



## FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

# FORMULACIONES OFTÁLMICAS

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2018

**Autor:** Gonzalo Miguel Adsuar Meseguer

Modalidad: Experimental

Tutor/es: Marta González Álvarez

María Isabel González Álvarez

*“En los ojos del joven arde la llama. En los del viejo, brilla la luz.”*

*Víctor Hugo.*



Este Trabajo de Fin de Grado ha sido realizado en el marco del proyecto *“APLICACIÓN DE HIDROGELES IÓNICOS PARA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS POR VIA OFTÁLMICA”* del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Este proyecto ha sido financiado por la Universidad Miguel Hernández. Convocatoria única 2017. Modalidad *“DESARROLLO DE UN PROYECTO DE PRUEBA DE CONCEPTO REALIZADA CON EL PROPÓSITO DE VERIFICAR QUE LA TECNOLOGÍA ES SUSCEPTIBLE DE SER EXPLOTADA DE UNA MANERA ÚTIL”*

Respecto al trabajo de investigación sobre hidrogeles iónicos, se ha trabajado con la patente con título: *“FORMULACIÓN PARA LIBERACIÓN MODIFICADA DE SUSTANCIAS ACTIVAS O FÁRMACOS, USO Y PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN”* ante la Oficina Española de Patentes y Marcas con registro P201631463.



## ÍNDICE

### Resumen

#### 1 Introducción y antecedentes

##### 1.1 Anatomía del sistema ocular

###### 1.1.1 Estructura ocular

###### 1.1.2 Barreras al paso de fármacos administrados por vía tópica ocular

###### 1.1.2.1 Pérdida de fármacos en la superficie corneal

###### 1.1.2.2 Estratificación corneal

###### 1.1.2.3 Barreras internas oculares

##### 1.2 Vías de administración ocular de fármacos

###### 1.2.1 Administración tópica ocular de fármacos

###### 1.2.2 Herramientas para optimizar la administración ocular de fármacos

###### 1.2.3 Hidrogeles como formulación tópica ocular

###### 1.2.3.1 Lentes de contacto como sistema de liberación de medicamentos

##### 1.3 Corticoides de uso oftálmico

###### 1.3.1 Dexametasona

##### 1.4 Antimicrobianos de uso oftálmico.

###### 1.4.1 Cloranfenicol

#### 2 Objetivos

#### 3 Material y Métodos

##### 3.1 Materiales

###### 3.1.1 Soluciones empleadas

###### 3.1.1.1 Solución HBSS

###### 3.1.1.2 Solución pH 7,4.

###### 3.1.1.3 Solución de suero fisiológico

##### 3.2 Obtención de hidrogeles

##### 3.3 Método de cargado de fármaco

##### 3.4 Ensayos de liberación de hidrogeles de dexametasona y cloranfenicol.

##### 3.5 Cuantificación del fármaco en las muestras

3.6 Ensayos previos al estudio comparativo de liberación entre solución de cloranfenicol e hidrogel de cloranfenicol.

3.6.1 Ensayo de irritabilidad oftálmica de la formulación.

3.6.1.1 Metodología

3.6.2 Ensayo de adhesividad del hidrogel a la córnea según su uso como película polimérica tipo parche.

3.6.2.1 Metodología

3.7 Permeabilidad

3.7.1 Preparación de la córnea del modelo animal.

3.7.2 Células de difusión

3.8 Protocolo experimental del estudio comparativo de permeabilidad entre solución de cloranfenicol e hidrogel de cloranfenicol.

4 Resultados y discusión

4.1 Validación de la técnica analítica

4.2 Resultados y discusión del ensayo de irritabilidad

4.3 Resultados y discusión del ensayo de adhesividad

4.4 Resultados y discusión de ensayos de liberación de hidrogeles de dexametasona y cloranfenicol

4.4.1 Resultados y discusión de ensayos de liberación de hidrogeles de dexametasona.

4.4.2 Resultados y discusión de ensayos de liberación de hidrogeles de dexametasona.

4.5 Resultados y discusión del ensayo de permeabilidad

4.5.1.1 Resultados y discusión del ensayo de permeabilidad sin lavado

4.5.1.2 Diseño de un nuevo protocolo experimental para considerar el efecto del parpadeo y lagrimeo.

5 Conclusión

6 Bibliografía

## RESUMEN

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales obtenidas a partir de polímeros hidrófilos que tienen la capacidad de hincharse en un medio acuoso sin disolverse, presentando utilidades de interés en el campo biomédico. En los últimos años se ha avanzado en su investigación y comercialización pudiendo obtener sistemas capaces de vehicular fármacos.

Desarrollar modelos y aplicaciones para la administración y liberación de fármacos en hidrogeles como forma farmacéutica se presenta como una alternativa a tener en cuenta frente a las formulaciones clásicas como colirios y ungüentos por un lado, que presentan problemas de biodisponibilidad y posología que dificultan su administración en su versión tópica, y por otro frente a las vías intravítreas que presentan demasiada invasividad y riesgo. Para ello se sintetizaron nuevos hidrogeles de dexametasona y cloranfenicol utilizando quitosán como polímero, y se estudiaron los parámetros de liberación de las formulaciones en hidrogel frente a soluciones de los mismos fármacos. Los perfiles de disolución obtenidos se analizaron con el parámetro estadístico  $f_2$  que permite comparar los perfiles de las formulaciones en hidrogel con las de referencia en solución. Además se llevó a cabo un ensayo de irritación del hidrogel de estudio sobre membrana corioalantoidea para analizar la viabilidad para administrar el hidrogel por vía oftálmica sin tener que recurrir a la técnica de Draize. Otro ensayo estudiado en el presente trabajo es el de mucoadhesividad de la formulación de estudio sobre córneas de modelos animales (conejos y cerdos), para estimar la capacidad mucoadhesiva de las formulaciones en el tejido corneal y determinar el incremento del tiempo de residencia en el lugar de aplicación. Por último se estudió la permeabilidad de las distintas formulaciones en hidrogel frente a las soluciones de los fármacos de estudio. Esto fue posible gracias a la creación de un modelo in vitro empleando córneas de modelos animales en células de Franz y analizando la cantidad de fármaco acumulada que iba pasando del compartimento dador de la célula de Franz al compartimento receptor a través de la córnea.

Los resultados obtenidos hacen necesario continuar con la experimentación de los ensayos comparativos entre formulaciones de dexametasona y cloranfenicol en hidrogel frente a las soluciones de los mismos fármacos.

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

El ojo humano, más allá de maravillarse al ser humano como sistema óptico, es un sistema complejo con ciertos privilegios anatómicos e inmunológicos que lo convierten en un órgano peculiar ya que ningún otro órgano corporal es tan accesible o visible para su observación pero al mismo tiempo plantea dificultades para la administración de fármacos<sup>1</sup>.

Su naturaleza conlleva que el desarrollo de la oftalmología y las demás disciplinas vinculadas con ella requieran de un elevado grado de especialización. Si además se tiene en cuenta que la ciencia avanza a pasos agigantados y pone a disposición de los profesionales sanitarios tecnología y una gran cantidad de herramientas, estos deben ser capaces, en aras de la ciencia, de adaptarse, conocer, investigar y dominar nuevas técnicas para el beneficio de los pacientes y la sociedad.

El papel del farmacéutico como engranaje de una maquinaria multidisciplinaria, ante esta incipiente demanda asistencial y exigencia de la población en materia de calidad visual, le obliga a reformularse desde el campo de la farmacoterapia, la investigación y la clínica para dar solución a patologías relacionadas con el aparato ocular de gran complejidad y riesgo, asociado a nefastas consecuencias para la visión.

Dentro de su faceta como experto del medicamento, el farmacéutico debe estar a la vanguardia de tratamientos, nuevas formulaciones y fármacos.

El concepto de fármaco se define como una molécula bioactiva, diferente de un nutriente, cuya estructura y configuración química produce un efecto biológico cuando se administra a un ser vivo en el que por lo general, se busca e idealiza que genere siempre más efectos beneficiosos que perjudiciales. Dichos efectos, beneficiosos y/o perjudiciales dependen entre otros factores de la vía de administración empleada<sup>2</sup>.

La administración tópica es habitual en el tratamiento de diversas patologías y trastornos oculares, fundamentalmente cuando se busca una actuación localizada en la superficie del ojo. No obstante, el ojo presenta mecanismos de protección tales como el lagrimeo y el parpadeo reflejo que provocan una recirculación y renovación del fluido lacrimal, lo cual limita el

tiempo de residencia de las administraciones tópicas clásicas como colirios y ungüentos sobre la superficie ocular. Si además se tienen en cuenta las barreras anatómicas y fisiológicas, se compromete la absorción del fármaco. Por ello, la biodisponibilidad ocular de medicamentos tópicos oculares convencionales es muy limitada, en torno al 5%, y se requiere de dosis más altas, en ocasiones perjudiciales para el ojo. Requieren también de administraciones repetidas que pese a su facilidad de administración pueden ser una complicación para conciliar con la vida del paciente.

Por otro lado los avances en la ciencia de los materiales han arrojado nuevas alternativas para el desarrollo de formulaciones sólidas para la administración ocular de fármacos. Los hidrogeles, los sistemas mucoadhesivos y los insertos oculares permiten optimizar la dosificación, facilitar la posología y mejorar la biodisponibilidad de muchos fármacos oculares además de reducir los efectos sistémicos, en la mayoría de ocasiones perjudiciales.

Cada día son más las personas usuarias de lentes de contacto en detrimento de las lentes clásicas. Las lentes de contacto blandas, a través de su naturaleza como hidrogeles, se postulan como un vehículo ideal para la formulación de fármacos.

### **1.1. Anatomía del sistema ocular**

El ojo es un órgano responsable en el proceso neurofísico de la visión con una anatomía y una fisiología peculiar. Cuenta con un sofisticado sistema de protección que lo protege de elementos físicos y químicos que puedan dañar su integridad<sup>3</sup>.

