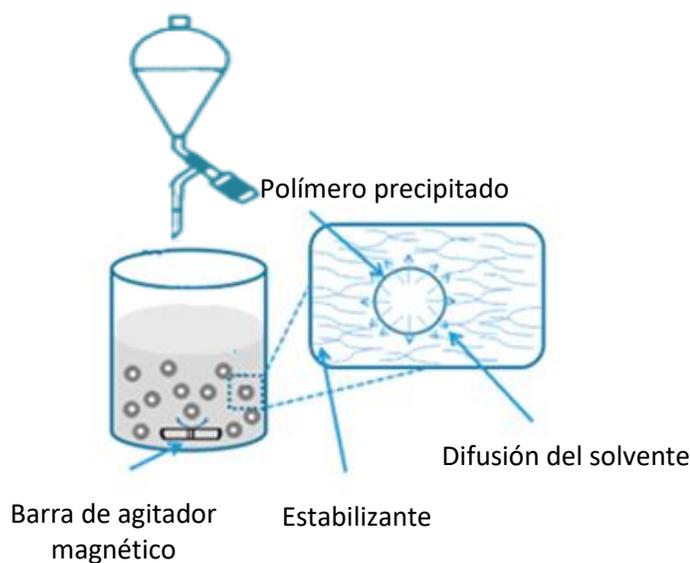


Figura 11. Preparación de nanopartículas por el método de nanoprecipitación

Las nanocápsulas, también pueden prepararse a través de esta técnica, mediante la adición de un volumen de aceite en la fase orgánica, el cual debe ser compatible con el polímero y al mismo tiempo, debe solubilizar el fármaco. Por lo que, una de las ventajas de esta técnica es que es útil para encapsular fármacos lipófilos e hidrófilos. Entre las desventajas del uso de esta técnica están: una baja eficiencia de encapsulación del fármaco en la matriz del polímero, comparado con otras técnicas y adicionalmente, la dificultad para eliminar completamente el solvente orgánico, una vez se han formado las nanopartículas [69].

1.3.4.2. Salting out

Este método consiste en la separación de un solvente miscible en agua de una solución acuosa enriquecida con electrolitos. La acetona suele ser el disolvente elegido debido a sus características de solubilización y su buena separación de soluciones acuosas con los electrolitos o agentes (*salting out*). El polímero y el

fármaco se disuelven en acetona, y esta solución se emulsifica bajo una fuerte agitación mecánica en un gel acuoso que contiene los electrolitos y un estabilizante. Esta emulsión aceite/agua se diluye con un volumen suficiente de agua o de soluciones acuosas para potenciar la difusión de la acetona hacia la fase acuosa, conduciendo así la formación de nanoesferas. El disolvente y los electrolitos se eliminan por filtración de flujo transversal (Figura 12) [70].

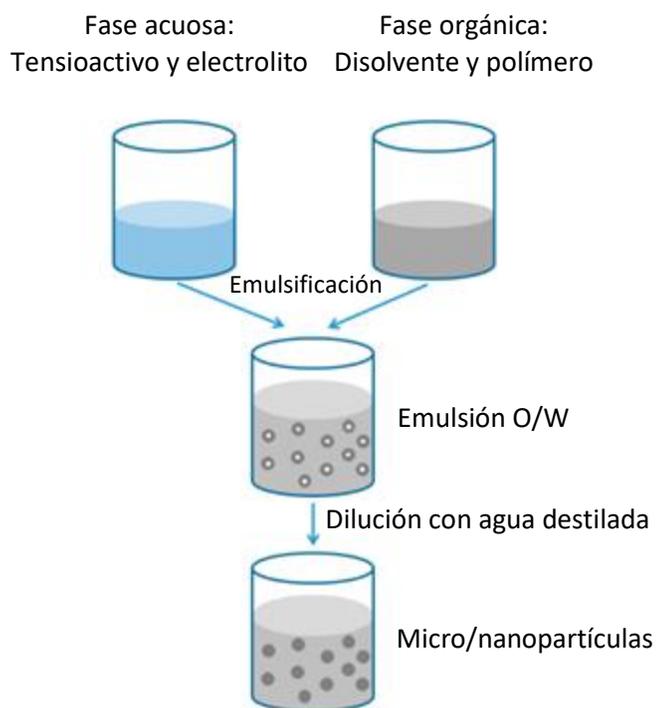


Figura 12. Preparación de nanopartículas por el método de Salting out

La elección correcta del electrolito es muy importante porque juega un gran papel en la eficacia de encapsulación. Entre las ventajas de este método cabe citar el excelente rendimiento del proceso, la facilidad de escalado y la posibilidad de encapsular proteínas y demás principios activos termolábiles, debido a que no se requiere incrementar la temperatura durante el proceso de preparación. Sin embargo, esta técnica está exclusivamente limitada a fármacos lipofílicos, electrolitos que permitan la separación de las fases evitando la precipitación y

agentes estabilizantes compatibles con soluciones acuosas saturadas y que no coacervan en presencia del disolvente, además de una serie de intensos lavados para eliminar los electrolitos [69].

1.3.4.3. Difusión del disolvente

Consiste en el uso de un disolvente parcialmente miscible en agua, que previamente se satura con agua para asegurar el equilibrio termodinámico entre ambos líquidos. El polímero se disuelve en el disolvente saturado con agua, y esta fase orgánica se emulsifica, bajo agitación vigorosa, en una solución acuosa que contiene un agente estabilizante. La posterior adición de agua al sistema provoca la difusión del disolvente a la fase externa, formándose así las nanopartículas. Dependiendo del punto de ebullición del disolvente, éste puede eliminarse por destilación o por filtración de flujo transversal. El procedimiento está ilustrado en la Figura 13, y al igual que en la mayoría de las técnicas anteriores, este método es eficaz para la encapsulación de fármacos lipófilos [71].

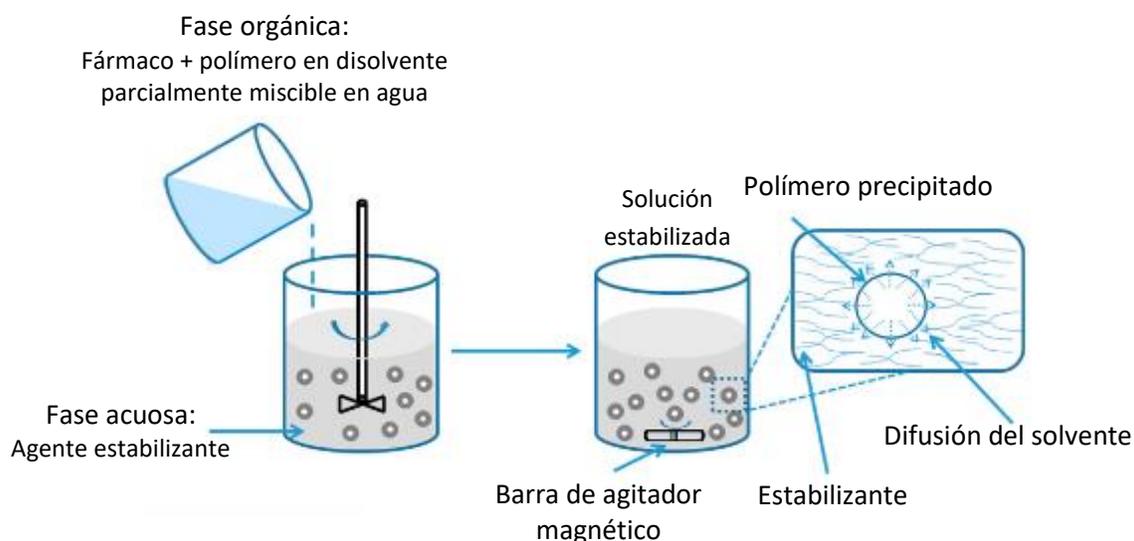


Figura 13. Representación esquemática del método de difusión del disolvente

1.3.4.4. Evaporación del disolvente

En este método, el polímero y el fármaco se disuelven en un solvente orgánico y volátil. Esta solución es emulsificada en una solución acuosa de un agente estabilizante. La emulsión se transforma en una suspensión coloidal por la evaporación del solvente orgánico que difunde a través de la fase continua de la emulsión. La emulsión puede prepararse en forma individual (agua / aceite y viceversa) o como doble emulsión ((agua/aceite)/agua, etc.) [58].

En ambos casos se utiliza la homogenización o ultrasonidos para reducir el tamaño de la gotícula de la emulsión, seguido de la evaporación del solvente orgánico, ya sea por agitación magnética continua a temperatura ambiente o bajo presión reducida, seguida de varios lavados con agua destilada para remover los aditivos tales como, los tensioactivos (Figura 14) [70].

La mayoría de disolventes empleados en esta técnica son organoclorados, por lo que siempre se debe verificar el contenido residual de dichos disolventes en la formulación final.

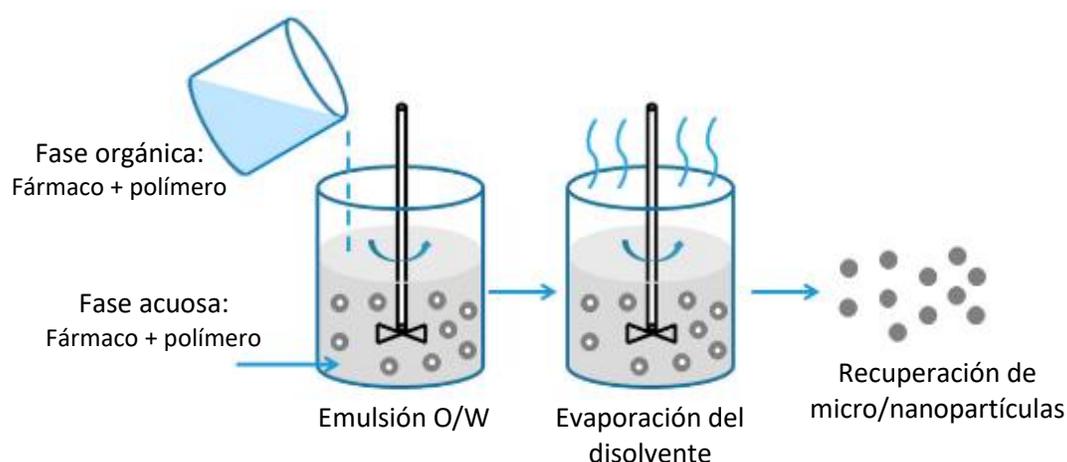


Figura 14. Representación esquemática del método de evaporación del disolvente

1.3.5. Estabilización a largo plazo de las nanopartículas

La elevada sensibilidad de las nanopartículas al estrés fisicoquímico durante el proceso de elaboración y el almacenamiento constituye la mayor dificultad para sus aplicaciones farmacéuticas. Las formulaciones de fármacos basados en nanopartículas poliméricas se preparan comúnmente en forma de presentaciones sólidas debido a que se logra una mayor estabilidad en el sólido que en el estado líquido y además proporciona otros beneficios como la facilidad de manejo y almacenamiento y la reducción en los costos de transporte, entre otros [72].

El método de secado es el más común para aumentar la estabilidad de las nanopartículas poliméricas. En general para convertir una solución o suspensión en un polvo seco o matriz seca (pastilla), el agua debe ser removida aplicando calor durante el secado ya sea por conducción, convección y / o radiación, que son las técnicas básicas utilizadas para vaporizar agua. Asimismo, se pueden aplicar presiones bajas para mejorar la tasa de deshidratación [73]. Aunque todas las técnicas de secado comparten un objetivo común (es decir, deshidratación), conceptualmente son diferentes e introducen diferentes tipos de estrés al compuesto que pueden comprometer su estabilidad. Por ello las técnicas requieren modificaciones y/o adaptaciones en función de las propiedades del compuesto.

La elección del método de secado depende de varios factores, tales como: las propiedades físicas del producto, la vía de administración del fármaco, el tipo de fuente de energía disponible, el sistema de cierre del envase y la escalabilidad de los equipos. Para los productos de alto valor, como es a menudo el caso de los productos farmacéuticos, el costo de la materia prima puede ser un factor primario que determinaría la selección del método del proceso, en cuanto a un bajo rendimiento o una recuperación de producto <100 %. El consumo de energía, calidad y tiempo de conservación del producto también son parámetros críticos evaluados durante la aplicación de la tecnología de secado. Por otra parte, las técnicas pueden producir muestras secas que poseen características significativamente diferentes [73,74].

El método de secado más utilizado en la industria farmacéutica es la liofilización seguida por el secado por pulverización (*spray-drying*) y secado con fluido supercrítico que se perfila como una alternativa viable. Existen modificaciones de estos métodos, como el recubrimiento por pulverización (*spray coating*) o el secado por liofilización y pulverización (*spray freeze drying-SFD*) que se utilizan más a pequeña escala [72].

La liofilización se considera un proceso altamente estabilizante. Esta técnica consiste en la desecación de la solución o suspensión por congelación de ésta y la posterior sublimación del hielo, sin pasar por una fase líquida intermedia a presión reducida. En el caso de una suspensión de nanopartículas, después de la desecación completa, se obtienen nanopartículas en polvo en forma de una matriz seca que es fácil de manejar y almacenar (Figura 15).

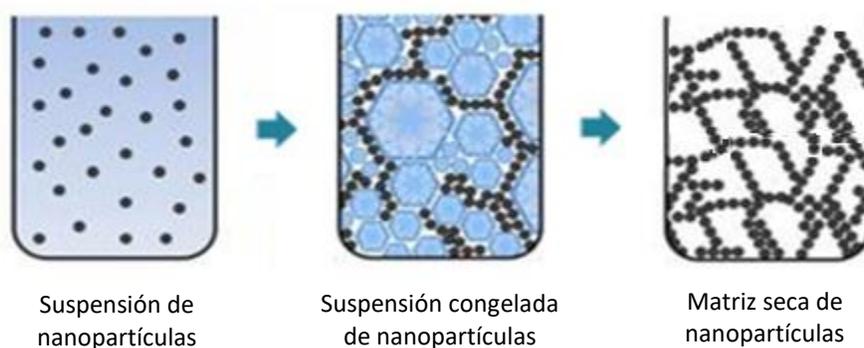


Figura 15. Estados de las nanopartículas al ser sometido a un proceso de liofilización

El producto, contenido en viales o en bandejas, es depositado encima de las placas de la cámara del liofilizador. Luego se procede a colocar los sensores de temperatura dentro del producto.

La temperatura de las placas se reduce a fin de lograr la completa congelación del producto (solidificación). Se enfría el serpentín del condensador que receptorá los vapores de agua emitidos por la muestra. Se pone en marcha la bomba de vacío

que reducirá la presión en el sistema durante todo el proceso. Cuando la presión en la cámara es suficiente baja, se inicia la sublimación del hielo. Para compensar el consumo de energía que esto significa, se aplica calor a las placas de la cámara durante todo el secado primario (Figura 16). Cuando todo el hielo ha sido sublimado, se inicia el secado secundario para eliminar el agua o humedad residual.

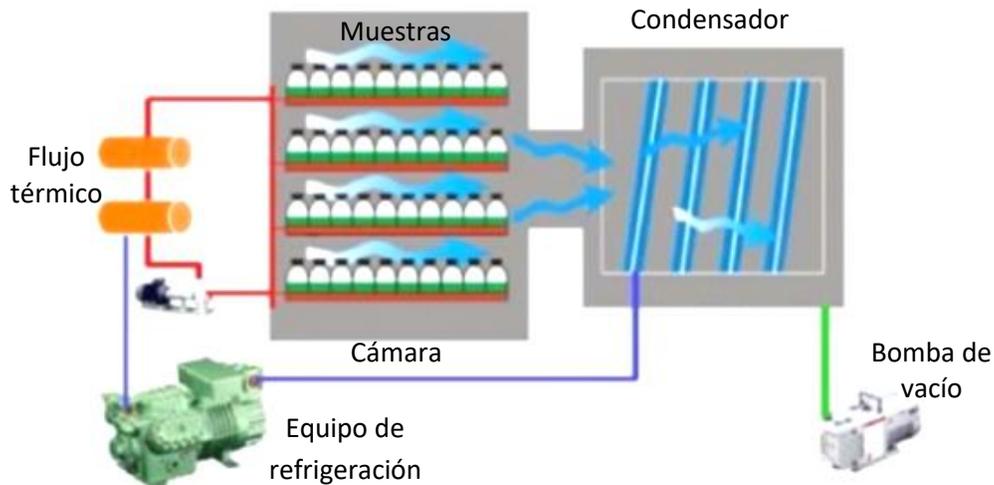


Figura 16. Representación esquemática del sistema de un liofilizador típico

El secado por pulverización es una técnica bien conocida para producir polvos, gránulos o aglomerados a partir de soluciones o suspensiones de fármacos y sus excipientes. En este método, la suspensión de nanopartículas se atomiza en una corriente de aire caliente. La atomización conduce a la formación de pequeñas gotas, donde el disolvente se evapora instantáneamente conduciendo a la formación de partículas de flujo libre tal como se representa en el esquema (Figura 17). Los parámetros del proceso deben ser controlados cuidadosamente con el fin de obtener el tamaño de partícula adecuado. El tamaño de las partículas depende del tamaño del inyector, el caudal de pulverización, la presión de atomización, la temperatura del aire de entrada y el grado de interrelación de ellos [75].

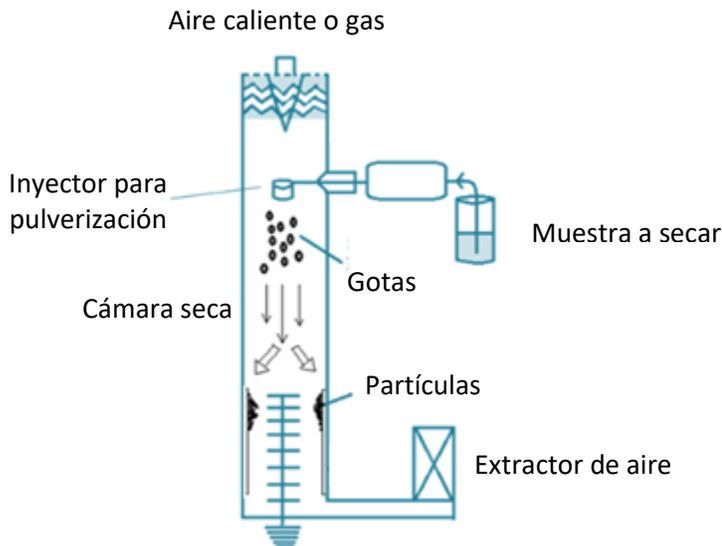


Figura 17. Representación esquemática del sistema de secado por pulverización

El secado por fluidos supercríticos es relativamente nuevo en el campo farmacéutico. Un fluido supercrítico puede ser un líquido o gas y se utiliza por encima de su punto crítico termodinámico de temperatura y presión [13].

Dos técnicas han sido desarrolladas para este método: La expansión rápida de la solución supercrítica (*RESS, rapid expansion of a supercritical solution*), donde el fármaco y el polímero se solubilizan en un fluido supercrítico para luego ser expandidos a través de un inyector para pulverización (Figura 18). El fluido supercrítico más empleado es el CO_2 , por su baja toxicidad y baja temperatura crítica. Cuando el CO_2 se expande durante la pulverización, las gotas se descomponen en gotas más finas, que a continuación se secan rápidamente por el flujo de gas para producir partículas de soluto que finalmente precipitan y se recogen. A pesar de que en esta técnica no emplea disolventes orgánicos para la formación de nanopartículas, los productos principales obtenidos se encuentran en la microescala en lugar de nanoescala, que es el principal inconveniente de RESS [70].

Una variante interesante de esta técnica es la expansión rápida de una solución supercrítica en un disolvente líquido (*RESOLV, rapid expansion of a supercritical solution into a liquid solvent*). La presencia de aditivos en el disolvente líquido que estabilicen las partículas sólidas e impidan la formación de agregados, incrementa la eficacia del proceso con respecto a la técnica RESS. Sin embargo, introduce como inconveniente la necesidad de recuperar las nanopartículas de la disolución líquida.

Las principales ventajas que ofrecen los fluidos supercríticos son la reducción en el uso de disolventes orgánicos y la posibilidad de formar las nanopartículas sin recurrir a elevadas temperaturas. No obstante, este novedoso proceso requiere una elevada inversión inicial para la obtención del equipamiento necesario y operar a elevadas presiones usando sistemas de alta presión. Sin embargo, es muy complicado disolver sustancias muy polares en CO₂ supercrítico. No obstante, el uso de cosolventes y/o tensioactivos permite disolver especies polares e iónicas [76,77].

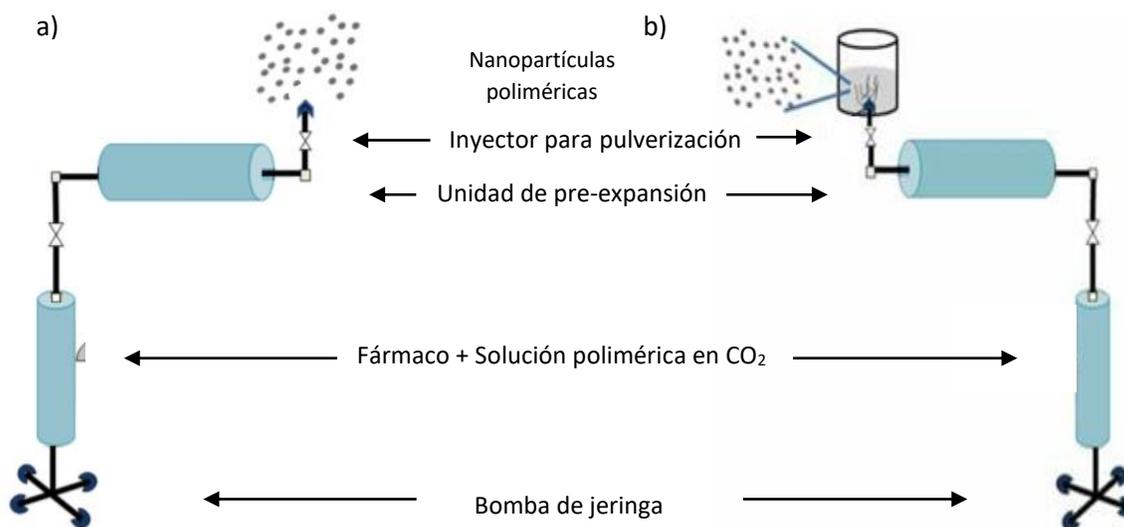


Figura 18. Representación esquemática del sistema de secado por fluidos supercríticos: a) rápida expansión de la solución de fluido supercrítico b) rápida expansión de la solución de fluido supercrítico en disolvente líquido.

Es evidente que no todos los métodos de secado son adecuados y el método ideal aún no se ha encontrado. Cada uno de los métodos tiene ventajas típicas, así como inconvenientes, de los cuales la relevancia y magnitud, además, puede ser determinada por las condiciones aplicadas en el proceso, así como la formulación (excipientes utilizados).

La idoneidad de estos tres métodos de secado específico depende de una serie de aspectos relevantes. Lo más importante en este sentido es el nivel de estrés del proceso, el riesgo de cristalización, la velocidad del proceso, la facilidad para diseñar partículas, la capacidad de recuperación (rendimiento), el coste y la experiencia actual en industria (Tabla 1).

Tabla 1. Conceptos generales relativos al secado de los productos por liofilización, pulverización y fluidos supercríticos (+: favorable, -: desfavorable) [78].

| Métodos de secado | <i>Estrés por atomización</i> | <i>Estrés por congelación</i> | <i>Estrés por calor</i> | <i>Velocidad del proceso</i> | <i>Riesgo de cristalización</i> | <i>Diseño de partícula</i> | <i>Capacidad</i> | <i>Coste</i> | <i>Experiencia industrial</i> |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------------|----------------------------|------------------|--------------|-------------------------------|
| Liofilización | + | - | + | - | + | - | +/- | - | + |
| Por pulverización | - | + | - | + | - | + | + | + | + |
| Por fluidos supercríticos | - | + | +/- | + | +/- | + | + | - | - |

1.4. LIOFILIZACIÓN

La liofilización como proceso industrial se desarrolló a mediados del siglo XIX. Pero sus principios eran ya conocidos y empleados por los incas para la conservación de patatas. El procedimiento ancestral consistía en dejar que las patatas se congelasen

durante la noche por la acción del frío de los Andes y gracias al calor de los primeros rayos de sol de la mañana y la baja presión atmosférica de las elevadas tierras andinas se producía la sublimación del agua congelada (liofilización natural) [73].

El verdadero desarrollo de la tecnología de liofilización fue durante la Segunda Guerra Mundial y en la postguerra, gracias al desarrollo de bombas de vacío eficaces [79]. En definitiva, la liofilización se desarrolló durante la guerra como un método de conservación de plasma sanguíneo y de penicilina, de modo que estos productos llegaran en perfectas condiciones desde los centros de producción hasta el frente. Hoy en día, el campo de sus aplicaciones incluye [80]:

- Sustancias químicas puras, fármacos y reactivos de laboratorio, con el fin de prolongar la vida útil y controlar las propiedades lábiles o reactivas de la molécula.
- Enzimas terapéuticas e industriales y agentes biológicos, tales como proteínas y ADN, para preservar la actividad biológica.
- Preservación de células, como alternativa al almacenamiento en nitrógeno líquido o en congeladores
- Tejidos para investigación y uso médico como sangre, hueso y tendón, como un paso de preservación y seguridad del paciente.
- Productos alimenticios, que permiten reducir los costes de transporte, prolongan la vida útil y maximizan el sabor y el valor nutricional.
- Preservación y recuperación de enseres especiales o con un valor sentimental. Por ejemplo; libros empapados, ramos de novia y hallazgos arqueológicos.
- Como paso de concentración, se utiliza para recuperar materiales de muestras diluidas para investigación adicional

1.4.1. Beneficios de la liofilización

La liofilización a pesar de ser una técnica compleja es aceptada por las autoridades reguladoras como una operación unitaria adecuada en la fabricación de productos terapéuticos. Esta técnica ofrece una gama de beneficios únicos [80]:

- El material liofilizado puede almacenarse a temperaturas tan altas como la temperatura ambiente, sin sufrir degradación. Sin los requisitos de las instalaciones criogénicas o de congelación, el coste energético y el riesgo de pérdida de producto por fallo de energía se reduce considerablemente.
- La liofilización puede ser operada en un ambiente más controlado que otras formas de secado, lo que significa menos probabilidad de contaminación.
- El secado puede extenderse hasta alcanzar el nivel de humedad residual especificado (del 0.1 % al 5 %)
- Como el producto se seca sin calentamiento excesivo, las proteínas y otros productos que serían desnaturalizados térmicamente se pueden conservar con éxito sin pérdida de actividad.
- Los productos liofilizados tienen una superficie muy elevada, lo que facilita su rápida reconstitución. Esto es particularmente importante en el caso de las vacunas y anticuerpos de emergencia, que deben administrarse lo antes posible. Las sopas y cafés instantáneos y las leches en polvo son ejemplos cotidianos de los beneficios de una rápida reconstitución.
- Los viales se pueden sellar bajo vacío o gas inerte, lo que ayuda a preservar los productos sensibles al oxígeno. Cuando se seca en viales o ampollas, el volumen de llenado puede controlarse con precisión.
- Como los productos son mucho más ligeros cuando están secos, la liofilización también ofrece el beneficio de reducir los costos de transporte.

Aunque también presenta algunos inconvenientes:

- Es necesaria una gran inversión de equipamiento, alrededor de tres veces el de otros métodos.
- Alto coste energético y elevado tiempo de proceso (entre 4 y 10 h/ciclo secado).

1.4.2. Proceso de la liofilización

Un proceso de liofilización típico puede ser dividido en tres etapas: congelación, secado primario y secado secundario. La Figura 19 muestra un esquema de un ciclo de liofilización típico.

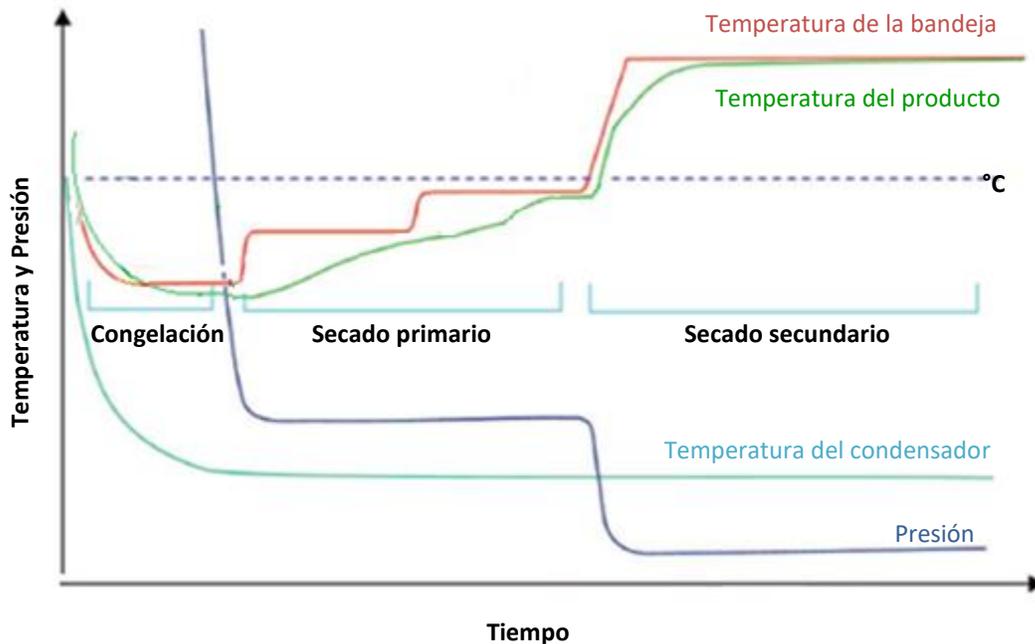


Figura 19. Esquema de un ciclo típico de liofilización

1.4.2.1. Etapa de congelación

La etapa de congelación se inicia enfriando las bandejas, sobre las cuales se colocan los viales con las muestras, a la temperatura de congelación deseada, manteniendo esta temperatura constante para equilibrar. En este contexto, la muestra primero se enfría hasta que se produzca la nucleación del hielo, lo que sucede varios grados por debajo del punto de congelación de equilibrio de la muestra, denominado superenfriamiento o supercooling. Después de la nucleación del hielo, los cristales de hielo comienzan a crecer dando como resultado la congelación de la muestra. En este punto están presentes dos fases, es decir hielo y solución concentrada en congelación, y la composición de la muestra se determina mediante la curva de congelación de equilibrio del agua en presencia del soluto [81]. Para los excipientes cristalinos, la cristalización del soluto ocurre cuando la temperatura del producto baja por debajo de la temperatura eutéctica (T_{eu}). Sin embargo, para los excipientes amorfos, la congelación continúa hasta que la viscosidad excede un valor crítico en el cual se produce la formación vítrea. La temperatura de este cambio se denomina temperatura de transición vítrea (T_g). Por lo tanto, para asegurar la solidificación completa de la muestra, ésta tiene que congelarse por debajo de T_g si está en estado amorfo o por debajo de T_{eu} si está en estado cristalino. Como al terminar el enfriamiento, la mayor parte del agua se ha separado del soluto, la etapa de congelación es la mayor etapa de deshidratación en la liofilización [82].

El estrés de la congelación puede producir la desestabilización de las nanopartículas. Cuando el hielo se separa de la parte concentrada formada por las nanopartículas, éstas pueden agregarse y en algunos casos fusionarse irreversiblemente modificando sus características morfométricas y morfológicas. Además, la cristalización del hielo podría ejercer un estrés mecánico en las nanopartículas produciendo su desestabilización [83]. Por este motivo, frecuentemente es necesaria la incorporación de excipientes especiales a la formulación para proteger el sistema antes de la liofilización.

También es importante ser consciente de la presencia de excipientes farmacéuticos, que generalmente se usan con la finalidad de facilitar la isotonicidad (por ejemplo, glucosa) o la estabilización (por ejemplo, dextrano y tensioactivos). Tales excipientes son de hecho crioprotectores que facilitan la reconstitución acuosa del producto liofilizado.

En general, la etapa de congelación en la liofilización es de suma importancia, ya que afecta considerablemente al rendimiento de la liofilización y a la calidad del producto final.

1.4.2.2. Etapa de secado primario

El secado primario, en el que la mayor parte del agua se extrae del producto por sublimación, se inicia reduciendo la presión en la cámara y elevando la temperatura de la bandeja para proporcionar el calor eliminado por sublimación del hielo.

La presión de la cámara ha de reducirse a un nivel inferior a la presión de vapor de hielo a la temperatura del producto. Sin embargo, las presiones demasiado bajas son también contraproducentes para velocidades de sublimación rápidas limitando la velocidad de transferencia de calor al producto. Como resultado, el hielo se elimina por sublimación del producto y se transfiere al condensador. En el condensador el vapor de agua es retenido sobre placas frías por cristalización [84].

La energía requerida para la transición de fase se proporciona ajustando la temperatura de la bandeja. Debido a que la entrada de energía se consume por sublimación, la temperatura del producto resultante es mucho menor que la temperatura de la bandeja [85].

La temperatura del producto que se aproxima a la temperatura del estante debido al final de la sublimación, es una forma común de detectar el final del secado primario.

En el proceso de liofilización, la transferencia de calor de la fuente de calor al producto es el paso limitante de la velocidad. Esto es causado por la elevada entrada de calor necesaria para la sublimación y por la dificultad de transferir calor en sistemas bajo alto vacío. En general, la transferencia de calor al producto se basa en tres componentes: radiación de superficies "cálidas", conducción directa dentro y entre fases sólidas, y conducción de gas (convección) dentro de las fases de vapor por difusión browniana y colisión molecular. La transferencia de masa en la etapa de secado primario se refiere a la transferencia de vapor de agua del producto a través de canales abiertos, creados por la sublimación previa de hielo, al condensador. La mayor y por lo tanto la resistencia más limitante a la transferencia de vapor de agua durante el secado primario es la resistencia del producto seco.

Para una eficiencia máxima del proceso, la temperatura del producto debe mantenerse lo más alta posible, generalmente por debajo de T_g o T_{eu} , y la presión de cámara más baja posible sin perjudicar la velocidad de sublimación [82].

Por otra parte, cada aumento de 1 °C en la temperatura del producto disminuye el tiempo de secado primario en aproximadamente 13 %, lo que refuerza la premisa de que la temperatura de secado debe mantenerse lo más alta posible. El proceso se caracteriza por la velocidad de sublimación que puede expresarse como:

$$V = \frac{A_p(P_p - P_0)}{R_p} \quad (1)$$

A_p es el área de la sección transversal del vial, P_p es la presión de vapor del producto en el frente de sublimación, P_0 es la presión de vapor parcial en el vial y R_p es la resistencia de la capa seca al flujo de vapor de agua [86].

