



UNIVERSIDAD CENTRAL de VENEZUELA

FACULTAD de FARMACIA

DOCTORADO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

**DESARROLLO DE UN NANOSISTEMA PARA LA LIBERACIÓN
DE FÁRMACOS INTRAVÍTREO**

Esp. ISABEL ANDUEZA

Trabajo presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela para optar
al título de Doctora en Ciencias Farmacéuticas.

TUTORA: Dra. ARACELIS ORTEGA PhD.



VEREDICTO

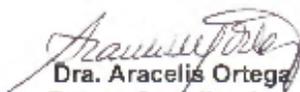
Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Farmacia y el Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad Central de Venezuela, para examinar la **Tesis Doctoral** presentada por la Especialista **ISABEL CECILIA ANDUEZA GALENO**, titular de la Cédula de Identidad **N° V- 5.539.297**, bajo el título "**DESARROLLO DE UN NANOSISTEMA PARA LA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS INTRAVÍTREO**", a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **Doctor en Ciencias Farmacéuticas**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día **Lunes 15 de Octubre de 2012** a las **08:30 a.m.**, para que la **autora** lo defendiera en forma pública, lo que la autora hizo en el **aula 703**, del 7mo. piso de la Facultad de Farmacia, mediante un resumen oral de su contenido. luego de lo cual respondió a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **Aprobarlo** por unanimidad, por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por la **autora**, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado es original, novedoso; enmarcado dentro de la línea de investigación de nuevas tecnologías, aplicadas al desarrollo de sistemas de liberación controlada, destinados a sitios o blancos específicos. Es un trabajo estimulante para continuar la investigación en el área de la Tecnología Farmacéutica en nuestra Universidad. El Jurado por unanimidad decidió calificar el Trabajo de Tesis Doctoral como **Excelente**.

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los **15** días del mes de **Octubre** del año **2012**, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Tutora-Coordinadora del jurado la Dra. Aracelis Ortega.

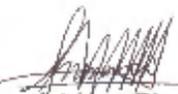

Dra. Aracelis Ortega
Tutora-Coordinadora
C.I. 1982171
Laboratorios FARMA, S.A
Facultad de Farmacia, UCV


Dra. Enriqueta Coromoto Rodríguez
C.I. 4165274
Facultad de Farmacia, UCV


Dr. Jaime Charris Charris
C.I. 11556719
Facultad de Farmacia, UCV


Dra. Evelyn Ochoa
C.I. 6548316
Facultad de Farmacia, UCV




Dra. Adriana Rincón
C.I. 9476877
Universidad de los Andes (ULA)

Es. 15/10/2012.

Página 2 de 2

AGRADECIMIENTO

A la Facultad de Farmacia y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, por su aporte económico durante la pasantía que me permitió realizar esta investigación.

Al Dr. Günther Hochhaus PhD, por haberme aceptado en su grupo de laboratorio del Departamento de Farmacéuticos de la Universidad de Florida, USA y financiar esta investigación.

A mi tutora, Dra. Aracelis Ortega PhD, quiero expresarle mis más sincero respeto y admiración, para mí fue un honor el haberme aceptado como su tutorada.

A todos los profesores que han integrado durante todos estos años la Comisión de Estudios de Postgrado de la Facultad de Farmacia de la UCV, por su voto de confianza, solidaridad, sabios consejos, orientación y motivación en impulsarme a ampliar mis conocimientos en el área de Tecnología Farmacéutica.

A las Profesoras Neira Gamboa, Milagros Avendaño, María Esther Vieira, María Luisa Serrano por todo su apoyo, colaboración y sabios consejos en la revisión de esta Tesis Doctoral.

A mi familia por su paciencia, apoyo y comprensión incondicional, los quiero mucho.

A mis compañeros de Cátedra Profesores: María Esther Vieira, Goretti Rodríguez y César Luna, mis más sinceros agradecimientos por haber asumido mis responsabilidades administrativas y académicas durante mi ausencia.

A todas aquellas personas que con su estímulo y solidaridad me ofrecieron su apoyo.

RESUMEN

La inyección intravítrea ha sido la vía de administración más eficaz para el tratamiento de enfermedades vitreoretinianas. Su práctica continua, no es agradable para los pacientes y a su vez podría causar complicaciones indeseadas. El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar un nanosistema de liberación polímero-terapéutico (conjugado)/nanopartícula, utilizando Dextrano y Quitosano como polímeros transportadores biodegradables, hidrosolubles y compatibles a nivel ocular así como Hemisuccinato de Metilprednisolona como fármaco modelo. Primeramente, el fármaco fue capaz de unirse covalentemente a dos Dextranos de pesos moleculares 10 y 70 kDa. En función del contenido del componente activo y perfil de liberación, se seleccionó el Hemisuccinato de Metilprednisolona-Dextrano 10 kDa para elaborar las nanopartículas de Quitosano por el método de gelificación iónica empleando tripolifosfato sódico como agente entrecruzante. Por último, las nanopartículas fueron cubiertas con lactosa aplicando el secado por atomización. Se evaluó morfología, distribución de tamaño de las partículas, carga superficial, contenido y eficacia de captura del fármaco. Las partículas esféricas presentaron superficies lisas y uniformes. El pH tuvo influencia en el tamaño de las partículas observándose una distribución bimodal a pHs \approx pKa del Quitosano y unimodal con un rango entre 130 - 170 nm a pHs $<$ pKa. La variación de los potenciales Zeta entre los compuestos involucrados en la reacción, indicaron la posible ocurrencia de la misma. Al comparar la liberación del conjugado con las Nanopartículas a pH fisiológico, se observó que la encapsulación retrasó la liberación del fármaco alrededor de un 50%. Las nanopartículas recubiertas formaron micropartículas de $1.780 \pm 0,5$ nm, lo que favoreció su dispersibilidad en agua. Este nuevo nanosistema, evidenció su posible potencial en el desarrollo de formulaciones de liberación intravítrea, que reduzca la frecuencia de administración, ofreciendo una excelente alternativa que proporcione un mayor grado de satisfacción y mejore la calidad de vida del paciente.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|------|
| Veredicto | pp |
| Agradecimiento | ii |
| Resumen | iv |
| Tabla de contenido | v |
| Lista de tablas | vi |
| Lista de figuras | viii |
| Lista de abreviaturas | ix |
| INTRODUCCIÓN | xi |
| Nanotecnología y Nanofarmacia | 1 |
| Sistemas poliméricos de liberación | 5 |
| Nanopartículas como sistema de liberación | 8 |
| Elaboración de Nanopartículas | 15 |
| OBJETIVO GENERAL | 18 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 26 |
| METODOLOGÍA | 26 |
| Materiales | 28 |
| Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) | 28 |
| Síntesis de los MPS-Dex conjugados | 31 |
| Determinación del contenido de MPS en los conjugados de MPS-Dex | 33 |
| Liberación <i>in vitro</i> del MPS durante la incubación del MPS- Dex con solución amortiguadora isotónica de fosfato | 33 |
| Comportamiento hidrolítico del MPS-Dex en solución de TPP y en solución amortiguadora de acetato pH=5,5 | 34 |
| Elaboración de las NPs _{MPS-Dex-Qs} por el método de gelificación iónica | 35 |
| Purificación de la superficie de las NPs _{MPS-Dex-Qs} | 36 |
| Caracterización de NPs _{MPS-Dex-Qs} | 37 |
| Morfología de las NPs | 37 |
| Distribución del tamaño de las NPs | 37 |
| Carga eléctrica superficial de las NPs | 38 |
| Estimación del contenido de MPS en las NPs. | 38 |
| Determinación de la eficacia de captura de la MPS en las NPs | 39 |
| Liberación <i>in vitro</i> del MPS durante la incubación de las NPs _{MPS-Dex-Q} con solución amortiguadora isotónica de fosfato | 40 |
| Elaboración de Micropartículas compuestas por NPs _{MPS-Dex-Qs} /Lactosa | 40 |
| Caracterización de las Micropartículas compuestas por NPs _{MPS-Dex-Qs} /Lactosa | 41 |
| Morfología | 41 |
| Distribución del tamaño de las partículas | 42 |