Desde el punto de vista de la administración ocular de fármacos, el ojo presenta una serie de limitaciones a tener en cuenta anatómica y fisiológicamente. La superficie ocular se debe encontrar siempre hidratada y ser ópticamente transparente para poder producir el fenómeno de enfoque de un objeto correctamente<sup>4</sup>.

Esto es gracias a la secreción lagrimal y al parpadeo, que suponen la primera barrera que limita la estancia de cualquier formulación en contacto con la superficie ocular. Posteriormente se encuentra la propia estructura ocular, donde

la córnea, la esclerótica y la barrera hematocorneal ejercen de barreras naturales.

Además hay que tener en cuenta factores alrededor y dentro del ojo. Rodeando al ojo se encuentran los músculos extraorbitales que permiten su movimiento en todas las direcciones y dentro del ojo hay que tener en cuenta elementos como la expresión de transportadores, la unión de las moléculas a la melanina y el estado físico del humor vítreo y humor acuoso, lo que limitará la absorción de cualquier sustancia situada en la superficie y en la cámara anterior del ojo<sup>5</sup>.

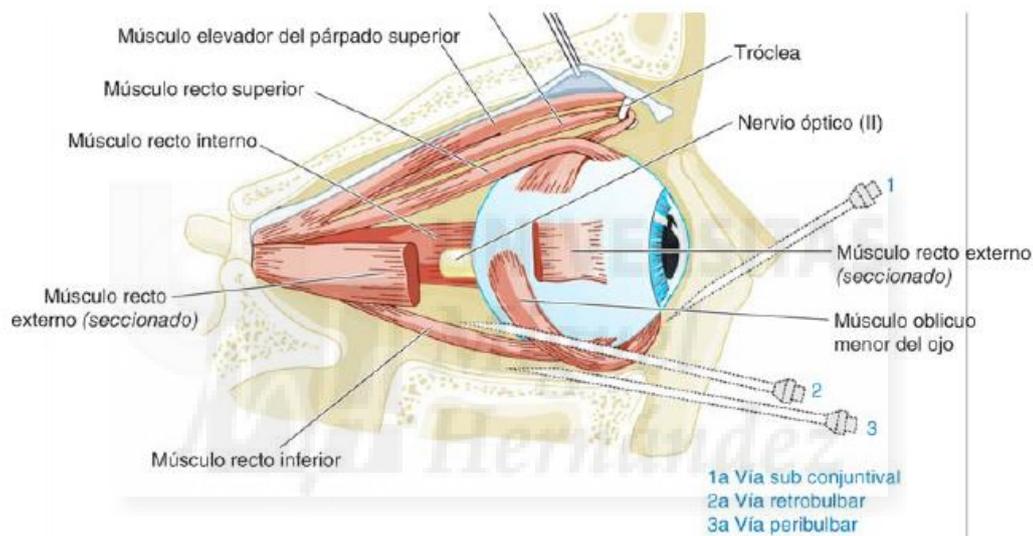


Figura 1. Anatomía del globo ocular y su relación con la órbita y los párpados. Las trayectorias que siguen las agujas (indicadas en azul) señalan algunas de las posibles rutas de administración intraocular de fármacos (Henderer y Rapuano, 2012).<sup>5</sup>

### 1.1.1 Estructura ocular.

La clasificación clásica establece la división del ojo en dos compartimentos o zonas, denominados segmento anterior y segmento posterior. El segmento anterior ocupa aproximadamente un tercio de la parte anterior del ojo y está compuesto por la córnea, la unión esclerocorneal, la conjuntiva, la red trabecular, las cámaras anterior y posterior, la red trabecular, el iris, la pupila, el conducto de Schlemm, el cristalino, las zónulas, el cuerpo ciliar y el humor acuoso<sup>6</sup>.

El segmento posterior comprende la parte posterior la esclerótica, la cual envuelve todo el ojo, el tracto uveal, la retina, la coroides, el nervio óptico y el humor vítreo<sup>7</sup>.

Entrando en detalle, en lo que respecta a la pared anatómica del globo ocular se distinguen tres capas concéntricas. La capa más externa se corresponde con la denominada capa fibrosa formada por la córnea en la parte anterior y la esclerótica en la parte posterior. La capa vascular o úvea se corresponde con la capa intermedia, formada por cuerpos ciliares, iris y coroides. Por último, la capa más interna es aquella que une sistema nervioso con el órgano ocular, implicando la retina, el nervio óptico y los vasos retinianos<sup>8</sup>.

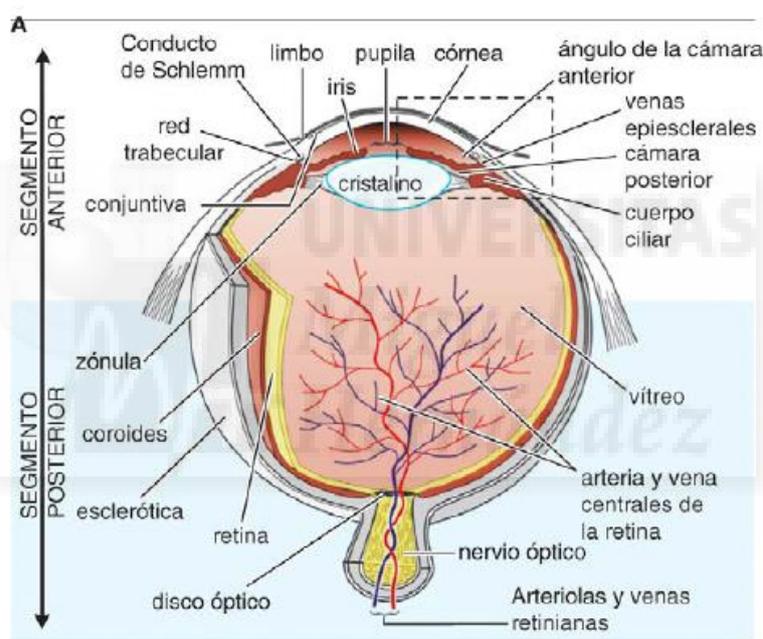


Figura 2. Anatomía general del ojo humano. División en segmentos (Henderer y Rapuano, 2012).<sup>5</sup>

## 1.1.2 Barreras al paso de fármacos administrados por vía tópica ocular

### 1.1.2.1 Pérdida de fármacos en la superficie corneal

Los párpados aseguran una distribución uniforme de las lágrimas sobre la superficie ocular. El aparato lacrimal está constituido por elementos glandulares accesorios que contribuyen a la hidratación, protección, lubricación y reparación del epitelio corneal.<sup>5</sup>

El pH medio de las lágrimas es de 7.35.<sup>9</sup>

Sin embargo, el drenaje nasolacrimal que se produce en la superficie ocular bajo la acción de los fluidos lagrimales reduce el tiempo de residencia de cualquier sustancia en contacto con la conjuntiva, lo que actúa como barrera al paso de fármacos de administración tópica ocular.<sup>3</sup>

#### **1.1.2.2 Estratificación corneal**

La córnea es un tejido transparente organizado en cinco capas superpuestas sin vascularización. Constituye la principal barrera biológica que deben vencer los fármacos para su absorción oftálmica o corneal. Su función es proteger al órgano ocular y dar forma al mismo.

Las capas que conforman la córnea son el epitelio, la membrana de Bowman, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio.<sup>5</sup>

El epitelio corneal es altamente lipófilo y constituye una importante barrera fisiológica para cualquier sustancia. Las moléculas hidrofóbicas pueden atravesar el tejido, pero su permeabilidad se encuentra limitada posteriormente por otra membrana hidrofílica, el estroma, el cual constituye casi el 90% del grosor corneal. Por último es menester destacar la hidrofobicidad de la membrana de Descemet caracterizada por uniones muy estrechas que impiden la entrada de sustancias. Por tanto, para que un fármaco pueda atravesar la córnea debe tener un coeficiente adecuado entre lipofilia-hidrofilia, sin olvidar otros factores como el grado de ionización, el peso molecular del fármaco, su tamaño, el pH, la fijación del fármaco a las proteínas de las lágrimas y la presencia de bombas de eflujo transmembrana.<sup>3</sup>

#### **1.1.2.3 Barreras internas oculares**

Una vez en el interior del sistema ocular, el fármaco en cuestión debe atravesar el tracto uveal, la retina, la barrera hemato-retiniana y el humor vítreo en el que está todo embebido.<sup>5</sup>

### **1.2. Vías de administración ocular de fármacos**

Son muy variadas y diferentes las patologías que pueden afectar a la integridad del sistema ocular. En función del área dañada se tendrán que emplear métodos diferentes teniendo en cuenta que el éxito de la terapéutica

dependerá de las concentraciones de fármaco en su lugar de acción durante un tiempo determinado sin causar efectos negativos.

La vía de administración ocular se emplea para la administración de principios activos cuyo objetivo terapéutico se focaliza en patologías oculares.

Existen ciertas circunstancias que van a requerir administraciones más invasivas como la administración periocular y la administración intraocular, pero la vía más frecuente es la administración tópica ocular.<sup>6</sup>

### **1.2.1. Administración tópica ocular de fármacos**

La vía tópica es la vía más empleada para la administración de medicamentos oftálmicos dada su sencillez, seguridad y no invasividad. Los fármacos más utilizados en esta vía son antimicrobianos como el ciprofloxacino o el cloranfenicol, betabloqueantes, corticoides como la dexametasona, mióticos y midriáticos entre otros, siempre buscando generar un efecto local en lugar de un efecto sistémico.<sup>10</sup>

Una vez se aplica el fármaco sobre la superficie ocular o el saco conjuntival este inicia su recorrido a través de la córnea hacia el humor acuoso, lo que se considera como respuesta terapéutica, o bien atraviesa la mucosa nasolacrimal (accediendo a circulación sistémica pudiendo producirse efectos no deseados), o bien atraviesa la conjuntiva y la esclerótica.