La resistencia del producto ya secado, que representa el 90 % de la resistencia total al flujo de vapor, aumenta con el secado progresivo y puede provocar un incremento de la temperatura del producto que posiblemente conduce al colapso de la matriz.

Sin embargo, la aparición de colapso a pequeña escala puede disminuir R_p y aumentar la tasa de sublimación [87]. Al final del secado primario, sólo está presente agua no congelada en la matriz liofilizada. Esta agua no puede eliminarse por sublimación, sino que debe eliminarse por desorción (secado secundario).

1.4.2.3. Etapa de secado secundario

La matriz seca producida por el secado primario contiene todavía unida un poco de agua no congelable que tiene que ser eliminada por desorción a temperaturas más altas (entre 20-40 °C). Para evitar el colapso, no se debe aumentar la temperatura del producto antes de que se haya eliminado todo el hielo. Asimismo, como el contenido de humedad residual al final del secado primario puede ser tan alto como 30 %, un aumento demasiado rápido en la temperatura de la bandeja puede hacer que la temperatura del producto aumente por encima de la temperatura de colapso dando lugar al colapso de la matriz [88].

Para promover aún más el proceso de secado, algunos autores recomiendan disminuir aún más la presión de la cámara para aumentar el gradiente de concentración de vapor de agua del producto a su entorno. El secado se ejecuta rápidamente durante la parte inicial del secado secundario causada por el alto contenido de agua, pero se ralentiza mucho a medida que el secado continúa. Es ventajoso una temperatura de bandeja elevada durante un periodo corto en vez de una temperatura baja durante un largo tiempo. Ello se debe a que la tasa de desorción del agua desacelera dramáticamente con el tiempo a una temperatura definida, y los tiempos más largos de 3-6 h, a una temperatura dada reducen el contenido de humedad sólo marginalmente [84,89].

1.4.3. Almacenamiento del producto

El éxito de la liofilización de las nanopartículas se basa, no únicamente en la resuspensión fácil y completa del liofilizado (sin la presencia de agregados macroscópicos), sino también en el mantenimiento de las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas y la estabilidad a largo plazo [90].

Un producto liofilizado debe presentar una degradación mínima y debe tolerar las temperaturas atmosféricas para fines de distribución. Sin embargo, sería peligroso suponer que los productos liofilizados son completamente estables en almacenamiento. La velocidad de desintegración seguirá estando ligada a las condiciones de almacenamiento tales como la temperatura, así como los productos están en viales cerrados bajo vacío, o rellenos con un gas inerte a presión parcial para reducir el efecto del espacio atmosférico de vial en el producto. La exposición a la luz también puede afectar la vida útil de un producto, pero como la mayoría de los productos generalmente se almacenan en cajas, en la práctica la exposición es mínima.

Los productos farmacéuticos o biotecnológicos reconstituidos de vez en cuando pueden verse afectados por iones o componentes filtrados del vial o tapón. Hoy en día se dispone de viales y tapones diseñados específicamente para solucionar estos problemas [80].

2. OBJETIVOS

Aunque las nanopartículas (NPs) presentan numerosas ventajas sobre otros sistemas de administración ocular de fármacos, tales como la liberación controlada del activo, su especificidad de acción, el paso a través de las barreras oculares, la buena tolerabilidad, la capacidad de incorporar fármacos lipófilos e hidrófilos y la protección del activo de la degradación en el medio biológico, el principal obstáculo que limita su utilización es su inestabilidad física o química en suspensiones acuosas. Para superar este inconveniente, el contenido de agua debe eliminarse para convertir la suspensión de NPs en una formulación en fase sólida capaz de mostrar una estabilidad adecuada para el almacenamiento a largo plazo. Con el fin de mejorar la estabilidad, la liofilización, es la técnica usualmente aplicada en la industria farmacéutica.

Teniendo en cuenta los aspectos anteriormente mencionados, el **principal objetivo** de este trabajo se ha centrado en la optimización del proceso de liofilización de sistemas nanoestructurados biodegradables para administración ocular de Flurbiprofeno, evaluando su influencia, una vez esterilizados por irradiación gamma, en el comportamiento biofarmacéutico, tolerancia ocular y eficacia terapéutica.

Este objetivo global podría desglosarse en los siguientes objetivos parciales:

1. Producción y caracterización de sistemas nanoestructurados de flurbiprofeno asociado a matrices poliméricas biodegradables de P&CL cuya composición cuantitativa asegure el cumplimiento de las exigencias básicas morfométricas de la vía ocular con una elevada asociación del fármaco al polímero.
2. Selección del agente protector más apropiado a fin de mantener las características iniciales de las NPs y asegurar las condiciones fisiológicas apropiadas para la vía ocular.

3. Estudio de las propiedades crio y lioprotectoras del agente estabilizante de la formulación (Poloxamer 188).
4. Estudio del proceso de liofilización en sus diferentes etapas, incorporando los agentes protectores seleccionados con el propósito de mantener la estabilidad físicoquímica de las NPs (tamaño de partícula reducido, homogeneidad de la muestra, carga superficial adecuada y elevada asociación del fármaco al polímero) y obtener una suspensión acorde a las condiciones requeridas para los colirios (osmolaridad y estabilidad después de ser reconstituidas) con un mínimo de humedad residual en el producto liofilizado.
5. Estudio de las interacciones fármaco-polímero mediante espectroscopia de fotoelectrones generado por rayos X y calorimetría diferencial de barrido.
6. Determinación del perfil de liberación *in vitro* del flurbiprofeno a partir de los sistemas matriciales desarrollados en presencia y ausencia del agente protector seleccionado, determinando el tipo de cinética de liberación en función del modelo matemático de ajuste.
7. Estudio del proceso de esterilización mediante irradiación gamma de estos sistemas, analizando su efecto en las características físicoquímicas de las NPs y en el perfil de liberación del fármaco.
8. Determinación de la estabilidad de las formulaciones de flurbiprofeno optimizadas, tanto liofilizadas como posteriormente esterilizadas en presencia de trehalosa (TRE) o polietilenglicol 3350 (PEG) como agentes protectores.

9. Análisis del comportamiento reológico de las formulaciones en diferentes condiciones (sin agente protector, liofilizados y esterilizados).
10. Estudio del efecto de la liofilización y esterilización de las NPs desarrolladas en la permeación corneal y escleral *ex vivo*, en un modelo de córnea porcina.
11. Determinación de la eficacia antiinflamatoria *in vivo* y la tolerancia *ocular in vivo* e *in vitro* de estos sistemas.

En base a los resultados obtenidos por las diferentes técnicas se seleccionarán las formulaciones idóneas para administración ocular en función de sus características morfométricas (condicionantes de posibles irritaciones oculares), la eficiencia de asociación del fármaco al sistema polimérico y el perfil de liberación del principio activo, que una vez optimizadas permitan, en un futuro próximo, su desarrollo galénico y su posterior utilización en clínica.

3. RESULTADOS

Los resultados obtenidos a través de los diferentes análisis llevados a cabo en la presente investigación, permitieron generar dos publicaciones científicas, en forma de artículos. Los títulos y autores de los mismos, se describen a continuación y al mismo tiempo, cada uno de estos artículos se acompaña de un breve resumen:

Artículo 1:

Ramos Yacasi GR., Calpena Campmany AC., Egea Gras MA., Espina García M., García López ML.

Freeze drying optimization of polymeric nanoparticles for ocular Flurbiprofen delivery: effect of protectant agents and critical process parameters on long-term stability.

Publicado en Drug Development and Industrial Pharmacy.

DOI: 10.1080/03639045.2016.1275669

Artículo 2:

Ramos Yacasi GR., García López ML., Espina García M., Parra Coca A., Calpena Campmany AC.

Influence of freeze-drying and γ -irradiation in preclinical studies of flurbiprofen polymeric nanoparticles for ocular delivery using d-(+)-trehalose and polyethylene glycol.

Publicado en International Journal of Nanomedicine.

DOI: 10.2147/IJN.S105606

Freeze drying optimization of polymeric nanoparticles for ocular Flurbiprofen delivery: effect of protectant agents and critical process parameters on long-term stability

Ramos Yacasi GR., Calpena Campmany AC., Egea Gras MA., Espina García M., García López ML. In **Drug Development and Industrial Pharmacy**

3.1. Freeze drying optimization of polymeric nanoparticles for ocular Flurbiprofen delivery: effect of protectant agents and critical process parameters on long-term stability (Artículo 1).

Resumen

Se prepararon suspensiones de NPs de flurbiprofeno asociado a una matriz de poli-epsilon-caprolactona (PεCL), utilizando poloxamer 188 como estabilizante (FB-PεCL-NPs), por la técnica del desplazamiento del disolvente, obteniendo unas características de tamaño de partícula, índice de polidispersión y carga superficial adecuados para la vía de administración ocular. Sin embargo, la suspensión presentó una pobre estabilidad cuando fue almacenada por largo tiempo.

Las NPs fueron sometidas al proceso de liofilización con el objetivo de superar los problemas de estabilidad a largo plazo. Primeramente, se realizó la selección de los agentes protectores más apropiados para las FB-PεCL-NPs utilizando un ciclo de liofilización conservador. De ello, se obtuvieron dos posibles excipientes: trehalosa (TRE) y polietilenglicol (PEG). Se estudió la influencia de la velocidad y la temperatura de congelación en la morfometría de las NPs con los agentes protectores seleccionados (TRE y PEG), así como la capacidad crioprotectora de ellas. Por otro lado, se estudió la influencia de la capacidad protectora de P188 en las FB-PεCL-NPs durante el proceso de liofilización.

La etapa del secado primario fue diseñada en base a la temperatura de colapso de las formulaciones a liofilizar. Teniendo en cuenta que esta etapa es la más costosa, la selección de sus parámetros se enfocó al incremento de la velocidad de sublimación para las distintas formulaciones, individualmente.

Finalmente, para terminar con el ciclo de liofilización, las bases del secado secundario fueron seleccionadas utilizando un diseño de experimentos. Los factores independientes de este estudio fueron: concentración de estabilizante, concentración del agente protector, temperatura de la bandeja en el secado secundario y tiempo de secado secundario, donde las características de congelación y secado primario fueron las seleccionadas previamente.

El estudio de la influencia de estos factores en el tamaño de partículas, índice de polidispersión, eficiencia de encapsulación, potencial zeta, humedad residual, osmolaridad y estabilidad después de ser reconstituidas fueron la plataforma para la selección de las fórmulas de FB-P&ECL-NPs más apropiadas para vía ocular.

Las FB-P&ECL-NPs optimizadas fueron estabilizadas con P188 al 3.5 % (p/p) y protegidos con PEG al 8 % (p/p). La suspensión fue sometida a un periodo de pre-enfriamiento a +10 °C durante 1 h, congelación a -50 °C durante 4 h, secado primario a +5 °C y 0.140 mbar durante 24 h y un secado secundario de 45 °C durante 10 h.

En estas condiciones las NPs mostraron 188.4 ± 1.3 nm de tamaño promedio de partícula, 0.087 ± 0.014 de índice de polidispersión, 85.5 % de eficiencia de encapsulación, 0.61 ± 0.12 % de humedad residual, -16.4 ± 0.1 mV de potencial zeta y 325 ± 7 mOsmol/Kg de osmolaridad. Estas características no sufrieron cambios estadísticamente significativos a los 12 meses de ser almacenados como polvos liofilizados. Después de su reconstitución, la estabilidad en suspensión superó el mes de estudio sin cambios fisicoquímicos.

Además, se utilizó calorimetría de barrido diferencial (DSC) y difracción de rayos X (XRD) para estudiar los componentes de las interacciones. Los espectros DSC y XRD confirmaron una interacción química adecuada entre los componentes de la formulación y mostraron un estado semicristalino después del proceso de liofilización.

Se consiguió una óptima formulación liofilizada para vía ocular. Evidentemente, el éxito del diseño de este sistema coloidal prometedor resultó de la cooperación racional entre una buena formulación y las condiciones adecuadas en el proceso de liofilización.

RESEARCH ARTICLE

Freeze drying optimization of polymeric nanoparticles for ocular flurbiprofen delivery: effect of protectant agents and critical process parameters on long-term stability

Gladys Rosario Ramos Yacasi , Ana Cristina Calpena Campmany, María Antonia Egea Gras, Marta Espina García and María Luisa García López

Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Universitat de Barcelona Facultat de Farmàcia y Ciències de la Alimentació, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Context: The stabilization of flurbiprofen loaded poly-ε-caprolactone nanoparticles (FB-PεCL-NPs) for ocular delivery under accurate freeze-drying (FD) process provides the basis for a large-scale production and its commercial development.

Objective: Optimization of the FD to improve long-term stability of ocular administration's FB-PεCL-NPs.

Methods: FB-PεCL-NPs were prepared by solvent displacement method with poloxamer 188 (P188) as stabilizer. Freezing and primary drying (PD) were studied and optimized through freeze-thawing test and FD microscopy. Design of experiments was used to accurate secondary drying (SD) conditions and components concentration. Formulations were selected according to desired physicochemical properties. Furthermore, differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffraction (XRD) were used to study interactions components.

Results: Optimized FB-PεCL-NPs, stabilized with 3.5% (w/w) P188 and protected with 8% (w/w) poly(ethylene glycol), was submitted to precooling at +10 °C for 1 h, freezing at -50 °C for 4 h, PD at +5 °C and 0.140 mbar for 24 h and a SD at +45 °C during 10 h. These conditions showed 188.4 ± 1.3 nm, 0.087 ± 0.014, 85.5 ± 1.4%, 0.61 ± 0.12%, -16.4 ± 0.1 mV and 325 ± 7 mOsm/kg of average size, polydispersity index, entrapment efficiency, residual moisture, surface charge and osmolality, respectively. It performed a long-term stability >12 months. DSC and XRD spectra confirmed adequate chemical interaction between formulation components and showed a semi-crystalline state after FD.

Conclusions: An optimal freeze dried ocular formulation was achieved. Evidently, the successful design of this promising colloidal system resulted from rational cooperation between a good formulation and the right conditions in the FD process.

ARTICLE HISTORY

Received 15 August 2016
Revised 11 November 2016
Accepted 17 December 2016

KEYWORDS

Flurbiprofen; poly-ε-caprolactone; nanoparticles; freeze-drying optimization; design of experiments; poly(ethylene glycol); D-(+)-trehalose

Introduction

Eye-drops are the most commonly selected form of fast drug delivery to treat ocular disorders¹. Moreover, this kind of formulation offers some incentives to the pharmaceutical industry, such as the cost and easy formulation development. However, given the inherent anatomical and physiological barriers presented in the eye, a poor drug bioavailability is expected, as a result of an extensive precorneal drug loss^{1,2}. For this reason, it is an attractive option to develop an efficient drug delivery system, which would lead to an increased contact time between the vehicle and the ocular tissue delaying simultaneously the elimination of the drug.

Thus, polymeric nanoparticles (NPs) development has increased in recent times. These systems are suitable for hydrophobic drugs, which have the advantage of maintaining drug activity at the site of action, allowing the patients easy drug administration^{3,4}. However, the stability of the NPs in their aqueous system is short, and this is the main limiting factor in using these systems.

NPs' physicochemical instability over storage could be overcome using the freeze-drying (FD) technique. FD is used for

stability improvement by removing the water of the suspension⁵. A typical FD process consists of three stages: freezing, primary drying (PD), which involves the removal of the ice by sublimation, and secondary drying (SD) stage, which removes the unfrozen water via desorption. Usually, protective agents are added to the formulation to prevent the stress caused by freezing and drying processes with the aim to retain the initial quality of NPs over the FD process. In addition, these agents improve the redispersion of the freeze-dried product⁶.

Lang et al.⁷ mention several criteria that the freeze-dried formulation should meet when intended for pharmaceutical applicability: (1) the drug should be stable during production and storage, (2) excipients should be FDA approved, (3) the freeze-dried product appearance should be acceptable and reproducible and (4) the preparation of the isotonic or closely isotonic liquid formulation should be easily and quickly administered.

Flurbiprofen (FB), a water insoluble non-steroidal anti-inflammatory drug, has been used to prevent intraocular inflammation during eye surgery and to treat the inflammation of the

CONTACT Gladys Rosario Ramos Yacasi  glramos011@hotmail.es  Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, University of Barcelona Faculty of Pharmacy and food, Av. Joan XXIII, 27-31, Barcelona, ES 08028, Spain

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

tissues surrounding the eye^{8,9}. Eye-drops solution is the pharmaceutical presentation of FB for ophthalmic applications; however, it presents a big disadvantage, as aforementioned.

In the present study, FB was successfully encapsulated in poly- ϵ -caprolactone (P ϵ CL), a biodegradable and biocompatible polyester used as a drug delivery system. Its hydrophobic and slow degrading nature makes P ϵ CL a suitable carrier to entrap lipophilic drugs such as FB¹⁰. Furthermore, P ϵ CL is considerably cheaper than other polymers (polyglycolide, polylactide) and their copolymers¹¹. The focus of the study was the development of FB freeze-dried polymeric NPs for ocular administration. In this context, collapse temperature (T_{co}) of samples were studied by using freeze-drying microscopy (FDM). The influence of various excipients on FB loaded P ϵ CL nanoparticles (FB-P ϵ CL-NPs) was investigated in order to select an appropriate protectant agent during FD. Moreover, the protective effect of P188 during FD was also considered. Subsequently, freezing conditions were studied and an appropriate PD stage was designed to each selected protectant agent. Finally, the influence of poloxamer 188 (P188) concentration, the protectant agent concentration and SD conditions such as temperature and time on the particle morphometry, surface charge, FB entrapment efficiency (EE), osmolality, residual moisture content and stability after aqueous reconstitution of freeze-dried FB-P ϵ CL-NPs, were evaluated through a design of experiments (DoE).

Materials and methods

Materials

Flurbiprofen and P ϵ CL with a molecular weight: \sim 10,000 to \sim 14,000 were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), as well as the following excipients: D(-)-Fructose, D-(+)-trehalose (TRE), D-mannitol, D-(+)-glucose, sucrose, poly(ethylene glycol) 3350 (PEG) and poly vinyl alcohol (PVA). Poloxamer 188 was supplied by BASF (Barcelona, Spain). All reagents and chemicals used were of analytical grade.

Preparation of FB-P ϵ CL-NPs

FB-P ϵ CL-NPs were prepared using the solvent displacement method described by Fessi et al.¹² Briefly, an organic solution containing 49.5 mg of P ϵ CL and 15 mg of FB in 30 ml of acetone was added dropwise, under moderate magnetic stirring at room temperature, into 60 ml of aqueous solution adjusted to a pH of 3.5 containing 249 mg of P188. Then, the organic solvent and part of the water were evaporated under reduced pressure using a rotary evaporator (BUCHI R-144, Flawil, Switzerland), to obtain a desired FB concentration in NPs suspension (1 mg/ml).

Physicochemical characterization of FB-P ϵ CL-NPs

The average particle size (Z_{av}) and polydispersity index (PI) of FB-P ϵ CL-NPs were determined by Photon Correlation Spectroscopy (PCS) at 25 °C using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Malvern, UK) diluted previously at 1:10 in Milli-Q water¹³. This instrument also determines the surface electrical charge of particles by measuring zeta potential (ZP). Each sample was properly diluted (1:40) in Milli-Q water. The ZP of NPs was calculated from the electrophoretic mobility using the Helmholtz-Smoluchowski equation¹⁴. Three measurements were carried out for each sample and the mean was calculated.

The EE of FB-P ϵ CL-NPs was estimated, indirectly quantifying the amount of non-encapsulated FB in the dispersion medium.

Briefly, the aqueous dispersion of FB-P ϵ CL-NPs was diluted (1:20) with Milli-Q water, prior to filtration/centrifugation, to avoid deposition of free FB (possibly crystallized) onto the NPs surface¹⁵. Then, the nanoencapsulated FB was separated by filtration/centrifugation using an Ultracel YM-100 (Amicon[®] Millipore Corporation, Bedford, MA) centrifugal filter, at 14,000 rpm for 15 min, and assessed by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) (Waters, Milford, MA), by applying the following equation:

$$E.E. (\%) = \frac{\text{Total amount of FB} - \text{Free FB}}{\text{Total amount of FB}} \cdot 100 \quad (1)$$

The detection wavelength was set at 247 nm in UV detector, using a reverse-phase C18 column of 4.6 \times 150 mm and a mobile phase composed of water:acetonitrile (35:60, v:v) acidified with ortho-phosphoric acid (pH 2.5)⁹. A flow rate of 1 ml/min was used and the retention time of the drug was at 3.2 min. Data analysis was done by Empower software.

Collapse temperature determination upon freeze drying

T_{co} determination of FB-P ϵ CL-NPs was performed using FDM (Olympus, Model BX51, Biopharma Accessories and Components, Winchester, UK) equipped with a video camera¹⁶. A sample of 4 μ l was placed between two cover slides located in the FDM chamber and cooled using liquid nitrogen to the target freezing temperature as per the programmed cycle. Then, a vacuum was applied using a vacuum pump to levels of 0.1 mbar to enable drying, and the temperature of the product was increased using a heat exchanger until collapse was evident. Data analysis was done by Linksys 32 software (Irvine, CA). The FDM has the advantage that it allows the direct observation of the product behavior during sublimation and works under low pressure, as does the freeze-drier. In this study, we used the term "collapse" to identify melting of crystalline components and collapse of the amorphous ration. Our formulations contain both crystalline and amorphous components, thus it is difficult to discern between both phenomena.

Freeze drying tests

All FD cycle were carried out in a Telstar Lyobeta Freeze dryer (Telstar, Barcelona, Spain), equipped with Pirani and capacitance vacuum gauges. The parameters and data were controlled and processed by the SAMIS system.

Freezing

In order to evaluate the resistance of NPs during the freezing stage, two different procedures were evaluated using 1.5 ml of FB-P ϵ CL-NPs filled into 8 ml flat-bottom and screw-cap glass vials containing 1.5 ml of suitable protectant agent.

The decrease in temperature at -196 °C/min, which is reached only with liquid nitrogen, was studied in FB-P ϵ CL-NPs formulations. In this way, samples in glass vials were placed in a shelf containing liquid nitrogen. Also, slow freezing rate were evaluated using shelf-ramped freezing. First, the samples were placed for 1 h on shelves previously cooled at $+10$ °C and then they were submitted at -50 °C for 4 h to ensure the total solidification of the samples, in this case, the decrease in temperature was at 0.5 °C/min. Using shelf cooled at temperatures $+2$ to $+5$ °C allows the samples to initiate nucleation foci to achieve a uniformity freezing¹⁷. Samples were thawed at room temperature. Z_{av} was

determined before freezing and after thawing, and the final to initial particle size ratio (S_f/S_i) was calculated by PCS.

Drying

In all drying cycles, the selection of parameters involved in PD was set according to Chang and Fischer curve¹⁸ which shows the mathematical relationship between chamber pressure, shelf temperature, product temperature (T_{product}) and sublimation rate and illustrates the rationale to maximize sublimation rate. The parameter that is of greatest importance is the T_{product} which cannot be directly controlled, thus these conditions were set according to T_{co} of sample ("Screening of protectant agents for FB-PεCL-NPs" section discusses it more extensively). In this research, the process was carried out by setting constant values of chamber pressure and heating shelf temperature, which is more similar to what happens in industrial practice¹⁹. Actually, recent studies describe mathematical models (nonlinear model predictive control system) to identify an appropriate combination of chamber pressure and temperature of heat transfer fluid in terms of maximum value for the T_{product} monitoring its evolution during PD^{20,21}. It was not considered because our objective was to obtain an appropriate FD cycle at controlled temperature and not to optimize the rate sublimation of a design space.

Moreover, in practice, there are other parameters that affect the drying rate such as the nature and shape of the glass vial, as well as any constriction in the way moisture that is allowed to leave (i.e. the nature of the stoppers). Pt100 sensors were used to monitor the T_{product} evolution and determinate carefully the end point of drying cycle. It is important to mention that an additional soak period was given in order to guarantee that all batches were dried.

The diffusion of water from the product filaments (SD) is not subject to simple kinetics and therefore it is not easily quantifiable²². The residual humidity (RH) into the dried product must be controlled, as the moisture level defines the product stability during storage²³. We selected SD conditions in an acceptable manner by ramping the shelf temperature. Low ramp rates (<1°C/min) toward SD were used in all assays as it is beneficial for product quality (i.e. less shrinkage). It ensures that the T_{product} does not exceed the T_{co} in this transition phase, especially SD startup, when water contents tend to be high and the T_{product} comes closer to the glass transition temperature (T_g)²⁴. The big difference between the selected temperatures (18°C and 45°C) allowed to look into the effects on the residual moisture content, but avoided excessive product softening and eventual collapse. At the end of the process, the vials were stoppered under vacuum.

In all the FD assays, aluminum foils, as thermal shield, were used on the inner side of the FD chamber door in order to reduce heterogeneity in heat transfer rates due to radiation from the door. Also, the tested samples were from central position shelf, as these vials represent the majority of the batch²⁵.

Residual humidity determination

The RH of the freeze-dried samples was determined by Karl Fisher coulometric titration (Titrimo 702 SM Coulometer, Metrohm, Filderstadt, Germany). Four milliliters of dry methanol (Hydranal™, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) was added to 600 mg of the freeze-dried samples by injection. The standard deviation was calculated from three repeated measurements.

Osmolality

The osmotic pressure of 50 μl of each freeze-dried FB-PεCL-NPs formulation was determined after aqueous reconstitution by using

a micro-osmometer Advanced® Model 3320 (Advanced Instruments, Inc., Norwood, MA).

Stability assays

A technology based on multiple light scattering analysis called TurbiScan™ Lab (Formulation, L'Union, France) was used to predict the stability of the developed formulation^{26,27}. Briefly, freeze-dried samples after aqueous reconstitution were filled into a glass vial which was completely scanned by a reading head. The reading head consisted of a pulsed near-infrared light source ($\lambda = 880$ nm) with two synchronous optical detectors which receive transmitted light (T) through the sample (0° from the incident radiation), and backscattered (BS) light by the sample (135° from the incident radiation) every 40 μm. In this way, stability and/or destabilization phenomena were detected much earlier than the operator's naked eye. In this study, the formulation was opaque, therefore only BS profile was used to evaluate physical stability of FB-PεCL-NPs. The measurements were performed every three days for 30 days in storage at +4°C. All samples were treated over a 30 days' period which is the manipulation time of multidose eye-drops in a habitual therapy to treat postoperative inflammation (~28 days)²⁸. The obtained profile characterizes the sample's stability (no variation of BS and T), particles migration (local peaks of variation of BS or T), and particles size variation (global variation of BS or T on the whole height).

Experimental design

DoE is a very useful tool for the identification of critical parameters and optimization of the respective process conditions²⁹. In this study, a four factor, two-level design was generated using JMP 7 statistical experiment design software (SAS, SAS Institute, Cary, NC). It required a total of 16 experiments in a full factorial design. The responses were therefore modeled using the following polynomial equation:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{34}x_3x_4 \quad (2)$$

where y is the dependent variable or response variable; x_1, x_2, x_3 and x_4 are the factors or independent variables, b_0 is the intercept, b_1, b_2, \dots are empirically derived coefficients related to the independent variables x_i or their interactions with the response y .

The four independent variables studied were P188 concentration (x_1), protectant agent (x_2), SD shelf temperature (x_3) and SD time (x_4). The response variables considered were Z_{av} , PI, EE, ZP, RH, osmolality and stability after aqueous reconstitution of freeze-dried FB-PεCL-NPs. The different levels for the independent variables are given in Tables 2(a) and 2(b). Responses were the result of the individual influences and the interaction of the four independent variables. To identify the significance of the effects and interactions between them, multiple linear regression analysis and ANOVA analysis were performed using Graphpad prism (Version 6 Demo; San Diego, CA). A p value less than .05 was considered to be statistically significant.

Interaction studies

The physical state of FB and the possible interactions between the drug and the components were assessed by X-ray spectroscopy and differential scanning calorimetry (DSC) analysis. In order to

remove the water, the NP's suspensions were ultracentrifuged at $99,276 \times g$ for 2 h (Optima L90K, ultracentrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA). The pellet was then dried to a constant weight in a desiccator³⁰. This procedure was not applied to the freeze-dried NPs due to the water absence.

X-ray powder diffractograms were recorded on a PANalytical X'Pert PRO powder diffractometer (Almelo, Netherlands). Samples were sandwiched between 3.6 μm films of polyester and exposed to $\text{CuK}\alpha$ radiation (45 kV, 40 mA, $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) in the angles $2\theta = 2^\circ - 60^\circ$ with a step size of 0.026° and a count time of 200 s.

DSC analysis was performed using a DSC823e System (Mettler-Toledo, Barcelona, Spain). Around 1–2 mg of bulk samples were heated from 25°C to 150°C at $10^\circ\text{C}/\text{min}$ under nitrogen atmosphere. Data were evaluated from the peak areas using the Mettler STARe V 9.01 DB software (Mettler-Toledo, Columbus, OH).

Results and discussion

P ϵ CL NPs containing FB and stabilized with P188 were successfully prepared by using the solvent displacement method, characterizing formulation in terms of Z_{av} , PI and ZP. A Z_{av} of $176.0 \pm 0.1 \text{ nm}$ with low PI (0.086 ± 0.010) characteristic of a monodisperse colloidal suspension, and a ZP value of $-17.20 \pm 0.15 \text{ mV}$ were obtained.

However, its physical and chemical stability was presented for just around three weeks; thus, an FD process was applied. Macroscopic aggregations in NPs were noticed after aqueous reconstitution of freeze-dried samples without any protectant agent (Table 1). These results suggested that FB-P ϵ CL-NPs suspension required the use of an additive which can protect NPs during the stabilization process. Also, several authors reported their use in relatively high concentration (10–30%)³¹.

Based on previous literature reports^{5,32,33}, seven excipients were chosen for this study: two monosaccharides (glucose and fructose), two disaccharides (TRE and sucrose), two polymers (PEG, PVA) and a polyol (mannitol). They were evaluated according to the minimal changes of NPs properties after FD, which confirm the conservation of NPs after aqueous reconstitution.

Screening of protectant agents for FB-P ϵ CL-NPs

In order to investigate the impact of protectant agent effects in NPs and accelerate the sublimation rate during the stabilization process, appropriate FD cycles were used in all assays to produce freeze-dried FB-P ϵ CL-NPs with good quality.

As PD is the most expensive stage of FD in terms of time and energy, the objective of PD optimization is generally focused on removing the bulk water by drying the product just below its T_{co} ^{16,34}. To accomplish this, a combination of higher shelf temperature and lower chamber pressure is better than a combination

of lower shelf temperature and higher chamber pressure. In this context, development of high T_{co} formulations results in high shelf temperature during PD. If the T_{product} is not maintained below T_{co} during sublimation, "melt-back" ($T_{\text{product}} > \text{eutectic temperature}$) or product collapse ($T_{\text{product}} > \text{glass transition temperature}$) takes place. In these conditions, the risk of losing macroscopic structure and collapses during FD is too high, that would then be named as "macrocollapse"³⁵. It could be resulting in a final unsatisfactory dosage form associated with NPs aggregation phenomena, NPs breaking, higher residual water content than a dried product without collapse and a long aqueous reconstitution time, among others. Nevertheless, there has been recent interest in FD in amorphous formulations at or above their T_{co} , specially at startup PD, in which the basic pore structure of the dry layer remains intact, showing little sign of visual or "macrocollapse", referred to as "microcollapse"³⁶. In spite of these aggressive FD cycles are useful to dramatically reduce the PD time, some studies have considered the association between loss of stability during the process or long term stability and "microcollapse", especially in proteins, so these effects should be studied in each specific case^{37–39}. All these would contribute to the development of a successful exergy analysis related to the operating conditions because this would improve the economic efficiency (and the sustainability) of the process by increasing the efficiency of energy utilization²⁰.

For this first evaluation, formulations were submitted in a conservative FD cycle. In this context, only one FD cycle was designed in order to avoid numerous time-consuming factors. Each protectant agent was tested at 3% (w/v). The freezing stage was carried out according to the slow freezing protocol (see "Freezing" section). This helped to promote ice nucleation and aim less supercooling supporting a faster sublimation and shorter drying time^{40,41}. Chang and Fischer¹⁸ curve helped us to establish a rational PD drying cycle with a minimum of trial and error experimentation resulting in acceptable products. PD temperature was set according to T_{co} of FB-P ϵ CL-NPs prepared with fructose, because it has the lowest T_{co} value (-42°C) (Table 1). Shelf temperature and chamber pressure were controlled as the major determinants in product drying³⁵. In order to allow sublimation, chamber pressure was reduced below the saturated vapor pressure of ice at the T_{product} . However, if this pressure is reduced to a negligible value compared to ice vapor pressure, the diffusion effects are absent and only hydrodynamic flow happens. Besides, when drying takes place at atmospheric pressure, there will be almost no gradient of total pressure and mass transport will be by the diffusion of moisture through air^{35,42}. As the sublimation of water vapor from the frozen sample is an endothermic reaction (sublimation heat 27.17 J/g approximately), the energy for continuing sublimation of ice needs to be supplied from the shelves by heating to increase shelf temperature³⁵. In this way, the

Table 1. Collapse temperature (T_{co}) and physicochemical characteristics of freeze-dried FB-P ϵ CL-NPs.

| Protectant agents added to FB-P ϵ CL-NPs | T_{co} ($^\circ\text{C}$) | Z_{av} (nm) | PI | S_f/S_i | Osm (mOsm/kg) | t_r (s) |
|---|--------------------------------------|----------------------|-------------------|-----------|---------------|-----------|
| Fructose | -42 | 213.3 ± 9.5 | 0.229 ± 0.070 | 1.30 | 345 ± 2 | <3 s |
| Trehalose | -36 | 194.0 ± 4.5 | 0.198 ± 0.028 | 1.17 | 160 ± 1 | <3 s |
| Mannitol | -24 | 235.4 ± 5.3 | 0.233 ± 0.014 | 1.14 | 340 ± 6 | <3 s |
| Glucose | -33 | 249.7 ± 7.5 | 0.424 ± 0.027 | 1.50 | 347 ± 2 | <3 s |
| Sucrose | -19 | 200.0 ± 2.7 | 0.218 ± 0.025 | 1.24 | 234 ± 2 | <3 s |
| PEG | -25 | 166.6 ± 3.1 | 0.097 ± 0.012 | 0.98 | 58 ± 1 | <3 s |
| PVA | -17 | 246.4 ± 3.8 | 0.093 ± 0.095 | 1.09 | 47 ± 2 | 720 s |
| None | -30 | 693.6 ± 48.3 | 0.658 ± 0.026 | 4.15 | 6 ± 1 | <3 s |

S_i : size immediately after the addition of the protectant agent; S_f : size after the freeze-thawing treatment.

following FD protocol was used: holding in precooling shelf at $+10^{\circ}\text{C}$ for 1h, freezing at -50°C for 4h, PD at -15°C and 0.047 mbar for 56h and SD at $+30^{\circ}\text{C}$ for 6h. A difference around 30°C can be observed between the T_{co} of FB-P ϵ CL-NPs protected with fructose and the established PD temperature. This was caused by the fact that the T_{product} was always lower than the shelf temperature, due to the loss of heat by sublimation and thermal resistance between shelf and vials.