| | |
|--|----|
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 43 |
| Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) | 44 |
| Síntesis de los MPS-Dex conjugados | 45 |
| Determinación del contenido de MPS en los conjugados de MPS-Dex | 49 |
| Liberación <i>in vitro</i> del MPS durante la incubación del MPS- Dex con solución amortiguadora isotónica de fosfato | 51 |
| Comportamiento hidrolítico del MPS-Dex en solución de TPP y en solución amortiguadora de acetato pH=5,5 | 56 |
| Elaboración de las NPs _{MPS-Dex-Qs} por el método de gelificación iónica | 58 |
| Purificación de la superficie de las NPs _{MPS-Dex-Qs} | 62 |
| Caracterización de las NPs _{MPS-DEX-QS} y micropartículas de NPs _{MPS-Dex-Qs} /lactosa | 63 |
| Morfología de las NPs _{MPS-Dex-Qs} | 63 |
| Morfología de las micropartículas de NPs _{MPS-DEX-QS} /lactosa | 65 |
| Distribución del tamaño de las NPs _{MPS-Dex-Qs} | 69 |
| Distribución del tamaño de las micropartículas de NPs _{MPS-DEX-QS} /lactosa | 71 |
| Carga eléctrica superficial de las NPs _{MPS-Dex-Qs} | 72 |
| Estimación del contenido de MPS en las NPs _{MPS-Dex-Qs} | 73 |
| Determinación de la eficacia de captura de la MPS en las NPs _{MPS-Dex-Qs} | 73 |
| Liberación <i>in vitro</i> del MPS durante la incubación de las NPs _{MPS-Dex-Q} con solución amortiguadora isotónica de fosfato | 74 |
| Elaboración de Micropartículas compuestas por NPs _{MPS-Dex-Qs} /lactosa | 76 |
| CONCLUSIONES | 77 |
| RECOMENDACIONES | 78 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 79 |
| GLOSARIO DE TÉRMINOS | 89 |
| ANEXOS | 94 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----------|
| Tabla I. Secuencia de solventes empleados para la purificación de las NPs _{MPS-Dex-Qs} | pp 36 |
| Tabla II. Resumen de los datos obtenidos de la distribución del tamaño de las partículas emitido por el Nanotrak NPA250 Ultra (n=3) | 70 |
| Tabla III. Comportamiento del tamaño de las NPs _{MPS-Dex-Qs} durante el proceso de elaboración | 72 |
| Tabla IV. Potencial ζ de MPS, MPS-Dex y de las NPs de Qs en diferentes medios de dispersión | 72 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|---------|
| Figura 1. Rutas de administración de los fármacos | pp 2 |
| Figura 2. Esquema de las principales estructuras y barreras oculares | 3 |
| Figura 3. Desacetilación de la quitina | 19 |
| Figura 4. Formación de partículas de Qs por emulsificación con glutaraldehído | 21 |
| Figura 5. Formación de partículas de Qs por gelificación iónica con TPP | 23 |
| Figura 6. Esquema de la síntesis de los conjugados de MPS-Dex | 32 |
| Figura 7. Secador por atomización a escala piloto | 41 |
| Figura 8. Estructura ramificada del Dex | 46 |
| Figura 9. MPS-Dex Conjugado | 47 |
| Figura 10. Hidrólisis básica del MPS-Dex en el grupo éster en posición 21 | 49 |
| Figura 11. Perfil de liberación acumulado de la MP y el MPS en buffer fosfato isotónico pH= 7,2 a 37°C | 52 |
| Figura 12. Esquema de la hidrólisis del grupo éster y de la migración del grupo acilo. | 54 |
| Figura 13. Mecanismo de la migración del grupo acilo del hemiéster de 21 → 17 en buffer fosfato pH=7,2 | 55 |
| Figura 14. Hidrólisis MPS-Dex 10 kDa en solución de TPP al 0,25% | 57 |
| Figura 15. Hidrólisis MPS-Dex 10 kDa en solución de AcH/AcNa 0,2M pH=5,5 | 57 |
| Figura 16. Mecanismo de formación de NPs Qs/TPP | 62 |
| Figura 17. Micrografía (MEB) de NPs _{MPS-Dex-Qs} | 63 |

LISTA DE FIGURAS, cont.

| | |
|---|----------|
| Figura 18. Micrografía (MEB) de $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Qs}}$ | pp 64 |
| Figura 19. Micrografías (MEB) de $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Qs}}$ antes y después del proceso de purificación a pH=5,5 | 65 |
| Figura 20. Micrografías (MEB) de $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Qs}}$ secadas por atomización sin lactosa | 66 |
| Figura 21. Micrografía (MEB) de micropartículas de $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Qs}}$ /lactosa, secadas por atomización | 67 |
| Figura 22. Micrografía (MTE) de micropartículas $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Qs}}$ /lactosa resdispersadas en agua | 68 |
| Figura 23. Micrografía (MTE) de micropartículas $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Qs}}$ /lactosa resdispersadas en agua | 68 |
| Figura 24. Distribución de tamaño de las $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Qs}}$ | 70 |
| Figura 25: Distribución del tamaño de las micropartículas $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Qs}}$ /lactosa | 71 |
| Figura 26. Perfil de liberación de $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Q}}$ en buffer (pH=7.2) a 37°C | 74 |
| Figura 27. Perfil de liberación de $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Q}}$ en buffer (pH=7.2) a 37°C | 75 |
| Figura 28. Perfil de liberación del Conjugado y del Nanosistema en buffer pH=7,2 a 37°C | 75 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AcH/AcNa: Ácido acético/Acetato de sodio.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

C18: Fase estacionaria hidrofóbica de la columna cromatográfica.

CDI: 1,1'Carbonildiimidazol.

d6-DMSO: Dimetilsulfoxido deuterado.

Da: Dalton.

Dex: Dextrano.

DMSO: Dimetilsulfoxido.

DSR: Desviación estándar relativa.

Fl: Fluoresceína.

Fl-Qs: Fluoresceína-Quitosano.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

kDa: Kilodalton.

kV: Kilovoltio.

mBar: milibario.

MEB: Microscopía electrónica de barrido.

MHz: Megahertzios. Un millón de hertzios (Hz).

MP: Metilprednisolona.

MP17S: 17-hemisuccinato *de 6-alfa*-metilprednisolona.

MPS: 21-hemisuccinato *de 6-alfa*-metilprednisolona.

MPS-Dex: 21-hemisuccinato *de 6-alfa*-metilprednisolona-Dextrano.

MPS-Dex-Qs: 21 hemisuccinato de Metilprednisolona-Dextrano-Quitosano.

MTE: Microscopía de transmisión electrónica.

mV: milivóltio.

nm: nanómetros.

NPs: Nanopartículas.

NPs_{MPS-Dex-Qs}: Nanopartículas de 21-hemisuccinato *de 6-alfa*-metilprednisolona -Dextrano-Quitsano.

NPs_{MPS-Dex-Qs}/lactosa: Micropartículas formadas por Nanopartículas de 21-hemisuccinato *de 6-alfa*-metilprednisolona-Dextrano-Quitsano recubiertas de lactosa.

PBS: Solución amortiguadora de fosfato.

PM: Peso molecular.

potencial ζ : potencial Zeta.

ppm: Partes por millón.

Qs: Quitosano.

Qs-TPP: Quitosano- tripolifosfato sódico.

r.p.m: Revoluciones por minuto.

r^2 : Coeficiente de correlación al cuadrado.

RMN ^1H : Resonancia magnética nuclear de protón.

TA: Temperatura ambiente, ($22^\circ \pm 2^\circ\text{C}$).

TEA: Trietilamina.

TPP: tripolifosfato sódico ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$).

tr: tiempo de retención.

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial, de acuerdo a sus siglas en inglés (*Vascular endothelial growth factor*).

µg/mL: microgramos/mililitros

µm: micrómetros

INTRODUCCIÓN

La inyección intravítrea es una técnica mínimamente invasiva de demostrada eficacia en el tratamiento de numerosas enfermedades vítreo-retinianas, si se compara con los dispositivos intravítreo que requieren de una intervención quirúrgica para su implantación. Además, en la mayoría de los casos, el dispositivo debe ser extraído una vez que éste se ha vaciado, lo que involucra mayores riesgos. Unido a esto, habría que sumarle los costos asociados a estos procedimientos.

En estos últimos años, se ha producido un aumento exponencial en el uso de las inyecciones intravítrea, debido a la administración de nuevos fármacos contra el edema macular, degeneración macular, alteraciones vasculares retinianas, retinopatía diabética, retinitis pigmentaria, inflamaciones intraoculares y la neovascularización coroidea entre otras patologías, (Gómez-Ulla y cols., 2009). La administración de la inyección intravítrea constituye un riesgo al paciente que aumenta con la frecuencia del tratamiento, pudiendo afectar su visión. En el año 2004 Jager y cols., publicaron los riesgos y complicaciones de este procedimiento, entre los que se encontraban endoftalmitis, desprendimiento de retina, hemorragias intraoculares y cataratas. La selección de esta vía de administración no es aceptada ni agradable por el paciente, sin embargo hasta el momento es una forma de lograr el efecto terapéutico a bajas dosis, disminuyendo la toxicidad y efectos adversos de los fármacos. Las otras vías tradicionales que podrían emplearse para estos tratamientos serían: tópicas, sistémicas y perioculares, Figura 1. La desventaja

que presentan, es que el fármaco debe atravesar las barreras fisiológicas oculares dificultando alcanzar los niveles terapéuticos fácilmente y esto implicaría asociar la continua administración con elevadas concentraciones, pudiéndose obtener efectos sistémicos indeseados, (Ogura, 2001; Ciulla y cols., 2004). Unido a esto, los fármacos disponibles para formulaciones oftálmicas, presentan en muchos casos baja solubilidad en agua, el medio más compatible a nivel ocular o también, baja solubilidad en lípidos, que evidencia menor biodisponibilidad debido a su poca penetración en las distintas barreras fisiológicas, (Järvinen y Niemi, 2007).