Si se emplean gotas oftálmicas, el fármaco se mezcla con el fluido lacrimal diluyéndose por la excesiva y continua secreción lacrimal. El contenido medio vertido por gota en una formulación oftálmica es de 30 microlitros. Sin embargo, por acción del parpadeo reflejo, el ojo solo es capaz de albergar 10 microlitros, los cuales se van renovando a un ritmo medio de 1.2 microlitros por minuto, lo que genera que el fármaco vaya eliminándose del área precorneal. Este hecho limita esencialmente la biodisponibilidad ocular de las formulaciones clásicas, la cual depende de la permeabilidad del epitelio corneal, el tiempo de residencia en la zona precorneal y la dinámica de fluido lacrimal.

Teniendo en cuenta estas limitaciones es necesaria la aplicación frecuente de elevadas concentraciones de fármaco para mantener niveles terapéuticos

adecuados, lo que además de poder ocasionar efectos no deseados va a repercutir negativamente en el cumplimiento del paciente.<sup>11</sup>

Por tanto los sistemas convencionales de administración tópica ocular tales como las gotas, suspensiones o pomadas y ungüentos, a pesar de su bajo coste de producción y su simplicidad, no pueden considerarse óptimos para el tratamiento de patologías oculares a pesar de que más del 90% de las formulaciones oftálmicas se producen en estas presentaciones.<sup>6</sup>

### **1.2.2. Herramientas para optimizar la administración ocular de fármacos.**

De cara a mejorar la biodisponibilidad tópica ocular se pueden seguir dos estrategias. Por un lado mejorar las técnicas de formulación básica para mejorar la solubilidad de los fármacos, y por otro trabajar en formulaciones que permitan aumentar el tiempo de residencia de los fármacos en el área precorneal o facilitando su penetración a través de la córnea.

### **1.2.3. Hidrogeles como formulación tópica ocular.**

Un hidrogel se considera un material polimérico entrecruzado de origen natural o sintético que se hincha en contacto con el agua formando un material blando y elástico, y que retiene una porción significativa de la misma sin disolverse.<sup>12</sup>

El proceso de síntesis de un hidrogel es en realidad un proceso de polimerización con una serie de particularidades. Entre en juego el papel del agente de entrecruzamiento junto con el del disolvente, el monómero, el agente iniciador y en algunos casos el agente desmoldeante.<sup>13</sup>

Un punto a tener en cuenta a favor de los hidrogeles es la elevada capacidad adhesiva, lo cual les permite garantizar un mayor tiempo de residencia en su lugar de acción. Esto se presenta como una gran ventaja ya que es una de las principales limitaciones de la vía oftálmica. Además, es menester tener en cuenta las bondades en materia de citocompatibilidad y mucoadhesividad, ya que no son perjudiciales para los órganos oculares y presentan propiedades bioadhesivas que les permiten convertirse en una opción muy viable para elaborar alternativas nuevas como formas farmacéuticas.

Desde el campo de la óptica, los hidrogeles son cada día más utilizados en forma de lentes de contacto por su sencillez, su índice de refracción adecuado entre 1.3 y 1.6, su versatilidad y los numerosos avances en este campo de la ciencia. Se consideran redes tridimensionales reticuladas de polímeros solubles en agua, capaces de absorber grandes cantidades de agua (>35% p/p) en las que puede difundir oxígeno hasta la córnea. Su capacidad de absorber agua es atribuida a la presencia de grupos hidrofílicos como  $-NH_2$ ,  $-OH$  o  $-COOH$ .<sup>13</sup>

Por otro lado desde el punto de vista terapéutico, los hidrogeles presentan un enorme potencial para ser vehículos de diferentes formulaciones. La unión de estos dos ámbitos plantea un futuro prometedor en el que poder emplear lentes de contacto con fines terapéuticos.<sup>14</sup>

#### **1.2.3.1. Mucoadhesividad.**

La bioadhesión se puede definir como un proceso, en el que dos materiales donde uno de ellos o los dos son de naturaleza biológica, se unen por un periodo de tiempo prolongado debido a la presencia de fuerzas interfaciales. Cuando intervienen membranas mucosas se denomina mucoadhesión.<sup>15</sup>

La unión entre el sistema bioadhesivo y la mucina está determinada por factores relacionados con el polímero, factores ambientales y fisiológicos. Entre los factores ambientales destaca el pH, la fuerza aplicada, el tiempo de contacto y el hinchamiento; como factores fisiológicos la renovación de la mucina y la presencia de alguna posible patología. Respecto a los factores vinculados con el polímero, destacan el peso molecular, la longitud de la cadena, la densidad del entrecruzamiento, disposición estérica, flexibilidad, hidratación, enlaces de hidrógeno, la concentración del polímero y su grado de ionización.

En el caso del quitosán, su mucoadhesividad se debe principalmente a las interacciones electrostáticas entre los grupos catiónicos del polímero grupos aniónicos de la mucina, aunque se han descrito más interacciones de tipo no electrostáticas e hidrofóbicas.<sup>14</sup>

### **1.2.3.2. Lentes de contacto como sistema de liberación de medicamentos.**

Dependiendo del monómero y su naturaleza, y de la proporción de agua incluida en la formulación del hidrogel, las lentes de contacto se clasifican en dos grandes grupos: hidrofílicas e hidrofóbicas.<sup>12</sup>

La *Food and Drug Administration* (FDA) las clasifica en tres categorías de acuerdo a su uso: no terapéuticas, de uso especializado y terapéuticas. Los objetivos de estas últimas son muy variados, encontrándose entre los más importantes aliviar el dolor ocular, favorecer la cicatrización de heridas corneales, ofrecer protección mecánica, mantener una correcta hidratación y controlar la liberación de medicamentos

La elevada biocompatibilidad de los hidrogeles, su estabilidad tanto química como térmica y su capacidad para moldearse los hace idóneos candidatos para dispositivos biomédicos y vehículos de fármacos para el tratamiento de enfermedades oculares.

El elevado contenido en agua de los hidrogeles permite la incorporación de algunos fármacos por simple inmersión en soluciones concentradas o vertiendo un pequeño volumen sobre su concavidad inmediatamente antes de su aplicación en el ojo, o incluso instilando gotas sobre la lente de contacto una vez insertada en el ojo.<sup>16</sup>

Una vez aplicado el fármaco a los hidrogeles, lo cual puede ser a veces complicado dependiendo de la naturaleza de ambos entes (hidrogel y fármaco), se produce la difusión del hidrogel al fluido lacrimal postlente, entre lente y córnea. La renovación del fluido lacrimal en esta zona es mucho más lenta lo que aumenta el tiempo de residencia sobre la superficie corneal. Diferentes modelos matemáticos y resultados clínicos sugieren que la biodisponibilidad ocular podría aumentar en un 50% en comparación con gotas oftálmicas, además de reducir en muchos casos los efectos adversos tópicos.<sup>16</sup>

El tiempo necesario para la difusión de un fármaco en el seno de un hidrogel disminuye conforme es mayor el contenido en agua. Por otro lado cuanto menor sea el peso molecular del fármaco, menos tiempo será necesario para la

liberación del fármaco. En ausencia de mecanismos de retención de fármacos específicos, la liberación de un fármaco desde el hidrogel sigue más bien las leyes de la difusión aunque puede originarse el efecto *burst* al entrar en contacto superficie corneal e hidrogel. Los principales factores determinantes del proceso de liberación con el espesor de la lente, su grado de hidratación y la concentración de un fármaco incorporado.<sup>17</sup>

### **1.3. Corticoides de uso oftálmico**

Los corticoides conforman un grupo de fármacos disponibles para el tratamiento de patologías oculares que conllevan un proceso inflamatorio. Se emplean tanto para afecciones tópicas del sistema ocular como para el tratamiento de patologías que afectan a la estructura interna, como la retina. Todo el conjunto de acciones antiinflamatorias se lleva a cabo fundamentalmente por la inhibición de la síntesis de lipocortina-1, que inhibe la acción de la fosfolipasa A2, enzima que libera los ácidos grasos poliinsaturados (ácido araquidónico) precursores de leucotrienos, prostaglandinas y otros factores responsables del proceso inflamatorio. Además reducen la permeabilidad vascular y estabilizan la barrera hemato-retiniana. Los corticoides más utilizados en terapia ocular tópica son la dexametasona, la prednisolona, la fluorometolona y el difluprednato.<sup>18</sup>

#### **1.3.1. Dexametasona**

Dexametasona es un corticoide fluorado, de larga duración de acción, de elevada potencia antiinflamatoria e inmunosupresora y prácticamente nula actividad mineralocorticoide.<sup>19</sup>

Su indicación terapéutica en su presentación en colirio es el tratamiento de las manifestaciones inflamatorias no infecciosas de las afecciones oculares que responden a los corticosteroides, tales como procesos inflamatorios no infecciosos de conjuntiva palpebral y bulbar, córnea y segmento anterior del ojo.<sup>20</sup>

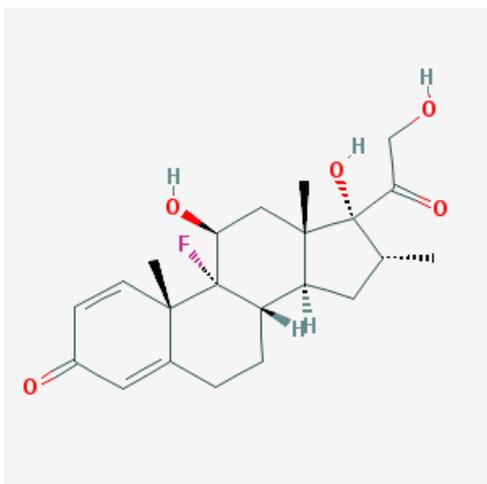


Figura 3. Estructura química de la dexametasona. Pubchem 5743.<sup>21</sup>

Su nombre químico es (8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17R)-9-fluoro-11,17-dihidroxi-17-(2-hidroxiacetil)-10,13,16-trimetil-6,7,8,11,12,14,15,16-octahidrociclopenta[a]fenantren-3-ona. Su fórmula empírica es  $C_{22}H_{29}FO_5$ , tiene un peso molecular de 392.467 g/mol. Es una molécula cristalina lipófila ( $\log P$  1.83) y poco soluble en agua (89mg/L a 25°C)<sup>21</sup>

La dexametasona presenta una elevada potencia antiinflamatoria y una reducida (casi nula) sobre la retención de sodio.<sup>18</sup> Además constituye una elección viable para el tratamiento de numerosas patologías periorbitales e intraoculares caracterizadas por edema e inflamación. Puede administrarse como antiinflamatorio de vía tópica con una gota de 3 a 6 veces al día, y si se trata de una afección inflamatoria grave, 1 gota cada 2 horas. Si se aplica en ungüento normalmente se aplica 3 veces al día. Por otro lado puede administrarse en vía intravítrea para tratar patologías como uveítis o degeneración macular a través de un implante en el ojo afectado y no tratando los dos ojos a la vez. Respecto a sus intervalos de repetición debe evitarse volver a llevarse a cabo en los próximos 6 meses a una administración.<sup>19</sup>

#### 1.4. Antimicrobianos de uso oftálmico

Existe una gran variedad de familias y grupos de antimicrobianos de interés clínico. Los mecanismos por los cuales con actividad antimicrobiana inhiben el crecimiento o causan la muerte de los microorganismos son muy variados, dependiendo del mecanismo de acción y de la diana afectada.