The visual inspection of tested formulations, containing different protectant agents, presented a good appearance without any "macrocollapse" or shrinkage of the structure. The freeze-dried FB-P ϵ CL-NPs were aqueously reconstituted to half of the freeze-dried volume, in order to recover the initial FB concentration (1 mg/ml), see "Freezing" section. They were evaluated in the Z_{av} , PI, osmolality and reconstitution time (Table 1). The results of this preliminary screening study displayed S_f/S_i ratios of <2 , which represent a good interaction between the protective agent and FB-P ϵ CL-NPs^{31,32,43}.

PEG was clearly the most effective protectant agent. In spite of its possible crystallization during freezing⁵, PEG retained initial NPs morphometric characteristics, which demonstrated excellent protective properties. Probably PEG works as a stabilizer and acts as a coating agent as it does with proteins⁴⁴.

TRE displayed the best performance from the sugar category. Even though it did not conserve PI value, it showed one of nearest values to the initial Z_{av} (Table 1). Some advantages of TRE against other sugars have been mentioned, such as: less hygroscopicity and the absence of internal hydrogen bonds, which allow more flexible formation of hydrogen bonds with NPs during FD⁵. Sugars are considered to be the most common protectant agents in FD. Several physical and chemical protective mechanisms involved in freezing and drying stages have been postulated and it is probable all of them contribute to NPs' stabilization. In the freezing stage, it has been mentioned that sugars act as a spacer between the NPs. Sugar hinders them from sticking until T_g is reached, hence NPs are isolated in a glassy matrix. In the drying stage, it has been suggested that sugars play a role of replacing water; they form hydrogen bonds with polar groups of NPs surface during sublimation. Also, it was proposed that sugars act via "dilution", isolating individual particles to provide stability; this physical separation within the unfrozen fraction is enough to inhibit harmful reactions (e.g. aggregation) and glass formation is not required²⁵.

Fructose, mannitol, glucose and sucrose were not effective in preserving initial morphometric FB-P ϵ CL-NPs characteristics at 3% (w/v). Furthermore, fructose, glucose and mannitol displayed hyperosmotic values. Osmolality of formulation designed for ocular administration should be similar to lacrimal fluid (around

302–318 mOsm/kg in normal eye) in order to avoid ocular irritation⁹.

The reconstitution time of freeze-dried samples is considered as another parameter of product quality. In this way, PVA showed a longer aqueous reconstitution time and a high Z_{av} . The reconstitution properties of freeze-dried samples are related with the dry matrix, such as: morphology, surface area, presence of collapse or melt back, presence of hydrophobic coatings and the uniformity of channels in the dry matrix. It is even a field to investigate⁴⁵.

Based on these studies, PEG and TRE were further evaluated as a possible protectant agent for FB-PCL-NPs.

Influence of P188 properties in FB-P ϵ CL-NPs in the FD process

P188 was reported as a poor steric stabilizer in FD due to its low molecular weight, compared with Poloxamer 407 and Poloxamer 338⁴⁶. In order to evaluate the protectant effect of P188 in FB-P ϵ CL-NPs during an FD process, NPs were stabilized and freeze-dried at different concentrations of P188 (1, 2.5, 5 and 7%). Having into account the T_{co} of FB-P ϵ CL-NPs determined by FDM (-30°C), an appropriate FD cycle was elaborated according to the same criteria as explained in "Freeze drying tests" section. Briefly: holding in precooling shelf at $+10^{\circ}\text{C}$ for 1h, freezing at -50°C for 4h, PD at 0°C and 0.140 mbar for 20h and SD at $+30^{\circ}\text{C}$ for 6h. Furthermore, samples were kept at the end of the freezing stage in order to evaluate the cryoprotectant properties of P188.

As can be seen in Figure 1, the different samples displayed S_f/S_i and PI_f/PI_i ratios <2 after the thawing test, which confirmed the efficiency of the cryoprotection system³¹. It showed P188 avoided NPs aggregation during the freezing stage, as this effect was not dependent on the P188 amounts studied in this test. However, freeze-dried NPs displayed very high S_f/S_i and PI_f/PI_i ratios after aqueous reconstitution. It showed that P188 had no protection effect on the drying stage.

P188 acts as a steric stabilizer of the NPs suspension, forming a hydrophilic layer at the NPs surface which prevent NPs aggregation^{47,48}. In addition, P188 has excellent water solubility through its polyethylene oxide (PEO) block, and allows hydrogen bonding interactions with water molecules. In this way, P188 acts as spacer between the NPs, avoiding their agglomeration during the freezing stage. In the drying stage, it can be assumed that two ends of crystallized PEO chain on separate particles may have formed inter-particle bridges during sublimation, as a result of the particles' proximity and covalent bond of P188 to the particles' surface⁵.

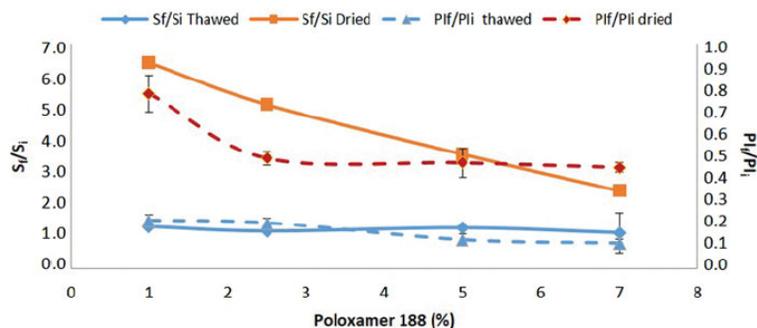


Figure 1. Determination of the protective properties of poloxamer 188.

Consequently, it results in aggregated particles after water removal.

Influence of freezing temperature and rate in FB-P β CL-NPs

The effects of the freezing temperature and rate on Z_{av} and PI of FB-P β CL-NPs were evaluated together because they are inherently related.

PEG and TRE were added individually to FB-P β CL-NPs at different concentration (3–10%) and submitted at two different freezing methods ("Freezing" section). No statistical differences were observed on Z_{av} and PI of NPs protected with PEG between both freezing conditions. TRE showed a similar performance (data not shown). It could be concluded that both freeze methods avoid NPs aggregation with the same level of efficacy for our formulations. Nevertheless, there was a statistical significant difference between them; a light increase in PI values was observed when FB-P β CL-NPs were frozen with TRE (PI = 0.123) in comparison with PEG (PI = 0.090) which was able to retain the initial values. This is probably associated with thermal properties of each excipient. Moretton et al.³¹ proved that at a certain freezing temperature, maltose formed a glassy matrix more stable than glucose due to

its higher T_g which aims for the anticipated glassy formation⁴⁹. In our case, T_{co} values of TRE and PEG (amorphous components) are -36°C and -25°C , respectively (Table 1). In this context, it is probably that the anticipated PEG glassy matrix performance prevents micellar aggregation before TRE. As it is well known, a slow freezing leads to the formation of large ice crystals with few and large pores structure. Thus, slow freezing protocol was selected to further studies because it facilitates the escape of water vapor during sublimation reducing the time of PD and avoiding NPs aggregation. An added benefit of these conditions is that it is more suitable for industrial scale in comparison with ultra-rapid freezing using liquid nitrogen.

Design and optimization of freeze-dried FB-P β CL-NPs

Adequate FD cycles were developed for each protectant agent according to the criteria explained in "Freeze drying tests" section: slow freezing rate was carried out as it was previously studied and the selection of drying parameters was set according to Chang and Fischer¹⁸. Thus, the following FD protocol was used: holding in precooling shelf at $+10^\circ\text{C}$ for 1h, freezing at -50°C for 4h, PD at $+5^\circ\text{C}$ and 0.140 mbar for 24h, using PEG as protectant agent.

Table 2a. Variables and measured responses for the 16 freeze-dried experiment formulation runs, with trehalose as protectant agent.

| Run order | Independent variables | | | | Measured responses | | | | | | |
|-----------|-----------------------|----------------|-------------------------------|--------------|--------------------|---------------|------------|---------------|-------------|-----------------|------------------|
| | C_{stab} (%) | C_{prot} (%) | T_{SD} ($^\circ\text{C}$) | t_{SD} (h) | Z_{av} (nm) | PI | EE (%) | ZP (mV) | RH (%) | Osm (mOsmol/kg) | Stability (days) |
| 1 | 1.66 | 3 | 18 | 3 | 194.1 ± 1.6 | 0.190 ± 0.054 | 87.5 ± 0.5 | -9.79 ± 0.11 | 9.27 ± 0.23 | 185 ± 1 | 3 |
| 2 | 1.66 | 3 | 18 | 10 | 203.1 ± 2.6 | 0.251 ± 0.024 | 86.5 ± 1.4 | -9.90 ± 0.09 | 5.77 ± 0.18 | 211 ± 3 | 3 |
| 3 | 1.66 | 3 | 45 | 3 | 203.6 ± 2.6 | 0.218 ± 0.067 | 86.0 ± 0.0 | -10.80 ± 0.17 | 3.12 ± 0.25 | 202 ± 3 | 7 |
| 4 | 1.66 | 3 | 45 | 10 | 207.4 ± 1.9 | 0.227 ± 0.045 | 87.0 ± 1.4 | -9.80 ± 0.08 | 0.34 ± 0.65 | 175 ± 2 | 3 |
| 5 | 1.66 | 10 | 18 | 3 | 181.6 ± 0.2 | 0.090 ± 0.045 | 86.8 ± 2.5 | -10.80 ± 0.06 | 5.05 ± 0.48 | 538 ± 4 | 7 |
| 6 | 1.66 | 10 | 18 | 10 | 178.7 ± 0.5 | 0.124 ± 0.032 | 87.0 ± 0.0 | -10.10 ± 0.19 | 2.50 ± 0.27 | 534 ± 8 | 10 |
| 7 | 1.66 | 10 | 45 | 3 | 183.7 ± 2.4 | 0.099 ± 0.023 | 87.5 ± 0.5 | -10.50 ± 0.30 | 2.87 ± 0.22 | 496 ± 4 | 14 |
| 8 | 1.66 | 10 | 45 | 10 | 191.9 ± 0.7 | 0.085 ± 0.012 | 87.0 ± 0.0 | -9.74 ± 0.06 | 0.29 ± 0.10 | 592 ± 6 | 24 |
| 9 | 3.5 | 3 | 18 | 3 | 245.6 ± 5.7 | 0.291 ± 0.023 | 86.0 ± 0.0 | -10.30 ± 0.14 | 7.67 ± 0.24 | 215 ± 1 | 3 |
| 10 | 3.5 | 3 | 18 | 10 | 265.8 ± 0.1 | 0.340 ± 0.015 | 86.5 ± 0.5 | -10.30 ± 0.11 | 2.31 ± 0.74 | 230 ± 2 | 3 |
| 11 | 3.5 | 3 | 45 | 3 | 295.8 ± 0.1 | 0.451 ± 0.018 | 87.5 ± 0.5 | -10.70 ± 0.07 | 4.00 ± 0.87 | 237 ± 2 | 3 |
| 12 | 3.5 | 3 | 45 | 10 | 251.8 ± 0.2 | 0.366 ± 0.013 | 87.5 ± 0.5 | -10.80 ± 0.06 | 1.10 ± 0.76 | 190 ± 2 | 3 |
| 13 | 3.5 | 10 | 18 | 3 | 183.2 ± 0.1 | 0.117 ± 0.016 | 86.5 ± 0.5 | -9.96 ± 0.37 | 8.38 ± 0.45 | 616 ± 8 | 10 |
| 14 | 3.5 | 10 | 18 | 10 | 183.2 ± 0.1 | 0.097 ± 0.064 | 86.0 ± 0.0 | -10.20 ± 0.10 | 3.96 ± 0.23 | 670 ± 6 | 14 |
| 15 | 3.5 | 10 | 45 | 3 | 186.6 ± 0.2 | 0.119 ± 0.072 | 87.0 ± 1.4 | -10.60 ± 0.27 | 3.78 ± 0.10 | 584 ± 5 | 14 |
| 16 | 3.5 | 10 | 45 | 10 | 182.8 ± 0.2 | 0.102 ± 0.012 | 86.5 ± 2.1 | -9.95 ± 0.18 | 1.21 ± 0.12 | 644 ± 5 | 21 |

Table 2b. Independent variables and measured responses for the 16 freeze-dried experiment formulation runs, with PEG as protectant agent.

| Run order | Independent variables | | | | Measured responses | | | | | | |
|-----------|-----------------------|----------------|-------------------------------|--------------|--------------------|---------------|------------|---------------|-------------|-----------------|------------------|
| | C_{stab} (%) | C_{prot} (%) | T_{SD} ($^\circ\text{C}$) | t_{SD} (h) | Z_{av} (nm) | PI | EE (%) | ZP (mV) | RH (%) | Osm (mOsmol/kg) | Stability (days) |
| 1 | 1.66 | 3 | 18 | 3 | 178.4 ± 2.4 | 0.096 ± 0.006 | 86.0 ± 0.0 | -17.50 ± 0.19 | 0.97 ± 0.12 | 56 ± 7 | 3 |
| 2 | 1.66 | 3 | 18 | 10 | 180.2 ± 12.8 | 0.102 ± 0.065 | 86.0 ± 2.1 | -17.20 ± 0.09 | 0.98 ± 0.11 | 69 ± 5 | 3 |
| 3 | 1.66 | 3 | 45 | 3 | 183.1 ± 2.0 | 0.114 ± 0.013 | 87.5 ± 0.5 | -17.20 ± 0.24 | 0.70 ± 0.94 | 70 ± 2 | 3 |
| 4 | 1.66 | 3 | 45 | 10 | 186.9 ± 1.8 | 0.104 ± 0.027 | 86.5 ± 0.5 | -17.40 ± 0.21 | 0.69 ± 0.19 | 56 ± 2 | 3 |
| 5 | 1.66 | 10 | 18 | 3 | 184.3 ± 2.2 | 0.098 ± 0.018 | 87.0 ± 0.0 | -17.20 ± 0.18 | 0.51 ± 0.32 | 296 ± 8 | 7 |
| 6 | 1.66 | 10 | 18 | 10 | 191.8 ± 2.2 | 0.086 ± 0.021 | 86.0 ± 0.0 | -16.80 ± 0.15 | 0.80 ± 0.24 | 330 ± 7 | 7 |
| 7 | 1.66 | 10 | 45 | 3 | 189.0 ± 2.2 | 0.085 ± 0.013 | 87.8 ± 2.5 | -17.40 ± 0.11 | 0.87 ± 0.17 | 345 ± 5 | 10 |
| 8 | 1.66 | 10 | 45 | 10 | 187.0 ± 3.4 | 0.086 ± 0.017 | 86.5 ± 0.5 | -17.30 ± 0.15 | 0.51 ± 0.11 | 311 ± 6 | 10 |
| 9 | 3.5 | 3 | 18 | 3 | 189.5 ± 1.1 | 0.129 ± 0.028 | 86.0 ± 0.0 | -17.20 ± 0.15 | 0.82 ± 0.23 | 90 ± 3 | 3 |
| 10 | 3.5 | 3 | 18 | 10 | 184.6 ± 6.7 | 0.116 ± 0.012 | 87.5 ± 0.5 | -16.70 ± 0.06 | 0.77 ± 0.14 | 87 ± 3 | 3 |
| 11 | 3.5 | 3 | 45 | 3 | 189.8 ± 1.2 | 0.131 ± 0.019 | 87.5 ± 1.4 | -17.40 ± 0.11 | 0.96 ± 0.11 | 81 ± 1 | 3 |
| 12 | 3.5 | 3 | 45 | 10 | 178.1 ± 3.7 | 0.127 ± 0.016 | 86.5 ± 1.4 | -17.80 ± 0.06 | 0.74 ± 0.15 | 85 ± 3 | 3 |
| 13 | 3.5 | 10 | 18 | 3 | 186.0 ± 2.0 | 0.084 ± 0.023 | 87.0 ± 0.0 | -17.00 ± 0.08 | 0.66 ± 0.21 | 396 ± 7 | 7 |
| 14 | 3.5 | 10 | 18 | 10 | 190.1 ± 2.2 | 0.075 ± 0.020 | 86.5 ± 0.5 | -17.60 ± 0.14 | 0.57 ± 0.22 | 410 ± 11 | 7 |
| 15 | 3.5 | 10 | 45 | 3 | 187.0 ± 1.0 | 0.095 ± 0.012 | 86.5 ± 0.5 | -17.50 ± 0.17 | 0.65 ± 0.16 | 343 ± 4 | 23 |
| 16 | 3.5 | 10 | 45 | 10 | 186.4 ± 2.4 | 0.101 ± 0.058 | 86.5 ± 1.4 | -17.60 ± 0.06 | 0.66 ± 0.62 | 385 ± 9 | 30 |

Initially, the chamber pressure proposed in the FD protocol using TRE as protectant agent was 0.050 mbar due to its low T_{co} (-36°C), it was modified because the diffusion effects were absent and only hydrodynamic flow takes place^{35,42}. It was as follows: holding in precooling shelf at $+10^{\circ}\text{C}$ for 1 h, freezing at -50°C for 4 h, PD at -3°C and 0.140 mbar for 24 h. SD time and SD temperature were studied at two levels in order to study their influence in RH on the product (see "Drying" section).

The full factorial design was focused on the determination of settings for stabilizer concentration (C_{stab}), protectant concentration (C_{prot}), shelf temperature in SD (T_{SD}) and time in SD (t_{SD}) to result in small Z_{av} , low PI, high EE, low RH, appropriate ocular osmolality, higher ZP values and longer stability in aqueous form. The response parameters and their magnitudes for each of the 16 experiments are given in Table 2(a) and (b).

According to estimated DoE responses to NPs prepared with TRE; the mean Z_{av} and PI values of freeze-dried FB-P ϵ CL-NPs decrease when TRE concentration and the interaction TRE/P188 concentration are increased. On the contrary, the size and PI values increase when P188 amount is increased ($p < .05$). As was aforementioned, NPs aggregation is due to the fact that P188 could form inter-particle bridges during sublimation.

Furthermore, osmolality increases when TRE concentration and stabilizer concentration are increased, the first one being the most influential in this response. The stability after aqueous reconstitution showed almost exclusive dependence on TRE concentration. TRE turns these systems more kinetically stable, probably because the migration phenomena are minimized, decreasing the risk of particle sedimentation, creaming or aggregation²⁶. Moreover, the SD shelf temperature, the interactions of the TRE concentration/SD time and the TRE concentration/SD shelf temperature were the others factors ($p < .05$) that governed the stability of the freeze-dried FB-P ϵ CL-NPs suspension in a positive way. Thus, a better stability will be induced when the factors mentioned before are increased.

Likewise, freeze-dried NPs showed low RH values when NPs suspensions were exposed at a higher SD shelf temperature and at a higher SD time. This result reinforces the premise that amorphous products as TRE are more difficult to dry than crystalline products¹⁶. TRE is a water-structure maker (kosmotrope), this means that the interaction between TRE/water is much stronger than water/water interaction. The amorphous TRE has local pockets of crystalline dihydrate where the residual water molecules are trapped and immobilized into a glassy matrix when water is scarce. This, along with the reversible transition of TRE between the dihydrate and anhydrous crystalline forms, was proposed to be the mechanism by which TRE maintains and protects an organism during drying. Moreover, the α -1,1-glycosidic bond in TRE is much less susceptible to hydrolysis than the α , β -1,2 glycosidic bond of the other nonreducing sugar (i.e. sucrose). All these factors probably slow down the release of water⁵⁰. Thus, higher temperatures and longer times are needed to remove the absorbed water in FB-P ϵ CL-NPs with TRE added.

According to the statistical ANOVA, independent factors did not have any significant influence on EE and ZP, so all their coefficients had a $p > .05$ ($\text{Prob} > [t]$). Figure 2 shows the Pareto plot for Z_{av} , PI, osmolality, RH and stability along with the p values for various factors or interactions. In order to generate a reduced regression equation for FB-P ϵ CL-NPs quality prediction, factors with no significant effects were omitted from the full models, while keeping only factors with significant effects. The reduced equations relating the physicochemical characteristics of NPs with

the independent variables were:

$$Z_{av} = 128.98 + 48.69 x_1 + 5.50 x_2 - 4.87 x_1 x_2 r^2 = 0.95 \quad (3)$$

$$PI = 0.10 + 0.11 x_1 + 0.001 x_2 - 0.01 x_1 x_2 r^2 = 0.98 \quad (4)$$

$$\text{Osmolality} = 46.96 - 1.40 x_1 + 41.32 x_2 + 4.95 x_1 x_2 r^2 = 0.99 \quad (5)$$

$$RH = 12.41 - 0.17 x_3 - 0.68 x_4 + 0.01 x_3 x_4 r^2 = 0.94 \quad (6)$$

$$\text{Stability} = 6.57 - 0.56 x_2 - 0.13 x_3 - 1.45 x_4 + 0.04 x_2 x_3 + 0.14 x_2 x_4 + 0.008 x_3 x_4 r^2 = 0.97 \quad (7)$$

The coefficients of determination indicated a good fit. Predicted responses were generated using Equations (3)–(7).

As can be seen in Figure 3, according to estimated DoE responses to NPs prepared with PEG, it displays that PEG concentration is the only significant factor ($p < .0019$) affecting the PI of samples. This influence provided a negative effect; thus, lower PI values were observed when PEG concentration was increased. Lower PI reveals good sample homogeneity and would allow closer contact between drug-loaded NPs and biological membranes. It promotes a more effective drug penetration into tissue^{51,52}. Furthermore, PEG concentration, SD shelf temperature and the interaction of these factors were significant ($p < .05$) to FB-P ϵ CL-NPs stability. They provided a positive effect; thus, an increased concentration of these factors would give a better stability to FB-P ϵ CL-NPs suspension.

In the same way as TRE-DoE; the osmolality response in PEG-DoE was positively governed by protectant and stabilizer concentrations, being the first one of the most predominant variable. The influence of independent factors on EE, Z_{av} , ZP and RH of freeze-dried FB-P ϵ CL-NPs showed no statistically significant differences.

Mostly, the RH % is determined by the final $T_{product}$, which is predominantly influenced by the shelf temperature and the duration of SD^{16,18,35}. Noticeable, even though all PEG-DoE formulations had different solid concentrations (4.0–11.9% w/w) and were submitted at different SD process conditions, they displayed RH values $< 1\%$ according to the Karl Fisher method (Table 2(b)). This may be due to the property of semi-crystalline materials such as P ϵ CL and PEG to maintain low absorbed water content¹⁶. This behavior is based on the conformational properties of the $-\text{OCCO}-$ sequence in PEG chain. It is suggested that the majority of the possible conformations from rotation around the C–C bond are relatively non-polar, while only two are strongly polar. This polar section has the lowest energy and interacts most favorably with water. The increase in temperature, such as happening in SD, impacts in two ways: the non-polar conformations start to govern the properties of the chain, so it makes interactions with water less favorable, additionally, the water activity increases and even more when its concentration decreases⁵³. Moreover, it was reported that the number of water molecules bound per monomeric unit decreases while PEG is under drying⁵⁴. Thereby, the PEG-water interactions become less favorable with increasing temperature and it would facilitate a surface fast drying of FB-P ϵ CL-NPs with PEG added.

According to the statistical ANOVA, independent factors did not have any significant influence on Z_{av} , EE, ZP and RH, so all their coefficients had a $p > .05$ ($\text{Prob} > [t]$). Figure 3 shows the Pareto plot for mean PI, osmolality and stability along with the p values for various factors or interactions. Factors with no significant effect were omitted from the full model in order to generate a reduced regression equation for FB-P ϵ CL-NPs quality prediction. The reduced equations relating to the physicochemical

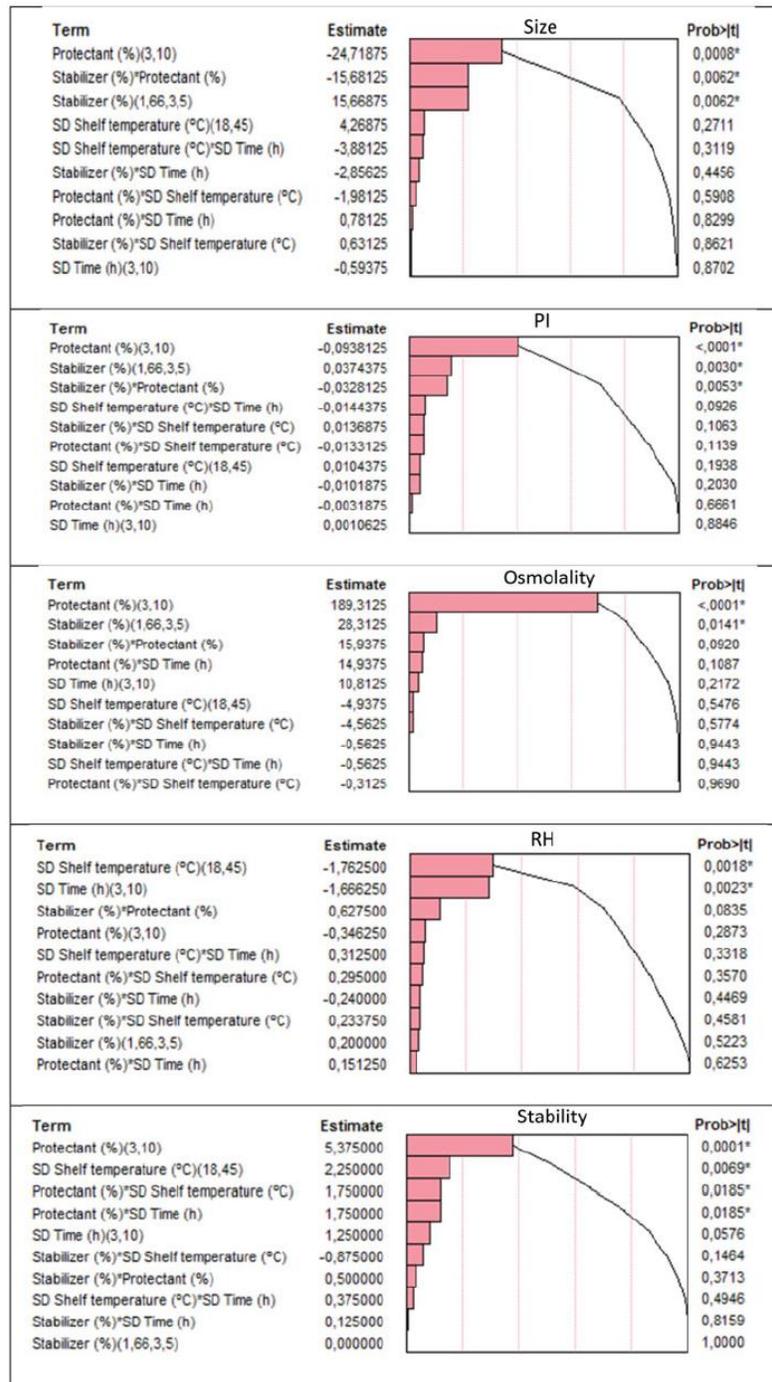


Figure 2. Pareto plot of TRE – DoE responses.

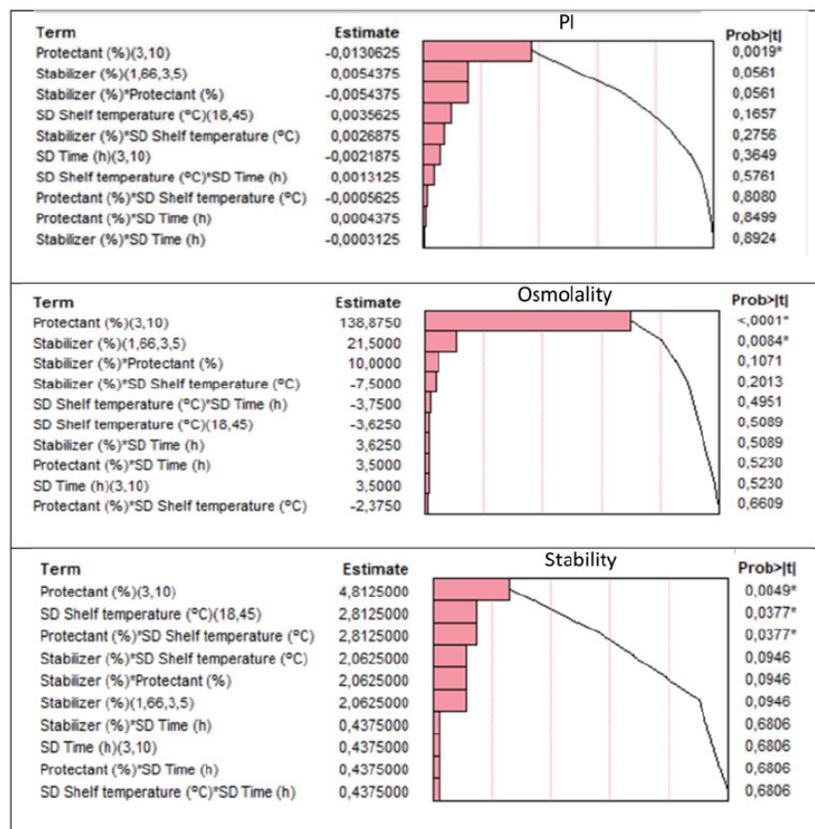


Figure 3. Pareto plot of PEG - DoE responses.

characteristics of NPs with the independent variables were:

$$PI = 0.126 - 0.004 x_2 \quad r^2 = 0.91 \quad (8)$$

$$Osmolality = -53.00 + 3.18 x_1 + 31.67 x_2 + 3.11 x_1 x_2 \quad r^2 = 0.99 \quad (9)$$

$$Stability = 4.50 - 0.50 x_2 - 0.18 x_3 + 0.06 x_2 x_3 \quad r^2 = 0.91 \quad (10)$$

The coefficients of determination indicated a good fit. Predicted responses were generated using Equations (8)–(10).

Optimized FB-P_εCL-NPs characterization

After generating the polynomial equations relating to the effects of independent factors and their interactions on the FB-P_εCL-NPs, JMP 7 desirability function was used to maximize the suitable characteristics of each formulation; they were 0.865 and 0.998 for FB-P_εCL-NPs prepared with TRE and PEG, respectively. Optimal formulation was based on the set criteria explained in "Design and optimization of freeze-dried FB-P_εCL-NPs" section Figure 4(a,b) shows the effect of different levels of each independent variable on the responses as well as the adequate values of independent factors that could lead to get the desired properties of FB-P_εCL-NPs as closely as possible.

Fresh formulations were prepared and freeze-dried according to optimized conditions: F-A, which contained FB-P_εCL-NPs stabilized with 1.66% (w/w) P188, was protected with 5% (w/w) TRE and was

submitted at holding in precooling shelf at +10 °C for 1 h, freezing at -50 °C for 4 h, PD at -3 °C and 0.140 mbar for 24 h and a SD at +42 °C during 10 h. In the same way, F-B, which contained FB-P_εCL-NPs stabilized with 3.5% (w/w) P188, was protected with 8% (w/w) PEG and was submitted at holding in precooling shelf at +10 °C for 1 h, freezing at -50 °C for 4 h, PD at +5 °C and 0.140 mbar for 24 h and a SD at +45 °C during 10 h. Sample characterizations were made immediately after FD and after 365 storage days at a room temperature to verify long-term stability, showing no significant differences between mean values. Results can be seen in Table 3.

As seen in Figure 5, both formulations maintained good appearance and displayed a very short reconstitution time. It showed good long-term stability in dried samples.

Regarding stability in aqueous form, freeze-dried F-A protected with TRE displayed around 15 days of stability after aqueous reconstitution (Figure 6(a)). Protectant concentration was the most positive influence factor, however, it increased osmolality toughly, as can be seen in Figure 2. This relationship avoids obtaining all desirable characteristic simultaneously. Nevertheless, the freeze-dried F-B prepared with PEG achieved stability over 30 days (Figure 6(b)). Also ZP influences on NPs' system stability as particles with the same polarity of electrical charge present electrostatic repulsion and prevent aggregation⁵⁵. Negative charges as a result of the presence of terminal carboxylic groups were observed in both formulations, characteristic of these types of systems^{56,57}. As NPs protected with PEG had

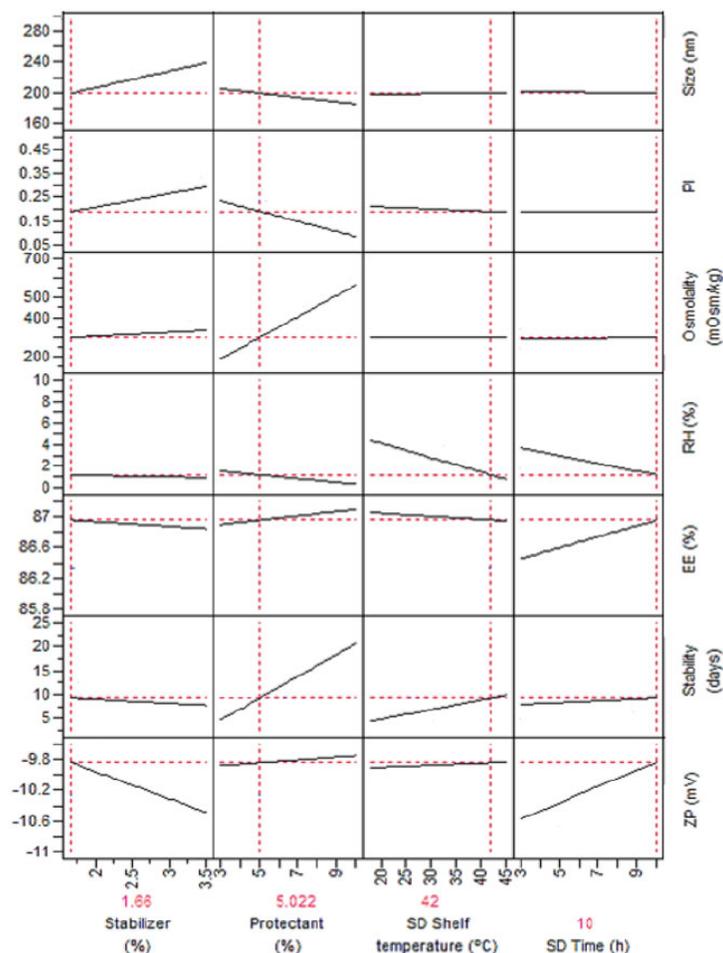


Figure 4. (a) Prediction profile for FB-P ϵ CL-NPs with TRE added with individual and overall desirability function and variability in factor levels: (JMP) stabilizer =1.66, protectant =5.02, SD shelf Temp =42, SD time =10. (b) Prediction profile for FB-P ϵ CL-NPs with PEG added with individual and overall desirability function and variability in factor levels: (JMP) stabilizer =3.50, protectant =8.09, SD shelf Temp =45, SD time =10.

higher negative charge, the NPs system will be more stable than NPs prepared with TRE. It was found that a high EE of FB was obtained for all formulations.