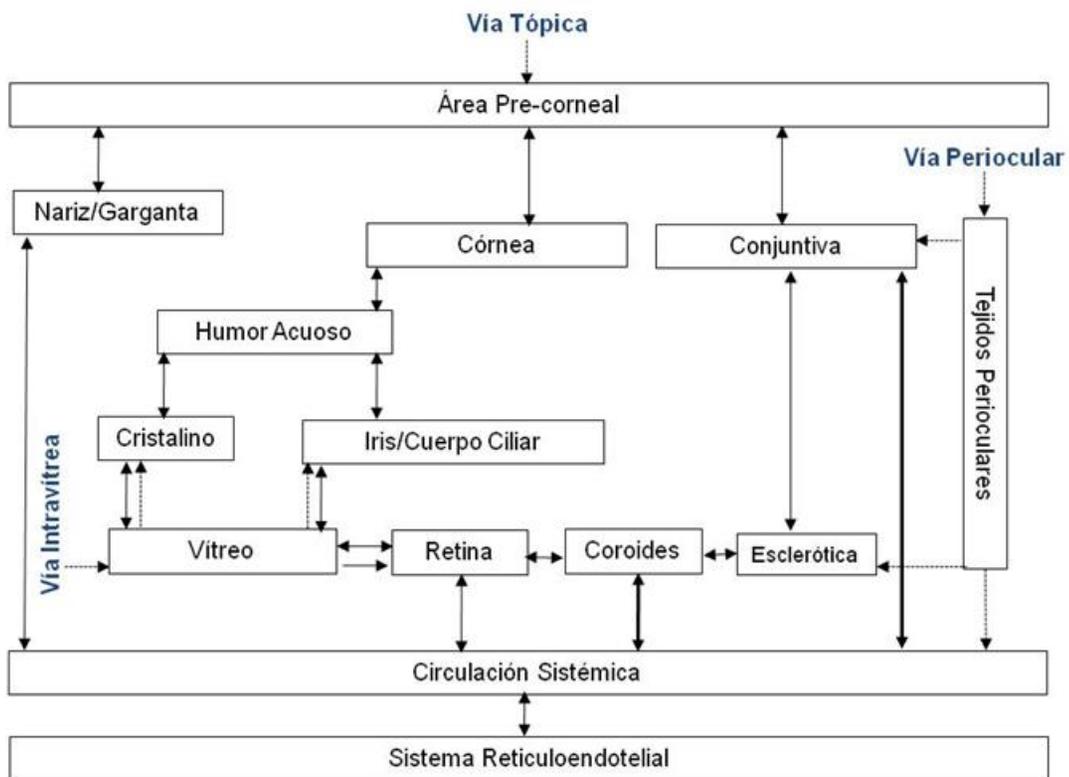


Figura 1. Rutas de administración de los fármacos. (Bu y cols. Curr. Drug. Metab. 2007).

Para entenderlo mejor, podríamos explicar brevemente la anatomo-fisiología del sistema ocular, Figura 2. A simple vista, pareciera ser un órgano ideal y de fácil acceso para el tratamiento del segmento anterior (córnea, cámara anterior, cámara posterior, iris, humor acuoso, cristalino, y cuerpo ciliar); por el contrario, está bien protegido contra la absorción de cualquier sustancia externa.

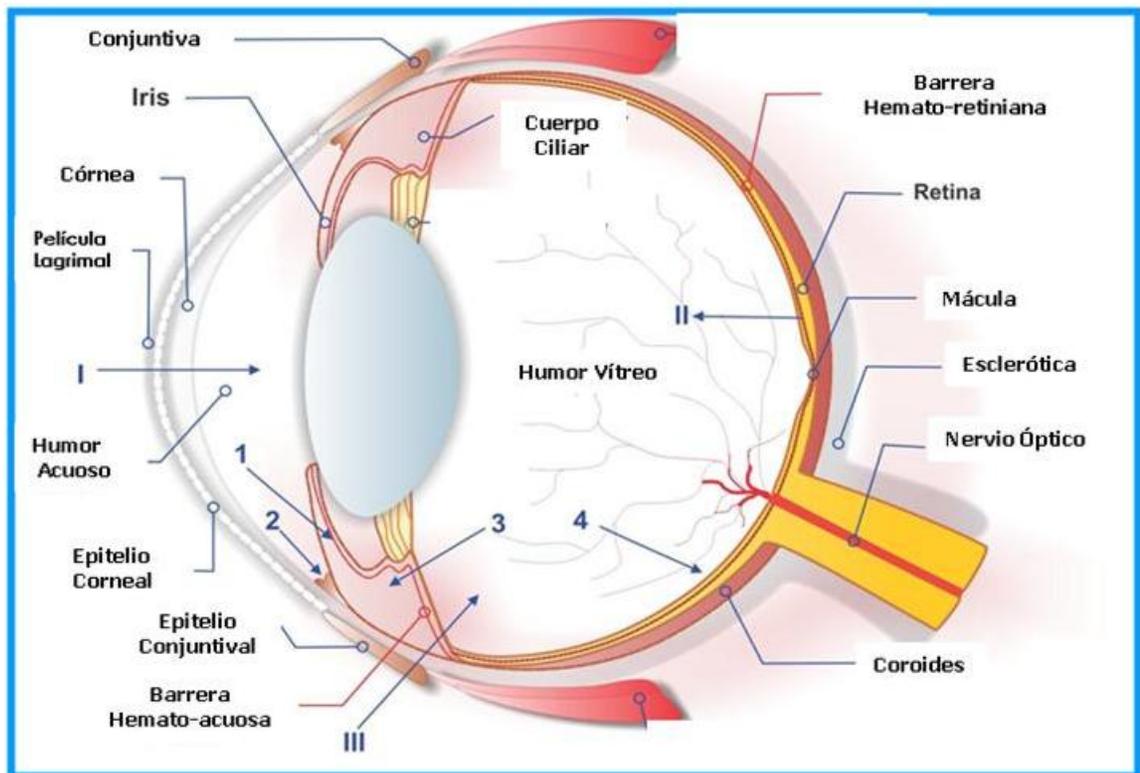


Figura 2. Esquema de las principales estructuras y barreras oculares. (Barar y cols. J. Ophth Vision Res. 2009).

En primer lugar, se encuentran los párpados y el fluido lagrimal y posteriormente la córnea, que forma una eficiente barrera física y biológica.

Cuando un material extraño o medicamento se introduce en la superficie ocular, se incrementa inmediatamente el flujo lagrimal, originando una rápida eliminación a través del conducto nasolagrimal, pasando luego a la membrana mucosal de la nariz, orofaringe y tracto gastrointestinal, de ahí, es capaz de alcanzar concentraciones importantes del fármaco a la circulación sistémica, (Bodor y Buchwald, 2005; Urtti, 2006). Es por ello, que la secreción lagrimal refleja, el parpadeo y la escasa permeabilidad de la córnea conducen a una pobre absorción de los fármacos de aplicación tópica y unido a esto, los sistemas enzimáticos y las rutas eficientes de eliminación, nasolagrimal y conjuntiva/esclerótica, determinan su baja Biodisponibilidad, (Sasaki y cols., 1996). En diferentes estudios farmacocinéticos se han reportado que entre el 2 y 5% de la dosis instilada se consigue en la cámara anterior, el resto es depurado, (Schoenwald, 1990; Davies, 2000). Por otra parte, en cuanto al segmento posterior del ojo se refiere (retina, coroides, esclerótica, y humor vítreo), éste está protegido por la barrera hemato-ocular que la constituye: la barrera anterior hemato-acuosa y la barrera posterior hemato-retiniana. La primera limita el acceso de fármacos hidrofílicos desde el plasma al humor acuoso. La segunda está formada por el epitelio pigmentario de la retina y por la malla de paredes de los capilares de la retina, restringiendo así la penetración en el segmento posterior de los fármacos que son administrados sistémicamente, (Urtti, 2006). De esta misma manera, la concentración efectiva de un fármaco en la retina administrado por la vía periocular, se ve afectada por las barreras que debe atravesar (esclerótica, coroides y el epitelio pigmentario de la retina) así como por su estructura química. Es por ello, que la

administración directa de los fármacos en el humor vítreo, ofrece un mejor acceso a las distintas partes del segmento posterior.

Todo lo anterior, nos conduce a pensar en nuevas estrategias que desarrollen fármacos y sistemas transportadores bajo la forma de liberación controlada con aplicación directa en los tejidos intraoculares, de forma tal, que alcancen concentraciones terapéuticas óptimas, efectos adversos locales y sistémicos mínimos, y una disminución en la frecuencia de administración.

NANOTECNOLOGÍA Y NANOFARMACIA

La Nanociencia y la Nanotecnología son la base de técnicas innovadoras para el transporte de fármacos con beneficios potenciales para el paciente. El desarrollo de nuevos sistemas de transporte y liberación controlada de moléculas con actividad terapéutica, es en la actualidad uno de los temas en que se centra la investigación farmacéutica, (Madrigal-Carballo y cols., 2007).

Ha sido difícil entre los expertos llegar a una definición consensuada acerca de la Nanotecnología, sin embargo, se puede decir que es una ciencia que abarca productos, procesos y propiedades a una escala nano/micrométrica, en donde la física, la química y la biología convergen para crearla.

Una de las definiciones más conocida, es la que ha usado la Iniciativa Nacional de Nanotecnología de los Estados Unidos, que la define como la investigación y desarrollo a nivel atómico, molecular o macromolecular en un rango por debajo de 100 nm (1-100 nm), con el fin de crear estructuras, dispositivos y sistemas, que tengan nuevas propiedades funcionales. A este nivel, los investigadores

pueden manipular los átomos y crear materiales (nanomateriales) con propiedades modificadas (Roco, 2011).

Más aún, Bawa y cols., (2005), propusieron una definición más apropiada y práctica: diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante la manipulación controlada de tamaño y forma a una escala nanométrica (escala atómico, molecular o macromolecular), para dar como resultado una nueva estructura, dispositivo y sistema con al menos una característica o propiedad mejorada.

Considerando que los sistemas biológicos interactúan con su medio ambiente a través de moléculas y estructuras multimoleculares que operan en escala nanométrica, es fácil comprender porque la nanotecnología tiene tanto potencial en el área de la medicina, en los productos farmacéuticos y en la biotecnología. Es por ello, que en la actualidad la Nanofarmacia se considera dentro de las tecno-ciencias, una de las tecnologías emergentes, (Timmermans y cols., 2011).