La pared celular puede verse afectada en la síntesis (fosfomicina, cicloserina) o el transporte de sus precursores (bacitracina, mureidomicinas), o en su organización estructural ( $\beta$ -lactámicos, glucopéptidos).

Los principales derivados que afectan a la membrana citoplásmica son las polimixinas y la daptomicina. La síntesis proteica puede bloquearse por una amplia variedad estructural de compuestos que afectan a algunas de las fases de este proceso: activación (mupirocina), iniciación (oxazolidinonas, aminoglucósidos), fijación del complejo aminoácido-ARNt al ribosoma (tetraciclinas, glicilciclinas) o elongación (anfenicoles, lincosamidas, macrólidos, cetólidos, estreptograminas o ácido fusídico). El trimetoprim y las sulfamidas (con frecuencia usados en combinación) son los representantes de los antimicrobianos que bloquean las vías metabólicas de la bacteria. El metabolismo de los ácidos nucleicos puede verse afectado en la ARN polimerasa dependiente de ADN (rifamicinas) o en el proceso de enrollamiento/desenrollamiento del ADN (quinolonas); algunos compuestos afectan directamente al ADN (nitroimidazoles, nitrofuranos). Algunos compuestos, aun siendo incapaces de inhibir o matar las bacterias, pueden bloquear sus mecanismos de resistencia, por lo que usados en combinación con otros antimicrobianos potencian la acción de estos últimos; de este grupo de sustancias sólo se emplean en clínica algunos inhibidores de  $\beta$ -lactamasas.<sup>22</sup>

Son múltiples las afecciones que pueden dañar el globo ocular. Entre ellas las infecciones oculares ocupan un papel importante por su repercusión negativa en la visión de los afectados, de no ser tratadas adecuadamente.

Los microorganismos pueden causar infecciones en diferentes estructuras del ojo tales como: los párpados, vías lagrimales, conjuntiva, córnea, esclera, cavidad vítrea, retina y nervio óptico.

Los colirios se emplean principalmente en el tratamiento de las infecciones de la conjuntiva (conjuntivitis) y las superficiales y profundas de la córnea y esclera. En el caso de las infecciones intraoculares (endoftalmitis) siempre se utilizan, pero asociado a otras vías de administración. También, se aplican en la profilaxis de infecciones quirúrgicas y traumáticas.

Por otra parte, los ungüentos se destinan para las infecciones de párpados, conjuntiva y, en ocasiones, de la córnea. Están compuestos por partículas de medicamentos suspendidas en una base oleaginosa y su mayor ventaja es que aumentan el tiempo de permanencia en las lágrimas, ya que el mayor problema de las administraciones tópicas es el tiempo de residencia en el lugar de acción.<sup>22</sup>

#### 1.4.1. Cloranfenicol

El cloranfenicol es un fármaco de amplio espectro con buena respuesta terapéutica. Es un bacteriostático, que daña de forma reversible la síntesis proteica bacteriana. Tiene un espectro de acción contra gérmenes gramnegativos, grampositivos y anaerobios. Cloranfenicol ejerce su efecto principal en células bacterianas por inhibición de la síntesis proteica mediante la unión a la subunidad 50S ribosomal impidiendo la adición de aminoácidos durante el ensamblaje de la cadena de peptídica. Las enterobacterias muestran resistencia variable. La *Pseudomonas aeruginosa* es resistente al cloranfenicol. Debe evitarse su uso por largo tiempo.<sup>23</sup>

Su indicación terapéutica es para infecciones del polo anterior del ojo (conjuntiva y/o córnea) causadas por microorganismos sensibles al cloranfenicol como microorganismos gram positivos aerobios tal como *Staphylococcus aureus*.

En España existe comercializada como forma de administración oftálmica de cloranfenicol la pomada oftálmica, ungüento. En 2015 se retiró la formulación en colirio.<sup>24</sup>

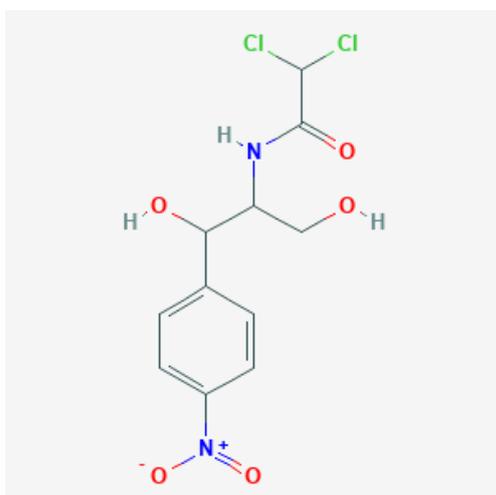


Figura 4. Estructura química del cloranfenicol. Pubchem 298.<sup>25</sup>

Su nombre químico es 2,2-dicloro-N-[1,3-dihidroxi-1-(4-nitrofenil) propan-2-il] acetamida. Su fórmula empírica es  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ , tiene un peso molecular de 323.126 g/mol. Es una molécula cristalina lipófila (log P 1.14) y poco soluble en agua (2.5 mg/mL a 25°C)

El cloranfenicol está indicado en patologías tales como conjuntivitis, blefaritis o queratitis donde se usa de forma tópica. La posología habitual es de aplicación de pomada cada 3 horas, ya que la formulación en gotas ya no se comercializa.<sup>19,</sup>

25

## 2. Objetivos

El objetivo de este estudio es diseñar, obtener y caracterizar nuevas formulaciones en hidrogel como alternativa a las formulaciones clásicas.

Los objetivos específicos han sido:

- Sintetizar nuevos hidrogeles utilizando quitosan como polímero para administrar fármacos de uso oftálmico como el cloranfenicol y la dexametasona.
- Evaluar la irritabilidad oftálmica de la formulación
- Determinar la adhesividad del hidrogel a la córnea según su uso como película polimérica tipo parche.
- Determinar perfiles de disolución de los principios activos de estudio dexametasona y cloranfenicol formulados en hidrogel, en un medio a pH 7.4.
- Estudiar la permeabilidad a través de la córnea de conejo y cerdo de los principios activos formulados como hidrogel y comparar con los valores obtenidos con los mismos fármacos en disolución utilizando un método *in vitro*.
- Diseñar un ensayo que permita valorar las ventajas de la formulación hidrogel respecto al tiempo de permanencia en el ojo.

### 3. Materiales y Métodos.

#### 3.1. Materiales.

Los materiales usados en este trabajo de investigación han sido: dexametasona, cloranfenicol, chitosán medio al 2% (HCl 35%, agente reticulante 6-PG-Na y metanol, suministrados por Sigma-Aldrich. Otros materiales: agua destilada, HBSS (suministrado por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández; SEA-UMH), córneas de conejo y cerdo (suministrado por SEA-UMH).

##### 3.1.1. Soluciones utilizadas.

###### 3.1.1.1. Solución HBSS

Composición solución HBSS proporcionada por SEA-UMH
0.137M NaCl
5.4mM KCl
0.25mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0.1g glucosa
0.44mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1.3mM CaCl <sub>2</sub>
1.0mM MgSO <sub>4</sub>
4.2 mM NaHCO

Tabla 1. Composición solución HBSS.

###### 3.1.1.2. Solución de pH 7,4.

Solución elaborada en laboratorio a partir de una solución ya preparada de pH 6,8. La posterior basificación se lleva a cabo titrando con NaOH 0,1 N y calibrando con pHmetro. Esta solución previa de pH 6,8 está formada por:

Composición Tampón Fosfato pH 6.8
4.04g NaCl
2.2mL NaOH 10M
6.8g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Csp 1000mL Agua miliQ
pH 6.8

Tabla 2. Composición solución pH 6.8

### **3.1.1.3. Solución de suero fisiológico.**

Suero fisiológico Acofar en unidosis de 5mL suministrado por Farmacia Centro.

### **3.2. Obtención de los hidrogeles.**

Para la preparación del hidrogel se pesan 2.00 gramos de chitosan medio y se añaden a una disolución de 100 mL de agua con HCl, de pH 0.1 N. Adicionalmente en otro vaso se pesan y preparan los principios activos de estudio, cloranfenicol (23.1 mg) y dexametasona (2.31 mg). Por otro se prepara el agente reticulante, el cual se pesa 1 gramo y se disuelve en 10 mL de agua destilada.

### **3.3. Método de cargado del fármaco.**

El cargado de los principios activos se llevó a cabo de forma simultánea a la formación del hidrogel.