It could be concluded that PEG was the best candidate to provide the desired features to produce freeze dried FB-P ϵ CL-NPs. Additionally, Ramos-Yacasi et al.⁵⁸ reported that PEG protected FB-P ϵ CL-NPs more successfully than TRE at the studied concentration. FB release from optimized FB-P ϵ CL-NPs with added PEG reached 62% and 74% while optimized FB-P ϵ CL-NPs with TRE reached 82% and 92%, before and after FD, respectively, *in vitro* release studies in 10h. It was because TRE induced or increased the porosity of NPs opening pathways facilitating a faster FB release from NPs during drying.

Moreover, in order to study the structure of the NPs and establish the physical state of them, the NPs components (FB, P ϵ CL and P188), the FB-P ϵ CL-NPs (F-A and F-B) and the free drug NPs were examined by X-ray and DSC analyses.

The X-ray spectrums of P ϵ CL and P188 showed that both had a semi-crystalline structure, whereas FB presented a crystalline

assembly (Figure 7). The X-ray profile of free drug NPs was similar to that obtained for the polymer (data not shown).

The FB pattern analysis in the NPs (F-A and F-B) showed that they consisted of two crystalline structure combinations (FB and part of the polymer). The peaks appearing at $2\theta=19.3^\circ$ and 23.3° corresponded to P188 can be due to there was some water with P188 retained in the pellet after centrifugation⁵⁹. During pellet desiccation, this remaining P188 is located outside FB-P ϵ CL-NPs, with a minor peak to F-A than F-B, when they were prepared with P188 at 1.66% and 3.5%, respectively (F-B data not shown).

DSC curves of FB, P188, P ϵ CL, FB-P ϵ CL-NPs and free drug NPs are displayed in Figure 8. P188 and P ϵ CL showed thermograms with a single sharp endothermic peak that corresponded to the melting transition ($54.1\pm 0.1^\circ\text{C}$ for P188 and $64.5\pm 0.1^\circ\text{C}$ for P ϵ CL). Free drug NPs presented an endothermic peak at $58.9\pm 0.1^\circ\text{C}$ with a lower enthalpy ($96.0\pm 0.1\text{ J/g}$) to that of the individual components ($103.4\pm 0.1\text{ J/g}$ for P ϵ CL and $124.6\pm 0.1\text{ J/g}$ for P188). The DSC curve of FB displayed an

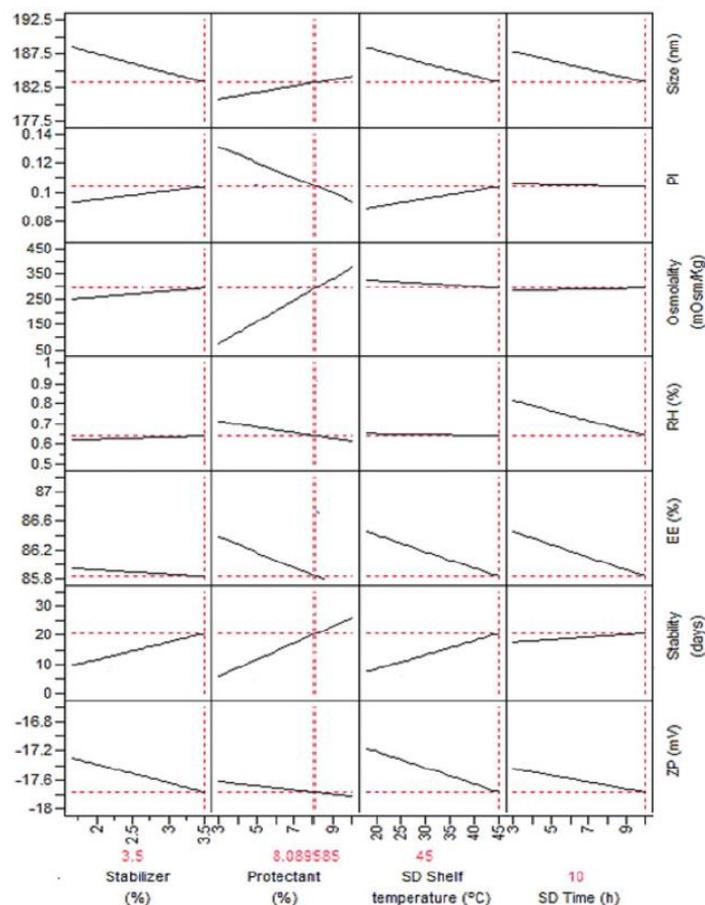


Figure 4. Continued.

Table 3. Comparison of physicochemical characteristics of optimized freeze-dried FB-P ϵ CL-NPs after long-time storage.

| | Test time after FD (days) | Z _{av} (nm) | PI | EE (%) | ZP (mV) | RH (%) | Osm (mOsmol/kg) |
|-----|---------------------------|----------------------|---------------|------------|--------------|-------------|-----------------|
| F-A | 1 | 191.7 ± 1.9 | 0.139 ± 0.012 | 86.5 ± 0.5 | -10.5 ± 0.12 | 1.79 ± 0.11 | 296 ± 8 |
| | 365 | 195.1 ± 0.9 | 0.140 ± 0.017 | 85.5 ± 0.5 | -9.8 ± 0.18 | 1.83 ± 0.15 | 306 ± 9 |
| F-B | 1 | 188.4 ± 1.3 | 0.087 ± 0.014 | 85.5 ± 1.4 | -16.4 ± 0.10 | 0.61 ± 0.12 | 325 ± 7 |
| | 365 | 193.7 ± 1.5 | 0.086 ± 0.012 | 87.0 ± 0.5 | -15.5 ± 0.17 | 0.65 ± 0.08 | 327 ± 5 |

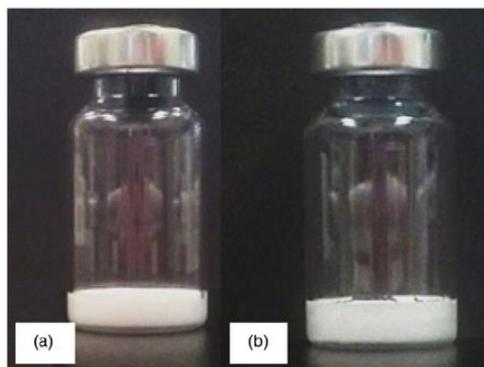


Figure 5. (a) F-A + 5% (w/w) TRE and (b) F-B + 8% (w/w) PEG after 365 days of storage at ambient conditions.

endothermic event during the heat treatment ($T = 114.6 \pm 0.1^\circ\text{C}$, $\Delta H = 106.1 \pm 0.1 \text{ J/g}$) corresponding to the solid-liquid melting transition.

FB-P ϵ CL-NPs showed a unique sharp thermal event at $56.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ with an enthalpy of $73.95 \pm 0.1 \text{ J/g}$. The fact that there was an absence of an endotherm corresponding to FB melting crystals indicated that most of the drug is included in the polymeric matrix⁶⁰. Similar results were obtained by other authors⁹. It was observed that FB-P ϵ CL-NPs endothermic peak presented a minor fusion temperature compared with free drug NPs; this was due to the FB content. In this context, F-A also showed a minor enthalpy value, because P ϵ CL and FB decreased enthalpy when there is an association between them, due to FB molecules acting as an impurity in the crystalline part of the polymer.

With respect to freeze-dried samples, the diffractograms showed two peaks at $2\theta = 19.1^\circ$ and 23.3° which corresponded to

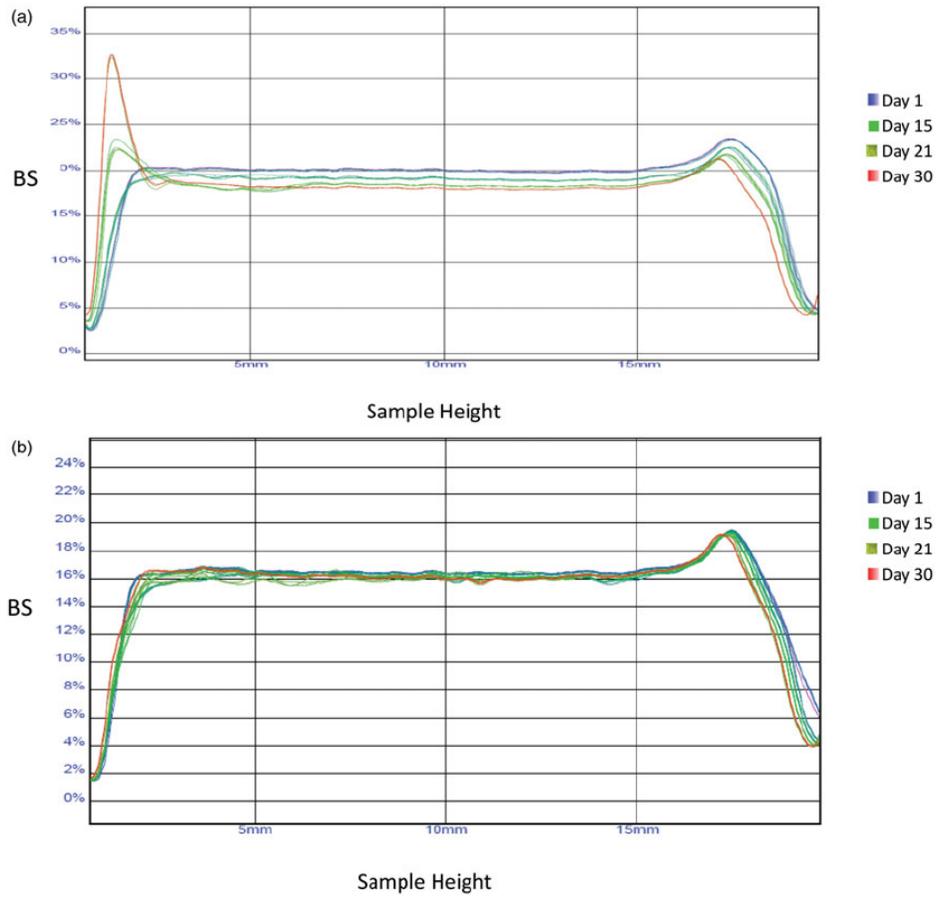


Figure 6. Backscattering (BS) profiles of: (a) F-A + 5% (w/w) TRE and (b) F-B + 8% (w/w) PEG as a function of sample height (mm) analyzed at different days during 30 days of storage at 4°C.

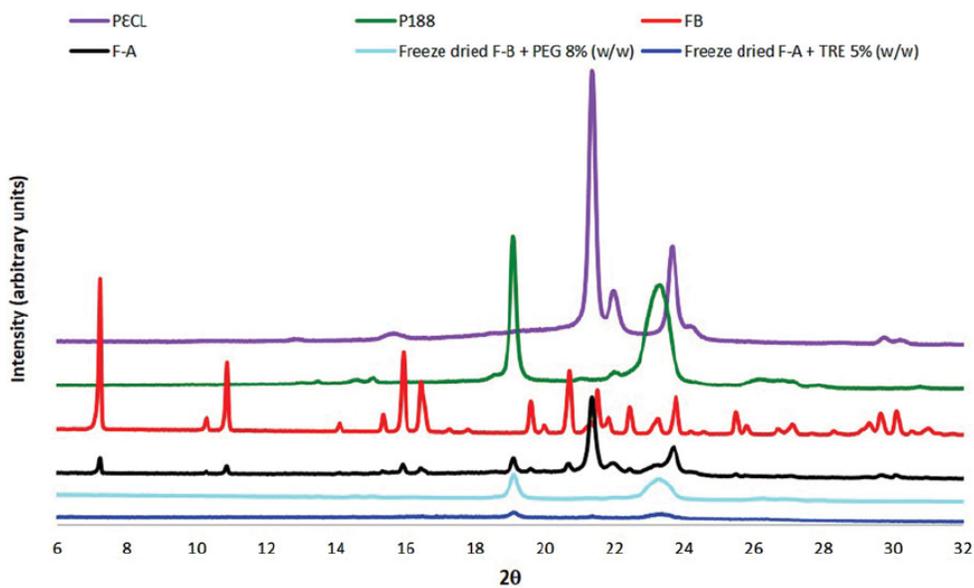


Figure 7. X-ray spectra of PεCL, P188, FB, F-A, freeze-dried F-A and freeze-dried F-B with their respective protectant agents.

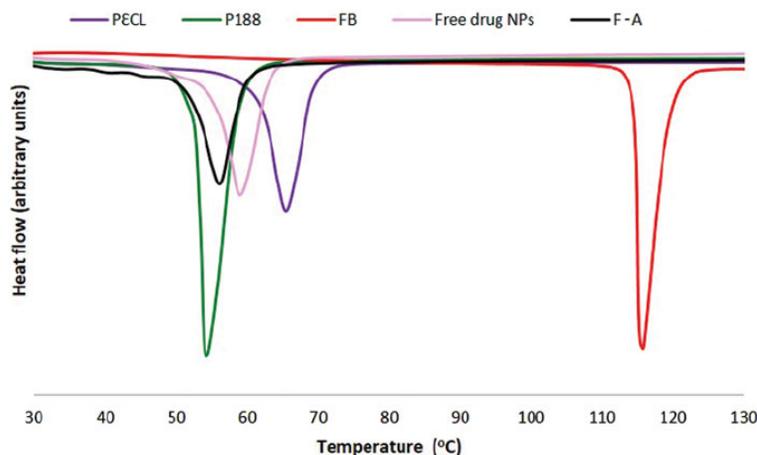


Figure 8. DSC spectra of P α CL, P188, FB, free drug NPs and formulation A.

the most intense peaks of P188. Furthermore, the signal intensity of P188 peaks in F-A + 5% TRE was less pronounced than F-B + 8% PEG. It was directly related to the amount of P188 used in the NPs preparation. Other components' profiles showed the conversion of their semi-crystalline state into amorphous one as there were no characteristic peaks of active ingredient and polymer.

Conclusions

FD is considered as a highly stabilizing process that facilitates to handle and store products involved in aqueous form. Freezing was less damaging than FD. In this way, this study had taken into account the P188 concentration and protectant agent concentration, as they showed a greater influence in the FD. The results present the cryoprotectant effect of P188 to FB-P α CL-NPs. P188 did not show any protective effect as a lyoprotectant. It indicates that some stabilizers involved in the design of the formulation are able to reinforce the morphometrical property preservation of the NPs during FD. Likewise, the results of initial screening to get an appropriate protectant agent to FB-P α CL-NPs show TRE and PEG as good alternatives. As slow freezing conditions (1 h in precooling shelf at +10 °C and then a decrease at -50 °C for 4 h) and fast freezing with nitrogen liquid were useful to prevent FB-P α CL-NPs aggregation, the first one was selected to reinforced the improvement of sublimation rates. PD was adjusted to below the T_{co} of the formulation in all assays. Finally, SD conditions ((SD time and SD shelf temperature) and (P188 concentration and protectant agent concentration)) were determined together since they are involved among them using a DoE. Summarizing, they were selected in term of its impact on freezing conditions and drying time.

The optimization of ocular formulation was successfully achieved in FB-P α CL-NPs prepared with PEG, in terms of appropriate ocular osmolality, low RH and long aqueous stability after reconstitution, maintaining small particle size, narrow particle size distribution and initial EE of FB after the FD process.

Evidently, the successful design of this colloidal system resulted from rational cooperation between a good formulation and the right conditions in the freezing and drying stages. Moreover, both original FD cycles were due to the fact that we ascertained the FD behavior of the product resulting in a significant time and energy saving for the industry. Such conditions produced an acceptable

non-collapsed freeze-dried matrix with a rapid reconstitution time and the conservation of NPs' properties.

Acknowledgements

Ramos Y. Gladys would like to thank Center of Excellence in Lyophilization (CoEL), part of REIG JOFRE Group, for their support in FD process. Special thanks to PhD. J. Barange and PhD. S. Nikolic for their training and helpful suggestions in the freeze drying field.

Disclosure statement

The authors report no conflicts of interest whatsoever to declare, and report no declarations of interest.

Funding

This work was supported by Ministerio de economía y competitividad from Spain from Spain (MCYT), project MAT2014-59134R, for financial support.

ORCID

Gladys Rosario Ramos Yacasi  <http://orcid.org/0000-0003-3898-9291>

References

1. Le Boulrais C, Acar L, Zia H, et al. Ophthalmic drug delivery systems—recent advances. *Prog Retin Eye Res* 1998;17:33–58.
2. Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discov Today* 2008;13:144–51.
3. Anand BS, Dey S, Mitra AK. Current prodrug strategies via membrane transporters/receptors. *Expert Opin Biol Ther* 2002;2:607–20.
4. Vinardell MP, Mitjans M. Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. *J Pharm Sci* 2008;97:46–59.

5. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:1688–713.
6. Vighi E, Ruozzi B, Montanari M, et al. Re-dispersible cationic solid lipid nanoparticles (SLNs) freeze-dried without cryoprotectors: characterization and ability to bind the pEGFP-plasmid. *Eur J Pharm Biopharm* 2007;67:320–8.
7. Lang R, Winter G, Vogt L, et al. Rational design of a stable, freeze-dried virus-like particle-based vaccine formulation. *Drug Dev Ind Pharm* 2009;35:83–97.
8. Shaikh MY, Mars JS, Heaven CJ. Prednisolone and flurbiprofen drops to maintain mydriasis during phacoemulsification cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 2003;29:2372–7.
9. Vega E, Gamisans F, García ML, et al. PLGA nanospheres for the ocular delivery of flurbiprofen: drug release and interactions. *J Pharm Sci* 2008;97:5306–17.
10. Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical applications of biodegradable polymers. *J Polym Sci B Polym Phys* 2011;49:832–64.
11. Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer—polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci* 2010;35:1217–56.
12. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm* 1989;55:R1–4.
13. Yegin BA, Lamprecht A. Lipid nanocapsule size analysis by hydrodynamic chromatography and photon correlation spectroscopy. *Int J Pharm* 2006;320:165–70.
14. Teeranachaideekul V, Junyaprasert VB, Souto EB, Müller RH. Development of ascorbyl palmitate nanocrystals applying the nanosuspension technology. *Int J Pharm* 2008;354:227–34.
15. Araújo J, Gonzalez-Mira E, Egea MA, et al. Optimization and physicochemical characterization of a triamcinolone acetamide-loaded NLC for ocular antiangiogenic applications. *Int J Pharm* 2010;393:168–76.
16. Tang X, (Charlie), Pikal MJ. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharm Res* 2004;21:191–200.
17. Shon M, Mather L. The importance of controlling nucleation temperature during the freeze step. Introduction of ControlLyo™ nucleation on-demand technology on the new FTS/SP Scientific™ LyoStar™ 3 freeze dryer. Available from: <http://www.spscientific.com/ArticlesAndTechnicalPapers/> [last accessed 12 Aug 2016].
18. Chang BS, Fischer NL. Development of an efficient single-step freeze-drying cycle for protein formulations. *Pharm Res* 1995;12:831–7.
19. Franks F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *Eur J Pharm Biopharm* 1998;45:221–9.
20. Fissore D, Pisano R, Barresi AA. Applying quality-by-design to develop a coffee freeze-drying process. *J Food Eng* 2014;123:179–87.
21. Pisano R, Fissore D, Barresi AA. Freeze-drying cycle optimization using model predictive control techniques. *Ind Eng Chem Res* 2011;50:7363–79.
22. Aldous BJ, Franks F, Greer AL. Diffusion of water within an amorphous carbohydrate. *J Mater Sci* 1997;32:301–8.
23. Pisano R, Rasetto V, Barresi AA, et al. Freeze-drying of enzymes in case of water-binding and non-water-binding substrates. *Eur J Pharm Biopharm* 2013;85:974–83.
24. Rambhatla S, Obert JP, Luthra S, et al. Cake shrinkage during freeze drying: a combined experimental and theoretical study. *Pharm Dev Technol* 2005;10:33–40.
25. Pisano R, Fissore D, Barresi AA, et al. Quality by design: optimization of a freeze-drying cycle via design space in case of heterogeneous drying behavior and influence of the freezing protocol. *Pharm Dev Technol* 2012;18:1–16.
26. Gonzalez-Mira E, Egea MA, Souto EB, et al. Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for ocular delivery. *Nanotechnology* 2011;22:45101.
27. Mengual O. TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta* 1999;50:445–56.
28. Bannale SG, Pundarikaksha HP, Sowbhagya HN. A prospective, open-label study to compare the efficacy and the safety of topical Loteprednol etabonate and topical flurbiprofen sodium in patients with post-operative inflammation after cataract extraction. *J Clin Diagn Res* 2012;6:1499–503.
29. Verma S, Lan Y, Gokhale R, Burgess DJ. Quality by design approach to understand the process of nanosuspension preparation. *Int J Pharm* 2009;377:185–98.
30. Abrego G, Alvarado HL, Egea MA, et al. Design of nanosuspensions and freeze-dried PLGA nanoparticles as a novel approach for ophthalmic delivery of pranoprofen. *J Pharm Sci* 2014;103:3153–64.
31. Moreton MA, Chiappetta DA, Sosnik A. Cryoprotection-lyophilization and physical stabilization of rifampicin-loaded flower-like polymeric micelles. *J R Soc Interface* 2012;9:487–502.
32. Saez A, Guzmán M, Molpeceres J, Aberturas M. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. *Eur J Pharm Biopharm* 2000;50:379–87.
33. Baheti A, Kumar L, Bansal AK. Excipients used in lyophilization of small molecules. *J Excipients Food Chem* 2010;1:41–54.
34. Chang BS, Randall CS. Use of subambient thermal analysis to optimize protein lyophilization. *Cryobiology* 1992;29:632–56.
35. Chang BS, Patro SY. Freeze-drying process development for protein pharmaceuticals. *Lyophilization Biopharm* 2004;2:113–38.
36. Pisano R, Fissore D, Barresi AA, Rastelli M. Quality by design: scale-up of freeze-drying cycles in pharmaceutical industry. *AAPS PharmSciTech* 2013;14:1137–49.
37. Depaz RA, Pansare S, Patel SM. Freeze-drying above the glass transition temperature in amorphous protein formulations while maintaining product quality and improving process efficiency. *J Pharm Sci* 2016;105:40–9.
38. Lewis LM, Johnson RE, Oldroyd ME, et al. Characterizing the freeze-drying behavior of model protein formulations. *AAPS PharmSciTech* 2010;11:1580–90.
39. Johnson R, Lewis L. Freeze-drying protein formulations above their collapse temperatures: possible issues and concerns. *Am Pharm Rev* 2011;14:50–54.
40. Kasper JC, Friess W. The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;78:248–63.
41. Oddone I, Van Bockstal PJ, De Beer T, Pisano R. Impact of vacuum-induced surface freezing on inter- and intra-vial heterogeneity. *Eur J Pharm Biopharm* 2016;103:167–78.
42. Zaidi A, Rawal S, Abichandani H. Heat and mass transfer. *Chem Age India* 1979;30:809–18.
43. Abdelwahed W, Degobert G, Fessi H. A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized

- by poly(vinyl alcohol): formulation and process optimization. *Int J Pharm* 2006;309:178–88.
44. Yang ZL, Li XR, Yang KW, Liu Y. Amphotericin B-loaded poly(ethylene glycol)-poly(lactide) micelles: preparation, freeze-drying, and in vitro release. *J Biomed Mater Res A* 2008;85:539–46.
 45. Teagarden DL, Baker DS. Practical aspects of lyophilization using non-aqueous co-solvent systems. *Eur J Pharm Sci* 2002;15:115–33.
 46. Patel HR, Patel RP, Patel MM. Poloxamers: a pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. *Int J PharmTech Res* 2009;1:299–303.
 47. Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Fessi H, Doelker E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm* 1998;24:1113–28.
 48. Jaeghere F, De Allémann E, Leroux JC, et al. Formulation and lyoprotection of poly(lactic acid-Co-ethylene oxide) nanoparticles: influence on physical stability and in vitro cell uptake. *Pharm Res* 1999;16:859–66.
 49. Miyajima K. Role of saccharides for the freeze-thawing and freeze drying of liposome. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;24:151–9.
 50. Jain NK, Roy I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci* 2009;18:24–36.
 51. Win KY, Feng SS. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 2005;26:2713–22.
 52. Anand P, Nair HB, Sung B, et al. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. *Biochem Pharmacol* 2010;79:330–8.
 53. Stensgaard Stoltze A. Investigation of water binding in aqueous solutions of poly(ethylene glycol), poly(propylene glycol) and symmetric triblock copolymers of poly(ethylene glycol) and poly(propylene glycol) [M.Sc. Thesis]; 2009. 42p.
 54. Christiansen K, Jørgensen M, Stoltze A. Determination of water activity in poly(styrene-co-acrylic acid) suspensions and polyethylene glycol solutions by relative humidity measurements; 2007.
 55. Feng S, Huang G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers. *J Control Release* 2001;71:53–69.
 56. Ahlin P, Kristl J, Kristl A, Vrečer F. Investigation of polymeric nanoparticles as carriers of enalaprilat for oral administration. *Int J Pharm* 2002;239:113–20.
 57. Leroueil-Le Verger M, Fluckiger L, Kim YI, et al. Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent. *Eur J Pharm Biopharm* 1998;46:137–43.
 58. Ramos-Yacasi G, García M, Espina M, et al. Influence of freeze-drying and γ -irradiation in preclinical studies of flurbiprofen polymeric nanoparticles for ocular delivery using d-(+)-trehalose and polyethylene glycol. *Int J Nanomedicine* 2016;11:1–14.
 59. Parra A, Mallandrich M, Clares B, et al. Design and elaboration of freeze-dried PLGA nanoparticles for the transcorneal permeation of carprofen: ocular anti-inflammatory applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2015;136:935–43.
 60. Ford JL, Timmins P. *Pharmaceutical thermal analysis: techniques and applications*. Chichester: Ellis Horwood Books in Biological Sciences; 1989.

Influence of freeze-drying and γ -irradiation in preclinical studies of flurbiprofen polymeric nanoparticles for ocular delivery using d-(+)-trehalose and polyethylene glycol

Ramos Yacasi GR., García López ML., Espina García M., Parra Coca A., Calpena Campmany AC. In **International Journal of Nanomedicine**.

3.2. Influence of freeze-drying and γ -irradiation in preclinical studies of flurbiprofen polymeric nanoparticles for ocular delivery using d-(+)-trehalose and polyethylene glycol (Artículo 2).

Resumen

En este estudio se investigó la suspensión de nanopartículas de poli-epsilon caprolactona (P ϵ CL) estabilizados con poloxamer 188 (P188) como sistema de administración ocular para flurbiprofeno (FB-P ϵ CL-NPs), con el propósito de superar los problemas asociados a su estabilidad, esterilidad, tolerancia y eficacia (criterios de Goldmann). Estos estudios se realizaron en dos formulaciones de FB-P ϵ CL-NPs diferentes; tanto en el tipo y concentración del agente protector, como también en su concentración de P188 (1.66 % y 3.5 %). Pero muy parecidos en algunas características fisicoquímicas (tamaño de partícula, eficiencia de encapsulación y carga superficial) aunque distintas en la homogeneidad de la muestra.

Las formulaciones se sometieron individualmente al proceso de liofilización y gamma irradiación con los distintos agentes protectores, polietilenglicol 3350 (PEG3350) y d - (+) trehalosa (TRE). Ambas formulaciones satisfacían los criterios de todos los parámetros fisicoquímicos requeridos para los productos farmacéuticos administrados por vía ocular.

Los estudios reológicos mostraron que las formulaciones de FB-P ϵ CL-NPs presentaron un comportamiento no newtoniano y grandes diferencias en sus valores de viscosidad tras la adición del agente protector. Después de la determinación de la liberación sostenida del fármaco (*in vitro*) de las nanopartículas, se procedió al estudio del análisis de permeación (*ex vivo*), utilizando tejidos oculares de cerdo (córnea y esclerótica). Estos estudios sugieren que la presencia de PEG3350 influye en la reducción de la permeación transcorneal de flurbiprofeno, en cambio, la TRE mejoró la permeación del activo a través de la córnea, especialmente después de la gamma irradiación. Por otra parte, el estudio de la permeación de flurbiprofeno

en esclerótica indicó que ambas formulaciones atraviezan este tejido sin mostrar ninguna afinidad significativa por los distintos excipientes (PEG3350 o TRE).

Las FB-P&CL-NPs irradiadas protegidas con PEG3350 (IR-NPsPEG) como también las irradiadas protegidas con TRE (IR-NPsTRE), que son los productos finales, se clasificaron como productos seguros (no irritantes) para la administración oftálmica en base a los resultados obtenidos en la prueba de HET-CAM y el test de Draize. Además, se realizó la prueba de eficacia antiinflamatoria *in vivo*, la cual mostró que las IR-NPsPEG tienen efectos antiinflamatorios más duraderos que las IR-NPsTRE y ambas más efectivas que la solución de fármaco libre. Las formulaciones después de su reconstitución acuosa, mostraron una estabilidad física adecuada durante los 30 días del estudio.

Este estudio concluye que ambas formulaciones cumplen con los criterios de Goldmann y demuestran cómo las nanopartículas esterilizadas (productos finales), con características innovadoras de permeación, podrían ser usadas como una alternativa factible a una solución de flurbiprofeno para aplicación ocular en ensayos clínicos.

Influence of freeze-drying and γ -irradiation in preclinical studies of flurbiprofen polymeric nanoparticles for ocular delivery using D-(+)-trehalose and polyethylene glycol

This article was published in the following Dove Press journal:

International Journal of Nanomedicine

23 August 2016

[Number of times this article has been viewed](#)

Gladys Rosario Ramos
Yacasi
María Luisa García López
Marta Espina García
Alexander Parra Coca
Ana Cristina Calpena
Campmany

Department of Pharmacy and
Pharmaceutical Technology and
Physical Chemistry, University of
Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract: This study investigated the suspension of poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles as an ocular delivery system for flurbiprofen (FB-PeCL-NPs) in order to overcome the associated problems, such as stability, sterility, tolerance, and efficacy, with two different FB-PeCL-NP formulations. The formulations were stabilized with poloxamer 188 (1.66% and 3.5%) and submitted individually for freeze-drying and γ -irradiation with polyethylene glycol 3350 (PEG3350) and D-(+)-trehalose (TRE). Both formulations satisfied criteria according to all physicochemical parameters required for ocular pharmaceuticals. The FB-PeCL-NP formulations showed non-Newtonian behavior and sustained drug release. Ex vivo permeation analysis using isolated ocular pig tissues suggested that the presence of PEG3350 results in a reduction of FB transcorneal permeation. Moreover, TRE improved the penetration of FB across the cornea, especially after γ -irradiation. In addition, both formulations did not show a significant affinity in increasing FB transscleral permeation. Both formulations were classified as nonirritating, safe products for ophthalmic administration according to hen's egg test-chorioallantoic membrane and Draize eye test. Furthermore, an in vivo anti-inflammatory efficacy test showed that irradiated FB-PeCL-NPs prepared with PEG3350 (IR-NPsPEG) have longer anti-inflammatory effects than those presented with irradiated FB-PeCL-NPs prepared with TRE (IR-NPsTRE). IR-NPsPEG showed a suitable physical stability after an aqueous reconstitution over >30 days. This study concludes that both formulations meet the Goldman's criteria and demonstrate how irradiated nanoparticles, with innovative permeation characteristics, could be used as a feasible alternative to a flurbiprofen solution for ocular application in clinical trials.

Keywords: nanoparticles, flurbiprofen, polyethylene glycol 3350, D-(+)-trehalose, freeze-drying, γ -irradiation

Introduction

Inflammation of the ocular surface has the highest incidence in the ophthalmology consultation, following injury, infection, or from chronic conditions.¹ Nonsteroidal anti-inflammatory drugs such as flurbiprofen (FB) have been used to inhibit intraoperative miosis during cataract surgery to reduce the risk of cystoid macular edema and postoperative inflammation of the anterior segment of the eye. FB, 2-(2-fluoro-4-biphenyl) propionic acid, exerts its anti-inflammatory action by inhibiting the cyclooxygenase enzymes.^{2,3} The most common FB pharmaceutical presentation is an eye drop solution. However, it has many disadvantages, for example, the solution's rapid elimination through the precorneal barriers (ie, eye blinking and tear flow), resulting in a reduced

Correspondence: Gladys Rosario Ramos
Yacasi

Department of Pharmacy and
Pharmaceutical Technology and Physical
Chemistry, University of Barcelona,
Av. Joan XXIII, 27-31, Barcelona 08028,
Spain
Email ggramos011@hotmail.es

submit your manuscript | www.dovepress.com



<https://doi.org/10.2147/IJN.S105606>

International Journal of Nanomedicine 2016:11 4093–4106

4093

© 2016 Ramos Yacasi et al. This work is published and licensed by Dove Medical Press Limited. The full terms of this license are available at <http://www.dovepress.com/terms.php> and incorporate the Creative Commons Attribution – Non Commercial (unported, v3.0) License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>). By accessing the work you hereby accept the Terms. Non-commercial uses of the work are permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. For permission for commercial use of this work, please see paragraphs 4.2 and 5 of our Terms (<http://www.dovepress.com/terms.php>).

duration of drug effect and consequently an increased regimen requiring a proportionately large volume of the administered eye drop.^{4,5}

Polymeric nanoparticles (NPs) enhance the ocular bio-availability of topically administered drugs, thus making a more suitable alternative. This colloidal system is well known to be highly adhesive to the ocular surfaces and forms a depot from which the drug is slowly delivered to the affected area. This not only reduces administration frequency but also directs the drug to a specific site.^{4,6} In this context, FB NPs suspension allows a direct FB permeation to the ocular tissue.

The development of NPs for ophthalmic preparations, as well as other pharmaceutical ocular presentations, must satisfy the Goldmann's criteria (stability, sterility, tolerance, and efficacy). Therapy efficacy is the most important criterion for ophthalmic preparation as it depends not only on the stability and tolerance of the preparation but also on the ocular permeability of the active ingredients.⁷

One major obstacle limiting the use of NPs is their instability in aqueous mediums. Freeze-drying is an industrially suitable method for the improvement of stability of NPs as it causes minimal changes in the product's physicochemical properties.⁸ As sterility is essential, eye formulations must satisfy this necessity. γ -Irradiation is commercially available and mainly used for the sterilization of pharmaceuticals; however, it has been suggested that this method can change polymer properties and release kinetics, hence the essentiality of product efficacy.^{9,10}

In order to evaluate the safety and efficacy of materials that may be in contact with the eye, the permeability across ocular tissues has been evaluated using the *in vivo* and *in vitro* eye models over many years. This key factor assists in the formulation of candidate selection for *in vivo* clinical studies.^{11,12} Porcine ocular tissues offer a good model system because they are the closest to human beings after primate; this is due to the absence of the tapetum layer in porcine eyes, which is present in many other animals such as cows, sheep, and rabbits. Research into other mammalian corneas, mainly those of farmed animals, could also aid the research of veterinary ophthalmic formulation development.¹³⁻¹⁵ Other notable similarities between human and porcine eyes are the retinal pigment epithelium, photoreceptor cells, and water content. In addition, biomechanical studies into scleral thickness also show similarities between porcine sclera and human sclera.¹⁶⁻¹⁸

In this research, an attempt was made to determine the effect of freeze-drying and γ -irradiation sterilization on parameters involved in topical ophthalmic formulation

made from FB-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles (FB-P ϵ CL-NPs). Freeze-drying was carried out using trehalose and polyethylene glycol 3350 (PEG3350) as protectants. After physicochemical characterization, *in vitro* release and *ex vivo* permeation were studied. Additionally, rheology properties, physical stability, ocular tolerance tests, and anti-inflammatory efficacy tests were used to determine the most appropriate ophthalmic formulation.