Dentro de la investigación y desarrollo de los productos farmacéuticos, la Nanofarmacia implica la preparación y liberación de medicamentos o sustancias terapéuticas ultra pequeñas, en un rango de tamaño molecular o nanométrico (preferiblemente entre 1-100 nm), en el sitio específico de acción del cuerpo humano, sin afectar órganos y tejidos sanos. Como es sabido, el 95% de los fármacos descubiertos recientemente, presentan pobres propiedades farmacocinéticas y de Biodisponibilidad (Brayden, 2003; Koo y cols., 2005). Por lo que el objetivo primordial de la Nanotecnología farmacéutica, es mejorar la farmacocinética, la farmacodinámica, la toxicidad no específica, la

inmunogenicidad y el bioreconocimiento de los sistemas, a fin de obtener una eficacia máxima y un mínimo de efectos secundarios. Para poder lograr esto, se deben considerar parámetros como: el fármaco, la formulación, ruta de administración y lugar específico de acción. Una de las aplicaciones de la Nanotecnología farmacéutica que más promete es la encapsulación de compuestos activos terapéuticos, para direccionar y localizar el sistema de administración de fármacos al lugar estimado (Koo y cols., 2005).

Por otro lado, la nanofarmacia también se ha enfocado en la síntesis de nanofármacos, que se definen como "...sistemas complejos de escala nanométrica constituidos al menos por dos componentes, siendo uno de ellos el agente bioactivo..." (Madrigal-Carballo y cols., 2007). El objetivo ideal que se quiere alcanzar con ellos, es lograr una estructura química distintiva que se ajuste de forma perfecta con un único blanco farmacológico aportando eficacia terapéutica sin toxicidad, (Madrigal-Carballo y cols., 2007).

En cuanto a la terapia ocular, a nivel tópico, es fundamental desarrollar sistemas bioadhesivos que proporcionen la adherencia y retención necesaria, mediante el empleo de biopolímeros. Los nanosistemas bioadhesivo pueden maximizar la absorción de fármacos oculares prolongando su tiempo de residencia en la córnea y la conjuntiva y minimizando la depuración precorneal y el metabolismo enzimático. Por otra lado, para el tratamiento del segmento posterior, se necesitan nanosistemas menos invasivos que proporcionen fármacos de liberación controlada más seguros y eficaces, (Nakhlband y Barar, 2011).

SISTEMAS POLIMÉRICOS DE LIBERACIÓN

En la búsqueda de técnicas más efectivas y eficientes, estudios más recientes se han inclinado hacia el empleo de macromoléculas para el desarrollo de sistemas de liberación. Macromoléculas tanto naturales como sintéticas, anticuerpos, lipoproteínas, proteínas, polipéptidos y polisacáridos han ofrecido potenciales ventajas como transportadores de compuestos con actividad terapéutica.

Para lograr esa meta, se han considerado dos estrategias fundamentales: Una de ellas consiste en el empleo de técnicas de manufactura farmacéuticas y la otra, se basa en la formación de profármacos como sistemas de liberación. En la primera se han desarrollado técnicas novedosas tales como recubrimiento del fármaco con polímeros pH dependientes, sistemas de liberación dependientes del tiempo, cubiertas biodegradables, incorporación de fármacos en sistemas como liposomas, niosomas, microesferas o nanopartículas (NPs) entre otros, (Dextran, 2009).

Estos últimos, pueden adquirir diferentes estructuras: monolítica, donde se forma una mezcla homogénea entre el fármaco y el polímero; de enlaces, donde hidrogeles poliméricos se unen al sitio activo mediante enlaces químicos y por último de reservorio, donde el agente terapéutico se encuentra encapsulado por el polímero.

Cuando se crean matrices poliméricas como sistemas de liberación, éstas pueden ser biodegradables o no, e hidrofóbicos o hidrofílicos. Los polímeros biodegradables hidrofóbicos, se han empleado en el desarrollo y elaboración de implantes, lentes intraoculares, reconstrucción dental, así como, en la

formulación de micro y nanoesferas como sistemas de liberación de fármacos, entre otras. Mientras que los biodegradables, hidrofílicos como el Quitosano (Qs), ha sido ampliamente usado en cirugía de las cavidades articulares, abdominales y pélvicas, a fin de evitar adherencia postoperatoria sin efectos tóxicos apreciables, (Yang y cols., 2008). En cirugía oftalmológica, el Qs es muy empleado, ya que también previene la adherencia y evita las enfermedades proliferativas oculares, (Chen y cols., 2002). Yang y cols., (2008), investigaron la viabilidad de usar el Qs como material de relleno en la cavidad vítrea, para el tratamiento de la vitreorretinopatía proliferativa. Ellos confirmaron que la respuesta inflamatoria no fue significativamente importante, y las fluctuaciones en la presión intraocular fueron bajas, sin cambios aparentes en el tejido intraocular. Otra ventaja que presentan estos polímeros hidrofílicos, es la capacidad de formar enlaces covalentes o de complejos poliiónicos con el fármaco, de tal manera de conformar estructuras tridimensionales que modifican la solubilidad del fármaco en agua. Estos sistemas por lo general, liberan el compuesto activo *in vivo*, mediante hidrólisis en dichos enlaces, (Dextran, 2009, Yasukawa y cols, 2005).

En el caso de la estrategia que emplea la formación de profármacos, ésta se fundamenta principalmente en que el compuesto sintetizado, es terapéuticamente inactivo pero en contacto con uno y/o varios sistemas biológicos específicos, se suceden reacciones enzimáticas y/o químicas, que liberan un compuesto terapéuticamente activo en el sitio de acción, (Stella y cols., 2007).

El objetivo de cualquier profármaco, es proteger transitoriamente un determinado grupo funcional del fármaco, uniéndolo a un grupo transportador. Esto contribuye entre otras cosas, a modificar sus propiedades fisicoquímicas, proteger y retardar la aparición de los procesos metabólicos químicos y/o biológicos así como, facilitar su transporte a través de la barrera biológica. La selección de un profármaco involucra factores como vía de administración, solubilidad en agua, estabilidad química, permeabilidad y el perfil de liberación deseado, (Strickley y Oliyai, 2007). La hidrosolubilidad de estos sistemas ofrece varias ventajas: estabiliza el agente terapéutico, mejora la solubilidad en agua de compuestos activos lipofílicos, cuando éstos se encuentran unidos a la macromolécula hidrofílica, incrementa el tiempo de vida *in vivo* del agente terapéutico, prolonga la duración de la acción y reduce los efectos colaterales, entre otras. Won y Chu (1998), elaboraron un profármaco de estrógeno modificado-dextrano, mediante enlace éster lábil entre el Dextrano (Dex) y el estrógeno. Los estudios de liberación *in vitro* demostraron que la hidrólisis de la hormona fue completa, siguiendo una cinética de cero orden.

Por lo demás, la estabilidad de los profármacos se ve afectada fundamentalmente por el pH, lo que implica considerar el medio biológico donde va ser incorporado, la multiplicidad de barreras fisiológicas que debe atravesar hasta llegar a su objetivo final, la secuencia cronológica de acontecimientos *in vivo* que aseguren la liberación del compuesto activo de una forma eficiente y a concentraciones deseadas, trayendo como resultado el efecto terapéutico óptimo, (Strickley y Oliyai, 2007).

Por otra parte, los profármacos de aplicación oftálmica en su mayoría son ésteres derivados del fármaco activo. La esterificación es posible en aquellas moléculas que presentan grupos hidroxilo libre y/o carboxilo. Estas uniones fármaco-ligando pueden modificar: las características lipofílicas del compuesto activo, su estabilidad en solución y su labilidad enzimática. El uso de profármacos en el área oftalmológica, se introdujo por primera vez en 1976 por Hussain y Truelove cuando desarrollaron la dipivefrina, un éster del ácido piválico de la epinefrina, el cual es 600 veces más lipofílico que el fármaco madre y con una mayor permeabilidad sobre la córnea humana. La hidrólisis ocurre principalmente en la córnea por la presencia de enzimas esterasas, (Hussain y Truelove, 1976; Redell y cols., 1983). Igualmente, Järvinene y cols. (1995), desarrollaron diésteres del ácido pilocárpico como profármacos de la pilocarpina. Estos compuestos presentan una buena solubilidad y estabilidad en agua, lipofilicidad adecuada y una buena liberación controlada de la pilocarpina, lo que mejora la penetración corneal, al compararla con la administración de la pilocarpina base. Ellos también comprobaron que el proceso de liberación del compuesto activo se inicia con una hidrólisis enzimática donde el diéster se transforma en monoéster y posteriormente se hidroliza químicamente a pilocarpina, (Järvinene y cols., 1995).

Otros estudios han demostrado que al incubar profármacos lipofílicos de aciclovir y ganciclovir bajo la forma de ésteres en el humor vítreo del conejo, la liberación del fármaco activo ocurre mediante hidrólisis enzimática debido a la presencia de esterasas, (Dias y cols., 2002). Se ha demostrado que a nivel del segmento posterior del ojo se encuentra, una gran variedad de enzimas

metabólicamente activas tales como esterasas, peptidasas y lisozimas que podrían estar involucradas en algunos pasos del metabolismo de fármacos y en la desintoxicación de los tejidos, a fin de mantener la homeostasis ocular, (Duvvuri y cols., 2004). Esto nos ha llevado a pensar a muchos investigadores, en el desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de sistemas de transporte de fármacos para uso oftálmico, que no solo incluye la optimización de sus propiedades fisicoquímicas, sino que también involucre la capacidad de regular la distribución y depuración del fármaco después de su administración; logren alcanzar el sitio específico de acción a una velocidad y régimen de dosificación terapéuticamente controlado y óptimo; libere el compuesto activo mediante reacciones enzimáticas y/o químicas *in vivo*; protejan y estabilicen el fármaco en el ambiente biológico durante todo su recorrido hasta llegar al lugar estimado y por último pero no menos importante, que reduzcan los efectos adversos y tóxicos, (De Campos y cols., 2004; Yasukawa y cols., 2005; Bodor y Buchwald, 2005; Prow y cols., 2008; Paolicelli y cols., 2009).