- Se pesan 23.1mg de cloranfenicol. En el caso de la dexametasona se pesan 2.31mg de principio activo.
- Se les añaden 0.77mg de quitosán medio al 2% en HCl 0.1N.
- Se dejan en agitación con imanes durante hora y media.
- Paralelamente se suspende agente reticulante 6PG en agua para alcanzar una concentración de 100mg/mL.
- Tras la espera de hora y media se añade el 6PG y se agita en vórtex un minuto.
- Tras agitar con el vórtex se obtiene una dispersión homogénea y blanquecina en los dos casos.
- Acto seguido se introducen las muestras en el congelador mientras se prepara el liofilizador y se lleva a -65°C, lo que tarda unos 120 minutos.
- Una vez se alcanza esta temperatura se sacan las dispersiones del congelador y se llevan al liofilizador donde se ponen a congelar durante hora y media.
- Posteriormente se pone a liofilizar durante 2 días en el programa “frío y vacío”.

Estas dispersiones se liofilizaron dando lugar a hidrogeles secos, xerogeles, en forma de disco por el vaso en el que se prepararon. Esta forma se puede manipular con facilidad y pueden rehidratarse para formar un hidrogel viscoso.

### 3.4. Ensayos de liberación de hidrogeles de dexametasona y cloranfenicol.

Se evaluó la capacidad de los hidrogeles como sistemas de liberación modificada. El ensayo se llevó a cabo en vasos colocados en un agitador orbital termorregulado (Stuart orbital incubator SI50) a 37° C y 80 revoluciones por minuto durante 24 horas. Los hidrogeles en forma de disco liofilizado se introdujeron, sin ningún dispositivo adicional, en los vasos que contienen 100 mL de medio tamponados a pH 7.4. La toma de muestras fue a determinados tiempos (5', 10', 15', 30', 1, 2, 4, 8, 12, 24 horas) y el volumen retirado se repuso con el medio tamponado a pH 7.4. Las concentraciones de dexametasona y cloranfenicol se analizaron por HPLC y sus datos se trabajaron en Excel extrapolando a rectas de calibrado elaboradas previamente con los principios activos disueltos en metanol. Los perfiles de disolución se compararán utilizando la fórmula  $f_2$  tras representar el porcentaje disuelto frente al tiempo con la siguiente fórmula:

$$f_2 = 50 * \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - E_t)^2 \right]^{-0.5} * 100 \right\}$$

Donde  $n$  es el número de muestras tomadas para realizar el cálculo,  $R_t$  es el porcentaje disuelto promedio en el tiempo  $t$  del producto de referencia y  $E_t$  es el porcentaje disuelto promedio en el tiempo  $t$  del producto de estudio

### 3.5. Cuantificación del fármaco en las muestras.

Para cuantificar la cantidad de fármaco de estudio en las muestras se realizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detección por ultravioleta. El sistema cromatográfico empleado fue un Sistema Alliance® HPLC, que consta de los siguientes módulos:

- Módulo de Separaciones Waters™ 2695 compuesto por una bomba cuaternaria e inyector automático integrado.

- Detector de absorbancia Waters <sup>TM</sup> 2487 doble  $\lambda$ .
- Registrador-integrador Empower <sup>TM</sup>

En cuanto a las condiciones cromatográficas, se utilizó una fase estacionaria reversa formada por:

- Precolumna Phenomenex <sup>®</sup> KJO-4282 con dos filtros de 2 microgramos y relleno con micropartículas C18 de 40 microgramos de tamaño (Phenomenex AJO-4287, C18 4 x 3.0 mm)
- Columna de acero inoxidable Waters <sup>TM</sup> modelo Nova Park<sup>®</sup> C18 de 150 mm de longitud, 3.9 mm de diámetro y tamaño de partícula 4 microgramos.

Se trabajó con un método isocrático a velocidad de flujo 1 ml/min y con temperatura de columna de 30°. La fase móvil fue una mezcla en proporción volumétrica de 50:50 de solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0.1% y acetonitrilo. Los componentes de la fase móvil se centrifugaron durante 10 minutos a 10000G, de las cuales se extrajo 150 microlitros en un vial con inserto para poder pinchar en el HPLC.

### **3.6. Ensayos previos al estudio comparativo de liberación entre solución de cloranfenicol e hidrogel de cloranfenicol**

#### **3.6.1. Ensayo de irritabilidad oftálmica de la formulación.**

Este ensayo se ha realizado utilizando huevos fecundados con la colaboración y asesoramiento del Dr. Otero de la Universidad de Santiago de Compostela. Se introducen los huevos fecundados obtenidos de una granja en una cámara climática hasta que se desarrolla la membrana corioalantoidea. Entonces se ponen en contacto con esta membrana las formulaciones: a) hidrogel, b) control positivo c) control negativo con el fin de determinar posteriormente el Índice de Irritación según la metodología descrita en detalle por el grupo del Dr. Otero-Espinar.<sup>26</sup>

#### **3.6.2. Ensayo de adhesividad del hidrogel a la córnea según su uso como película polimérica tipo parche.**

El ensayo de mucoadhesividad in vitro se realiza para estimar la capacidad mucoadhesiva de las formulaciones en el tejido corneal. Para este ensayo se

diseñó un sistema que consta de una superficie inclinada 45 grados sobre la cual se instala un dispositivo que bombea un flujo constante de fluido lagrimal de 4 mL/min. Sobre esta superficie se colocaron portaobjetos a los que se les pegaron con cianoacrilato las corneas. Se administran las formulaciones y se pone en marcha el flujo de fluido. A tiempos prefijados se analiza la cantidad de fármaco remanente en la superficie e interior de la córnea.

### **3.7. Permeabilidad.**

Para determinar la permeabilidad de los fármacos y las corneas de estudio se realizó el estudio de permeabilidad *in vitro* en células de Franz. A continuación se describe la preparación de la córnea, el montaje de las células de difusión y el protocolo experimental.

#### **3.7.1. Preparación de la córnea del modelo animal**

En los experimentos de absorción transcorneal se utilizó como membrana la córnea de modelos animales, conejos en un primer momento y cerdos en el último ensayo porque el servicio de experimentación animal no pudo aportar más muestras.

Para mantener la homogeneidad se seleccionaron modelos de conejos blancos New Zealand aportados por el SEA-UMH. Se separó la córnea del modelo animal mediante bisturí quirúrgico ayudado de pinzas quirúrgicas tras la eutanasia del modelo animal que ya había participado en otro estudio donde no se requerían las corneas, siempre acompañado de una aprobación de un comité ético. La extracción de la córnea se hace recortando en torno a la esclera en lo que se conoce vulgarmente como “casquete”. Estas corneas se lavaron con HBSS y se colocaron directamente sobre las células de Franz para la posterior realización del ensayo. Para la extracción de las corneas se eutanasia al animal en el quirófano, se sujeta el ojo con pinzas y se clava un bisturí en la esclera. Acto seguido se extrae el bisturí y en la incisión creada se introduce una tijera quirúrgica con la que se traza un recorrido en torno a la córnea. Una vez se ha extraído el “casquete” se debe colocar directamente en la célula de Franz, o en su defecto en un bote estéril con suero fisiológico o solución HBSS y llevar al laboratorio para montar en la célula de Franz.

Los primeros ensayos del experimento con dexametasona se realizaron en corneas de conejo. Sin embargo, ante la imposibilidad de conseguir más muestras se planteó una alternativa con ojos de cerdo facilitados por el SEA-UMH para el resto de ensayos.

### 3.7.2. Células de difusión.

Los ensayos de permeabilidad se llevaron a cabo en células de difusión conocidas como células de Franz (Figura 5). Se trata de un sistema cerrado conformado por dos piezas cilíndricas de vidrio que forman dos compartimentos conocidos como dador y como receptor. Entre ellas se sitúa la membrana de estudio, en el caso de esta investigación una córnea de modelo animal, conejo o cerdo.

El compartimento receptor tiene una tubuladura en un lado que permite la toma de muestras y la reposición del volumen retirado durante el muestreo. La córnea se coloca entre ambos compartimentos de manera que la zona externa de la córnea en el modelo del ojo quede hacia el compartimento dador y la zona interna de la córnea en contacto con la solución receptora.

La estanqueidad del conjunto se garantiza con los bordes esmerilados en la zona de contacto con la córnea, además de que se ve reforzada por la presencia de una pinza externa que mantiene las dos partes unidas. Esta pinza se encuentra unida a un soporte metálico que facilita la estabilidad de las células de Franz en el baño termostatzado, ya que para simular las condiciones fisiológicas se introducen las células en un baño a 37°C.

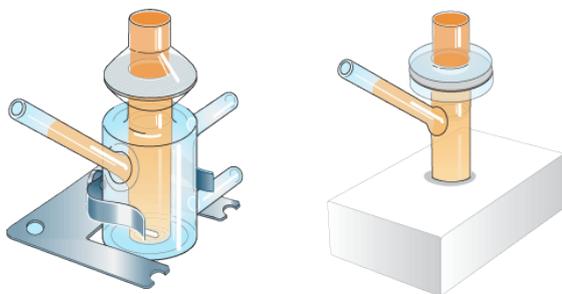


Figura 5. Célula de Franz. (analyses systeme) <sup>27</sup>

### 3.8. Protocolo experimental del estudio comparativo de permeabilidad entre solución de cloranfenicol e hidrogel de cloranfenicol.

El ensayo se realiza de la siguiente forma: para garantizar que las córneas son aptas para el estudio, previamente al inicio del experimento es necesario comprobar la integridad de las membranas tras su extracción, visualmente.

Se deben montar las córneas en las células de Franz. En el compartimento receptor se administra tampón de pH 7,4. Esta solución debe prepararse previamente y se debe comprobar que el pH tenga el valor adecuado, con el pHmetro. En el compartimento receptor de la célula de Franz se introduce un imán y se llena de solución hasta el límite de su capacidad, 12 mL. Acto seguido se coloca la córnea encima y se cubre con el compartimento dador de la célula de Franz. Se fija la unión con una pinza lateral. Se coloca la célula en un soporte y se introduce en un baño termostatzado a  $37 \pm 0.5^{\circ} \text{C}$  y con agitación a 300 rpm.