Materials and methods

Materials

FB and poly(ϵ -caprolactone) with a molecular weight of ~10,000–14,000 from Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA) as well as D-(+)-trehalose (TRE) and PEG3350 were purchased. Poloxamer 188 (P188; Lutrol® F68) was sourced from BASF (Barcelona, Spain). Double distilled water was used after filtration using a Millipore® system (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). All other reagents were of analytical grade.

Production and characterization of FB-P ϵ CL-NPs

FB-P ϵ CL-NPs stabilized with P188 were prepared by the solvent displacement technique described by Fessi et al.¹⁹ Briefly, an organic solution of 49.5 mg of P ϵ CL in 30 mL of acetone, containing FB (15 mg/mL), was added dropwise into 60 mL of an aqueous P188 solution (8.3 mg/mL or 17.5 mg/mL of P188) at pH 3.5 under moderate magnetic stirring. Finally, using a rotary evaporator (R-144; Buchi, Flawil, Switzerland), the acetone was evaporated at 35°C under reduced pressure and the suspension of FB-P ϵ CL-NPs was concentrated to 15 mL to obtain a final concentrated suspension of FB-P ϵ CL-NPs with 1 mg/mL of FB.

The mean particle size (Z_{av}) and polydispersity index (PI) were determined by PCS using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) at 25°C. Samples were previously diluted with ultrapurified water. Zeta potential (ZP) was calculated from electrophoretic mobility as is described elsewhere.⁴

Entrapment efficiency (EE) of FB-P ϵ CL-NPs was estimated by indirectly quantifying the amount of nonencapsulated FB in the dispersion medium.⁹ Briefly, the amount of nontrapped FB was separated by filtration/centrifugation technique using centrifugal filter devices (EMD Millipore) at 14,000 rpm for 15 minutes. Prior to filtration/centrifugation, each sample was diluted with MilliQ water (1:20) to avoid deposition of free FB (possibly crystallized in the aqueous phase) on the surface of NPs and assessed by reversed-phase

high-performance liquid chromatography (RP-HPLC; Waters, Milford, CT, USA) applying the following equation:

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

The detection wavelength was set at 247 nm in the UV detector, reversed-phase C18 column 4.6×150 mm, using a mobile phase composed of water:acetonitrile (35:60, v:v) acidified with orthophosphoric acid (pH 2.5). A flow rate of 1 mL/min was used, and the retention time of the drug was at 3.2 minutes. Data analysis was done with the Empower Chromatography Software (Milford, MA, USA).

Freeze-drying process

The freeze-drying process was carried out in a Telstar Lyo-Beta freeze dryer (Telstar, Barcelona, Spain) equipped with Pirani and capacitance vacuum gauges. TRE or PEG3350-loaded FB-PeCL-NPs were prepared by adding 15 mL of protectant agent solution (TRE at 10% [w:v] or PEG3350 at 16% [w:v]) to the 15 mL FB-PeCL-NPs formulations. Then an aliquot of 3.0 mL was transferred to an 8 mL flat-bottom screw cap glass vial.

The freeze-drying cycle for FB-PeCL-NPs prepared with TRE was as follows: holding in precooling shelf at +10°C for 1 hour, a freezing at -50°C for 4 hours, a primary drying at -3°C/0.14 mbar for 12 hours, and a secondary drying at 42°C for 10 hours. The FB-PeCL-NPs prepared with PEG3350 were freeze-dried using the following cycle: holding in precooling shelf at 10°C for 1 hour, a freezing at -50°C for 4 hours, a primary drying at 5°C/0.14 mbar for 12 hours, and a secondary drying at 45°C for 10 hours. After freeze-drying, the samples did not show any sign of collapse and all the freeze-dried matrix was white and easily rehydrated by manual shaking. They were aqueous reconstituted in the initial volume (volume before addition of protectant solution) in order to recover the initial FB concentration.

Table 1 describes the composition parameters of the optimized freeze-dried NP formulations. The component's amounts were selected according to experiments satisfying

the demands required for eye drops in terms of low Z_{av} , low PI, high EE, appropriate osmolality, and high ZP.

Osmolality

The osmolality of ~50 μ L of each FB-PeCL-NPs formulation was measured by means of Advanced® Model 3320 Micro-Osmometer (Advanced® Instruments, Inc., Norwood, MA, USA).

γ -Irradiation sterilization

Freeze-dried FB-PeCL-NP powders were γ -irradiated using ^{60}Co as irradiation source (Aragogamma, Barcelona, Spain) and received a dose of 25 kGy. Although recent studies suggest the possibility to use lower irradiation dose previous to validation,²⁰ according to the European Pharmacopoeia, 25 kGy represents the adequate absorbed dose for the purpose of sterilizing pharmaceutical products when bioburden is not known.^{9,20} Furthermore, it is considered a standard γ -irradiation dose recommended for terminal sterilization of medical products that maintain a valid sterility assurance level of 10^{-6} .²¹

Rheological studies

Rheological properties of FB-PeCL-NPs suspension were evaluated at 25°C using a rotational rheometer HAAKE RheoStress 1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) equipped with a fixed lower plate and an upper cone plate, 2° (Haake C60/2° Ti, 6 cm diameter). Viscosity curves and flow curves were recorded for 3 minutes during the ramp-up period from 0 seconds⁻¹ to 100 seconds⁻¹, 1 minute at 100 seconds⁻¹ (constant shear rate period), and finally, 3 minutes during the ramp-down period from 100 seconds⁻¹ to 0 seconds⁻¹. All measurements were performed in triplicate.

Stability studies

The physical stability of the FB-PeCL-NPs suspension was assessed after 1 day, 7 days, 15 days, 21 days, and 30 days of storage at 4°C in a TurbiScanLab® (Formulation, L'Union, France). This instrument is able to detect destabilization, without dilution of the sample, much earlier than the operator's naked eye.^{5,7} Each formulation (15 mL) was placed in a cylindrical glass measuring cell that was completely scanned by a pulsed near-infrared light source ($\lambda=880$ nm) with two

Table 1 Composition of the freeze-dried optimized NPs formulation

| FB-PeCL-NPs | cFB (mg/mL) | cPeCL (mg/mL) | cPI 88 (mg/mL) | cPA (mg/mL) |
|-------------|-------------|---------------|----------------|-------------|
| FD-NPsTRE | 1.0 | 3.3 | 16.6 | 100 |
| FD-NPsPEG | 1.0 | 3.3 | 35.0 | 160 |

Notes: NPsTRE, formulation prepared with trehalose as a protectant agent; NPsPEG, formulation prepared with PEG3350 as a protectant agent.

Abbreviations: c, concentration; NPs, nanoparticles; FB, flurbiprofen; PeCL, poly(ϵ -caprolactone); PI 88, poloxamer 188; PA, protectant agent; FD, freeze-dried condition.

synchronous optical detectors. The transmission detector (T) receives the light transmitted through the sample (0° from the incident radiation) and the backscattering (BS) detector receives the light backscattered by the sample (135° from the incident radiation) every $40\ \mu\text{m}$ at 25°C for a period of 60 minutes.

In this study, only BS profile was used to evaluate physical stability of FB-PeCL-NPs due to the opacity of the formulations. The obtained profile characterizes the sample's stability (no variation of BS and T), particle migration (local peaks of variation of BS or T), and particle size variation (global variation of BS or T on the whole height). If the BS profiles have a deviation of $\leq \pm 2\%$, it can be considered that there are no significant variations in particle size. Variations more than $\pm 10\%$ indicate unstable formulations.²²

In vitro release

In vitro release study of FB from FB-PeCL-NP formulations was performed in amber glass Franz-type diffusion cells with a diffusion area of $0.64\ \text{cm}^2$ for 40 hours, keeping sink conditions for the entire experiment at 32°C under 600 rpm stirring. These cells consist of a donor and a receptor chamber between which a dialysis membrane is positioned.²³ The dialysis membrane (MWCO 12,000–14,000 Da, Visking Dialysis Tubing; Medicell International Ltd., London, UK) was hydrated for 24 hours before being mounted in the Franz cell. In all, $400\ \mu\text{L}$ of the test formulation was applied to the membrane in the donor chamber and the receptor chamber of the cell was filled with 6 mL of phosphate buffer solution (PBS) at pH 7.4. The FB-PeCL-NP formulations were compared with the free drug ($1\ \text{mg/mL}$) dissolved in PBS at pH 7.4. At selected time intervals, $300\ \mu\text{L}$ of bulk solution was analyzed by RP-HPLC to determine the concentration of the released FB. The samples withdrawn were replaced by $300\ \mu\text{L}$ of PBS maintaining sink conditions.

Four different kinetic models (zero order, first order, Higuchi, and hyperbola) were used to fit the experimental data obtained from drug release experiments.²⁴ Model parameters were calculated using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The coefficient of determination (r^2) and the Akaike's information criterion (AIC), which is a discrimination model parameter, were determined in order to select a model that best fits the release of each sample. A lower AIC indicated the best data-adjusted model. The AIC was calculated by the equation:

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

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

Ex vivo FB permeation across isolated pig cornea and sclera

The ex vivo FB permeation from FB-PeCL-NP formulations was evaluated using isolated pig cornea and sclera using Franz-type diffusion cells. Fresh pig eyes were obtained from adult male pigs (Landrace and Large White hybrids) weighing 45–60 kg. The pig ocular balls were recycled and supplied by the Faculty of Medicine at Barcelona University, Spain. All experiments were performed according to the statement of Association for Research in Vision and Ophthalmology on the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. They were also approved by the Ethical Committee of the University of Barcelona (number 7428) and the committee of Animal Experimentation of the Regional Autonomous Government of Catalonia, Spain (Law 32/2007 of November 7, 2007, and "Real Decreto 1201/2005", October 10, 2005).

The pigs were sedated with neck intramuscular administration using ketamine ($3\ \text{mg/kg}$) + xylazine ($2.5\ \text{mg/kg}$) + midazolam ($0.17\ \text{mg/kg}$). The animals were euthanized by an overdose of sodium thiopental ($100\ \text{mg/kg}$) administered through the marginal ear vein under deep anesthesia using propofol ($1\ \text{mg/kg}$). Eyes were carefully removed and immediately excised. Ocular tissues were kept moist by placing them in Hank's balanced salt solution in order to maintain the viability of the cells.²⁶ The excised tissue (cornea or sclera) was fixed between clamped donor and receptor compartments of the perfusion with a diffusion area of $0.64\ \text{cm}^2$. In all, $200\ \mu\text{L}$ of the test formulation was applied to the tissue surface in the donor compartment, and the receptor compartment of the cell was filled with 6 mL of PBS. A constant temperature of $32^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ and $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ for cornea and sclera, respectively, was kept by a circulating water jacket and stirring at 600 rpm. A total of $300\ \mu\text{L}$ of the test formulation was withdrawn from the receptor solution at predetermined intervals. It was replaced by an equal volume of fresh buffer after each sample collection. All experiments were carried out under sink conditions. Samples were analyzed in triplicate by RP-HPLC.

The cumulative amounts of FB (mg) that had penetrated per surface area of the ocular membrane (cm^2) were corrected for the sample removal and plotted versus time (hour). The permeation profiles were analyzed on the basis of a diffusion model for a finite dose condition.

Flux (J) through the ocular tissue was calculated by plotting the cumulative amount of permeated FB against time in

steady state and determining the slope of the linear portion of the curve by linear regression analysis. In this plot, the lag time (T_l) is the intercept with the x -axis (time). The apparent permeability coefficients (K_p , cm/h) were calculated according to the following equation:

$$K_p = J \times \frac{60}{A \times C_0} \quad (3)$$

where J ($\mu\text{g}/\text{min}$) is the flux across the ocular tissue, A is the exposed tissue surface area (cm^2), C_0 ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) is the initial amount of formulation tested in the donor compartment, and 60 is taken as the factor to convert minute into hour. Experimental data were processed using GraphPad Prism and compared using an application of a parametric statistical assay (the analysis of variance [ANOVA] test) followed by Tukey's multiple comparison test ($P < 0.05$).

At the end of the permeation study, the tissue (cornea or sclera) was removed from the Franz cell. It was then cleaned with gauze soaked in a 0.05% solution of sodium lauryl sulfate and washed with distilled water. The permeation area of the tissue was excised and weighed; its FB content was extracted with acetonitrile:water (50:50, v:v) under sonication for 15 minutes using an ultrasound bath and then analyzed by RP-HPLC.

The corneal hydration levels were investigated by measuring total water content through desiccation (gravimetric method). Each corneal sample was carefully removed from the scleral ring and weighed (W_a). It was then desiccated at 100°C for 6 hours to determine the corresponding dry corneal weight (W_b). The percentage of corneal hydration level (HL%) was defined as:

$$\text{HL}\% = \left(1 - \frac{W_b}{W_a}\right) \times 100 \quad (4)$$

In vitro ocular tolerance test

The potential ocular irritation of FB-PeCL-NP formulations was determined using Hen's egg test-chorioallantoic membrane (HET-CAM) bioassay. Fertilized hen's eggs weighing 50–60 g were obtained from Llorens SA poultry farm (Tarragona, Spain). The egg's shell and the inner membrane were previously removed; therefore, the chorioallantoic membrane (CAM) separating the embryo from the air chamber became visible.

In order to obtain a baseline of the test, to ensure the assay conditions do not provide an incorrect result,

a positive control (0.3 mL of 1% sodium dodecyl sulfate and 0.1 N NaOH) and a negative control (0.3 mL of 0.9% NaCl solution) were performed. In all, 0.3 mL of FB-PeCL-NPs were placed over the CAM and effects such as hemorrhage, lysis, and coagulation were documented within 5 minutes of application.²⁷ The ocular irritation index (OII) was calculated by the following expression:

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

where h (seconds) is the time of the first appearance of blood hemorrhages, l (seconds) is the time of the first appearance of vessel lysis, and c (seconds) is the time of the first appearance of protein coagulation on CAM. 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 ocular tolerance test

In vivo eye irritation was evaluated in pigs (Large White–Landrace) by the Draize eye test, which is the official technique for the evaluation of cosmetic and pharmaceutical products for ocular instillation by the interpretation of Kay and Calandra.²⁸ A single instillation of 50 μL of each sample was instilled in one eye using the untreated contralateral eye as a control, and then readings were performed 1 hour after sample application and then after 1 day, 2 days, 3 days, 4 days, and 7 days. The opacity (cornea), congestion and swelling (iris), and redness and discharge (conjunctiva) were graded on a scale from 0 to 4, 0 to 2, and 0 to 3, respectively, after evaluation by slit lamp. The Draize score was determined by visual assessment of changes in these ocular structures. The mean total score (MTS) was calculated as follows:

$$\text{MTS} = \sum \frac{x_1(n)}{5} + \sum \frac{x_2(n)}{2} - \sum \frac{x_3(n)}{5} \quad (6)$$

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

Ocular anti-inflammatory effect

The anti-inflammatory efficacy of FB-PeCL-NP formulations was tested in pigs by instillation of a single dose of 50 μL of sample tested or 0.9% (w/v) isotonic saline solution (control) in the conjunctival sac of the left eye. The contralateral eye was used as an untreated control. After 60 minutes,

50 μ L of 0.5% (w/v) sodium arachidonate solution (SAS) in PBS (pH 7.4) was instilled in the left eye. Inflammation was quantified from 30 minutes to 150 minutes after application of SAS according to a modified Draize scoring system.¹¹ Ocular changes were graded according to the MTS aforementioned.

Results and discussion

FB-P ϵ CL-NP particles characterization

Chemical parameters of FB-P ϵ CL-NPs freeze-dried with TRE (FD-NPsTRE) and FB-P ϵ CL-NPs freeze-dried with PEG3350 (FD-NPsPEG) maximize the desirable physicochemical properties of NPs under certain freeze-drying conditions. It is important to highlight that both formulations are different in terms of protectant agent type, protectant agent concentration, and P188 concentration as shown in Table 1. No significant difference was observed in Z_{av} of FD-NPsTRE and FD-NPsPEG, 191.7 \pm 1.9 nm and 190.4 \pm 1.3 nm, respectively. PI values of FD-NPsPEG were in the range of monodisperse systems (PI <0.1), whereas FD-NPsTRE showed PI values >0.1. Both formulations had similar negative surface charge, as indicated ZP values. Furthermore, the EE for both formulations reached 85%. These results are summarized in Table 2.

Since these formulations have a therapeutic goal, the powders of FD-NPsTRE and FD-NPsPEG were γ -irradiated (IR-NPsTRE and IR-NPsPEG). To have a complete study on the effects of these processes on FB release and ocular permeation profile, we decided to produce FB-P ϵ CL-NPs before freeze-drying and γ -irradiation sterilization. In this way, FB-P ϵ CL-NP suspensions with the protectant agent (NPsTRE and NPsPEG) and without the protectant agent (F-A and F-B) were prepared and their physicochemical properties were evaluated as shown in Table 2.

The results obtained demonstrate that γ -irradiation did not seem to have any effect on Z_{av} , PI, ZP, and EE of the optimized freeze-dried formulations. It can be observed that FD-NPsTRE and IR-NPsTRE showed significantly different PI values than FD-NPsPEG and IR-NPsPEG as evaluated by the statistical ANOVA ($P>0.05$). PI values of formulations prepared with TRE after freeze-drying and sterilization revealed less homogenous suspension than the other samples. It is well known that a smaller Z_{av} and a low PI involve a higher and closer contact with the drug-loaded particles and the biological tissue. This helps to obtain a more efficient permeation of the drug into the tissue.^{29,30}

It is widely known that higher ZP values, either positive or negative, allow greater long-term stability.³¹ In our case, all samples showed a negative ZP value ranging from -12.00 mV to -18.40 mV. This can be attributed to the presence of lactone residues on the polymeric matrix surface.³² Thus, all samples being assayed were considered to be satisfactory NP suspensions.

Hypotonic solution may cause corneal edema.³³ Hypertonic solution causes lachrymation, a burning sensation, and cell desquamation.^{34,35} As expected, F-A and F-B (suspension without therapeutic goal) showed hypo-osmolality values. Other samples displayed appropriate osmolality. The EE in the FB-P ϵ CL-NPs was found to be 86%. No significant differences were observed in the EE values for all samples.

Rheological studies

Rheological behavior of IR-NPsTRE, IR-NPsPEG, FD-NPsTRE, FD-NPsPEG, and their individual basic formulations (F-A and F-B) were analyzed.

All samples presented viscosity curves that were nearly constant with increasing shear rate corresponding to Newtonian behavior. F-A, FD-NPsTRE, and IR-NPsTRE

Table 2 Physicochemical properties and EE of FB-P ϵ CL-NPs

| FB-P ϵ CL-NPs | Z_{av} (nm) | PI | EE (%) | ZP (mV) | Osmolality (mOsm/kg) |
|------------------------|-----------------|-------------------|------------|-------------------|----------------------|
| F-A | 171.8 \pm 1.7 | 0.091 \pm 0.014 | 86 \pm 1 | -13.10 \pm 0.57 | 6 \pm 1 |
| NPsTRE | 170.6 \pm 3.2 | 0.090 \pm 0.011 | 87 \pm 1 | -12.70 \pm 0.32 | 315 \pm 3 |
| FD-NPsTRE | 191.7 \pm 1.9 | 0.139 \pm 0.012 | 85 \pm 1 | -12.00 \pm 0.42 | 296 \pm 3 |
| IR-NPsTRE | 187.5 \pm 1.2 | 0.131 \pm 0.015 | 86 \pm 0 | -13.20 \pm 0.17 | 305 \pm 1 |
| F-B | 175.9 \pm 0.0 | 0.078 \pm 0.006 | 85 \pm 1 | -17.70 \pm 0.11 | 9 \pm 1 |
| NPsPEG | 190.2 \pm 1.2 | 0.069 \pm 0.017 | 86 \pm 0 | -18.40 \pm 0.72 | 310 \pm 2 |
| FD-NPsPEG | 190.4 \pm 1.3 | 0.087 \pm 0.014 | 85 \pm 1 | -15.50 \pm 0.83 | 316 \pm 1 |
| IR-NPsPEG | 192.5 \pm 2.0 | 0.091 \pm 0.028 | 85 \pm 1 | -15.30 \pm 0.37 | 318 \pm 1 |

Notes: F-A, nanoparticles' suspension with P188 at 1.66%; NPsTRE, formulation prepared with trehalose as a protectant agent; F-B, nanoparticles' suspension with P188 at 3.5%; NPsPEG, formulation prepared with PEG3350 as a protectant agent. Data presented as mean \pm standard deviation.

Abbreviations: EE, entrapment efficiency; FB, flurbiprofen; P ϵ CL, poly(ϵ -caprolactone); NPs, nanoparticles; Z_{av} , mean particle size; PI, polydispersity index; ZP, zeta potential; FD, freeze-dried condition; IR, irradiated condition.

showed 1.225 ± 0.043 mPa/s, 1.608 ± 0.043 mPa/s, and 1.648 ± 0.038 mPa/s, respectively, as viscosity values. Likewise, F-B, FD-NPsPEG, and IR-NPsPEG showed 1.664 ± 0.056 mPa/s, 5.425 ± 0.043 mPa/s, and 6.594 ± 0.033 mPa/s, respectively, as viscosity values. Viscosity was increased in freeze-dried formulations due to the addition of protectant agents. FD-NPsTRE and IR-NPsTRE showed an extremely low viscosity in comparison with formulations prepared with PEG3350. IR-NPsPEG showed the greatest viscosity ($P < 0.05$). A low viscosity benefits redispersion after aqueous reconstitution and makes easy dispensing of the eye drop. Likewise, systems with low viscosity allow good tolerance with little blinking pain.²⁶

In vitro drug release

An in vitro release study of the FB from the protectant agent-free formulations (F-A and F-B), formulations with the protectant agent (NPsTRE and NPsPEG), optimized

freeze-dried formulations (FD-NPsTRE and FD-NPsPEG), sterilized freeze-dried formulations (IR-NPsTRE and IR-NPsPEG), and free drug solution (FB, dissolved in PBS) was conducted.

As represented in Figure 1A, the release profile of FB from the free drug solution exhibited faster and complete release behavior after 4 hours. F-A displayed a very similar release profile to the F-B ($P > 0.05$), more prolonged than exhibited by free drug. Similar results were obtained by Vega et al⁶ for the in vitro drug release with different amounts of P188.⁶

However, as seen in Figure 1B, FB release decreased when protectant agents were added to their respective basic formulation. It was more evident in NPsPEG than NPsTRE, which reached 62% and 82% after 10 hours of drug release, respectively. This trend was maintained in the following FB-PeCL-NPs states (freeze-dried and sterilized). These results could be attributed to the fact that an increase in the viscosity of the dispersion medium can decrease the rate of particle

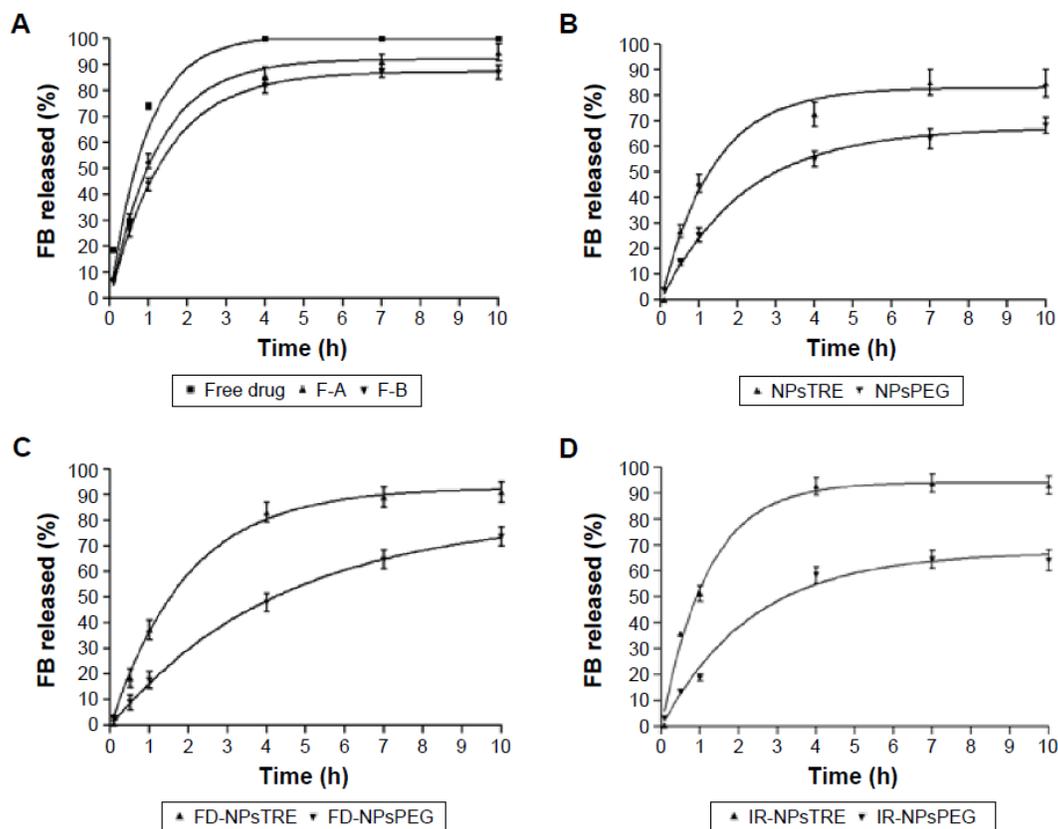


Figure 1 In vitro FB release profiles of (A) F-A and F-B, (B) NPsTRE and NPsPEG, (C) FD-NPsTRE and FD-NPsPEG, and (D) IR-NPsTRE and IR-NPsPEG, compared with free drug solution (mean \pm SD, n=3).

Notes: F-A, nanoparticles' suspension with P188 at 1.66%; F-B, nanoparticles' suspension with P188 at 3.5%; NPsTRE, formulation prepared with trehalose as protectant agent; NPsPEG, formulation prepared with PEG3350 as protectant agent.

Abbreviations: FB, flurbiprofen; FD, freeze-dried condition; IR, irradiated condition; h, hours; SD, standard deviation; NPs, nanoparticles.

sedimentation (according to the equation of Stokes' law).³⁶ Consequently, we can expect a slower rate of descent to ocular tissue in freeze-dried NPs with PEG3350 after aqueous reconstitution, thus allowing an extended dosage in the same proportion. The presence of Newtonian behavior ensures that blinking should have no effect on viscosity.³⁷

Also, the effective control of FB released either in the burst effect or over 10 hours in FD-NPsPEG and IR-NPsPEG can be related to the compact structure of the polymeric matrix obtained by the addition of PEG3350 that reduces FB diffusion rate, especially when water is removed during sublimation.³⁸

Comparative to the formulations using PEG, the samples with TRE added achieved a higher released amount of FB. Approximately 92%–94% of FB amount was released in the first 10 hours from FD-NPsTRE and IR-NPsTRE, respectively, as shown in Figure 1C and D. TRE was reported as a protectant agent that induces or increases the porosity of NPs.³⁹ It may open a pathway for a faster FB release from NPs and for its possible degradation by external factors. Two mechanisms of pore formation have been postulated, and it is probable that both contribute to the higher FB release rate. The surface of NPs and porosity of the final dried cake are strongly influenced by the freezing stage (freeze-drying process) due to the elimination of the ice crystals by sublimation, creating an open network of pores that may affect the morphological characteristics of NPs. Furthermore, TRE is able to form more flexible hydrogen bonds with NPs; thus, it is removed more easily from the surface of NPs and FB is released in a higher amount.^{39,40}

The literature reported the effect of γ -irradiation on PeCL structure; upon irradiation, the polymer displays cross-linking between polymeric chains or even between surfactant and PeCL chains.⁴¹ As can be seen in Figure 1D, the release profile of NPs did not significantly change after γ -irradiation. Only the intrinsic viscosity of FB-PeCL-NPs using PEG added increased from 5.425 mPa/s to 6.594 mPa/s after irradiation. This leads to the assumption that the release was slightly modified after sterilization, although, the γ -irradiation at 25 kGy did not determine cross-linking or modification reactions in the matrix components. Probably, this effect was reduced by the higher amounts of PEG3350 contained in the dried NPs. On the other hand, IR-NPsTRE displayed a very similar release rate than the free drug solution ($P>0.05$). Besides their rheological properties and the γ -irradiation effects on PeCL aforementioned, this may be because of easy breakdown of TRE coat by sterilization, facilitating a direct exposition of NP. Some authors reported that TRE increases drug release, which corroborated the profiles obtained.^{20,42,43}

Here, it can be suggested that PEG3350 protected FB-PeCL-NPs more successfully than TRE at the studied concentration, although γ -radiation may influence the drug release kinetics.

The evaluation of FB degradation after irradiation was performed by RP-HPLC. The irradiated sample's chromatograms were similar to the non-irradiated sample's chromatograms and did not reveal any evidence of the drug radiolysis in the tested irradiation dose.

Furthermore, as shown in Table 3, all samples were adjusted to various kinetic models, such as zero order,

Table 3 Parameters for kinetic models of FB-PeCL-NP formulations and free drug solution

| Models | Parameters | Units | F-A | NPsTRE | FD-NPsTRE | IR-NPsTRE | F-B | NPsPEG | FD-NPsPEG | IR-NPsPEG | Free drug |
|-------------|--------------|----------------------|--------|--------|-----------|-----------|--------|--------|-----------|-----------|-----------|
| Zero order | AIC | – | 48.176 | 47.546 | 48.385 | 50.614 | 47.643 | 41.204 | 37.034 | 43.442 | 51.021 |
| | r^2 | | 0.757 | 0.762 | 0.792 | 0.684 | 0.762 | 0.866 | 0.946 | 0.819 | 0.639 |
| First order | AIC | – | 22.546 | 29.845 | 23.318 | 27.804 | 13.193 | 18.028 | 11.809 | 26.027 | 38.677 |
| | r^2 | | 0.997 | 0.988 | 0.997 | 0.993 | 0.999 | 0.997 | 0.999 | 0.990 | 0.954 |
| | K_f | minute ⁻¹ | 0.820 | 0.736 | 0.510 | 0.839 | 0.703 | 0.455 | 0.225 | 0.424 | 1.054 |
| | SD | | 0.051 | 0.097 | 0.040 | 0.079 | 0.022 | 0.033 | 0.013 | 0.062 | 0.217 |
| | Q_{∞} | μg | 91.90 | 82.81 | 92.40 | 94.17 | 87.22 | 67.02 | 81.70 | 67.25 | 100.90 |
| | SD | | 1.484 | 2.819 | 1.970 | 2.287 | 0.716 | 1.384 | 1.954 | 2.864 | 5.405 |
| | $t_{1/2}$ | minute | 0.845 | 0.942 | 1.358 | 0.827 | 0.986 | 1.524 | 3.079 | 1.634 | 0.657 |
| Hyguchi | AIC | – | 42.607 | 41.874 | 42.256 | 46.046 | 41.950 | 32.594 | 24.548 | 37.685 | 47.500 |
| | r^2 | | 0.904 | 0.907 | 0.931 | 0.853 | 0.908 | 0.968 | 0.993 | 0.931 | 0.799 |
| Hyperbola | AIC | – | 22.875 | 27.638 | 31.732 | 33.046 | 26.227 | 12.467 | 7.930 | 30.817 | 40.655 |
| | r^2 | | 0.996 | 0.991 | 0.987 | 0.983 | 0.993 | 0.999 | 0.999 | 0.978 | 0.936 |

Notes: F-A, nanoparticles' suspension with P188 at 1.66%; NPsTRE, formulation prepared with trehalose as a protectant agent; F-B, nanoparticles' suspension with P188 at 3.5%; NPsPEG, formulation prepared with PEG3350 as a protectant agent; r^2 , determination coefficient; K_f , release rate constant; Q_{∞} , maximum amount of dissolved drug; $t_{1/2}$, drug half-life.

Abbreviations: FB, flurbiprofen; PeCL, poly(ϵ -caprolactone); NPs, nanoparticles; FD, freeze-dried condition; IR, irradiated condition; AIC, Akaike's information criterion; SD, standard deviation.

first order, Higuchi, and hyperbola. In this case, the most of the formulations followed the first-order model, which was also confirmed by the coefficient of determination, r^2 (highest value), except for NPsPEG and FD-NPsPEG that followed a hyperbola kinetic model. As FB is homogeneously distributed in the polymeric matrix, the drug release occurs by drug diffusion mechanism. Moreover, the low molecular weight of FB (244.25 Da) improves the diffusion mechanism.⁶

FB release from the irradiated samples depended on chemical properties provided by the protectant agent even though the FB release profiles were influenced by freeze-drying. The release pattern was not affected by the P188 amount – even by size homogeneity of NPs in suspension (PI).

In order to help us to predict in vivo release behavior and elucidate the detailed release mechanism of this colloidal system, studies on drug release kinetics are fundamental. The corresponding biopharmaceutical parameters were determined to confirm the results observed in Figure 1. Although there were not statistically differences between F-A and F-B, it could be observed that samples with PEG (NPsPEG, FD-NPsPEG, and IR-NPsPEG) showed a constant weak release rate (K_p) against formulations containing TRE (NPsTRE, FD-NPsTRE, and IR-NPsTRE). The maximum concentration of released drug (Q_∞) from IR-NPsTRE and IR-NPsPEG was $379.20 \pm 19.44 \mu\text{g}$ and $267.10 \pm 20.06 \mu\text{g}$, respectively ($P < 0.05$). It could be seen that PEG3350 increased drug half-life in comparison with TRE that maintained a drug half-life similar to the free drug solution as evaluated by the statistical ANOVA ($P > 0.05$).

Ocular permeation study

The ocular permeability of drugs is clinically important as it is one of the major factors that determine the efficacy of

topically applied preparations. An ex vivo permeation study was carried out to compare the permeation profile of FB from the optimized freeze-dried formulations (FD-NPsTRE and FD-NPsPEG), sterilized formulations (IR-NPsTRE and IR-NPsPEG), FB-PeCL-NPs suspensions with and without protectant agent (NPsTRE, NPsPEG, F-A, F-B), and free drug solution. Table 4 shows the permeation parameters of the formulations and the amount of drug retained (Q_r). The results of the permeation studies were compared using a parametric statistical assay (the ANOVA test), followed by Tukey's multiple comparison test ($P < 0.05$).