Una plataforma tecnológica que está siendo muy usada en la terapia del cáncer, es la llamada polímeros terapéuticos. Ellos no son considerados como simples sistemas convencionales de transporte de fármacos, sino más bien como entidades químicas nuevas que presentan perfiles farmacocinéticos distintos al fármaco madre. El término “polímeros terapéuticos”, engloba cinco grupos de nanoconstrucciones híbridas que utilizan polímeros hidrosolubles, con actividad farmacológica o polímeros que forman parte de una entidad compleja de muchos componentes inertes, donde el agente terapéutico se une covalentemente al polímero, (Duncan, 2003a). Estas nanoconstrucciones

incluyen: fármacos poliméricos bioactivos, micelas poliméricas, poliplejos con aplicación como vectores no virales en transporte génico, fármaco - polímero conjugados y proteína-polímero conjugados, (Madrigal-Carballo y cols., 2007).

Los fármaco-polímero conjugados, son compuestos híbridos de tamaño nanométrico entre 5 a 15 nm, que combina covalentemente un agente bioactivo con un polímero, para garantizar no sólo la eficiente entrega del fármaco en el sitio específico, sino también que mantenga sus concentraciones terapéuticas dentro de un determinado período de tiempo, (Duncan, 2003b; Vicent, 2007).

Como se dijo anteriormente, esta terminología, ha sido empleada fundamentalmente para una novedosa clase de nanofármacos anticancerosos, los cuales pueden proteger al fármaco de una degradación prematura, evita que se presenten interacciones en el medio biológico de forma anticipada, lo que hace disminuir su toxicidad, favorece la selectividad celular, mejora la absorción del fármaco en el tumor, bien sea incrementando su permeabilidad y efecto de retención o activándose en la células blanco, (Duncan, 2006; Peer y cols., 2007). Este concepto fue introducido por primera vez por Helmut Ringsdorf en 1975 y se basa en la formación de un enlace covalente fisiológicamente lábil entre el fármaco y la cadena principal de la macromolécula, (Ringsdorf, 1975). En estos compuestos hay al menos tres grandes componentes: un polímero soluble, un enlace biodegradable y un fármaco unido covalentemente. *In vivo*, este enlace se rompe y se libera el fármaco y con ello su acción farmacológica. Para formar estos compuestos conjugados se han usado hasta los momentos cuatro polímeros: (N-(2-hidroxipropil) metacrilamida, ácido poli-L-glutámico, polietilenoglicol y Dex, (Elvira, 2005; Duncan, 2006).

Kin y cols., (2002), investigaron la cinética de distribución de una solución al 0,25% de tetrametilrodamina-dextrano 70kDa, después de una inyección subconjuntival en ratones. Se observó una distribución paulatina en las distintas áreas del ojo incluyendo retina y nervio óptico, alcanzándose mediante la difusión a través de la esclerótica. La vida media en la esclerótica y la coroides fue alrededor de 16 a 100 horas respectivamente. Este trabajo demuestra el potencial que presenta este polímero hidrofílico como posible sistema de liberación para la retina y úvea.

Asimismo, el empleo de estos fármaco-dextrano conjugados solubles en agua, tienden a disminuir la toxicidad del fármaco, modifican la biodistribución y sobretodo aumentan la efectividad terapéutica. Se ha demostrado que metotrexate conjugado con dextrano penetran selectivamente en los tejidos y eliminan células cancerígenas. En este mismo sentido, se han evidenciado a dosis baja, cambios favorables en la curva dosis-respuesta, (Maeda y cols., 1992; Dang y cols., 1994).

Los conjugados de fármaco-dextrano hasta la fecha, no han sido empleados en formulaciones oculares, sin embargo la buena capacidad transportadora de este polímero, sus excelentes propiedades fisicoquímicas, su estabilidad cuando se somete a esterilización por calor húmedo, su baja toxicidad ocular y la posibilidad de modificar las propiedades farmacocinéticas del fármaco, constituye un prometedor polímero terapéutico de liberación ocular. Estos nuevos compuestos podrían ser capaces de liberar al agente activo en el sitio específico de acción, mediante reacciones enzimáticas y/o químicas.

Todas estas tecnologías prometen ser más efectivas y eficientes que las formulaciones tradicionales, sin embargo todas ellas presentan ventajas y desventajas. Para lograr alcanzar un sistema de liberación prologada específico ideal, se deben evaluar en su conjunto y posiblemente la combinación de dos o más de estas tecnologías nos podría conducir con éxito a un sistema de liberación intravítreo deseado.

NANOPARTÍCULAS COMO SISTEMA DE LIBERACIÓN

Como ya se ha referenciado, una de las aplicaciones de la nanotecnología farmacéutica es buscar el direccionamiento específico del fármaco mediante el desarrollo de sistemas inteligentes de nanoparticulados. Las NPs constituyen partículas coloidales con diámetros menores a 1 μm . Se definen como dispersiones de partículas o partículas sólidas con un rango de tamaño entre 10-1000 nm, donde los fármacos se encuentran disueltos, atrapados, encapsulados o unidos a una matriz que por lo general es polimérica. Dependiendo del método de elaboración se pueden obtener: NPs, nanocápsulas o nanoesferas. Las nanocápsulas, son sistemas en los cuales los fármacos se encuentran confinados en una cavidad rodeada por una única membrana polimérica, donde el fármaco puede estar disuelto y/o adsorbido en el núcleo y/o superficie de la interfase. Mientras que las nanoesferas son estructuras matriciales sólidas, en los cuales el fármaco está física y uniformemente dispersado dentro de la matriz y/o adsorbido en la superficie, (Mohanraj y Chen, 2006).

Las NPs, son partículas constituidas por polímeros biodegradables, biocompatibles, no antigénicos. Su tamaño tan pequeño, le confiere un papel fundamental que le permite el paso a través de los capilares para lograr alcanzar lugares específicos, incluso, estructuras intracelulares donde el fármaco pueda ejercer su acción. Esto va a depender del efecto terapéutico que se desee, ya que estos sistemas pueden ser administrados por diferentes rutas: ocular, parenteral, oral, nasal, pulmonar, bucal, transdérmica, entre otras, (Mitra y Maitra, 2002).

Es por ello, que el tamaño, número y forma de las partículas así como, su carga, las características en su superficie y la liberación del componente farmacológicamente activo, tienen gran influencia en el comportamiento biológico, puesto que todos estos parámetros son necesarios para alcanzar el sitio específico de acción a una velocidad y régimen de dosificación terapéuticamente óptimos.

El empleo de estos sistemas de liberación tiene múltiples ventajas entre las que podemos señalar, (Mohanraj y Chen, 2006):

- a) Manipular el tamaño de las partículas y las características de la superficie durante la manufactura, con la finalidad de alcanzar un sitio de acción específico.
- b) Modificar la distribución y depuración (clearance) del fármaco con el objeto de alcanzar una eficacia terapéutica y reducir los efectos secundarios.
- c) Modular las características y liberación del fármaco esperado mediante la selección de los componentes de la matriz que formarán las NPs.

- d) Incorporar grandes cantidades de fármaco dentro de un sistema matricial sin que ocurra ninguna reacción química, lo que favorece la preservación de su actividad farmacológica.
- e) Unir ligandos específicos en la superficie de las partículas o crear NPs magnéticas que dirigen el fármaco *in vivo* al lugar deseado.

Por otra parte, el pequeño tamaño de las partículas y su gran área de superficie puede conducir a la formación de agregados, baja incorporación del fármaco en la matriz polimérica y una rápida liberación. Estas desventajas, constituyen un reto a superar, a fin de lograr emplear las bondades de estos sistemas, en la formación de nuevas formas farmacéuticas que proporcionen una liberación específica, efectiva y controlada de los fármacos, (Mohanraj y Chen, 2006).

El empleo de los polímeros y macromoléculas en la formación de microesferas y NPs como nuevos vehículos de cesión de fármacos, ha generado gran interés en el desarrollo de productos oftálmicos, ya que favorecen la permanencia de este sistema en el sitio de aplicación, donde el fármaco puede ser liberado por diferentes mecanismos como difusión, reacción enzimática o química, degradación polimérica, erosión e intercambio iónico entre otros, (Kaur y cols., 2004).

La Budesonida, un corticosteroide capaz de inhibir la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, de acuerdo a sus siglas en inglés), ha sido encapsulada en microesferas y NPs de ácido poliláctico. Se ha demostrado que estos sistemas prolongan la permanencia del fármaco en la retina, humor vítreo, córnea y cristalino, al compararlos con el mismo

compuesto bajo la forma solubilizada con ciclodextrina, (Kompella y cols., 2001).

De Campos y cols., (2004), cuantificaron y estudiaron el mecanismo de interacción de NPs de Fluoresceína-Quitosano (FI-Qs) en las superficies epiteliales de la córnea y la conjuntiva de conejos machos albinos de Nueva Zelanda. Ellos demostraron, que la interacción de la FI en la superficie ocular fue más efectiva bajo la forma de NPs.

ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Para la elaboración de las NPs se han desarrollado diferentes metodologías. Una de las técnicas empleadas para ello, es la elaboración de una emulsión con posterior evaporación de la fase orgánica, de manera de dejar las partículas dispersas en la fase acuosa. Esta técnica tiene como limitantes el empleo de solventes tóxicos como el diclorometano; el tamaño de las partículas obtenido es igual o superior a 200 nm y además, los polímeros y fármacos empleados deben ser de naturaleza hidrofóbica, ya que las NPs se forman en la fase orgánica. Se emplean polímeros del ácido láctico, D, L-glicólico, ácido D,L-láctico-co-glicólico, cianoacrilato, (Mitra y Maitra, 2002; Mohanraj y Chen, 2006). En los últimos tiempos, el Qs ha recibido gran interés desde el punto de vista médico y farmacéutico; demostrando su uso como potencial sistema de liberación de fármaco, es por ello, que muchos trabajos de investigación se han enfocado en el desarrollo de NPs de Qs.