Para este ensayo se coloca en el compartimento dador una solución de cloranfenicol o un hidrogel de cloranfenicol, creando dos grupos simulando las condiciones de utilización clínica. La solución de cloranfenicol es de 2.25mg/mL en solución tampón 7,4 previamente elaborada, aproximándose a la máxima solubilidad teórica, 2.5mg/mL y debe prepararse previamente al comienzo del estudio también. El hidrogel de cloranfenicol debe elaborarse y liofilizarse con anterioridad conforme a lo explicado previamente.

Los tiempos de muestreo prefijados son los siguientes: 5', 10', 15', 30', 1h, 2h, 3h, 14h, 15h, 18h y 24h para todos los ensayos que se han realizado. En dichos tiempos se toman 150 microlitros de muestra del compartimento receptor de la célula de Franz. Posteriormente se centrifugan y se analizan en cromatografía HPLC. En la tabla 3 se muestran las condiciones del ensayo.

Condiciones	Especificaciones
Aparato	Agitador con baño.
Medio de disolución	Solución Tampón pH 7,4 a 37°C

<b>Volumen de disolución del compartimento receptor</b>	12 mL
<b>Volumen de muestra</b>	0.080mg de hidrogel de cloranfenicol o 1mL de solución de cloranfenicol (2.25mg/ml) en tampón 7,4.
<b>Velocidad de agitación</b>	300 rpm
<b>Tiempo de muestreo</b>	5', 10', 15', 30', 1h, 2h, 3h, 14h, 15h, 18h', 24h
<b>Determinación</b>	Cromatografía líquida de alta resolución 238nm

Tabla 3. Especificaciones para el ensayo del Cloranfenicol

#### 4. Resultados y discusión

##### 4.1. Validación de la técnica analítica

Las técnicas analíticas fueron validadas previamente por el equipo de investigación.

##### 4.2. Resultados y discusión del ensayo de irritabilidad

La figura muestra una imagen de la membrana corioalantoidea tras su exposición al hidrogel obtenido sin fármaco. Los resultados indicaron que el hidrogel no es irritante. Esto concuerda con la literatura al descartar la aparición de alteraciones tales como hemorragia, vasoconstricción y coagulación, pudiendo evitarse realizar el test de Draize en ojo de conejo directamente.<sup>28</sup>



Figura 6. Imagen de membrana corioalantoica, sin irritación, tras administración de formulación de estudio.

### 4.3. Resultados y discusión del ensayo de adhesividad

El ensayo de mucoadhesividad in vitro se ha realizado para estimar la capacidad mucoadhesiva de las formulaciones en el tejido corneal. Para este ensayo se diseñó un sistema que consta de una superficie inclinada 45 grados sobre la cual se instala un dispositivo que bombea un flujo constante de fluido lagrimal de 1 mL/min.<sup>30</sup> Sobre esta superficie se colocaron portaobjetos a los que se les pegaron con cianoacrilato las córneas. Se administró el hidrogel vacío y cargado con ambos fármacos y se puso en marcha el flujo de fluido. Los resultados indicaron que el gel se adhiere a la córnea y permanece inmutable durante las 5 horas que duró el ensayo. Sin embargo el gel se despegaba frotando durante unos minutos con un algodón.

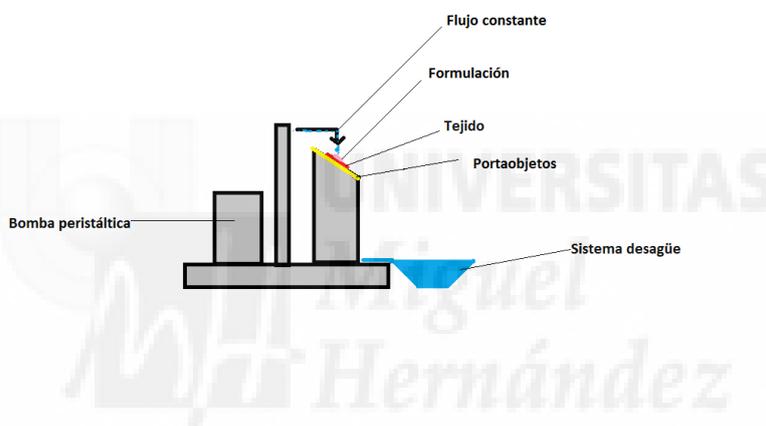


Figura 7. Esquema del sistema de plano inclinado diseñado para el sistema de mucoadhesividad. Adaptado de María Teresa Martínez Martínez. Capítulo 2. Mucoadhesividad in vitro<sup>30</sup>

Este resultado concuerda con los obtenidos para otros hidrogeles de quitosán. La presencia de mucinas y otras proteínas con el quitosán forma unos agregados capaces de alterar el potencial Z de las membranas y generar fenómenos de atracción electrostática, además de los fenómenos de puente de hidrógeno y efectos hidrofóbicos a nivel molecular, que junto con el pH y la disposición física concuerdan con los resultados arrojados de bioadhesión en la córnea con la formulación de estudio.<sup>29</sup>

### 4.4. Resultados y discusión de los ensayos de liberación de hidrogeles de dexametasona y cloranfenicol.

#### 4.4.1. Resultados y discusión de los ensayos de liberación de hidrogeles de dexametasona.

En la tabla 4 se muestran los resultados de porcentaje de fármaco liberado desde la matriz del hidrogel y disuelto en el medio de estudio que imita el fluido lacrimal frente a los distintos tiempos de muestreo de los ensayos de dexametasona, así como de su valor promedio también ilustrado en la figura 8.

Tiempo (min)	Ensayo Dexametasona 1		Ensayo Dexametasona 2	Ensayo Dexametasona 3	Ensayo Dexametasona promedio
	% disuelto	% disuelto	% disuelto	% disuelto	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	8,30	3,64	3,62	5,19	2,69
10	12,45	10,27	6,10	9,60	3,22
15	15,81	11,24	6,83	11,29	4,48
30	21,43	26,86	7,25	18,51	10,12
60	25,50	33,62	25,28	28,13	4,75
120	37,74	42,05	28,52	36,10	6,90
240	53,42	56,74	41,31	50,49	8,12
480	82,36	79,06	70,47	77,30	6,13
720	103,80	97,36	83,69	94,95	10,26
1440	107,07	97,22	98,93	101,07	5,26

Tabla 4. Porcentaje de Dexametasona disuelta a cada tiempo de referencia a pH 7.4.

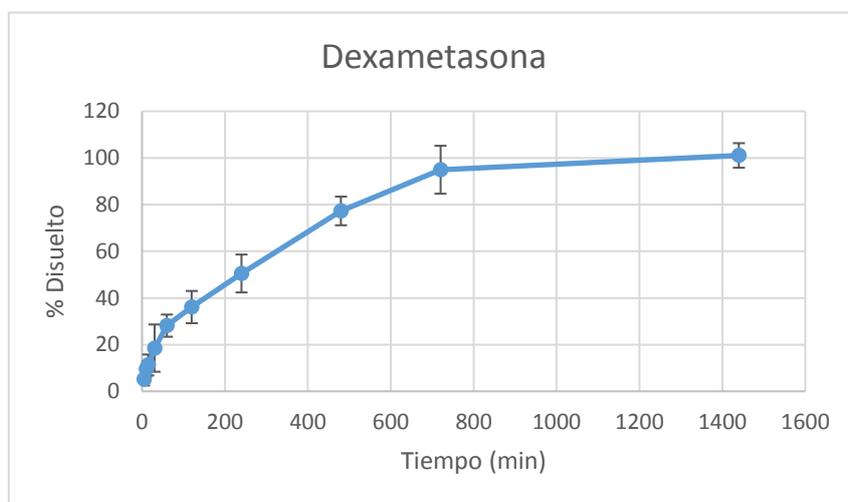


Figura 8. Perfil promedio de liberación de dexametasona a pH 7.4.

Los resultados del perfil de liberación indican que en una hora se libera aproximadamente el 28%, mientras que en cuatro horas se libera aproximadamente un 50%. La liberación de los hidrogeles de dexametasona es del 100% a las 10 horas, periodo de tiempo que corresponde con el descanso nocturno. Estos resultados indican que el fármaco se ha encapsulado con éxito en el hidrogel y que en el medio que simula el fluido lacrimonal se produce una liberación sostenida en el tiempo.

Estos resultados son adecuados para plantear la siguiente fase de ensayos in vitro para este sistema de liberación. Los resultados permitirían plantear una formulación en lente de hidrogel que pudiese aplicarse durante el descanso nocturno ya que facilitara y simplificara la actual sistemática que requiere instilaciones cada hora y que dificulta la adherencia e interfiere en el descanso nocturno.

#### 4.4.2. Resultados y discusión de los ensayos de liberación de hidrogeles de cloranfenicol.

En la tabla 5 se muestran los resultados de porcentaje de fármaco liberado desde la matriz del hidrogel y disuelto en el medio de estudio frente a los distintos tiempos de muestreo de los ensayos de dexametasona, así como de su valor promedio también ilustrado en la figura 9.

Tiempo (min)	Ensayo Cloranfenicol 1	Ensayo Cloranfenicol 2	Ensayo Cloranfenicol 3	Ensayo Cloranfenicol promedio	
	% disuelto	% disuelto	% disuelto	% disuelto	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	8,96	6,77	4,58	6,77	2,18
10	28,78	20,37	11,95	20,37	8,41
15	28,53	21,08	13,63	21,08	7,44
30	45,31	36,94	28,57	36,94	8,36
60	56,02	47,95	39,87	47,95	8,07

<b>120</b>	64,24	55,63	47,01	55,63	8,61
<b>240</b>	71,30	60,22	49,15	60,22	11,07
<b>480</b>	75,11	66,80	58,50	66,80	8,30
<b>720</b>	81,91	74,02	66,14	74,02	7,88
<b>1440</b>	102,80	88,19	73,57	88,19	14,61

Tabla 5. Porcentaje de Cloranfenicol disuelta a cada tiempo de referencia a pH 7.4.