Corneal permeation study

The transcorneal permeation profile of FB is shown in Figure 2. F-A showed a smaller K_p than F-B. It is well known that transcorneal permeation of a lipophilic drug, like FB, is higher than hydrophilic drugs. The higher amount of P188 in F-B probably reinforced the penetration of FB in the cornea as shown in Figure 2A. However, as seen in Figure 2B, the performance changed when a protector was added.

In freeze-dried NPs, TRE had a stronger influence on the permeation properties. In spite of FD-NPsPEG and IR-NPsPEG presenting better homogeneity in morphometric characteristics, FD-NPsTRE and IR-NPsTRE reached a significantly higher K_p . Noticeably, IR-NPsPEG displayed the smallest K_p and the largest amount of drug retained in the cornea, $33.95\% \pm 0.99\% / \text{cm}^2 \cdot \text{g}$.

It can be seen from Figure 2C and D an increase in K_p from FD-NPsTRE to IR-NPsTRE ($P < 0.05$), while K_p from FD-NPsPEG to IR-NPsPEG was maintained ($P > 0.05$). Only the IR-NPsTRE reached similar amount of FB permeated through the corneal tissue to free drug solution, $116.03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $119.70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. They represented $58.02\% \pm 2.45\%$ and $59.85\% \pm 1.95\%$ of total exposed

Table 4 FB corneal and scleral permeation parameters from FB-PeCL-NP formulations and free drug solution

| FB-PeCL-NPs | Cornea | | | Sclera | | |
|-------------|-------------|-----------------------------|------------------------------|-------------|-----------------------------|------------------------------|
| | T_L (h) | $K_p \times 10^{-2}$ (cm/h) | Q_r (%/cm ² ·g) | T_L (h) | $K_p \times 10^{-2}$ (cm/h) | Q_r (%/cm ² ·g) |
| F-A | 0.008±0.098 | 1.156±0.144 | 17.96±0.38 | 2.045±0.164 | 1.045±0.045 | 34.15±1.03 |
| NPsTRE | 0.936±0.112 | 1.616±0.150 | 18.78±1.34 | 2.478±0.125 | 0.931±0.073 | 25.25±1.44 |
| FD-NPsTRE | 1.249±0.095 | 1.668±0.118 | 12.49±0.94 | 1.700±0.832 | 0.289±0.061 | 19.82±1.78 |
| IR-NPsTRE | 0.965±0.127 | 2.368±0.132 | 13.95±1.43 | 2.605±0.821 | 0.525±0.092 | 11.31±0.34 |
| F-B | 1.190±0.108 | 1.624±0.095 | 15.52±2.03 | 2.533±0.184 | 1.026±0.075 | 21.75±1.82 |
| NPsPEG | 0.194±0.092 | 1.077±0.168 | 14.76±1.79 | 1.626±0.173 | 0.657±0.057 | 14.51±2.18 |
| FD-NPsPEG | 1.554±0.132 | 1.134±0.128 | 11.18±2.45 | 1.748±0.184 | 0.410±0.088 | 13.30±1.63 |
| IR-NPsPEG | 1.025±0.117 | 0.841±0.131 | 33.95±0.99 | 1.632±0.192 | 0.392±0.037 | 15.08±1.85 |
| Free drug | 0.223±0.243 | 2.048±0.192 | 25.45±1.89 | 1.787±0.274 | 1.824±0.836 | 27.10±1.93 |

Notes: T_L , Drug lag time; K_p , permeability coefficient; Q_r , amount of drug retained; F-A, nanoparticles' suspension with P188 at 1.66%; NPsTRE, formulation prepared with trehalose as a protectant agent; F-B, nanoparticles' suspension with P188 at 3.5%; NPsPEG, formulation prepared with PEG3350 as a protectant agent.

Abbreviations: FB, flurbiprofen; PeCL, poly(ϵ -caprolactone); NP, nanoparticle; h, hour; FD, freeze-dried condition; IR, irradiated condition.

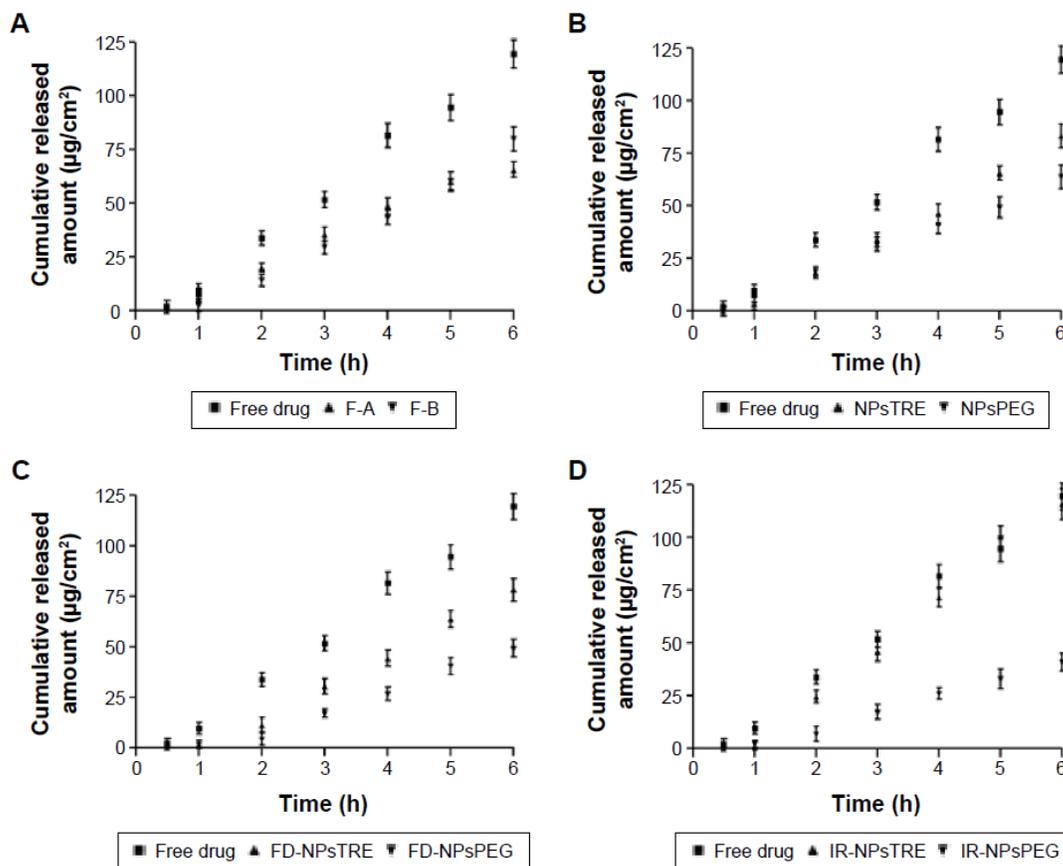


Figure 2 Ex vivo corneal permeation profile of FB from (A) F-A and F-B, (B) NPsTRE and NPsPEG, (C) FD-NPsTRE and FD-NPsPEG, and (D) IR-NPsTRE and IR-NPsPEG, compared with free drug solution after 6 h (mean \pm SD, $n=3$).

Notes: F-A, nanoparticles' suspension with P188 at 1.66%; F-B, nanoparticles' suspension with P188 at 3.5%; NPsTRE, formulation prepared with trehalose as a protectant agent; NPsPEG, formulation prepared with PEG3350 as a protectant agent.

Abbreviations: FB, flurbiprofen; FD, freeze-dried condition; IR, irradiated condition; h, hours; SD, standard deviation; NPs, nanoparticles.

sample amount without significant differences. As was aforementioned, besides TRE lends to expose drug directly through pore formation, sterilization could help to break TRE core; thus, TRE enhances cornea permeation of FB. Furthermore, in spite of their intrinsic viscosity, it was noted that IR-NPsTRE and IR-NPsPEG took a similar time to fill the stratum corneum, T_L ($P>0.05$).

The results indicate that the inclusion of FB in the PeCL matrix with TRE as an additive can help considerably in the penetration of the drug across the cornea after γ -irradiation. Moreover, Q_r from IR-NPsPEG was higher than Q_r from IR-NPsTRE – this is in accordance with the low FB release profile presented by IR-NPsPEG.

HL is a parameter frequently used to evaluate the ideal cornea conditions. The normal cornea has an HL of 76%–80%. A hydration level that is 3%–7% above the normal value

denotes the epithelium or endothelium damage.⁴⁴ The HL was maintained within the accepted range (78.79%–81.35%) for all formulations and corroborated the lack of damage on the corneal tissue.

Scleral permeation study

Scleral is a fairly leaky tissue that has 20 times greater surface area (potential drug depot) than the cornea tissue. The transscleral delivery route offers advantages over the corneal route, such as metabolic inactivity and high permeability to macromolecules.^{45,46} So far, FB permeation has been studied in the sclera.

The ex vivo permeation of FB after 6 hours through the scleral tissue can be seen in Figure 3. FB was able to traverse across sclera in spite of the transscleral pathway fairly permeable just to hydrophilic molecules.⁴⁷ The largest

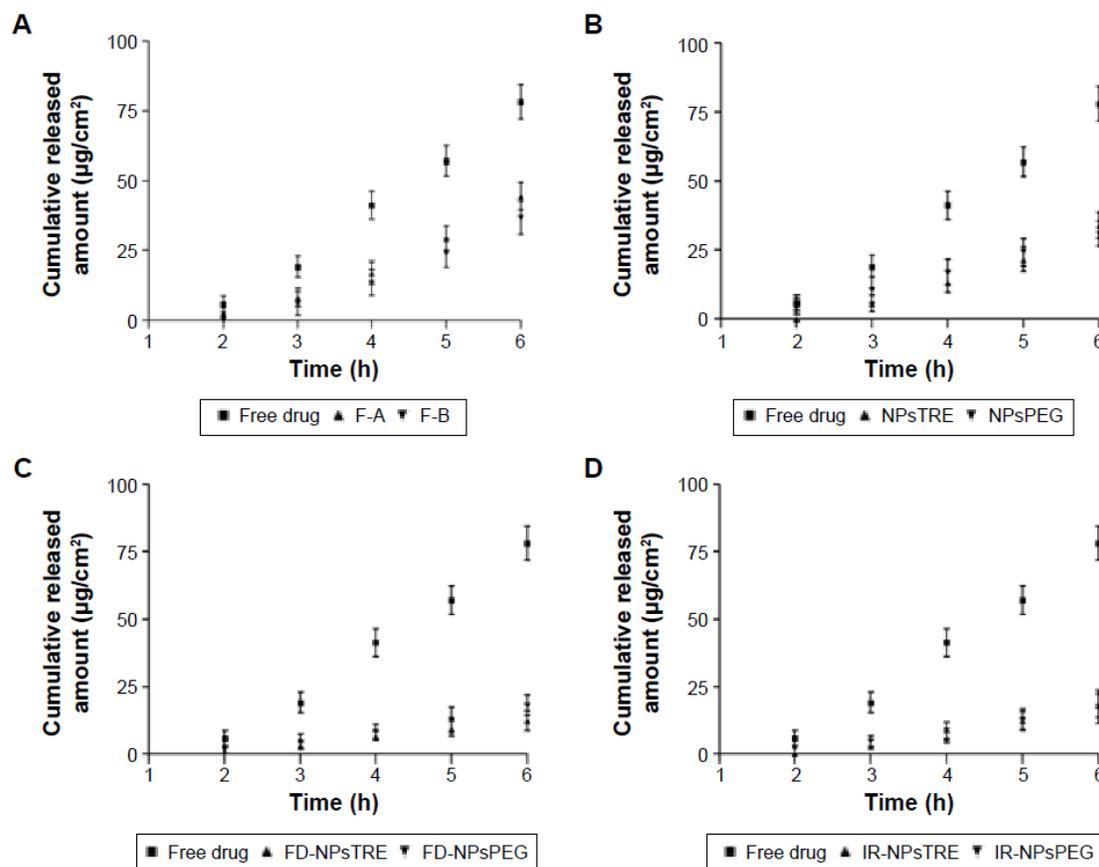


Figure 3 Ex vivo sclera permeation profile of FB from (A) F-A and F-B, (B) NP_sTRE and NP_sPEG, (C) FD-NP_sTRE and FD-NP_sPEG, and (D) IR-NP_sTRE and IR-NP_sPEG, compared with free drug solution after 6 h (mean \pm SD, n=3).

Notes: F-A, nanoparticles' suspension with P188 at 1.66%; F-B, nanoparticles' suspension with P188 at 3.5%; NP_sTRE, formulation prepared with trehalose as a protectant agent; NP_sPEG, formulation prepared with PEG3350 as a protectant agent.

Abbreviations: FB, flurbiprofen; FD, freeze-dried condition; IR, irradiated condition; h, hours; SD, standard deviation; NPs, nanoparticles.

K_p , $1,824 \pm 0.836 \times 10^{-2}$ cm/h was displayed by the free drug solution, while K_p corresponding to F-A and F-B was similar ($P > 0.05$).

However, a K_p decrease in samples with the addition of the protective agent was observed. The results showed that the additive influenced reduced scleral permeability. The freeze-drying process and γ -irradiation did not have any effect on the K_p parameter ($P > 0.05$). Moreover, FB from all samples took similar times to permeate the sclera (lag time). The Q_t in sclera from IR-NP_sTRE and IR-NP_sPEG was similar and considerably less than Q_t from the free drug solution.

As illustrated in Figure 3D, IR-NP_sTRE and IR-NP_sPEG reached a similar cumulative permeated FB amount through the scleral tissue, $18.20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $17.70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively. They represented $9.10\% \pm 0.86\%$ and $8.85\% \pm 0.57\%$ of total exposure sample amount, indicating no therapeutic efficacy

difference ($P > 0.05$). Moreover, the amount of FB permeated through sclera from the free drug solution was not as high as permeated from the cornea. The amount was $78.20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and represented only 39.10% of the total exposure sample amount. This result showed that morphometric characteristic (PI) and viscosity of formulations were less important than FB chemical affinity in the target tissues. It is clear that free drug solution showed upper permeation efficacy; however, this assay did not consider the rapid elimination of solution through the blinking of the eye and drainage of tear flow – nasolacrimal, which reduces its bioavailability to $\sim 75\%$.⁴⁸

In vitro and in vivo tolerance studies

After application of 0.3 mL of irradiated FB-PeCL-NPs on the CAM, no effect of hemorrhage, lysis, or coagulation was observed. An OII of 0.02 ± 0.08 and 0.07 ± 0.06 was obtained in

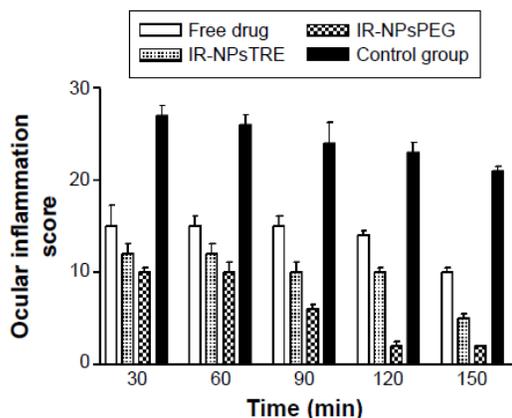


Figure 4 Anti-inflammatory activities of FB from the IR-NPsTRE and IR-NPsPEG formulations, free drug solution, and control (SAS) mean \pm SD, n=3.

Notes: NP_sTRE, formulation prepared with trehalose as a protectant agent; NP_sPEG, formulation prepared with PEG3350 as a protectant agent.

Abbreviations: FB, flurbiprofen; IR, irradiated condition; SAS, sodium arachidonate solution; min, minutes; SD, standard deviation; NP_s, nanoparticles.

IR-NPsTRE and IR-NPsPEG, respectively. Therefore, these formulations were classified into the OII of “non-irritant”, which indicates optimal ocular tolerance. According to Draize eye test, no sign of ocular inflammation, congestion, swelling, or lacrimation was observed (scores were zero in both cases). These results are in accordance with those obtained by the HET-CAM and thus can be classified as non-irritating, safe products for ophthalmic administration.

Efficacy of ocular anti-inflammatory effect

As seen in Figure 4, the ocular anti-inflammatory activity of irradiated FB-PeCL-NPs demonstrated a decrease in the

ocular inflammation caused by instillation of SAS. During the first 60 minutes, no statistically significant differences were observed between IR-NPsTRE, IR-NPsPEG, and the free drug solution. After 90 minutes, IR-NPsPEG exhibited significant differences when compared to the free drug solution. Finally, after 120 minutes, IR-NPsPEG exhibited statistically higher anti-inflammatory effect than IR-NPsTRE, which correlated directly with the Q_t values in the ocular tissues shown in Table 4.

Although the free drug solution showed high Q_t values of FB in the cornea and sclera, it performed a lower anti-inflammatory efficacy compared to the NP formulations after 90 minutes. This anti-inflammatory efficacy of longer duration can be explained by the formation of FB depot by adhesive effect that promotes a slow drug release and consequently a continuous pharmacological action.

Stability studies

The recorded transmission profiles of IR-NPsTRE and IR-NPsPEG gave relevant information regarding the intrinsic suspension stability. After 15 days, a variation of BS on the right side of the IR-NPsTRE fingerprint (bottom vial) indicated a sedimentation process (Figure 5A), considered a reversible physical process. On the other hand, in IR-NPsPEG, the presence of creaming, sedimentation, or flocculation was undetected for >30 days (Figure 5B). These results may be related to the strong PEG3350 influence over increased viscosity to stabilize this colloidal system than the steric stabilization given by P188. The higher ZP of IR-NPsPEG also has a better positive impact on the system stability than IR-NPsTRE.

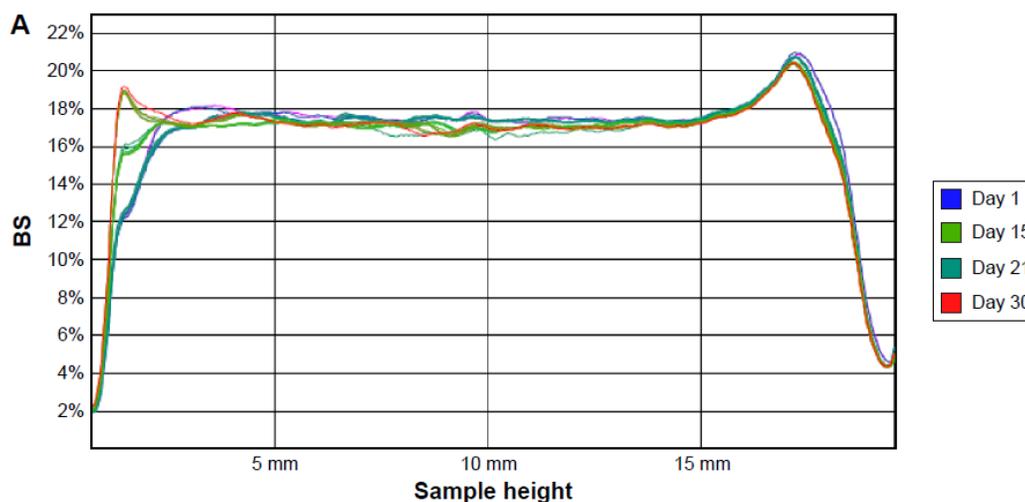


Figure 5 (Continued)

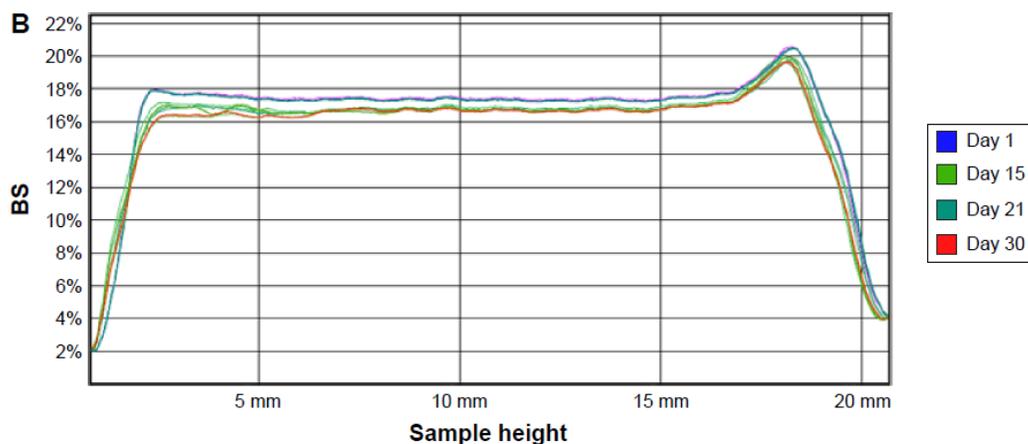


Figure 5 BS profiles of (A) IR-NPs-TRE and (B) IR-NPs-PEG analyzed at different days during 30 days of storage at 4°C.
Notes: NPs-TRE, formulation prepared with trehalose as a protectant agent; NPs-PEG, formulation prepared with PEG3350 as a protectant agent.
Abbreviations: BS, backscattering; IR, irradiated condition; NPs, nanoparticles.

The slight changes in the bottom and top are attributed to the meniscus of the samples forming contact with the glass. In parallel with these studies, possible changes in the mean particle size were monitored by photon correlation spectroscopy analysis. There were no significant differences in stability during the monitored time.

Conclusion

A Goldmann's criteria analysis was performed on FB-loaded polycaprolactone NPs prepared with trehalose and PEG3350 as protective agents. In vitro release profiles showed that both additives, trehalose and PEG3350, gave inherent characteristics to their basic formulation components, which could promote or hinder FB release. Such characteristics have a stronger effect than the NP morphometrical characteristics in the permeation rate. Regarding transcorneal permeation, freeze-drying and γ -irradiation hindering FB release from formulations PEG added, while these conditions have an adverse effect on added formulations of TRE. However, these processes did not influence transscleral permeation.

Ocular irritating effects were absent in both in vitro and in vivo tests. In summary, both formulations could be employed as a controlled release formulation in preclinical studies; however, out of the two formulations, it must be noted that the PEG3350 formulation has a greater potential based on longer satisfactory anti-inflammatory effects.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Spanish Ministry of Science and Innovation (grants MAT2011-26994 and MAT2014-59134R). GR Ramos Yacasi would also like to

acknowledge the kind help of Doctor Sasha Nikolic from Reig Jofre Group of Barcelona, Spain, for his useful advice regarding the freeze-drying process.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Mueller JB, McStay CM. Ocular infection and inflammation. *Emerg Med Clin North Am.* 2008;26(1):57–72.
- Ahuja M, Dhake AS, Sharma SK, Majumdar DK. Topical ocular delivery of NSAIDs. *AAOJ.* 2008;10(2):229–241.
- Vasconcelos A, Vega E, Pérez Y, Gómara MJ, García ML, Haro I. Conjugation of cell-penetrating peptides with poly (lactide-co-glycolic acid)-polyethylene glycol nanoparticles improves ocular drug delivery. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:609–631.
- Vega E, Gamisans F, García ML, Chauvet A, Lacoulonche F, Egea MA. PLGA nanospheres for the ocular delivery of flurbiprofen: drug release and interactions. *J Pharm Sci.* 2008;97(12):5306–5317.
- Gonzalez-Mira E, Egea MA, Souto EB, Calpena AC, García ML. Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for ocular delivery. *Nanotechnology.* 2011;22(4):045101.
- Vega E, Egea MA, Valls O, Espina M, Garci ML. Flurbiprofen loaded biodegradable nanoparticles for ophtalmic administration. *J Pharm Sci.* 2006;95(11):2393–2405.
- Furrer P, Delie F, Plazzonnet B. Ophthalmic drug delivery. In: Rathbone MJ, Hadgraft J, Roberts MS, Lane ME, editors. *Modified-Release Drug Delivery Technology.* Raleigh, NC: Pharmaceu Tech, Inc; 2008:59–84.
- Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(15):1688–1713.
- Vega E, Egea M, Calpena A. Role of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on freeze-dried and gamma-irradiated PLGA and PLGA-PEG diblock copolymer nanospheres for ophthalmic. *Int J Nanomedicine.* 2012;7(1):1357–1371.
- Kroll C, Borchert H, Kissel T. Tetracycline-HCl-loaded poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres prepared by a spray drying technique: influence of γ -irradiation on radical formation and polymer degradation. *J Control Release.* 1999;59(1):23–32.

11. Wilhelmus KR. The Draize eye test. *Surv Ophthalmol*. 2015;45(6):493–515.
12. Vinardell MP, Mitjans M. Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. *J Pharm Sci*. 2008;97(1):46–59.
13. Mohanty B, Mishra S, Majundar D. Effect of formulation factors on in vitro transcorneal permeation of voriconazole from aqueous drops. *J Adv Pharm Technol Res*. 2013;4(4):210–216.
14. Ghate D, Edelhauser HF. Ocular drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2006;3(2):275–287.
15. Ruiz-Ederra J, García M, Hernández M, et al. The pig eye as a novel model of glaucoma. *Exp Eye Res*. 2005;81(5):561–569.
16. Nicoli S, Ferrari G, Quarta M, et al. Porcine sclera as a model of human sclera for in vitro transport experiments: histology, SEM, and comparative permeability. *Mol Vis*. 2009;15:259–266.
17. Olsen TW, Edelhauser HF, Lim JJ, Geroski DH. Human scleral permeability: effects of age, cryotherapy, transscleral diode laser, and surgical thinning. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36(9):1893–1903.
18. Olsen TW, Sanderson S, Feng X, Hubbard WC. Porcine sclera: thickness and surface area. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(8):2529–2532.
19. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammouy N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm*. 1989;55(1):R1–R4.
20. Bozdag S, Dillen K, Vandervoort J, Ludwig A. The effect of freeze-drying with different cryoprotectants and gamma-irradiation sterilization on the characteristics of ciprofloxacin HCl-loaded poly(D,L-lactide-glycolide) nanoparticles. *J Pharm Pharmacol*. 2005;57(6):699–707.
21. Kowalski JB, Aoshuang Y, Tallentire A. Radiation sterilization: evaluation of a new approach for substantiation of 25 kGy. *Radiat Phys Chem*. 1999;58(2000):77–86.
22. Celia C, Trapasso E, Cosco D, Paolino D, Fresta M. Turbiscan lab expert analysis of the stability of ethosomes and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2009;72(1):155–160.
23. Franz TJ. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol*. 1975;64(3):190–195.
24. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci*. 2001;13(2):123–133.
25. Alvarado HL, Abrego G, Souto EB, et al. Nanoemulsions for dermal controlled release of oleanolic and ursolic acids: in vitro, ex vivo and in vivo characterization. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015;130:40–47.
26. Parra A, Mallandrich M, Clares B, et al. Design and elaboration of freeze-dried PLGA nanoparticles for the transcorneal permeation of carprofen: ocular anti-inflammatory applications. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015;136:935–943.
27. Tavaszi J, Budai P. The use of HET-CAM test in detecting the ocular irritation. *Commun Agric Appl Biol Sci*. 2007;72(2):137–141.
28. Kay J, Calandra J. Interpretation of eye irritation tests. *J Soc Cosmet Chem*. 1962;13:281–289.
29. Liu CH, Wu CT. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2010;353(2–3):149–156.
30. 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(1):2–13.
31. Feng S, Huang G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol®) from nanospheres of biodegradable polymers. *J Control Release*. 2001;71(1):53–69.
32. Ravi PR, Vats R, Dalal V, Gadekar N, Aditya N. Design, optimization and evaluation of poly-ε-caprolactone (PCL) based polymeric nanoparticles for oral delivery of lopinavir. *Drug Dev Ind Pharm*. 2015;41(1):131–140.
33. Ludwig A, Van Ooteghem M. The influence of the osmolality on the precorneal retention of ophthalmic solutions. *J Pharm Belg*. 1987;42(4):259–266.
34. Motolko M, Breslin CW. The effect of pH and osmolarity on the ability of tolerate artificial tears. *Am J Ophthalmol*. 1981;91(6):781–784.
35. Holly FJ, Lamberts DW. Effect of nonisotonic solutions on tear film osmolality. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981;20(2):236–245.
36. Yadollahi R, Vasilev K, Simovic S. Nanosuspension technologies for delivery of poorly soluble drugs. *J Nanomater*. 2015;2015:13.
37. Alvarado HL, Abrego G, Garduño-Ramirez ML, Clares B, Calpena AC, García ML. Design and optimization of oleanolic/ursolic acid-loaded nanoplateforms for ocular anti-inflammatory applications. *Nanomedicine*. 2015;11(3):521–530.
38. Dorati R, Genta I, Montanari L, et al. The effect of γ-irradiation on PLGA/PEG microspheres containing ovalbumin. *J Control Release*. 2005;107(1):78–90.
39. Fonte P, Soares S, Costa A, et al. Effect of cryoprotectants on the porosity and stability of insulin-loaded PLGA nanoparticles after freeze-drying. *Biomater*. 2012;2(4):329–339.
40. Kasper JC, Friess W. The freezing step in lyophilization: physicochemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;78(2):248–263.
41. Narkis M, Sibony-Chaouat S, Siegmann A, Shkolnik S, Bell JP. Irradiation effects on polycaprolactone. *Polymer (Guildf)*. 1985;26(1):50–54.
42. Singh KK, Shegokar R. Conversion of stavudine lipid nanoparticles into dry powder. *Int J Pharma Bio Sci*. 2011;2(1):443–457.
43. Bartolotta A, D'Oca MC, Campisi M, et al. Effects of gamma-irradiation on trehalose-hydroxyethylcellulose microspheres loaded with vancomycin. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005;59(1):139–146.
44. Schoenwald R, Huang H. Corneal penetration behavior of beta-blocking agents I: physicochemical factors. *J Pharm Sci*. 1983;72(11):4–10.
45. Ayalasomayajula SP, Kompella UB. Retinal delivery of celecoxib is several-fold higher following subconjunctival administration compared to systemic administration. *Pharm Res*. 2004;21(10):1797–1804.
46. Prausnitz MR, Noonan JS. Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye. *J Pharm Sci*. 1998;87(12):1479–1488.
47. Geroski DH, Edelhauser HF. Transscleral drug delivery for posterior segment disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;52(1):37–48.
48. Tangri P, Khurana S. Basics of ocular drug delivery systems. *Int J Res Pharm Biomed Sci*. 2011;2(4):1541–1552.

International Journal of Nanomedicine

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

Dovepress

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

4. DISCUSIÓN

En la presente memoria se ha llevado a cabo la optimización del proceso de liofilización de FB, agente antiinflamatorio no esteroideo, asociado a sistemas coloidales de liberación controlada de fármacos de naturaleza polimérica en forma de NPs, evaluando su influencia en el comportamiento biofarmacéutico con el fin de favorecer la biodisponibilidad tópica del fármaco a nivel ocular para prevenir y/o tratar el dolor y la inflamación que afectan a las estructuras del segmento anterior del ojo.

Las NPs desarrolladas se elaboraron a partir de poliésteres alifáticos de P&ECL, cuyas características tales como: biocompatibilidad, cinética de degradación más lenta que cualquier otro poliéster biodegradable, facilidad de producción y atoxicidad han inducido a los investigadores a utilizarlos en sistemas de liberación controlada de fármacos [61,62]. Siendo la P&ECL un polímero hidrofóbico y de degradación lenta se le considera como un vehículo adecuado para incorporar fármacos lipofílicos como el FB (solubilidad en agua a 37 °C: 0.03 mg/mL).

Para la elaboración de las NPs se seleccionó el método de desplazamiento del solvente ya que es un procedimiento reproducible, rápido y económico para la preparación de NPs poliméricas monodispersas en un intervalo de tamaños de aproximadamente 50-300 nm [68,91]. Esta técnica implica la interacción de dos medios; un medio orgánico, donde el polímero y el fármaco son disueltos en acetona, que se adicionada gota a gota sobre un medio acuoso en presencia de un estabilizante (en nuestro caso P188) bajo agitación magnética. El medio orgánico al entrar en contacto con el medio acuoso provoca la insolubilización del polímero, el cual precipita ayudado por la rápida difusión del solvente que posteriormente, es eliminado mediante rotaevaporación a presión reducida [47]. El mecanismo de formación de las NPs por esta técnica se debe a la turbulencia interfacial que se genera durante el desplazamiento del solvente.

El P188, un copolímero tribloque biocompatible, fue seleccionado como tensioactivo (agente estabilizante) en la preparación de NPs de P&ECL debido a su prácticamente nula toxicidad y a su aprobación por la FDA. Ello permite la administración tópica de

estos sistemas coloidales sin necesidad de eliminación previa del tensioactivo no asociado al polímero.

La elaboración de las NPs mediante la técnica de desplazamiento del solvente es un proceso complejo, en el cual muchos parámetros experimentales definen las características del producto final. Los ajustes sustanciales de las concentraciones de P&CL para producir NPs con un contenido alto de FB y las características morfológicas apropiadas (tamaño promedio, PI, potencial zeta) fueron elegidos basándonos en base a estudios previos realizados en nuestro laboratorio para asegurar el cumplimiento de las exigencias básicas de la vía tópica ocular (tamaño de partícula reducido, homogeneidad de la muestra, elevada asociación del fármaco al polímero y una buena estabilidad física).

La elevada sensibilidad de las NPs al estrés fisicoquímico durante el proceso de elaboración y sobre todo durante el almacenamiento es la mayor dificultad para sus aplicaciones farmacéuticas. Por ello, las formulaciones de fármacos basados en NPs poliméricas se preparan comúnmente como formas de dosificación sólidas debido a que se logra una mayor estabilidad en el sólido que en el estado líquido y además proporciona otros beneficios tales como la facilidad de manejo y almacenamiento y la reducción en los costes de transporte, entre otros [83].

Dentro de los diferentes procesos de secado utilizados, la liofilización es considerada como un proceso altamente estabilizante. La liofilización es una operación multietapa en la que, obviamente, cada paso es crítico. Los principales factores de este proceso son bien conocidos y deben estar bajo estricto control para lograr una operación exitosa. Por lo tanto, antes de la liofilización, la formulación de NPs debe caracterizarse físicamente y seguidamente, los parámetros del proceso de liofilización necesitan ser optimizados con respecto a las características de la formulación. De esta manera, considerando los principios fisicoquímicos implicados se logra minimizar los enfoques de ensayo y error [81].

En el **Artículo 1**, la preparación de NPs de P&CL por el método de desplazamiento del solvente con un tamaño promedio de 176.0 ± 0.1 nm, un PI de 0.086 ± 0.010 y un potencial zeta de -17.20 ± 0.15 mV, se llevó a cabo de una manera reproducible y

eficiente. El tamaño de partícula es un factor importante en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos para vía ocular debido a que conlleva al riesgo de irritación ocular [92]: las partículas de elevado tamaño inducen a la secreción lagrimal refleja que incrementa el drenaje lagrimal, lo cual lleva a la eliminación de la dosis instilada reduciendo la biodisponibilidad del fármaco debido a una disminución del tiempo de residencia del activo en el saco conjuntival. Por otro lado, los tamaños de partícula pequeños (aprox. 100 nm) favorecen la penetración a través de las barreras oculares que aquellos de tamaño mayor (entre 800-1000 nm) [51].