El Qs es un polisacárido que presenta una estructura similar a la celulosa, donde los monosacáridos se encuentran unidos de forma lineal en posiciones

$\beta(1-4)$ al igual que en la celulosa. Sin embargo, su diferencia radica en que cada unidad posee grupos amino (2-amino-2-desoxi- β -D-glucosa y 2-acetoamido-2-desoxi- β -D-glucosa). El Qs se obtiene por desacetilación de la quitina, un polisacárido que se encuentra en grandes cantidades en los crustáceos marinos. Se consigue comercialmente bajo diferentes pesos moleculares que van desde 3.800 a 20.000 Dalton y con grados de desacetilación que oscilan entre 66% y 95%, Figura 3.

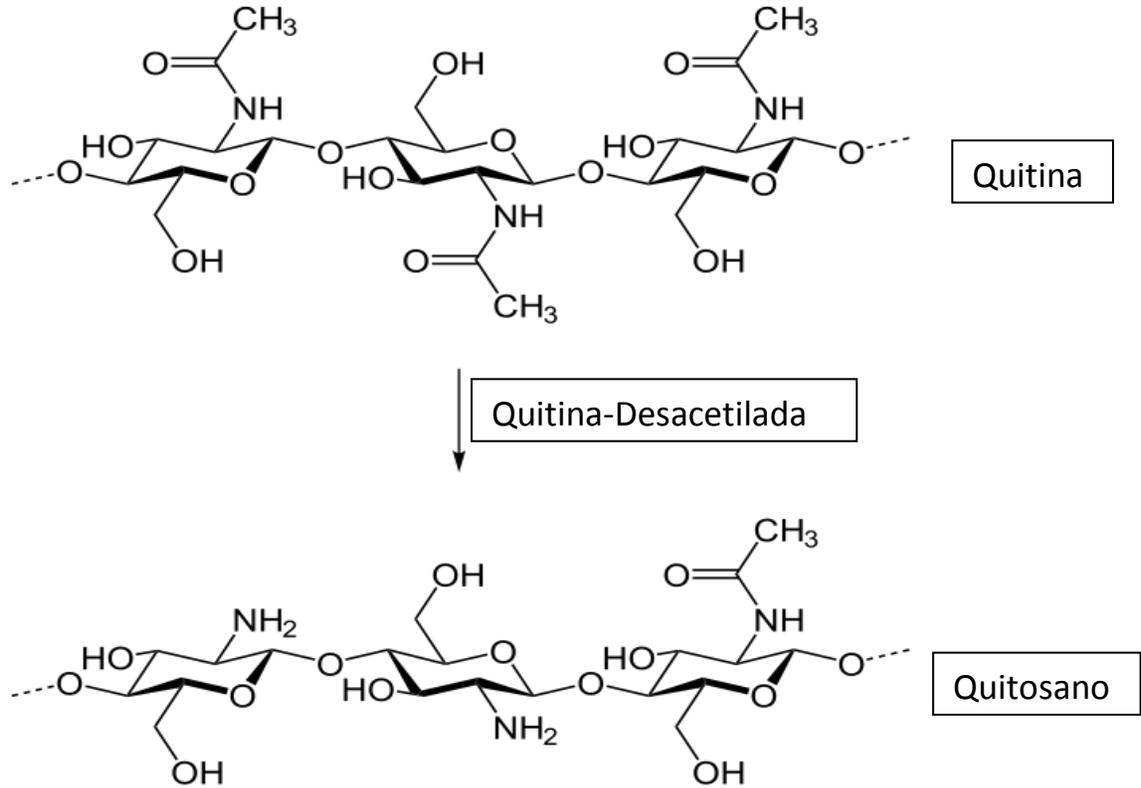


Figura 3. Desacetilación de la quitina. (Hilborn J. WIREs Nanomed Nanobiotechnol, 2011)

Se presenta como un copolímero catiónico a pHs neutro o alcalinos, con grupos amino libres lo que le confiere una baja solubilidad en agua, sin embargo a pH ácido, estos grupos se protonan confiriéndole una buena solubilidad en este solvente la cual depende, de los grupos amino y N-acetilo libres. Esta característica le permite interactuar en ambientes acuosos con: fármacos, macromoléculas, polímeros cargados negativamente y con algunos polianiones, trayendo como resultado la formación de sistemas de liberación, (Agnihotri y cols., 2004; Gómez-Gaete y cols., 2007).

Desde el punto de vista biofarmacéutico, es capaz de adherirse a las superficies mucosales lo que hace interesante estudiar su utilidad como sistema de liberación de fármacos en formulaciones oftálmicas, nasales, vaginales y orales, entre otras, ya que podría incrementar el tiempo de residencia en el sitio de absorción. Se ha propuesto como mecanismo de mucoadhesión, la interacción de la carga positiva del grupo amino del Qs con la carga negativa del ácido siálico que se encuentra presente en las mucosas, (Janes y cols., 2001; De Campos y cols., 2004; Dhawan y cols., 2004).

Por otra parte, el Qs es un polímero biodegradable y biocompatible, es capaz de degradarse gradualmente en glucosa y finalmente en agua y dióxido de carbono *in vivo*. No causa reacciones alérgicas ni rechazo y se elimina del organismo sin causar reacciones colaterales, (Arai y cols., 1968).

Se han reportado numerosas técnicas para la elaboración de estas micropartículas y NPs entre las que se pueden nombrar:

- 1) Emulsificación: Se emplea glutaraldehído como agente surfactante. Los grupos aldehídos del glutaraldehído, forman un enlace imino covalente con

los grupos aminos del Qs, lo cual reduce su solubilidad en medio acuoso dando paso a la creación de las partículas, Figura 4, (Kotadiya y cols., 2009). Algunos estudios han demostrado que esta técnica tiene efectos negativos sobre la viabilidad celular así como, la capacidad de integrar fármacos macromoleculares, (Janes y cols., 2001).

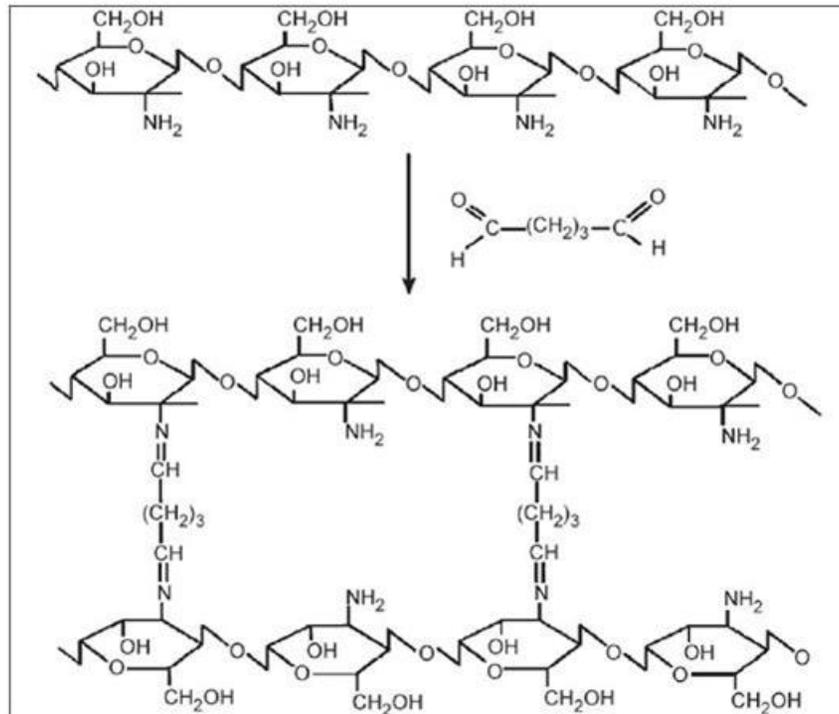


Figura 4. Formación de partículas de Qs por emulsificación con glutaraldehído. (Kotadiya y cols., Int. J. G. Pharm, 2009).

2) Secado por Atomización: Se fundamenta en la atomización de gotas líquidas y su posterior secado con corriente de aire caliente. Para formar las partículas con esta técnica, hay que incorporar conjuntamente la dispersión del polímero, el fármaco y el agente entrecruzante. Posteriormente, la atomización crea gotículas que son secadas por evaporación del solvente en

una corriente de aire caliente y esto conlleva a la formación de partículas sólidas dispersas. Por lo general, se incorpora a la mezcla líquida, un agente que aumenta el volumen de las partículas como la lactosa o el manitol, de tal manera de disminuir su agregación, ya que mantiene las partículas separadas, (Vivek y cols., 2010).

- 3) Secado por atomización con aire nebulizado: es una modificación de la técnica anterior en la que el orificio de atomización posee dos entradas o inyectores: en una de ellas, entra el aire comprimido a alta velocidad y por el otro el líquido a dispersar y secar. El choque entre el flujo de aire y líquido a gran velocidad, genera gotas muy finas que serán secadas posteriormente con aire caliente, (Agnihotri y cols., 2004; Bailey y Berkland, 2009; Vivek y cols., 2010). Una variedad de trabajos han empleado esta técnica para elaborar micropartículas de Qs con diferentes principios activos y enzimas, (Agnihotri y cols., 2004; Bailey y Berkland, 2009; Vivek y cols., 2010).
- 4) Gelificación iónica: Se basa en la formación de complejos debido a la atracción de cargas opuestas. Las atracciones electrostáticas crean interacciones físicas, que dan origen a las partículas insolubles en medio acuoso. En la formación de estos complejos se emplea por lo general agua como solvente por lo que es menos tóxica, (Csaba y cols., 2009).