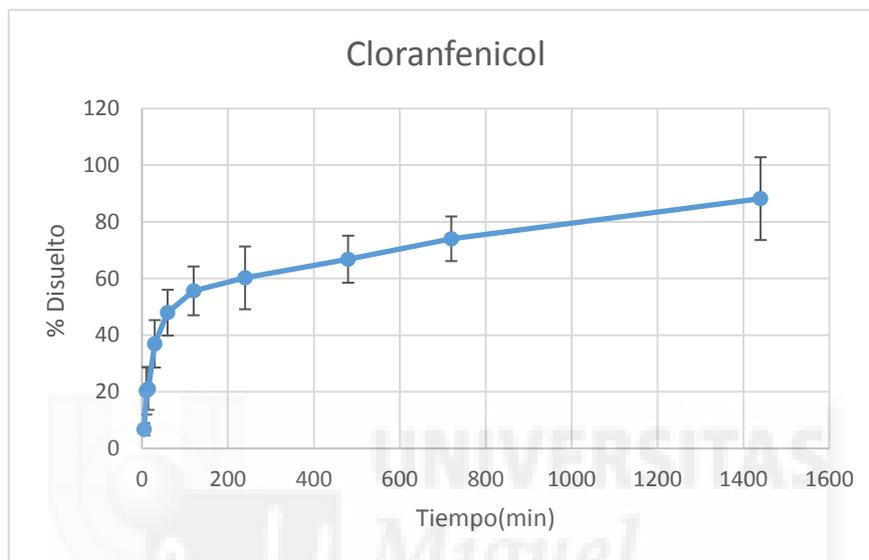


Figura 9. Perfil promedio de liberación de cloranfenicol a pH 7.4.

Los resultados del ensayo de liberación muestran que en una hora se libera aproximadamente el 47% del fármaco encapsulado, mientras que en cuatro horas se libera aproximadamente un 60%. La liberación de los hidrogeles de cloranfenicol es del 80% a las 20 horas. Estos resultados indican que el fármaco se ha encapsulado con éxito en el hidrogel y que en el medio que simula el fluido lacrimal se produce una liberación sostenida en el tiempo.

Estos resultados, aunque el hidrogel de cloranfenicol requiere más tiempo para liberar la totalidad de fármaco, son adecuados para plantear la siguiente fase de ensayos in vitro para este sistema de liberación. Los resultados permitirían plantear una formulación en lente de hidrogel que pudiese aplicarse durante el descanso nocturno ya que facilitara y simplificara la actual sistemática que requiere instilaciones cada hora y que dificulta la adherencia e interfiere en el descanso nocturno.

#### 4.5. Resultados y discusión de los ensayos de permeabilidad.

##### 4.5.1. Resultados y discusión del ensayo de permeabilidad sin lavado

Los ensayos de permeabilidad se llevaron a cabo en células de Franz. Se compararon los perfiles de acumulación de fármaco en el compartimento receptor de la célula de Franz tras la colocación de las muestras de hidrogel y de solución en los compartimentos dadores de diferentes células de Franz con intención de evaluar la permeabilidad de la córnea a las distintas formulaciones. La tabla 6 muestra los valores obtenidos en concentraciones promedio a cada tiempo de referencia y la figura 10 las cantidades acumuladas de cloranfenicol a cada tiempo de referencia para las formulaciones de solución e hidrogel.

CLORANFENICOL	Concentraciones promedio (microM)	
	Solución	Hidrogel
<b>5</b>	26,27	43,44
<b>10</b>	59,20	51,31
<b>15</b>	86,01	55,13
<b>30</b>	105,19	64,80
<b>60</b>	112,04	79,47
<b>120</b>	120,54	94,46
<b>180</b>	122,49	99,54
<b>840</b>	148,07	110,50
<b>900</b>	159,03	128,20
<b>1080</b>	155,25	125,20
<b>1440</b>	162,54	147,62

Tabla 6. Concentraciones promedio de Cloranfenicol en solución e hidrogel en compartimento receptor a cada tiempo de referencia

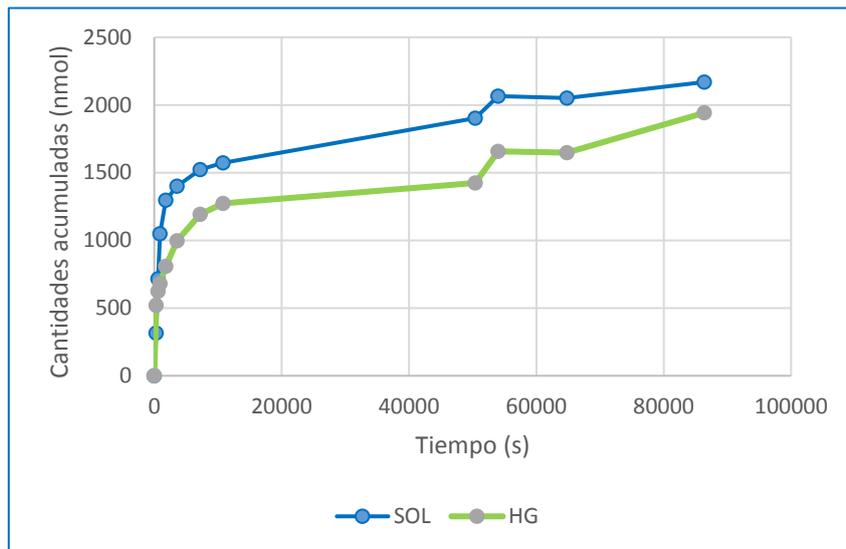


Figura 10. Cantidades acumuladas de cloranfenicol a cada tiempo de referencia en las distintas formulaciones de solución e hidrogel. SOL: solución libre; HG: formulación e hidrogel

Los resultados de concentración de fármaco en compartimento receptor con el tiempo permiten calcular los valores de permeabilidad de las distintas formulaciones a través de las córneas de estudio. En la figura 11 se muestran los resultados de permeabilidad. Como se puede apreciar el valor de permeabilidad es mayor en el caso de la solución de cloranfenicol, mientras que los valores de la formulación en hidrogel son más bajos. Estos resultados entran dentro de lo esperado debido a que en la formulación en hidrogel el principio activo debe liberarse mientras que en la solución se encuentra ya disuelto y resulta más sencillo y directo que pase a través de la córnea que si tiene que producirse un paso previo de liberación.

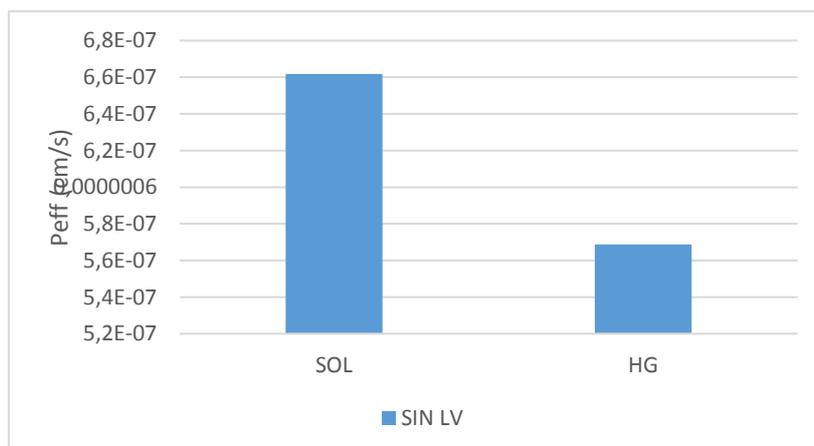


Figura 11. Valores de permeabilidad de las formulaciones en hidrogel y soluciones a través de la córnea de estudio.

Por otro lado, el valor obtenido tras el cálculo de  $f_2$  con los parámetros del estudio es de 35,73. Partiendo de que a partir de un valor de  $f_2$  mayor de 50 se

consideran perfiles similares, el valor de 35,73 indica que los perfiles obtenidos pueden considerarse estadísticamente diferentes. Esto permite deducir que el hecho de encapsular el principio activo en el hidrogel modifica la farmacocinética del proceso al limitar la velocidad de liberación.

No obstante, a vista de los resultados se comprueba que el ensayo no es capaz de reproducir lo que ocurre *in vivo* ya que uno de los problemas de la administración ocular es justamente la rápida eliminación del lugar de administración.

#### **4.5.2. Diseño de un nuevo protocolo experimental para considerar el efecto del parpadeo y lagrimeo.**

Los resultados del ensayo anterior indican que el hidrogel, al liberar más lentamente proporciona una menor permeabilidad de cloranfenicol a través de la córnea ya que, en este caso, la liberación es el factor limitativo. No obstante, la ventaja del sistema hidrogel es el mayor tiempo de residencia en el lugar de administración debido a su mucoadhesividad y este ensayo no permite evaluar este aspecto que se ha comprobado previamente. Es por ello que se ha diseñado un nuevo ensayo para poder tener en cuenta el efecto del lagrimeo y parpadeo.

Para simular el efecto de lavado que se llevará a cabo a través del lagrimeo y el drenaje nasolacrimal, se realizará un estudio en el que añadir 150 microlitros de suero tampón 7.4 un minuto antes de cada toma. Previamente, unos 90 segundos antes de la toma de muestras, se vaciará el compartimento todo el volumen alojado de forma que el estudio se aproxime más a la realidad fisiológica del sistema ocular y eliminando suavemente la solución, manteniendo el resto del protocolo de forma idéntica al ensayo anterior.

Los tiempos de muestreo prefijados serán los siguientes: 5', 10', 15', 30', 1h, 2h, 3h, 14h, 15h, 18h y 24h para todos los ensayos que se han realizado. En dichos tiempos se tomarán 150 microlitros de muestra del compartimento receptor de la célula de Franz. Cuando resten 90 segundos para la toma de muestras se vaciará todo el volumen del compartimento dador y cuando resten 60 se les añadirá el volumen de lavado de 150 microlitros de solución tampón

7.4 en el compartimento dador de la célula de Franz. Posteriormente se centrifugará y se analizará en cromatografía HPLC. Adicionalmente se determinará la cantidad de fármaco retenido en el tejido corneal al final del ensayo. En la tabla 7 se muestran las condiciones del ensayo que se realizará en el futuro.