Asimismo, otro factor importante es la carga superficial de las NPs. Valores de potencial zeta más elevados, tanto positivos como negativos, tienden a estabilizar las suspensiones debido a que la repulsión electrostática que existe entre las partículas con la misma carga superficial, previene la agregación de las mismas. En nuestro caso, las FB-P ϵ CL-NPs presentan carga superficial negativa como resultado de los grupos carboxílicos terminales en la superficie de las partículas, que son característicos en estos tipos de sistemas [57].

Aunque la liofilización posee numerosas ventajas sobre otros procesos de secado, también conlleva ciertos desafíos. Este proceso implica fuerzas inherentes de desestabilización que pueden afectar las cualidades de las NPs, por lo que es habitual el uso de excipientes, como crio- y lioprotectores. Su selección debe ser cuidadosamente pensada, ya que no existe una relación directa entre su uso y la estabilización de NPs. Por ello como primer paso para la obtención de un protocolo de liofilización adecuado para las FB-P ϵ CL-NPs, se realizó un rastreo para la selección del excipiente más apropiado como agente protector [93].

Primeramente, las muestras liofilizadas en viales pasaron una inspección visual, donde presentaron buena apariencia y un aspecto uniforme. El volumen seco de las muestras fue idéntico al de la suspensión coloidal inicial (por tanto, sin colapso o contracción en la pastilla liofilizada), lo que indica que el proceso de liofilización al que fueron sometidas no sobrepasó la temperatura crítica del producto (temperatura de colapso). Seguidamente, las muestras fueron examinadas bajo distintos criterios

de selección (Tabla 1 del Artículo 1), tales como: el tamaño de partículas y PI, para evaluar la capacidad de protección del excipiente en el mantenimiento de las características morfométricas de las NPs; la osmolaridad, que debe ser similar a la del fluido lagrimal (alrededor de 302-318 mOsm/Kg en el ojo normal) para evitar la irritación ocular al contacto con la formulación desarrollada para administración del FB [94] y el tiempo de reconstitución de las muestras liofilizadas ya que es otro parámetro de la calidad del producto y pensando en la comodidad para el paciente de hacer el uso más inmediato posible del medicamento.

Bajo estas bases primarias se descartaron 6 de los 8 agentes protectores examinados. Fructosa, manitol, glucosa, PVA y sacarosa no fueron eficaces en la preservación de las características morfométricas iniciales de FB-P&CL-NPs al 3 % (p/v). Además, fructosa, glucosa y manitol mostraron valores hiperosmóticos. Sin embargo, TRE mostró el mejor comportamiento del grupo de los azúcares de acuerdo a los criterios mencionados anteriormente. Ello, posiblemente se deba a las ventajas químicas que presenta TRE frente a los otros azúcares, como menor higroscopicidad y ausencia de puentes internos de hidrógeno, lo que permite una formación más flexible de enlaces de hidrógeno hacia las NPs en la liofilización [83]. La mayoría de las muestras liofilizadas se pueden rehidratar fácilmente en agua destilada, a excepción del PVA que mostró un tiempo de reconstitución más largo.

Se detectaron pequeñas diferencias en los parámetros de tamaño de las NPs en presencia de PEG, lo que se constató con el menor valor obtenido para Sf/Si, así como también con el tamaño promedio de partícula más cercano a los valores iniciales. En resumen, PEG fue claramente el agente protector más eficaz, que probablemente, funciona como un estabilizador y actúa como un agente de revestimiento como lo hace con las proteínas [95]. Por consiguiente, PEG y TRE fueron seleccionados como posibles agentes protectores para las FB-P&CL-NPs.

Con referencia al diseño del ciclo de liofilización para la selección del agente protector, se utilizaron parámetros conservadores con características que favorecerían la obtención de un buen producto liofilizado. De este modo, se utilizó el siguiente protocolo: un periodo de pre-enfriamiento a +10 °C durante 1 h, que

ayuda a la formación de núcleos de hielo en toda la suspensión, lo que permite una congelación más homogénea y un superenfriamiento más pequeño [96]. Para asegurar la solidificación completa de la muestra, ésta se sometió a un periodo de congelación a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 h. La selección de los parámetros del secado primario fue enfocada con el objetivo de lograr una eficiencia máxima del proceso (en este sentido para todos los ciclos de liofilización de esta investigación), es decir, por debajo de la T_g o T_{eu} de la muestra a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 0.047 mbar durante 56 h y un secado secundario a $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 6 h.

Asimismo, se estudió la influencia protectora del P188 en las distintas fases de la liofilización para las FB-P ϵ CL-NPs. La Figura 1 del Artículo 1 indica que las NPs presentaron relaciones de S_f/S_i y $Pl_f/Pl_i < 2$ después del ensayo de descongelación a diferentes concentraciones de P188 (1, 2.5, 5 y 7 %), lo que confirmó su eficiencia en la crioprotección para el sistema [97]. Sin embargo, se observó agregación de las NPs después de la eliminación del agua, es decir, el P188 no tuvo ningún efecto de protección en la etapa de secado, lo que se constató con los altos valores S_f/S_i y Pl_f/Pl_i obtenidos después de la reconstitución acuosa.

El P188 actúa como estabilizador estérico de la suspensión NPs, debido a su excelente solubilidad en agua a través de su bloque de óxido de polietileno (PEO), lo que permite las interacciones de enlaces de hidrógeno con moléculas de agua. De esta manera, el P188 actúa como separador entre las NPs, evitando su aglomeración durante la etapa de congelación [69,98]. A diferencia del PVA, los poloxamers son conocidos como pobres estabilizadores estéricos durante la liofilización [99]. Este comportamiento no favorecedor se mostró en la etapa de secado de las FB-P ϵ CL-NPs, posiblemente dos extremos de la cadena PEO (cristalizada en diferentes partículas) tienden a formar puentes durante la sublimación a consecuencia de la baja concentración de agua, por la proximidad de las partículas y el enlace covalente de P188 de la superficie de las partículas [83].

El ciclo de liofilización es un proceso con etapas críticas, cuyo diseño involucra muchos parámetros experimentales los cuales definen las características del producto final. Por este motivo, resulta imprescindible evaluar el efecto de los

principales parámetros experimentales que afectan a las propiedades, tanto de las partículas como de la matriz seca.

En el proceso de liofilización, la congelación es considerada la fase más agresiva y crítica. Los efectos de la temperatura y velocidad de congelación fueron evaluados en las FB-P ϵ CL-NPs con los agentes protectores seleccionados (PEG Y TRE) a diferentes concentraciones (3 o 10 %) (Tabla 2).

Tabla 2. Características morfométricas de FB-P ϵ CL-NPs después del test de descongelación

| Agente protector (% w/v) | Congelación rápida | | | Congelación lenta | | |
|--------------------------|--------------------|-------------|--------------------------------|--------------------|-------------|--------------------------------|
| | Tamaño de NPs (nm) | PI | S _F /S _I | Tamaño de NPs (nm) | PI | S _F /S _I |
| PEG 10% | 197.3±2.222 | 0.098±0.018 | 1.16 | 201.8±2.217 | 0.086±0.021 | 1.22 |
| PEG 3% | 169.6±1.003 | 0.090±0.024 | 1.01 | 165.9±1.089 | 0.095±0.026 | 0.99 |
| TRE 10% | 178.1±1.823 | 0.109±0.019 | 1.06 | 177.4±2.850 | 0.103±0.016 | 1.06 |
| TRE 3% | 177.1±1.892 | 0.117±0.011 | 1.08 | 174.4±2.045 | 0.113±0.057 | 0.99 |
| Ninguno | 199.0±2.052 | 0.190±0.018 | 1.19 | 261.4±2.014 | 0.317±0.076 | 1.57 |

PI, polidispersión; S_F/S_I, relación del tamaño de partícula después de la agregación del agente protector y después del tratamiento de descongelación.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño y PI de las NPs protegidas con PEG o TRE entre ambas condiciones de congelación, lo que indica que ambos métodos de congelación son eficaces para evitar la agregación de NPs. Sin embargo, se observó un ligero aumento estadísticamente significativo en los valores de PI en las FB-P ϵ CL-NPs protegidas con TRE, probablemente debido a los valores de T_g de TRE y PEG (-36 °C y -25 °C respectivamente), que apunta a la formación vítrea anticipada de PEG e impide la agregación micelar antes de TRE.

Las condiciones de congelación deben evitar la agregación de las NPs y aumentar la velocidad de secado. En vista de que ambos métodos impiden por igual la agregación de las FB-P ϵ CL-NPs, el criterio de selección se hizo en base a la

obtención de un secado eficiente. Una congelación lenta conduce a la formación de grandes cristales de hielo con una estructura de pocos y largos poros ayudando a la reducción del tiempo de sublimación. Por tanto, se seleccionó el protocolo de congelación lenta (Sección de congelación del Artículo 1) ya que evita agregación de las FB-P&CL-NPs y facilita el escape de vapor de agua durante la sublimación reduciendo el tiempo de secado.

Los parámetros en la fase de secado primario se seleccionaron de acuerdo a la curva de Chang y Fischer [100], que muestra la relación matemática entre la presión de la cámara, la temperatura de la bandeja, la temperatura del producto y el ajuste de sublimación, e ilustra la razón para maximizar la tasa de sublimación. Tal modelo aparentemente simple está sujeto a complejidades considerables que dificultan al ajuste de las condiciones óptimas de secado y la obtención de un tiempo de ciclo económico de secado. El secado primario se centró en la eliminación del agua del producto justo por debajo de su T_{co} para una eficiente utilización de la energía.

Después de los estudios sobre congelación y secado primario, se seleccionaron cuatro variables de formulación que podían ser críticas para las características fisicoquímicas de estos sistemas liofilizados. Las dos primeras variables están enfocadas en la formulación (concentración del estabilizante y del agente protector). Las consiguientes variables están orientadas a la parte del proceso que completaría el diseño del ciclo de liofilización, el secado secundario (temperatura de las bandejas y tiempo del secado secundario). Se aplicó un diseño factorial completo de dos niveles para cada uno de los protectores (TRE y PEG). Se prepararon un total de 32 formulaciones (Tablas 2a y 2b del Artículo 1) con el fin de evaluar el efecto de estas cuatro variables y sus interacciones en el tamaño promedio de partícula, PI, eficiencia de asociación del fármaco al polímero, potencial zeta, humedad residual, osmolaridad, y estabilidad en suspensión después de ser liofilizada. Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para identificar la significancia ($p < 0.05$) de los efectos individuales de los factores y sus interacciones en las propiedades de las partículas.

Estos estudios se llevaron a cabo con el propósito de obtener una composición cuantitativa y los parámetros del diseño del ciclo de liofilización, tales que nos aseguren el cumplimiento de las exigencias básicas de la vía ocular (tamaño de partícula reducido, homogeneidad de la muestra, elevada asociación del fármaco al polímero, baja humedad residual, osmolaridad adecuada y una buena estabilidad física) aún después de un periodo largo de almacenamiento. El uso de diseños experimentales está muy extendido para optimizar parámetros de ciertos procesos, especialmente para establecer las condiciones óptimas que permitan obtener una determinada respuesta y se han aplicado, con éxito, en formulaciones farmacéuticas entre las que se encuentran las NPs [52].

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el diseño factorial realizados con NPs protegidas con TRE demostró que tanto la concentración de TRE de forma independiente como la interacción TRE-P188 influyeron significativamente sobre el tamaño promedio de las FB-P&CL-NPs y su PI, ayudando a la obtención de un menor tamaño (Figura 2 del Artículo 1). Debido a su menor higroscopicidad y ausencia de puentes de hidrógeno internos frente a otros azúcares, la interacción TRE-agua es más fuerte que la interacción agua-agua. Ello permite un mejor aislamiento de las FB-P&CL-NPs y por ende un mantenimiento de su tamaño [101]. Por otra parte, estos parámetros morfométricos (tamaño promedio y PI) aumentan cuando la concentración de P188 aumenta. El incremento del tamaño promedio de partícula con la concentración de P188 se debe a una agregación en las NPs; tal como se ha mencionado antes, ello se puede atribuir a que P188 podría formar puentes inter-particulares durante la sublimación [83].

Igualmente, de acuerdo al diseño factorial con PEG se puede observar que la presencia de este protector influye en la obtención de una menor polidispersión de las FB-P&CL-NPs (Figura 3 del Artículo 1). La agregación de PEG a la formulación ayuda a la formación de una matriz polimérica compacta, ya que sus moléculas se unen a las NPs como lo hace el tensioactivo [102] y además, la agregación de PEG incrementa la viscosidad en la suspensión notablemente (Sección de estudios reológicos del Artículo 2). Es probable que ambos factores contribuyan a la estabilización de las FB-P&CL-NPs. Asimismo, esta buena estabilización se ve

reflejada en el tamaño de las partículas, el cual no fue influenciado por ninguna de las cuatro variables estudiadas.

Estás cuatro variables seleccionadas para el estudio tampoco demostraron, en ambos diseños, ninguna influencia en la eficiencia de encapsulación de las NPs. Se ha reportado que la asociación del fármaco al polímero para NPs preparadas mediante la técnica del desplazamiento de solvente, depende principalmente de la solubilidad del fármaco en el polímero. Cuando el fármaco presenta una baja afinidad por el polímero, tiende a difundir desde la fase orgánica a la acuosa durante el proceso de formación de las NPs, dando lugar a porcentajes bajos de encapsulación [103,104]. El FB es poco soluble en agua, en medio ácido a pH inferiores al pKa (4.23) del fármaco se encontrará en su forma no disociada (insoluble). Por ende, el fármaco tiene más afinidad por el polímero dando lugar a una mayor eficiencia de asociación del fármaco al polímero e incrementando así, el tamaño de partícula de estos sistemas.

Asimismo, se observó que la osmolaridad está influenciada por la concentración del agente protector (TRE o PEG) y la concentración de estabilizante, siendo la primera la más influyente en el incremento de esta respuesta.

El principal propósito de someter un material a secado, a menudo es incrementar su estabilidad a largo plazo. El agua actúa como plastificante del estado amorfo, disminuyendo la T_g y aumentando así la movilidad molecular. Además, el agua puede participar directamente en reacciones de degradación ya sea como reactivo (es decir, hidrólisis) o como catalizador y también puede servir como disolvente o medio de reacción. Por ello, es importante obtener niveles de humedad residual suficientemente bajos para que, la viabilidad y la integridad del producto no se vean comprometidas con el tiempo [105]. Las variables seleccionadas no mostraron influencia en la HR de las formulaciones preparadas con PEG. Aunque todas las NPs preparadas con PEG presentaron concentraciones de sólidos diferentes (4.0-11.9 % p/p) y se sometieron a diferentes condiciones de proceso de secado secundario, todas ellas mostraron valores de HR < 1 % de acuerdo con el método de Karl Fischer (Tabla 2b del Artículo 2). Este comportamiento se basa en las

propiedades conformacionales de la secuencia -OCCO- en la cadena PEG, donde la mayoría de las posibles conformaciones de rotación alrededor del enlace C-C son relativamente no polares, mientras que sólo dos son fuertemente polares. El aumento de la temperatura, como sucede en el secado secundario, tiene dos impactos: las conformaciones no polares comienzan a regir las propiedades de la cadena, por lo que las interacciones con el agua son menos favorables y la actividad del agua se ve aumentada, especialmente cuando disminuye su concentración [106]. También se reportó que el número de moléculas de agua unidas por unidad monomérica de PEG disminuye mientras se va secando [107]. Por lo tanto, las interacciones PEG-agua se vuelven menos favorables con el aumento de la temperatura lo que facilitaría un secado con mínima HR %. Las NPs liofilizadas con TRE mostraron valores bajos de HR % cuando las suspensiones fueron expuestas a una temperatura de bandeja más alta y por un tiempo más prolongado en el secado secundario. Este resultado refuerza la premisa de que los productos amorfos como TRE son más difíciles de secar que los productos cristalinos como el PEG [84]. La interacción TRE/agua es mucho más fuerte que la interacción agua/agua. La TRE amorfa tiene compartimientos de dihidrato cristalino donde las moléculas de agua residual son atrapadas e inmovilizadas en una matriz vítrea cuando el agua es escasa. Además, el enlace α -1,1-glicosídico en TRE es mucho menos susceptible a la hidrólisis que el enlace α,β -1,2 glicosídico de otros azúcares no reductores (como la sacarosa). Finalmente, la TRE presenta la transición reversible de TRE dihidrato a las formas cristalinas anhidras. Todos estos factores probablemente ralentizan la liberación de agua [101]. Por lo tanto, para eliminar el agua absorbida en NPs protegidas con TRE son necesarias temperaturas más altas y tiempos más largos.

Como ya es conocido, los sistemas de liberación controlada de fármacos son inestables durante periodos largos de almacenamiento, por ello suelen conservarse en forma de liofilizados. Sin embargo, también es importante el estudio de la estabilidad física y química después de la reconstitución acuosa, ya que la agregación de excipientes requeridos para la liofilización puede desfavorecer este

factor, principalmente durante el tiempo de utilización del medicamento (1 mes para los colirios reconstituidos).

La estabilidad después de la reconstitución acuosa mostró una fuerte dependencia de la concentración de agente protector. Tanto TRE como PEG favorecen la estabilidad de estos sistemas desde el punto de vista cinético, probablemente debido a que los fenómenos de migración se minimizan, disminuyendo el riesgo de sedimentación, cremado o agregación de las partículas [52]. Por otra parte, la temperatura de la bandeja en el secado secundario ($T^{\circ}.SD$), las interacciones del agente protector- $T^{\circ}.SD$ también influenciaron la estabilidad de manera positiva para ambos casos ($p < 0.05$). La interacción TRE-tiempo de secado secundario mostró un ligero dominio en la estabilidad. Sin embargo, no hay investigaciones previas que relacionen estos factores ($T^{\circ}.SD$ y tiempo de secado secundario) con la obtención de suspensiones más estables después de su reconstitución. Otro factor a considerar en la estabilidad es la carga superficial de las NPs, el análisis de las cuatro variables seleccionadas para el estudio demostró que ninguna de ellas influyó en la carga superficial de las NPs. Este hecho se puede atribuir a la presencia de P188, un tensioactivo no-iónico, que probablemente impide la unión de iones a las NPs por impedimento estérico.

A partir de los resultados obtenidos en el diseño factorial y de acuerdo con los objetivos de este estudio, se utilizó el programa JMP 7 para predecir y seleccionar las condiciones experimentales más apropiadas. Las condiciones con las que se obtuvieron las formulaciones de las NPs con los mejores valores de tamaño de partícula reducido, PI bajo, porcentaje alto de FB encapsulado en la matriz polimérica, potencial zeta elevado, baja HR, osmolaridad adecuada para vía oftálmica y buena estabilidad en suspensión después de ser liofilizadas son las siguientes: FB-P&ECL-NPs estabilizadas con 1.66 % de P188 y protegidas con 5 % de TRE, fueron sometidas a un periodo de pre-enfriamiento a +10 °C durante 1 h, congelación a -50 °C durante 4 h, secado primario a -3 °C y 0.140 mbar durante 24 h y un secado secundario de +42 °C durante 10 h. Las FB-P&ECL-NPs estabilizadas con 3.5 % de P188 y protegidas con 8 % de PEG, fueron sometidas a un periodo de pre-enfriamiento a +10 °C durante 1 h, congelación a -50 °C durante 4 h, secado

primario a +5 °C y 0.140 mbar durante 24 h y un secado secundario de +45 °C durante 10 h. Las muestras fueron analizadas inmediatamente después de la liofilización y después de 1 año de almacenamiento a temperatura ambiente sin mostrar diferencias significativas entre la media de los valores de los factores analizados (Tabla 3 del Artículo 1), presentando buena apariencia de su matriz liofilizada y corto tiempo de reconstitución.

La estabilidad física después de la reconstitución acuosa de las FB-P&CL-NPs optimizadas se analizó usando el analizador óptico TurbiScan®Lab, a distintos días durante un mes de almacenamiento a +4 °C. La suspensión mostró un pronunciado pico de la señal retrodispersada (> 10 %) en el lado izquierdo de la gráfica de las FB-P&CL-NPs protegidas con TRE, el cual indicó una migración de partículas en la parte inferior del vial, por tanto, se dio un proceso de sedimentación (Figura 6a del Artículo 1). Esta desestabilización no se observó en la gráfica de las NPs protegidas con PEG (Figura 6b del Artículo 1) durante los 30 días del estudio.

Tal como se mencionó anteriormente, la carga superficial influye en la estabilidad de estos sistemas debido a que las partículas con la misma polaridad de carga eléctrica presentan repulsión electrostática. La agregación de PEG o TRE no alteró la carga superficial de las NPs, lo que indica la fuerte presencia de P188 en la superficie de las NPs (Tabla 2 del Artículo 2). Por otra parte, la presencia de PEG incrementa notablemente la viscosidad en la formulación, lo cual favorece la estabilidad de la suspensión de NPs (Sección de estudios reológicos del Artículo 2).

Las interacciones fisicoquímicas fármaco – polímero en las FB-P&CL-NPs antes y después de liofilizar, se evaluaron por difracción de rayos X y análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los espectros de rayos X de la P&CL y del P188 demuestran que ambos tienen una estructura semicristalina, mientras que el FB pone de relieve una estructura cristalina (Figura 7 del Artículo 1). El análisis de los difractogramas obtenidos por rayos X para F-A y F-B (formulaciones bases sin agente protector) reveló una combinación de dos estructuras (FB y P&CL), asimismo, se vieron picos a $2\theta = 19.3^\circ$ y 23.3° correspondientes al P188 (Figura 7 del Artículo 1). Probablemente, después de la centrifugación quedó un poco de agua

retenido al P188 en el sedimento, facilitando al P188 situarse fuera de las NPs durante la desecación [108]. El espectro de rayos X de F-A presentó picos de P188 inferiores a F-B, debido al diferente porcentaje de P188 en su preparación, 1.66 % y 3.5 %, respectivamente (datos de F-B no mostrados).

Los termogramas obtenidos por DSC de las NPs y sus componentes se muestran en la Figura 8 Artículo 1. El P188, la P&CL y el FB mostraron termogramas con un solo pico endotérmico agudo que corresponden al punto de fusión; 54.1 ± 0.1 °C, 64.5 ± 0.1 °C, 114.6 ± 0.1 °C respectivamente. Las FB-P&CL-NPs mostraron un evento térmico único a 56.0 ± 0.1 °C, sin observarse un pico correspondiente a la fusión de los cristales de FB, lo cual indicó que la mayor parte del fármaco está disperso en la matriz polimérica [60]. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores [94].

La temperatura de fusión de las F-A fue inferior a la temperatura de fusión de las NPs libres de fármaco debido al contenido del FB. Asimismo, F-A mostró un valor de entalpía bajo, consecuencia de la asociación de P&CL y FB (103.4 ± 0.1 J/g y 106.1 ± 0.1 J/g, respectivamente) que disminuyen la entalpía debido a que las moléculas de FB actúan como impureza en la parte cristalina del polímero.

Con respecto a las muestras liofilizadas, los difractogramas obtenidos por rayos X mostraron dos picos a $2\theta = 19.1^\circ$ y 23.3° que corresponden a los picos más intensos de P188. La intensidad de esta señal está directamente relacionada con la cantidad de P188 utilizada en la preparación de las NPs. Los perfiles de los otros componentes mostraron su conversión al estado amorfo, puesto que no se observó los picos característicos del principio activo y polímero.

El **Artículo 2** está enfocado a los estudios pre-clínicos de las FB-P&CL-NPs, ya que el desarrollo de NPs para preparaciones oculares debe satisfacer los criterios de Goldmann (estabilidad, esterilidad, tolerancia y eficacia). La eficacia terapéutica es el criterio más importante para la preparación oftálmica ya que depende no sólo de la estabilidad y tolerancia de la preparación sino también de la permeabilidad ocular de los ingredientes activos [109].

La liofilización es el proceso por el cual se logró la estabilización de las FB-P&ECL-NPs y permitió obtener dos posibles formulaciones apropiadas para vía ocular: FB-P&ECL-NPs liofilizadas con TRE (FD-NPsTRE) y liofilizadas con PEG (FD-NPsPEG). Ambas formulaciones fueron el resultado de los estudios del proceso de liofilización y de composición de las FB-P&ECL-NPs para que sean idóneos como productos farmacéuticos oftálmicos (Artículo1). FD-NPsTRE y FD-NPsPEG son diferentes tanto en el tipo y concentración de agente protector, como también en su concentración de P188 (Tabla 1 del Artículo 2), pero muy parecidos en cuanto al tamaño de partícula (191.7 ± 1.9 nm y 190.4 ± 1.3 nm para FD-NPsTRE y FD-NPsPEG, respectivamente) y la eficiencia de encapsulación (ambas alrededor de 85 %), sin diferencia estadísticamente significativa. La polidispersión de FD-NPsPEG se mostró dentro del rango de los sistemas monodispersos ($PI < 0.1$), mientras que FD-NPsTRE mostró valores de polidispersión > 0.1 debido principalmente a la capacidad protectora de TRE durante el proceso de liofilización (Artículo 1). Asimismo, ambas formulaciones tenían una similar carga superficial negativa. Estos resultados están resumidos en la Tabla 2 del Artículo 2.

Las formulaciones oculares deben satisfacer la necesidad de ser estériles. El método más idóneo para lograr este objetivo es la gamma irradiación y se usa principalmente para productos farmacéuticos termolábiles, por su alto poder de penetración, baja reactividad química, bajos niveles de residuos, pequeños cambios de temperatura en la muestra y pocas variables a controlar durante el proceso. Sin embargo, se ha sugerido que la dosis que garantiza la esterilidad (25 kGy) puede cambiar las propiedades del polímero y la cinética de liberación, por ello es esencial analizar la eficacia del producto después de este proceso [110,111].

Dado que estas formulaciones tienen un objetivo terapéutico, las formulaciones de FD-NPsTRE y FD-NPsPEG fueron irradiados a una dosis de 25 kGy (IR-NPsTRE e IR-NPsPEG). Para conocer los efectos de la liofilización y esterilización en la liberación de FB y el perfil de permeación ocular, se decidió evaluar el perfil de las suspensiones de FB-P&ECL-NP con el agente protector (NPsTRE y NPsPEG) y sin el agente protector (F-A y F-B) antes de ser sometidos a estos procesos. El proceso de gamma- irradiación no tuvo ningún efecto sobre el tamaño promedio de partícula,

PI, carga superficial y eficiencia de encapsulación de las formulaciones liofilizadas optimizadas. Los valores de estas propiedades en las distintas muestras estudiadas se muestran en la Tabla 2 del Artículo 2.

Así, todas las formulaciones para el ensayo de liberación de FB y permeación ocular, se consideraron suspensiones de NPs satisfactorias; presentando valores de potencial zeta negativo (-12.00 mV - -18.40 mV), eficiencia de encapsulación elevada (85-86 %) y osmolaridad ocular apropiada a excepción de F-A y F-B (suspensiones sin objetivo terapéutico). Adicionalmente, se analizaron las propiedades reológicas de las formulaciones, presentando curvas de viscosidad constantes y crecientes que corresponden al comportamiento newtoniano y que indican que las formulaciones se adhieren fácilmente al aplicarse sobre la superficie ocular. Los resultados obtenidos revelan que la inclusión de un 16.0 % de PEG y 10.0 % de TRE en las formulaciones produce un incremento significativo de la viscosidad. FD-NPsTRE y IR-NPsTRE mostraron una viscosidad baja frente a las formulaciones preparadas con PEG (FD-NPsPEG y IR-NPsPEG), que beneficia la redispersión después de la reconstitución acuosa del producto liofilizado facilitando su dispensación.

La determinación de los perfiles de liberación *in vitro* permite predecir el comportamiento *in vivo* de las NPs. Esos estudios fueron llevados a cabo en células de Franz bajo condiciones *sink*, en un medio de PBS isotónico a pH 7.4 (próximo al pH lagrimal) y 32 °C (temperatura del área precorneal), con el fin de reproducir las condiciones fisiológicas de la vía ocular. Los perfiles de liberación de FB de estos sistemas coloidales se compararon con la solución del fármaco libre (1.0 mg/mL en PBS pH 7.4). Los resultados obtenidos revelan que la liberación de FB desde la solución de fármaco libre fue más rápida comparada con las FB-P&ECL-NPs, asimismo, las formulaciones F-A y F-B a pesar de tener distintas concentraciones de P188 presentaron un perfil de liberación de FB muy similar (Figura 1A del Artículo2). Resultados similares fueron reportados por otros autores para la liberación de fármaco *in vitro* con diferentes cantidades de P188 [112].

La liberación del fármaco a partir de partículas poliméricas puede ocurrir a través de la difusión, erosión del polímero o una combinación de estos [113]. Si la difusión del fármaco es más rápida que la degradación de la matriz, el mecanismo de liberación del fármaco se produce principalmente por difusión. Una liberación rápida del fármaco, conocido como “efecto estallido” se debe a la fracción del mismo adsorbida o débilmente unida a la superficie de las NPs [60]. Todas las formulaciones exhiben un comportamiento de liberación sostenido, con una liberación rápida al inicio, debido a la cantidad de fármaco presente en la superficie de las NPs, seguido por una fase de liberación lenta, correspondiente a la difusión del fármaco atrapado en el interior de las mismas (Figura 1 del Artículo 2).

Sin embargo, la velocidad de liberación y las cantidades de fármaco liberadas disminuyen después de la agregación de agente protector a las FB-P&CL-NPs (Figura 1B del Artículo 2). Este perfil fue mucho más evidente para las FB-P&CL-NPs protegidas con PEG que con TRE. Ello se atribuye al aumento en la viscosidad del medio de dispersión de la suspensión que conlleva a un descenso más lento de las NPs al tejido ocular. Asimismo, otros autores reportaron que la agregación de PEG ayuda en la formación de una estructura muy compacta con la matriz polimérica después del proceso de secado lo que podría retardar la difusión del fármaco [102]. Contrario a ello, las NPs protegidas con TRE alcanzaron una cantidad liberada más alta de fármaco (Figura 1C y D del Artículo 2). La TRE se considera un agente protector que induce o aumenta la porosidad de las NPs, lo que ayuda a obtener una liberación más rápida de fármaco. Ello está relacionado directamente con la etapa de congelación de la liofilización; TRE es capaz de formar enlaces de hidrógeno más flexibles con las NPs, creando una red abierta de poros durante la sublimación que pueden afectar las características morfológicas de las NPs [96,114].

La viscosidad intrínseca de las FB-P&CL-NPs protegidas con PEG aumentó de 5.425 mPa/s a 6.594 mPa/s después del proceso de gamma irradiación (IR-NPsPEG). Sin embargo, el perfil de liberación no señaló ninguna influencia apreciable de los componentes de la matriz. Probablemente, este efecto se redujo por las grandes cantidades de PEG contenidas en las NPs liofilizadas. Por otra parte, IR-NPsTRE mostraron una velocidad de liberación muy similar a la solución

de fármaco libre, debido a la fácil descomposición de la capa de TRE después de la gamma irradiación, facilitando una exposición directa de las NPs [115]. Estos resultados concuerdan con autores que reportaron que TRE incrementa la liberación del fármaco tanto después de la liofilización como después de la irradiación [115,116].

La cantidad FB liberado desde las formulaciones ensayadas, se ajustó a diferentes modelos cinéticos, calculándose el coeficiente de determinación (r^2) y el valor de AIC, el cual indica la idoneidad del modelo para un determinado conjunto de datos. Cuanto menor sea el valor de AIC, el modelo se ajusta mejor al conjunto de los datos. Los valores de AIC obtenidos a partir de las cantidades de FB liberadas y acumuladas a las 10 h del ensayo para las formulaciones, se ajustan adecuadamente al modelo cinético de primer orden lo que fue confirmado por r^2 , con excepción de NPsPEG and FD-NPsPEG, que se ajustan adecuadamente al modelo cinético de hipérbola (Tabla 3 del Artículo 2). Ello indica que la liberación de FB desde estas formulaciones, se produce por difusión pasiva, especialmente a través de los poros de la matriz. Además, el bajo PM de FB (244.25 Da) mejora el mecanismo de difusión [112,117]. Es importante mencionar que la liberación de FB no se vió afectada por la cantidad de P188, ni por la polidispersión del tamaño de las NPs en suspensión.

Las NPs además de permitir la liberación controlada del agente activo, deberían permitir alcanzar niveles de concentración terapéutica efectivos en el tejido afectado del organismo, independientemente de la vía de administración por un período de tiempo prolongado y con una escasa o nula exposición sistémica [118]. Cuando los fármacos penetran en el organismo a través de la mayoría de las vías de administración, deben atravesar varias membranas celulares semipermeables, que actúan como barreras biológicas que, de modo selectivo, inhiben el paso de las moléculas de fármaco [119]. Es así como el ojo logra mantener sus estructuras inalteradas para una correcta visión, lo que lo convierte en un órgano difícil para la absorción de principios activos

Con el fin de evaluar la capacidad de estos sistemas para favorecer la penetración corneal, se estudió la permeación corneal *ex vivo* de estas partículas y se comparó con la solución de fármaco libre (1 mg/mL).

F-A mostró un coeficiente de permeabilidad (K_p) más pequeño que F-B, probablemente, la mayor cantidad de P188 en F-B reforzó la penetración del fármaco en la córnea (Figura 2A del Artículo 2). La inclusión del agente protector en las FB-P&CL-NPs cambió significativamente el rendimiento en ambas formulaciones (Figura 2B del Artículo 2). La diferencia de PI entre FD-NPsPEG y IRNPsPEG, al igual que en la liberación *in vitro*, tampoco influyó en el perfil de permeación transcorneal de FB. FD-NPsTRE y IR-NPsTRE alcanzaron un incremento significativo en la penetración del fármaco a través de la córnea (Figura 2C-D del Artículo 2). Alcanzando incluso IR-NPsTRE una cantidad de FB permeado a través del tejido corneal de $116.03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, cantidad muy similar a la solución de fármaco libre, $119.70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Por otro lado, IR-NPsPEG mostró un K_p más bajo y la mayor cantidad de fármaco retenido en la córnea, $33.95 \pm 0.99 \text{ \%}/\text{cm}^2 \cdot \text{g}$ en comparación con las otras muestras. Estos resultados refuerzan las premisas mencionadas anteriormente; la TRE facilita la liberación de FB de la matriz polimérica debido al favorecimiento de la formación de las depresiones sobre la superficie de las NPs, asimismo, promueve considerablemente la permeación de FB a través de la córnea después de la gamma irradiación.

Se determinó el nivel de hidratación corneal, lo que indicó que todas las córneas están dentro del rango de hidratación corneal normal. Por tanto, las formulaciones evaluadas no causaron daños tisulares en el epitelio ni endotelio (Sección de estudio de permeación corneal del Artículo 2)[120].