Calvo y cols., (1997a,b), desarrollaron un método para elaborar NPs de Qs empleando esta última técnica. Se mezclan dos fases acuosas; una contiene la dispersión de Qs y en la otra se encuentra una solución del polianión, tripolifosfato sódico (TPP). La carga positiva del grupo amino del Qs produce interacciones iónicas (inter e intramoléculares) con la carga negativa del

polianión, originando una transformación de líquido a gel, que da origen a la formación de las partículas. Esta técnica se lleva a cabo a temperatura ambiente, donde el pH de las fases acuosas juega un papel fundamental. La solución acuosa de TPP (pH entre 7 y 9), es añadida a la dispersión de Qs que puede contener un pH entre 4 y 6, Figura 5, (Janes y cols., 2001; Devika y cols., 2006; Fernandes y cols., 2008; Mohammadpourounighi y cols., 2010).

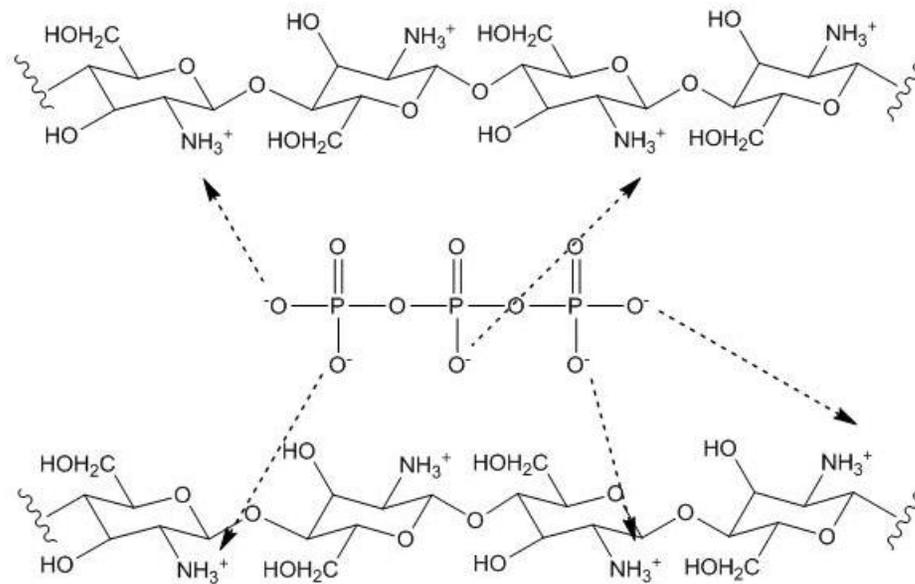


Figura 5. Formación de partículas de Qs por gelificación iónica con TPP (Fernandes y cols., Sens. Actuators B. 2008)

Muchas investigaciones han empleado gelificación iónica para formar partículas de Qs-TPP como sistemas de liberación de macromoléculas. Partículas de Qs conteniendo insulina mejoraron la absorción a nivel nasal, (Fernández-Urrusuno y cols., 1999). Asimismo, NPs de Qs-TPP de tamaños entre 250-400 nm y con

un contenido de 80% de insulina asociado al Qs, mejoraron la absorción de la insulina a nivel intestinal, (Pan y cols., 2000).

Xu y Du (2003) elaboraron diferentes formulaciones de NPs de Qs-TPP en albúmina de suero de bovino. En este trabajo, concluyeron que factores como el peso molecular y el grado de acetilación del Qs, la relación polímero:macromolécula así como, la presencia de polietilenglicol, tuvieron influencia en la liberación de la proteína.

Otros estudios, evaluaron el potencial que tienen partículas de Qs-TPP como transportadoras y como módulos de cesión de macromoléculas a ser liberadas en el colon. Ellos emplearon albúmina de suero de bovino marcada con isotiocianato de fluoresceína; demostrando que las enzimas colónicas y fecales son capaces de degradar las partículas de Qs permitiendo la liberación de la proteína, (Zhang y cols., 2002).

Adicionalmente, se evaluó la toxicidad, respuesta y tolerancia *in vivo* de NPs de Qs como potencial sistema de liberación en la superficie ocular. Se encapsuló, albúmina de suero de bovino marcada con isotiocianato de fluoresceína empleando la gelificación iónica con TPP. El tamaño promedio de las partículas obtenido fue de 289 ± 13 nm con un potencial zeta de $+35,9 \pm 1,4$ mV. La eficiencia en la encapsulación de la proteína fue bastante buena, $92,3\% \pm 0,4\%$. Asimismo, en los estudios de liberación en presencia de solución amortiguadora de fosfato observaron que, la albúmina se encontraba fuertemente unida a las partículas de Qs-TPP, (Enríquez y cols., 2006).

Todo lo anteriormente evaluado y dada la gravedad de las patologías que afectan el segmento posterior del ojo, se requiere de una solución a corto plazo.

Se han hecho esfuerzos para lograr obtener una formulación ideal, que disminuya sustancialmente la frecuencia y el riesgo de la administración intravítrea, sin que hasta los momentos se hayan conseguido resultados completamente satisfactorios. Es por ello que, esta tesis Doctoral para optar al título de Doctora en Ciencias Farmacéuticas, en el área de Tecnología Farmacéutica, se enfocó en desarrollar un nuevo nanosistema de liberación controlada de fármacos intravítreo, con polímeros biocompatibles, hidrosolubles y de baja toxicidad ocular como el Dex y Qs. Se empleó 21-hemisuccinato de 6-*alfa*-metilprednisolona (MPS) como fármaco modelo y se tomó en consideración para la formulación, la combinación de dos nanoestructuras (fármaco-polímero conjugado/NPs) y el sitio de aplicación.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un nanosistema conjugado de Dex con NPs de Qs como vehículo para la liberación controlada de fármacos intravítreo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer el método analítico para evaluar el contenido del fármaco modelo MPS y su estructura activa terapéutica.

Estandarizar el método de cromatografía líquida de alta resolución para evaluar el contenido del fármaco modelo MPS y su estructura activa terapéutica.

Sintetizar el 21-hemisuccinato *de 6-alfa*-metilprednisolona-Dextrano (MPS-Dex) conjugados, con Dex de diferentes pesos moleculares.

Caracterizar los derivados obtenidos por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón.

Determinar el contenido de MPS en los conjugados de MPS-Dex.

Evaluar la liberación *in vitro* del MPS en condiciones isotónicas y a pH fisiológico.

Seleccionar un conjugado en función al contenido del compuesto activo y perfil de liberación, para ser encapsulado en las NPs.

Evaluar el comportamiento hidrolítico del conjugado MPS-Dex seleccionado en solución de TPP y en solución amortiguadora de acetato pH= 5,5.

Desarrollar las NPs de MPS-Dex empleando Qs como polímero transportador y aplicando el método de gelificación iónica.

Caracterizar las NPs de 21-hemisuccinato *de 6-alfa*-metilprednisolona-Dextrano-Quitsano (NPs_{MPS-Dex-Qs}): morfología, distribución de tamaño de las partículas, carga superficial, contenido de MPS, eficacia de captura del MPS.

Evaluar la liberación del MPS del nanosistema, en condiciones isotónicas y a pH fisiológico.

Elaborar micropartículas compuestas por NPs_{MPS-Dex-Qs} recubiertas de lactosa (NPs_{MPS-Dex-Qs/lactosa}) aplicando el método de secado por atomización.

Caracterizar las micropartículas de NPs_{MPS-Dex-Qs/lactosa}: morfología y distribución de tamaño de las partículas.

METODOLOGÍA

MATERIALES

La Metilprednisolona (MP) y el MPS fueron adquiridos de Steraloids Inc, USA. Dex con pesos moleculares promedios de 72,627 kDa y 10,200 kDa; 1,1' Carbonildiimidazol (CDI); Dimetilsulfóxido anhidro (DMSO); Dimetilsulfóxido deuterado (d6-DMSO); 2 propanol anhidro; éter metil terbutílico anhidro; hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico (HCl), bolsas de diálisis de celulosa, Qs (50-190 kDa) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, USA. Trietilamina (TEA); tamiz molecular de 4Å Grado 514; acetato de sodio; ácido acético glacial; TPP; acetonitrilo y metanol grado HPLC y solución amortiguadora de fosfato pH= 7,4 fueron obtenidos de Fisher Scientific, USA. Papel adhesivo de carbón conductivo de doble cara y rejilla de cobre (malla 200) con soporte de carbono marcas PELCO®. Lactosa extra fina de EM industry, NY, USA. Impactador de cascada de Andersen obtenido por Copley Scientific.

Todas las pruebas y determinaciones se realizaron como mínimo por triplicado.

ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Para determinar el contenido del fármaco modelo y del compuesto activo terapéutico, MPS y MP respectivamente, se modificó el método de HPLC ya reportado por Mcleod y cols., 1993, Se aplicó el método de HPLC con fase reversa empleando una bomba binaria Waters modelo 1525; un detector de

absorbancia dual Waters 2487; un automuestreador Waters 717. Los datos fueron integrados usando el programa Water-Breeze®.

La columna empleada fue una YCM pack pro C18 (5 µm, 105 x 4.6 mm). La fase móvil estaba conformada por 60% de Metanol y 40% de solución amortiguadora de acetato de sodio/ácido acético 0,2M proporción 21:79 respectivamente pH = 5,5. La fase móvil fue desgasificada con ultrasonido y helio. La velocidad de flujo fue de 1,2 mL/min. Los eluados fueron detectados a 254 nm. El volumen de inyección fue de 50 µL. Todas las determinaciones fueron bajo un sistema isocrático.