Condiciones	Especificaciones
Aparato	Agitador con baño.
Medio de disolución	Solución Tampón pH 7,4 a 37°C
Volumen de disolución del compartimento receptor	12 mL
Volumen de muestra	0.080mg de hidrogel de cloranfenicol o 1mL de solución de cloranfenicol (2.25mg/ml) en tampón 7,4.
Velocidad de agitación	300 rpm
Tiempo de muestreo	5', 10', 15', 30', 1h, 2h, 3h, 14h, 15h, 18h', 24h
Tiempo de lavado	60 segundos antes de la toma de muestra
Tiempo de vaciado del compartimento dador	90 segundos antes de tomar muestras.
Determinación	Cromatografía líquida de alta resolución 238nm

Tabla 7. Especificaciones para el ensayo del Cloranfenicol con lavado entre muestras

## 5. Conclusión.

- Se han sintetizado nuevos hidrogeles con dexametasona y cloranfenicol empleando quitosán como polímero.
- Se evaluó la irritabilidad oftálmica de la formulación exponiendo el hidrogel sin fármaco a la membrana corioalantoica. El ensayo permitió determinar que la formulación no es irritante.

- El ensayo in vitro de adhesividad del hidrogel a la córnea demostró que el gel se adhiere a la córnea de manera efectiva aunque se puede despegar frotando con algodón durante unos minutos.
- Se determinaron perfiles de disolución de las formulaciones de dexametasona y cloranfenicol en hidrogel en un medio a pH 7.4 los cuales permitieron demostrar que el fármaco se había encapsulado con éxito y que la liberación a partir del hidrogel se producía de manera sostenida durante varias horas.
- Se estudió la permeabilidad a través de la córnea de conejo y cerdo de las formulaciones de cloranfenicol en hidrogel y se comparó con los valores obtenidos con el mismo fármaco en disolución a través de un método in vitro en células de Franz. Los resultados preliminares obtenidos indican que los valores de permeabilidad son diferentes para el fármaco libre y para el fármaco contenido en el hidrogel aunque se requiere un mayor número de nuevos ensayos.
- Se ha diseñado un ensayo en células de Franz reproduciendo el efecto del lagrimeo que permitirá medir las concentraciones de las muestras en cornea y en el compartimento receptor de la célula de Franz y analizar el tiempo de permanencia de las distintas formulaciones en el ojo. Además se medirán las concentraciones de fármaco acumulado en córnea.

Los ensayos realizados indican que el sistema hidrogel planteado resulta prometedor para administrar fármacos a nivel oftálmico ya que permiten un gran incremento del tiempo de residencia y una liberación prolongada en el tiempo.

## 6. Bibliografía

1. JY, Niederkorn. Una nueva apreciación del privilegio ocular inmune. SEO. Sociedad Española de Oftalmología. [Acceso abril 2018]. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S036566912005000800002](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S036566912005000800002)
2. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R. J. Rang y Dale Farmacología. Volumen único. VI edición. Barcelona: Elsevier; 2008
3. Henderer, J.D., Rapuano, C.J. Sección XIV Oftalmología. Farmacología ocular. En: Brunton, L., Chabner, B., Knollman, B. (Goodman & Gilman). Las bases farmacológicas de la terapéutica. Duodécima edición. México: McGraw-Hill; 2012. Pag. 1773-1801
4. Viqueira Pérez, V., De Fez Saiz, D., Martínez Verdú, F. M Óptica fisiológica: modelo paraxial y compensación óptica del ojo. ISBN: 978-84-7908-775-3; 2004
5. Wilson, C.G., Tan, L.E. Nanostructures overcoming the ocular barrier: physiological considerations and mechanistic issues. En: Alonso, M.J., Csaba, N.S. Nanostructured biomaterials for overcoming biological barriers. Cambridge: RSC Drug discovery Series nº 22; 173-189 (2012).
6. Gaudana, R., Jwala, J., Boddu, S.H.S., Mitra, A.K. Recent Perspectives in ocular drug delivery. Pharm. Res. 26, 1197-1216 (2009).
7. Cholkar, K., Patel, S.P., Vadlapudi, A.D., Mitra, A.K. Novel strategies for anterior segment ocular drug delivery. J. Ocul. Pharmacol. Th. 29, 106-123 (2013).
8. Thibodeau, G.A., Patton, K. T. Órganos de los sentidos. En: Thibodeau, G.A., Patton, K.T. Anatomía y fisiología. 6ª ed. Madrid: Elsevier Mosby; 2007. Pag. 553-591.
9. Baños, J.E., Bosh, F. Farmacología de la secreción lacrimal. En: Baños, J.E., March, M. Farmacología ocular. 2ª ed. Barcelona: UPC; 2002. Pag. 169-175
10. Peraire, C., Obach, R. Administración de fármacos por vía nasal, oftálmica y ótica. En: Doménech, J., Martínez, J., Peraire, C. Tratado general de biofarmacia y farmacocinética. Volumen II. Parte I: Vía de administración

- de fármacos: aspectos biofarmacéuticos. Ed. Madrid: Editorial Síntesis, 2013. Pag. 125-166.
11. March, M.A. Farmacocinética ocular. En: Baños, J.E., March, M. Farmacología ocular. 2ª ed. Barcelona: UPC; 2002a. Pag. 105-123.
  12. N.Efron, Butterworth Heinemann, *Contact Lens Practice*, 2010, pp.3-9, 15-17, 84-85
  13. Hoffman, AS (2002). «Hydrogels for biomedical applications». *Adv Drug Deliv Rev* 54: 3-12
  14. María Teresa Martínez Martínez. Capítulo 1. Introducción. Desarrollo y aplicaciones de hidrogeles para la administración modificada de fármacos. Tesis Doctoral. Valencia, 2016.
  15. Shakir Mansuri Prashant Kesharwani Keerti Jain Rakesh K. Tekade N.K.Jain Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *Reactive and Functional Polymers Volume 100*, 2016, 151-72.
  16. Alvarez-Lorenzo, C., Hiratani, H., Concheiro, A. Contact lenses for drug delivery. Achieving sustained release with novel systems. *Am. J. Drug Deliv.* 4, 131-151 (2006).
  17. Wajs, G., Meslard, J.C. Release of therapeutic agents from contact lenses. *Crit. Rev. Ther. Drug* 2, 275-289 (1986).
  18. Flórez, J. Esteroides corticales y antiinflamatorios esteroideos. En: Flórez, J. Farmacología humana. 6ª ed. Barcelona: Elsevier; 2014. Pag. 824-836.
  19. Bot Plus 2.0. Base de datos de medicamentos del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos... [Acceso abril 2018]. Disponible en: <https://botplusweb.portalfarma.com/botplus.aspx#>
  20. Centro de información del medicamento. CIMA. Ficha técnica Colircusí Dexametasona 1mg/1mL coliro en solución [Acceso abril 2018] Disponible en: [https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/40602/FT\\_40602.html.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/40602/FT_40602.html.pdf)
  21. Dexametasona. Open Chemistry Data Base, Pubchem. Compuesto 5743. [Acceso en Abril 2018] Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5743>
  22. Jorge Calvo y Luis Martínez-Martínez. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 2009; 27:44–52

23. Barberá Loustaunau E, Vázquez Castro F. Tratamientos tópicos oculares: revisión. Rev Terapéutica 2009; 33:80-81.
24. Centro de información del medicamento. CIMA. Ficha técnica Oftalmolosa Cusí Cloranfenicol 10mg/1mg pomada oftálmica [Acceso abril 2018] Disponible en: [https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/19495/FT\\_19495.html](https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/19495/FT_19495.html)
25. Cloranfenicol. Open Chemistry Data Base, Pubchem. Compuesto 298. [Acceso en Abril 2018]] Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/298>
26. Fernández-Ferreiro et al. Evaluación de la toxicidad in vitro de los antibióticos fortificados en gotas elaborados en los departamentos de farmacia hospitalaria. Farm Hosp. 2016 Sep 1;40: 352-70
27. Células de Franz. SES GmbH – Analysesysteme [Acceso Mayo 2018] Disponible en: [http://www.ses-analysesysteme.de/PG\\_SES-Franz\\_Answers\\_uk.htm](http://www.ses-analysesysteme.de/PG_SES-Franz_Answers_uk.htm)
28. GM, Yisel, OC, Alfonso, SA, Carmen, MM, Jose Luis, PE, Arelia, SP, Enrique. Unidad de Toxicología Experimental. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Santa Clara. Cuba. Evaluación de la irritabilidad oftálmica de cremas cosméticas mediante un método in vitro en sustitución de la prueba en conejos Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/26425538\\_-\\_Evaluacion\\_de\\_la\\_irritabilidad\\_ofthalmica\\_de\\_cremas\\_cosmeticas\\_mediante\\_un\\_metodo\\_in\\_vitro\\_en\\_sustitucion\\_de\\_la\\_prueba\\_en\\_conejos\\_Ophthalmic\\_irritability\\_evaluation\\_of\\_cosmetic\\_creams\\_by\\_in\\_vitro\\_met](https://www.researchgate.net/publication/26425538_-_Evaluacion_de_la_irritabilidad_ofthalmica_de_cremas_cosmeticas_mediante_un_metodo_in_vitro_en_sustitucion_de_la_prueba_en_conejos_Ophthalmic_irritability_evaluation_of_cosmetic_creams_by_in_vitro_met) [acceso Mayo 13 2018].
29. Ioannis A. Sogias, Adrian C. Williams and Vitaliy V. Khutoryanskiy Why is Chitosan Mucoadhesive? Biomacromolecules 9, 7, 1837-1842
30. María Teresa Martínez Martínez. Capítulo 2. Hidrogeles covalentes basados en tetraquis (hidroximetil) fosfonio. Mucoadhesividad in vitro. Desarrollo y aplicaciones de hidrogeles para la administración modificada de fármacos. Tesis Doctoral. Valencia, 2016.