La esclerótica es un tejido bastante permeable, además, tiene 20 veces más superficie que el tejido de la córnea, lo que la convierte en una buena posibilidad en el transporte de fármacos a estructuras oculares posteriores, asociándolos a diferentes sistemas de liberación controlada, que minimicen los posibles efectos adversos. [121,122]. Del mismo modo que la permeación corneal *ex vivo*, se estudió la permeación escleral *ex vivo* y se comparó con la solución de fármaco libre (1

mg/mL) con el fin de evaluar la capacidad de estos sistemas para favorecer la penetración escleral.

El FB fue capaz de atravesar la esclerótica a pesar de tener naturaleza hidrófila [123]. La solución de fármaco libre alcanzó el coeficiente de permeabilidad más alto, seguidas por F-A y F-B que fueron muy similares entre ellas ($P > 0.05$). La adición del agente protector influyó en la reducción de la permeabilidad escleral (Figura 3B-D del Artículo 2). El proceso de liofilización y la gamma irradiación no tuvieron ningún efecto sobre el coeficiente de permeabilidad de las NPs ($P > 0.05$). Además, los productos finales, IR-NPsTRE y IR-NPsPEG, alcanzaron cantidades de FB acumulado muy parecidos ($18.20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $17.70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente), lo que indica que no hay diferencia de eficacia terapéutica entre ellos (Figura 3D del Artículo 2). Todo ello demuestra nuevamente que las diferencias de las características morfométricas y la viscosidad de las formulaciones en estudio eran menos importantes que la afinidad química del FB con los tejidos diana. Aunque la solución de fármaco libre mostró una eficacia de permeación superior a las suspensiones de FB-P&CL-NPs irradiadas (productos finales), en este ensayo no consideró la eliminación rápida de la solución a través del parpadeo del ojo y el drenaje del flujo naso-lagrimal, lo que reduce su biodisponibilidad al $\sim 75 \%$ [124].

Las estructuras externas oculares están constituidas por diferentes tejidos muy sensibles a la irritación ocular inducida por agentes químicos o farmacológicos, que, en casos extremos, pueden desencadenar un cuadro clínico de ulceración corneal y pérdida de visión. Con el fin de determinar la potencial irritación ocular inducida por los sistemas coloidales desarrollados, se utilizaron dos ensayos para determinar la tolerancia ocular de las formulaciones: el ensayo de HET-CAM (*in vitro*) basado en la observación de reacciones, tales como hemorragia, coagulación intravascular o lisis de los vasos sanguíneos [125] y el test de Draize (*in vivo*), ya que la legislación española todavía exige la realización de este ensayo antes de la comercialización de fármacos administrados por vía tópica. La aplicación de ambos métodos reveló una tolerancia ocular óptima para las formulaciones IR-NPsTRE y IR-NPsPEG (Artículo 2).

Uno de los aspectos básicos para la idoneidad de un sistema polimérico de liberación controlada de fármacos por vía ocular, además de sus propiedades fisicoquímicas, su farmacocinética y su tolerancia ocular es la eficacia biológica y terapéutica.

La eficacia antiinflamatoria *in vivo* de estos sistemas en la prevención de los procesos inflamatorios secundarios frente a una agresión de carácter químico, inducida por ácido araquidónico, fue evaluada examinando el grado de inflamación del iris y conjuntiva ocular. Durante los primeros 60 minutos, IR-NPsTRE, IR-NPsPEG y la solución de fármaco libre redujeron por igual el grado de inflamación ocular y la hiperemia del iris (Figura 4 del Artículo 2). A los 60 minutos siguientes, la eficacia antiinflamatoria de las NPs fue evidentemente superior a la solución de fármaco libre, presentando IR-NPsPEG un mayor y continuo efecto antiinflamatorio. Las NPs poseen propiedades bioadhesivas que incrementan el tiempo de permanencia del fármaco sobre la superficie ocular y consecuentemente una prolongada acción farmacológica [108,112,126]. Además, ha sido descrito previamente que el tiempo de residencia de las NPs es mayor en los tejidos oculares inflamados debido a las modificaciones fisiológicas que acompañan estos procesos [127].

Nuevamente las estabildades de las suspensiones optimizadas fueron evaluadas para verificar si el proceso de gamma irradiación tuvo alguna influencia sobre este factor en los productos finales (IR-NPsTRE, IR-NPsPEG), ya que constituye otro parámetro de calidad del producto. El perfil de radiación retrodispersada (BS) por las muestras de IR-NPsPEG (Figura 5B del Artículo 2) no sufrió cambios con relación al perfil de FD-NPsPEG (Figura 6B del Artículo 1), es decir continuó presentando una muy buena estabilidad durante los 30 días de estudio. Por otro lado, IR-NPsTRE (Figura 5^a del Artículo 2) presentó una variación de BS inferior al 5 % en el lado derecho del perfil de transmisión (parte inferior del vial) que indicó un proceso de sedimentación (después de 30 días). Esta variación física es considerada reversible y es mucho menor a la registrada en el perfil de la FD-NPsTRE (Figura 6A del Artículo 1). Ello puede estar relacionado principalmente por

el incremento de la viscosidad y la influencia de la esterilización sobre las NPs para estabilizar este sistema coloidal.

Las investigaciones recogidas en esta Tesis Doctoral aseguran los beneficios del desarrollo de la liofilización con PEG y TRE de NPs de PCL para liberación controlada de FB para el tratamiento de procesos inflamatorios a nivel ocular. Los principales resultados que se han obtenido constituyen, en cierta medida, una base a la expansión industrial de estos sistemas coloidales.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo, el FB se formuló en NPs de P ϵ CL para administración ocular. Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en los diferentes ensayos para la estabilización de las FB-P ϵ CL-NPs y su influencia en distintos estudios pre-clínicos, se puede concluir que:

1. La asociación de un agente antiinflamatorio no esteroideo, flurbiprofeno (1.0 mg/ml), a poli- ϵ -caprolactona (3.3 mg/ml) por la técnica de desplazamiento del solvente, en presencia de Poloxamer 188 (16.6 mg/ml) como agente estabilizante de la formulación, ha permitido obtener nanopartículas con unas características morfométricas (tamaño promedio de partícula de 176 nm y polidispersión inferior a 0.1) y carga superficial (potencial zeta -17.2 mV) adecuadas para administración ocular, aunque con una estabilidad limitada.
2. Los agentes protectores utilizados en el proceso de liofilización de las NPs (TRE y PEG) se seleccionaron en base a su idoneidad en el mantenimiento de la morfometría inicial de estos sistemas, el tiempo de reconstitución y la osmolaridad de la formulación una vez reconstituida, aspecto crucial para los preparados de administración ocular.
3. El P188 demostró capacidad protectora para las FB-P ϵ CL-NPs durante la etapa de congelación de la liofilización, sin embargo, no fue capaz de mantener las propiedades morfométricas de las NPs en la etapa de secado, es decir el P188 es un buen crioprotector más no lioprotector.
4. Dado que el análisis del proceso de congelación (rápido o lento) de las FB-P ϵ CL-NPs con los agentes protectores seleccionados no puso de relieve diferencias significativa en la agregación de las mismas, se seleccionó la congelación lenta que conduce a la formación de grandes cristales de hielo con una estructura de poros largos y escasos que permite incrementar la velocidad de sublimación.

5. Las condiciones de secado primario seleccionadas en base a la temperatura de colapso de las formulaciones (determinada mediante microscopia de liofilización) utilizando la curva de Chang y Fischer para la elección de los parámetros, fueron: +5 °C a 0.140 mbar para las FB-P&CL-NPs protegidas con PEG y -3 °C a 0.140 mbar para las protegidas con TRE.
6. La optimización del proceso de liofilización de las FB-P&CL-NPs, por diseño de experimentos, puso en relieve el efecto de dos variables relacionadas con el producto (concentración del estabilizante y del agente protector) y dos relacionadas con el proceso (temperatura y tiempo de secado secundario), así como sus interacciones en la morfometría de las partículas, la humedad residual, la osmolaridad y la estabilidad en suspensión después de ser liofilizada, más no en su carga superficial y la eficiencia de asociación del fármaco al polímero.
7. Tanto la concentración de TRE y PEG como la interacción TRE-P180 disminuye los parámetros morfométricos de las FB-P&CL-NPs. El tamaño promedio de las NPs protegidas con TRE disminuye al disminuir la concentración P188. La presencia de PEG como crioprotector mejora la homogeneidad de la muestra, reduciendo su polidispersión.
8. La osmolaridad depende de la concentración del estabilizante y en mayor medida del agente protector utilizado. No se observaron variaciones significativas de la HR ($HR < 1\%$) en las FB-P&CL-NPs protegidas con PEG en función de las variables analizadas, a diferencia de las NPs con TRE que mostraron valores bajos de HR cuando fueron expuestas a una temperatura de bandeja en el secado secundario más elevada y por un tiempo más prolongado.
9. Los análisis espectroscópicos y térmicos de la interacción fármaco-polímero en los sistemas matriciales desarrollados ponen de manifiesto que la mayor

parte del fármaco se encuentra en forma de dispersión molecular en el polímero.

10. La esterilización por gamma irradiación (a 25 KGy) de las formulaciones liofilizadas no modificó la morfometría ni la carga superficial de las partículas, manteniéndose la asociación inicial del fármaco al polímero y su osmolaridad.
11. Los perfiles de liberación *in vitro* de las nanopartículas mostraron que ambos aditivos, TRE y PEG3350, condicionan el proceso en mayor medida que las características morfométricas de dichas partículas.
12. La estabilidad de las FB-P&CL-NPs una vez reconstituidas fue superior en presencia de PEG, (30 días) respecto a las de TRE (15 días). El proceso de gamma irradiación mejoró considerablemente la estabilidad de las FB-P&CL-NPs en presencia de TRE (30 días), manteniendo sus características morfométricas, con una baja humedad residual y osmolaridad adecuada para administración ocular, aún después de un año de almacenamiento en su forma sólida.
13. En la permeación transcorneal, la liofilización y la gamma irradiación obstaculizan la liberación de FB de las formulaciones que contienen PEG, mientras que estas condiciones tienen un efecto contrario sobre las formulaciones que contienen TRE. Sin embargo, estos procesos no influyeron en la permeación transescleral.
14. Los estudios de eficacia antiinflamatoria *in vivo* de ambas formulaciones de FB-P&CL-NPs pusieron de relieve una disminución significativa de la inflamación ocular y la hiperemia en mayor grado respecto a la solución de fármaco libre con una tolerancia ocular óptima, siendo las nanopartículas con PEG, las que presentan mayor duración del efecto antiinflamatorio.

15. El éxito del diseño del sistema coloidal, FB-P&CL-NPs protegidas con PEG, resultó de la cooperación racional entre una buena formulación y las condiciones adecuadas en las etapas de congelación y secado enfocados principalmente en la calidad del producto y en un ahorro significativo de tiempo y de energía para la industria. Estos sistemas poliméricos podrían constituir, tras el desarrollo galénico y clínico adecuado, una nueva forma de administración de flurbiprofeno de interés en la prevención de la inflamación secundaria a cirugía ocular.

6. REFERENCIAS

1. Alonso, M. J. & Couvreur, P. 2012 Historical View of the Design and Development of Nanocarriers for Overcoming Biological Barriers. In *Nanostructured Biomaterials for Overcoming Biological Barriers* (eds M. J. Alonso N. S. Csaba & A. Martínez), pp. 644. Royal Society of Chemistry.
2. Schneider, M., Windbergs, M., Daum, N., Loretz, B., Collnot, E. M., Hansen, S., Schaefer, U. F. & Lehr, C. M. Crossing biological barriers for advanced drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2013);**84**, 239–241.
3. Skalicky, S. E. 2016 *Ocular and Visual Physiology Clinical Application*. Sydney: Springer.
4. Kelly, A. & Kinney, O. Detecting Dry Eye in Contact Lens Wearers. *Contact Lens Spectr.* (1998);**13**, 21–28.
5. Stein, H., Slatt, B., Stein, R. & Freeman, M. Fitting guide for rigid and soft contact lenses: A practical approach. *Optom. Vis. Sci.* (2002);**79**, 281–282.
6. Murube del Castillo, J. 1986 Dacriología Básica. In *Sistema lagrimal. Dacriología básica: diagnóstico y tratamiento de sus afecciones* (ed Weil-Milder), pp. 21–6.
7. Geroski, D. H. & Edelhauser, H. F. Drug Delivery for Posterior Segment Eye Disease. *Investig. Vis. Sci.* (2000);**41**, 961–964.
8. Garg, A., Sheppard, J. D., Donnenfeld, E. D., Meyer, D. & Mehta, C. K. 2006 *Ojo seco y otros trastornos de la superficie ocular: Diagnóstico y tratamiento en Xerodacriología*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
9. Chrai, S. S., Makoid, M. C. & Eriksen, S. P. Drop size and initial dosing frequency problems of topically applied ophthalmic drugs. *J. Pharm. Sci.* (1974);**63**, 333–8.
10. Cummings, T. J. 2013 *Ophthalmic pathology: a concise guide*. 2013th edi. Heidelberg: Springer.
11. Holland, E. J., Mannis, M. J. & Lee, B. W. 2013 *Ocular surface disease: cornea, conjunctiva and tear film*. Philadelphia: Saunders Company.

12. Mitra, A. K. 2003 *Ophthalmic drug delivery systems*. 2nd editio. New York: Marcel Deerk.
13. Watsky, M. A., Jablonski, M. M. & Edelhauser, H. F. Comparison of conjunctival and corneal surface areas in rabbit and human. *Curr. Eye Res.*(1998);**7**, 483–6.
14. Amaral, J., Fariss, R. N., Campos, M. M., Robison, W. G., Kim, H., Lutz, R. & Becerra, S. P. Transscleral-RPE permeability of PEDF and ovalbumin proteins: Implications for subconjunctival protein delivery. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2005);**46**, 4383–4392.
15. Ambati, J., Canakis, C. S., Miller, J. W., Gragoudas, E. S., Edwards, A., Weissgold, D. J., Kim, I., Delori, F. C. & Adamis, A. P. Diffusion of high molecular weight compounds through sclera. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2000);**41**, 1181–1185.
16. Ambati, J., Gragoudas, E. S., Miller, J. W., You, T. T., Miyamoto, K., Delori, F. C. & Adamis, A. P. Transscleral delivery of bioactive protein to the choroid and retina. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2000);**41**, 1186–1191.
17. Kaur, I. P., Garg, A., Singla, A. K. & Aggarwal, D. Vesicular systems in ocular drug delivery: An overview. *Int. J. Pharm.* (2004);**269**, 1–14.
18. Pathak, Y. & Thassu, D. 2009 *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization*. Florida: Chemical Rubber Company.
19. Li, H. F., Petroll, W. M., Møller-Pedersen, T., Maurer, J. K., Cavanagh, H. D. & Jester, J. V. Epithelial and corneal thickness measurements by in vivo confocal microscopy through focusing (CMTF). *Curr. Eye Res.* (1997);**16**, 214–221.
20. Yanoff, M. & Duker, J. S. 2013 *Ophthalmology*. 4th editio. Philadelphia: Saunders.
21. Schoenwald, R. D. & Ward, R. L. Relationship between steroid permeability across excised rabbit cornea and octanol-water partition coefficients. *J. Pharm. Sci.* (1978);**67**, 786–8.

22. Järvinen, K., Järvinen, T. & Urtti, A. Ocular absorption following topical delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (1995);**16**, 3–19.
23. Mishima, S. & Trenberth, S. M. Permeability of the corneal endothelium to nonelectrolytes. *Invest. Ophthalmol.* (1968);**7**, 34–43.
24. Kim, J. H., Green, K., Martinez, M. & Paton, D. Solute permeability of the corneal endothelium and Descemet's membrane. *Exp. Eye Res.* (1971);**12**, 231–8.
25. Bourne, W. M., Nelson, L. I. L. & Hodge, D. O. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* (1997);**38**, 779–782.
26. García Lopez, M. 2002 *Nuevas estrategias en administración ocular de fármacos*. Barcelona: Romargraf SA.
27. Dhanapal, R. & Ratna, J. Ocular drug delivery system: a review. *Innov. Drug Discov.* (2012);**2**, 4–15.
28. Ghate, D. & Edelhauser, H. F. Ocular drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* (2006);**3**, 275–87.
29. Barar, J., Javadzadeh, A. R. & Omid, Y. Ocular novel drug delivery: impacts of membranes and barriers. *Expert Opin. Drug Deliv.* (2008);**5**, 567–581.
30. Boddu, S. H., Gupta, H. & Patel, S. Drug Delivery to the Back of the Eye Following Topical Administration: An Update on Research and Patenting Activity. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* (2014);**8**, 27–36.
31. Nichols, J. & Snyder, R. Topical nonsteroidal anti-inflammatory agents in ophthalmology. *Curr. Opin. Ophthalmol.* (1998);**9**, 40–4.
32. Vane, J. R. & Botting, R. M. Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *Am. J. Med.* (1998);**104**, 2S–8S.
33. Michael Raizman, M. Corticosteroid therapy of eye disease. Fifty years later. *Arch. Ophthalmol. Ophthalmol* (1996);**114**, 1000–1.
34. Smith, T. J. Cyclooxygenases as the principal targets for the actions of

- NSAIDs. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* (1998);**24**, 501–523.
35. Samiy, N. & D'Amico, D. Endogenous Fungal Endophthalmitis. *Int. Ophthalmol. Clin.* (1996);**36**, 147–162.
 36. Gamache, D. A., Graff, G., Brady, M. T., Spellman, J. M. & Yanni, J. M. Nepafenac, a unique nonsteroidal prodrug with potential utility in the treatment of trauma-induced ocular inflammation: I. Assessment of anti-inflammatory efficacy. *Inflammation* (2000);**24**, 357–370.
 37. Davies, N. M. Clinical Pharmacokinetics of Flurbiprofen and its Enantiomers. *Clin. Pharmacokinet.* (1995);**28**, 100–114.
 38. Chiarini, A., Tartarini, A. & Fini, A. pH-Solubility Relationship and Partition Coefficients for some Anti-Inflammatory Arylaliphatic Acids. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. (1984);**317**, 268–273.
 39. Nozu, K. Flurbiprofen: highly potent inhibitor of prostaglandin synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* (1978);**529**, 493–6.
 40. Van Miert, A. S. & Van Duin, C. T. The antipyretic effect of flurbiprofen. *Eur. J. Pharmacol.* (1977);**44**, 197–204.
 41. Dionne, R. A., Snyder, J. & Hargreaves, K. M. Analgesic efficacy of flurbiprofen in comparison with acetaminophen, acetaminophen plus codeine, and placebo after impacted third molar removal. *J. Oral Maxillofac. Surg.* (1994);**52**, 916–919.
 42. Anderson, J. A. & Chen, C. C. 1988 Multiple dosing increases the ocular bioavailability of topically administered flurbiprofen. *Arch. Ophthalmol.*
 43. Arredondo-Peñaranda, A. & Londoño-López, M. E. Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. *Rev. Ing. Biomédica* (2014);**3**, 83–94.
 44. Escobar, J., García, D., Zaldivar, D. & Katime, I. Hidrogeles. Principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos. *Iberoam. Polímeros* (2002);**3**, 1–25.

45. Ministerio de Sanidad y consumo 2005 Monografías de formas farmacéuticas. In *Real Farmacopea Española.*, pp. 645. Madrid.
46. Bawarski, W. E., Chidlow, E., Bharali, D. J. & Mousa, S. A. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* (2008);**4**, 273–282.
47. Rao, J. P. & Geckeler, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog. Polym. Sci.* (2011);**36**, 887–913.
48. Kreuter, J. Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. II: Comparison of the body distribution of nanoparticles with the body distribution of microspheres (diameter greater than 1 micron), liposomes, and emulsions. *Pharm. Acta Helv.* (1983);**58**, 217–26.
49. Couvreur, P., Dubernet, C. & Puisieux, F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (1995);**41**, 2–13.
50. Carvalho Silva, R., Alexandre Muehlmann, L., Rodrigues Da Silva, J., de Bentes Azevedo, R. & Madeira Lucci, C. Influence of nanostructure composition on its morphometric characterization by different techniques. *Microsc. Res. Tech.* (2014);**77**, 691–696.
51. Nagarwal, R. C., Kant, S., Singh, P. N., Maiti, P. & Pandit, J. K. Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. *J. Control. Release* (2009);**136**, 2–13.
52. Gonzalez-Mira, E., Egea, M. A., Souto, E. B., Calpena, A. C. & García, M. L. Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for ocular delivery. *Nanotechnology* (2011);**22**, 45101.
53. Song, X., Zhao, Y., Hou, S., Xu, F., Zhao, R., He, J., Cai, Z., Li, Y. & Chen, Q. Dual agents loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2008);**69**, 445–453.
54. Deshiikan, S. R. & Papadopoulos, K. D. Modified Booth equation for the calculation of zeta potential. *Colloid Polym. Sci.* (1998);**276**, 117–124.

55. Araújo, J., Gonzalez-Mira, E., Egea, M. a., Garcia, M. L. & Souto, E. B. Optimization and physicochemical characterization of a triamcinolone acetonide-loaded NLC for ocular antiangiogenic applications. *Int. J. Pharm.* (2010);**393**, 168–176.
56. Dunne, M., Corrigan, O. I. & Ramtoola, Z. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials* (2000);**21**, 1659–1668.
57. Abrego, G., Alvarado, H. L., Egea, M. A., Gonzalez-Mira, E., Calpena, A. C. & Garcia, M. L. Design of Nanosuspensions and Freeze-Dried PLGA Nanoparticles as a Novel Approach for Ophthalmic Delivery of Pranoprofen. *J. Pharm. Sci.* (2014);**103**, 3153–3164.
58. Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R. & Rudzinski, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release.* (2001);**70**, 1–20.
59. Cavallaro, G., Fresta, M., Giammona, G., Puglisi, G. & Villari, A. Entrapment of β -lactams antibiotics in polyethylcyanoacrylate nanoparticles: Studies on the possible in vivo application of this colloidal delivery system. *Int. J. Pharm.* (1994);**111**, 31–41.
60. Niwa, T., Takeuchi, H., Hino, T., Kunou, N. & Kawashima, Y. Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *J. Control. Release* (1993);**25**, 89–98.
61. Dash, T. K. & Konkimalla, V. B. Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *J. Control. Release* (2011);**158**, 15–33.
62. Sinha, V. R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R. & Trehan, A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. *Int. J. Pharm.* (2004);**278**, 1–23.

63. Murthy, R. 1997 Biodegradable polymers. In *Controlled and novel drug delivery*, pp. 27–51. New Delhi: CBS.
64. Ravi, P. R., Vats, R., Dalal, V., Gadekar, N. & Aditya, N. Design, optimization and evaluation of poly- ϵ -caprolactone (PCL) based polymeric nanoparticles for oral delivery of lopinavir. *Drug Dev. Ind. Pharm.* (2015);**41**, 131–40.
65. Woodruff, M. A. & Hutmacher, D. W. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Prog. Polym. Sci.* (2010);**35**, 1217–1256.
66. Vert, M. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* (2009);**20**, 437–446.
67. Chen, C., Cai, G., Zhang, H., Jiang, H. & Wang, L. Chitosan-poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) graft copolymers: Synthesis, self-assembly, and drug release behavior. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* (2011);**96**, 116–124.
68. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N. & Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* (1989);**55**, R1–R4.
69. Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H. & Doelker, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* (1998);**24**, 1113–1128.
70. Nagavarma, B. V. N., Yadav, H. K. S., Ayaz, A., Vasudha, L. S. & Shivakumar, H. G. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* (2012);**5**, 16–23.
71. Galindo-rodriguez, S., Alle, E., Fessi, H. & Doelker, E. Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-out , Nanoprecipitation Methods. *Pharm. Res.* (2004);**21**, 1428–1439.
72. Haggag, Y. a. & Faheem, A. M. Evaluation of nano spray drying as a method for drying and formulation of therapeutic peptides and proteins. *Front. Pharmacol.* (2015);**6**, 1–5.

73. Walters, R. H., Bhatnagar, B., Tchessalov, S., Izutsu, K. I., Tsumoto, K. & Ohtake, S. Next generation drying technologies for pharmaceutical applications. *J. Pharm. Sci.* (2014);**103**, 2673–2695.
74. Webb, S. D., Golledge, S. L., Cleland, J. L., Carpenter, J. F. & Randolph, T. W. Surface adsorption of recombinant human interferon-gamma in lyophilized and spray-lyophilized formulations. *J. Pharm. Sci.* (2002);**91**, 1474–1487.
75. Elzoghby, A. O., Samy, W. M. & Elgindy, N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J. Control. Release.* (2012);**157**, 168–182.
76. Rollins, H., Bunker, C., Sun, Y.-P., Meziani, J. & Bandara, J. 2002 Preparation and Processing of Nanoscale Materials by Supercritical Fluid Technology. In *Supercritical Fluid Technology in Materials Science and Engineering* (ed M. Dekker), pp. 491–576. New York: Chemical Rubber Company.
77. Girotra, P., Singh, S. K. & Nagpal, K. Supercritical fluid technology: a promising approach in pharmaceutical research. *Pharm. Dev. Technol.* (2013);**18**, 22–38.
78. Amorij, J. P., Huckriede, A., Wilschut, J., Frijlink, H. W. & Hinrichs, W. L. J. Development of stable influenza vaccine powder formulations: Challenges and possibilities. *Pharm. Res.* (2008);**25**, 1256–1273.
79. Alted, L. 2015 Mejora de las condiciones de liofilización para obtención de fruta en polvo.
80. Technology, B. 2012 *Introduction to Freeze drying*. 2nd edn. United Kingdom: BTL intelliggent freeze drying.
81. Franks, F. Freeze-drying of bioproducts: Putting principles into practice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (1998);**45**, 221–229.
82. Kasper, J. C., Winter, G. & Friess, W. Recent advances and further challenges in lyophilization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2013);**85**, 162–169.
83. Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S. & Fessi, H. Freeze-drying of

- nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2006);**58**, 1688–713.
84. Tang, X. (Charlie) & Pikal, M. J. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice. *Pharm. Res.* (2004);**21**, 191–200.
85. Nail, S. L. The Effect of Chamber Pressure on Heat Transfer in the Freeze Drying of Parenteral Solutions. *PDA J. Pharm. Sci.* (1980);**34**, 358–368.
86. Schersch, K., Betz, O., Garidel, P., Muehlau, S., Bassarab, S. & Winter, G. Systematic investigation of the effect of lyophilizate collapse on pharmaceutically relevant proteins III: Collapse during storage at elevated temperatures. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2013);**85**, 240–252.
87. Overcashier, D. E., Patapoff, T. W. & Hsu, C. C. Lyophilization of protein formulations in vials: Investigation of the relationship between resistance to vapor flow during primary drying and small-scale product collapse. *J. Pharm. Sci.* (1999);**88**, 688–695.
88. Franks, F. & Auffret, T. 2007 *Freeze-drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals: principles and practice*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
89. Pikal, M. J., Shah, S., Roy, M. L. & Putman, R. The secondary drying stage of freeze drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. *Int. J. Pharm.* (1990);**60**, 203–207.
90. Fonte, P., Reis, S. & Sarmiento, B. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *J. Control. Release.* (2016);**225**, 75–86.
91. Beck-Broichsitter, M., Rytting, E., Lebhardt, T., Wang, X. & Kissel, T. Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: A shift in the ‘ouzo region’ upon drug loading. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2010);**41**, 244–253.
92. Schoenwald, R. D. & Stewart, P. Effect of particle size on ophthalmic bioavailability of dexamethasone suspensions in rabbits. *J. Pharm. Sci.*

- (1980);**69**, 391–394.
93. Lale, S. V, Goyal, M. & Bansal, A. K. Development of lyophilization cycle and effect of excipients on the stability of catalase during lyophilization. *Int. J. Pharm. Investig.* (2011);**1**, 214–21.
 94. Vega, E., Gamisans, F., García, M. L., Chauvet, A., Lacoulonche, F. & Egea, M. A. PLGA nanospheres for the ocular delivery of flurbiprofen: drug release and interactions. *J. Pharm. Sci.* (2008);**97**, 5306–17.
 95. Yang, Z. L., Li, X. R., Yang, K. W. & Liu, Y. Amphotericin B-loaded poly(ethylene glycol)-poly(lactide) micelles: preparation, freeze-drying, and in vitro release. *J. Biomed. Mater. Res. A* (2008);**85**, 539–46.
 96. Kasper, J. C. & Friess, W. The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2011);**78**, 248–263.
 97. Moretton, M. A., Chiappetta, D. A. & Sosnik, A. Cryoprotection-lyophilization and physical stabilization of rifampicin-loaded flower-like polymeric micelles. *J. R. Soc. Interface.* (2012);**9**, 487–502.
 98. Jaeghere, F. De, Allémann, E., Leroux, J.-C., Stevels, W., Feijen, J., Doelker, E. & Gurny, R. Formulation and Lyoprotection of Poly(Lactic Acid-Co-Ethylene Oxide) Nanoparticles: Influence on Physical Stability and In Vitro Cell Uptake. *Pharm. Res.* (1999);**16**, 859–866.
 99. Patel, H. R., Patel, R. P. & Patel, M. M. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. *Int. J. PharmTech Res.* (2009);**1**, 299–303.
 100. Chang, B. S. & Fischer, N. L. Development of an efficient single-step freeze-drying cycle for protein formulations. *Pharm. Res.* (1995);**12**, 831–837.
 101. Jain, N. K. & Roy, I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci.* (2009);**18**, 24–36.

102. Dorati, R., Genta, I., Montanari, L., Cilurzo, F., Buttafava, A., Faucitano, A. & Conti, B. The effect of γ -irradiation on PLGA/PEG microspheres containing ovalbumin. *J. Control. Release* (2005);**107**, 78–90.
103. Panyam, J., Williams, D., Dash, A., Leslie-Pelecky, D. & Labhasetwar, V. Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* (2004);**93**, 1804–1814.
104. Barichello, J. M., Morishita, M., Takayama, K. & Nagai, T. Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method. *Drug Dev. Ind. Pharm.* (1999);**25**, 471–476.
105. Andronis, V., Yoshioka, M. & Zografi, G. Effects of sorbed water on the crystallization of indomethacin from the amorphous state. *J. Pharm. Sci.* (1997);**86**, 346–357.
106. Stensgaard Stoltze, A. 2009 Investigation of Water Binding in Aqueous Solutions of Poly(ethylene glycol), Poly(propylene glycol) and Symmetric Triblock Copolymers of Poly(ethylene glycol) and Poly(propylene glycol).
107. Christiansen, K., Jørgensen, M. & Stoltze, A. 2007 Determination of Water Activity in Poly(styrene-co-acrylic acid) Suspensions and Polyethylene Glycol Solutions by Relative Humidity Measurements.
108. Parra, A., Mallandrich, M., Clares, B., Egea, M. A., Espina, M., García, M. L. & Calpena, A. C. Design and elaboration of freeze-dried PLGA nanoparticles for the transcorneal permeation of carprofen: ocular anti-inflammatory applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. (2015);**136**, 935–943.
109. Furrer, P., Delie, F. & Plazonnet, B. 2008 Modified-Release Drug Delivery Technology. In *Ophthalmic drug delivery* (ed N. Raleigh), pp. 59–84. Pharmaceu Tech, Inc.
110. Vega, E., Egea, M. & Calpena, A. Role of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on freeze-dried and gamma-irradiated PLGA and PLGA–PEG diblock copolymer nanospheres for ophthalmic. *Int. J. Nanomedicine* (2012);**7**, 1357–1371.
111. Kroll, C., Borchert, H. & Kissel, T. Tetracycline-HCl-loaded poly (DL -lactide-

- co-glycolide) microspheres prepared by a spray drying technique : influence of γ -irradiation on radical formation and polymer degradation. *J. Control. Release* (1999);**59**, 23–32.
112. Vega, E., Egea, M. A., Valls, O., Espina, M. & Garci, M. L. Flurbiprofen Loaded Biodegradable Nanoparticles for Ophthalmic Administration. *J. Pharm. Sci.*(2006);**95**, 2393–2405.
113. Faisant, N., Siepmann, J. & Benoit, J. P. PLGA-based microparticles: Elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2002);**15**, 355–366.
114. Fonte, P., Soares, S., Costa, A., Andrade, J. C., Seabra, V., Reis, S. & Sarmiento, B. Effect of cryoprotectants on the porosity and stability of insulin-loaded PLGA nanoparticles after freeze-drying. *Biomatter* (2012);**2**, 329–339.
115. Singh, K. K. & Shegokar, R. Conversion of stavudine lipid nanoparticles into dry powder. *Int. J. Pharma Bio Sci.* (2011);**2**, 443–457.
116. Bartolotta, A., D'Oca, M. C., Campisi, M., De Caro, V., Giandalia, G., Giannola, L. I., Brai, M. & Calderaro, E. Effects of gamma-irradiation on trehalose-hydroxyethylcellulose microspheres loaded with vancomycin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2005);**59**, 139–146.
117. Ford, J. L., Rubinstein, M. H., McCaul, F., Hogan, J. E. & Edgar, P. J. Importance of drug type, tablet shape and added diluents on drug release kinetics from hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets. *Int. J. Pharm.* (1987);**40**, 223–234.
118. Le Boursais, C., Acar, L., Zia, H., Sado, P. A., Needham, T. & Leverage, R. Ophthalmic drug delivery systems—Recent advances. *Prog. Retin. Eye Res.* (1998);**17**, 33–58.
119. España, S. A. E., editor 2007 *El manual Merck*. 11th edn. S.A. Elsevier España.
120. Schoenwald, R. & Huang, H. 1983 Corneal penetration behavior of beta-blockers: blocking agents I: Physicochemical factors. *J. Pharm. Sci.* (1983);**72**, 4–10.

121. Ayalasonmayajula, S. P. & Kompella, U. B. Retinal delivery of celecoxib is several-fold higher following subconjunctival administration compared to systemic administration. *Pharm. Res.* (2004);**21**, 1797–1804.
122. Prausnitz, M. R. & Noonan, J. S. Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: A literature analysis for drug delivery to the eye. *J. Pharm. Sci.* (1998);**87**, 1479–1488.
123. Geroski, D. H. & Edelhauser, H. F. Transscleral drug delivery for posterior segment disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2001);**52**, 37–48.
124. Tangri, P. & Khurana, S. Basics of Ocular Drug Delivery Systems. *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.* (2011);**2**, 1541–1552.
125. Tavaszi, J. & Budai, P. The use of HET-CAM test in detecting the ocular irritation. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* (2007);**72**, 137–141.
126. Ludwig, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2005);**57**, 1595–1639.
127. Zimmer, A. K., Maincent, P., Thouvenot, P. & Kreuter, J. Hydrocortisone delivery to healthy and inflamed eyes using a micellar polysorbate 80 solution or albumin nanoparticles. *Int. J. Pharm.* (1994);**110**, 211–222.