Para la validación del método, se evaluó su exactitud mediante el porcentaje de recuperación para tres niveles de concentración: bajo, medio, alto dentro del rango de la curva de linealidad del método (curvas de calibración) y cada concentración se analizó como mínimo tres veces, y se evaluó el porcentaje de recuperación con respecto al valor esperado.

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \frac{\text{Cantidad obtenida}}{\text{Cantidad teórica}} \times 100$$

Se estableció como rango de aceptación para el porcentaje de recuperación entre 95 - 105% y porcentaje del coeficiente de variancia entre -20 y +20%, (Horwitz, 1982; Quintana y cols., 2009).

Las determinaciones fueron realizadas por el mismo analista en las mismas condiciones de trabajo.

Por otra parte, se determinaron los límites de detección y cuantificación así como la linealidad, (Quattrocchi y cols., 1992).

Límite de detección:

$$\frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Límite de cuantificación:

$$\frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Donde:

Y_{bl} = respuesta del blanco

S_{bl} = desviación estándar del blanco

b = pendiente de la curva de calibración

n = número de determinaciones

Soluciones patrones

Las soluciones madres de MP y MPS se prepararon a una concentración de 200 y 220 $\mu\text{g/mL}$ en metanol y se conservaron en nevera a $5^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Cada solución de trabajo se preparó diariamente por dilución de las soluciones madres en fase móvil en concentraciones de 20 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$ para la MP y 11 $\mu\text{g/mL}$ para el MPS.

Soluciones de patrones cromatográficos:

Las curvas de calibración para cada patrón se prepararon a partir de las soluciones de trabajo en concentraciones de 0,2-0,5-1,0-2-4-5-10-20 $\mu\text{g/mL}$ y 5-

10-15-20-25-30-40-50 µg/mL para la MP y 0,2-0,6-1,0-2,0-4,0-6,0-11 µg/mL para el MPS. Se graficaron las áreas de los picos cromatográficos contra su concentración. Se calculó el coeficiente de correlación cuadrado (r^2) y la pendiente (m) de cada curva, usando para ello la fórmula de la ecuación de la recta: $y = bx + a$ y la regresión lineal. Finalmente las rectas fueron empleadas para obtener las concentraciones de los analitos en µg/mL.

SÍNTESIS DE LOS MPS-Dex CONJUGADOS

Se sintetizaron dos MPS-Dex conjugados empleando dos pesos moleculares de Dex: 70kDa y 10kDa. Se adaptaron los métodos previamente publicados por Mc Leod y cols., 1993; Pang y cols., 2002 y Varshosaz y cols., 2009. A continuación una breve descripción de la metodología.

Condiciones:

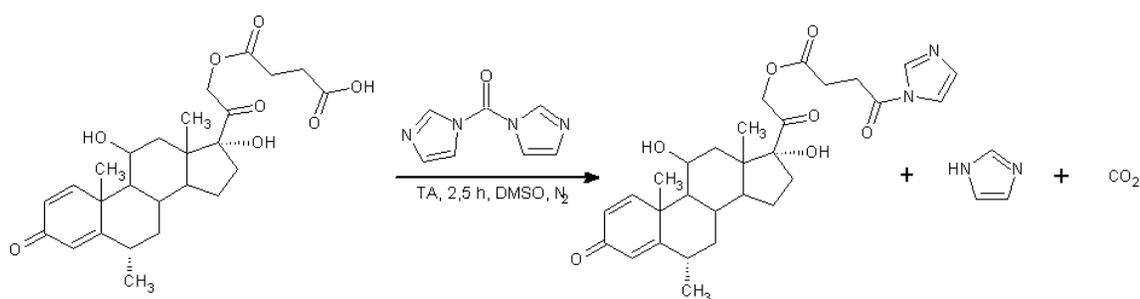
Atmósfera de nitrógeno, protección de la luz y reactivos anhidros.

Procedimiento general:

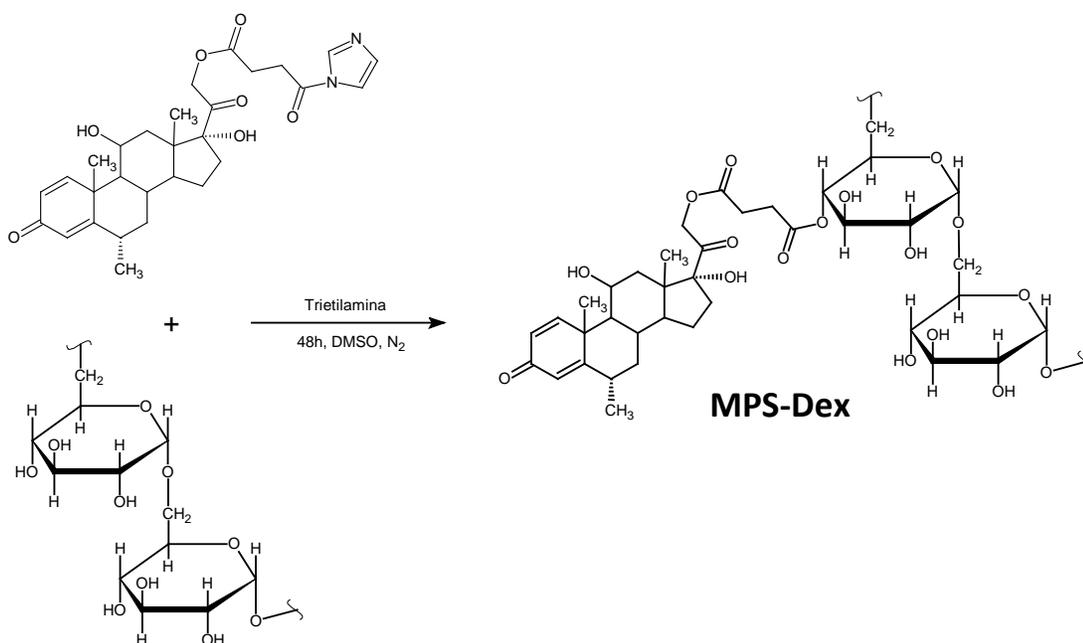
Se disolvieron 0,1062 mmol de MPS y 0,4934 mmol de CDI en 3 mL de DMSO y se mantuvo en agitación constante por 2,5 horas a Temperatura ambiente (TA), $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Luego se incorporó una solución que contenía 0,05 mmol de Dex (70 o 10 kDa) en DMSO y 1 mL de TEA. Se continuó agitando por 48 horas a TA. Los productos MPS-Dex 70kDa y MPS-Dex 10kDa fueron precipitados y lavados con mezclas de 2-propanol y éter metil terbutílico. Finalmente, se liofilizaron en un liofilizador FreeZone 6 Labconco Co. por 48 horas a -62°C y 0,370 mBar y se conservaron en tubos de poliestireno a -80°C

en un refrigerador Freezer, Queve Systems IWC. Un esquema del proceso de síntesis se representa en la Figura 6.

Los productos obtenidos se caracterizaron empleando espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones (RMN ^1H), en un espectrómetro *Bruker Avance II 600 MHz* con una sonda fría de detección inversa de 5 mm a 37°C . El desplazamiento químico fue reportado en ppm. Los analitos emplearon como solvente a $\text{d}_6\text{-DMSO}$.



MPS



Dextrano

Figura 6. Esquema de la síntesis de los conjugados de MPS-Dex

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE MPS EN LOS CONJUGADOS DE MPS-Dex.

La cuantificación del contenido del fármaco se logra mediante una hidrólisis alcalina donde se libera el compuesto activo terapéutico, MP, (Varshosaz y cols., 2009). Se disolvieron 5 mg de cada uno de los MPS-Dex en 3 mL de metanol y se hicieron reaccionar con 5 mL de NaOH 0,02N por 20 minutos. La reacción se detuvo con solución de HCl. El contenido de MP resultante de la hidrólisis se determinó aplicando el método de HPLC, descrito anteriormente. Los resultados se expresaron en concentración de mg MPS/100mg de MPS-Dex.

LIBERACIÓN in vitro DEL MPS DURANTE LA INCUBACIÓN DEL MPS-Dex CON SOLUCIÓN AMORTIGUADORA ISOTÓNICA DE FOSFATO

Para ello, se incubaron tres muestras de 5 mg de MPS-Dex en 8 mL de solución amortiguadora isotónica de fosfato pH=7,2 a $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ con agitación constante a 40 revoluciones por minuto (r.p.m.). Se tomaron muestras de 500 μL a diferentes tiempos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24 horas y luego 2, 3, 4, 5, 6 días y se diluyeron con 500 μL de fase móvil. En cada toma de muestra se repuso el volumen con solución amortiguadora de fosfato, (Dann, 1999).

Las concentraciones liberadas fueron evaluadas por el método de HPLC previamente descrito. Se reportó el promedio y la desviación estándar de los porcentajes de MP liberados del MPS-Dex. Éste fue calculado como la cantidad acumulada de MP liberada dividida entre la cantidad total de MP

contenida en el conjugado en función del tiempo. Asimismo, se reportó el contenido de MPS liberado durante el mismo período de estudio.

Para ello se aplicaron las siguientes fórmulas:

$$\% Di = \frac{Di}{D} \times (100)$$

$$Di = (Xi)(Fd)(Vo) + \sum_{i=0}^{N-1} Ei$$

%Di = porcentaje de MP liberado al tiempo i de muestreo.

Di = mg de MP liberados al tiempo i de muestreo.

D = mg de MP en 5 mg de MPS-Dex

Xi = concentración de MP al tiempo i de muestreo

Fd = Factor de dilución

Vo = Volumen inicial del medio de disolución

Ei = mg de MP liberados en el volumen de la muestra al tiempo i de muestreo

N = número de extracciones al tiempo i de muestreo

COMPORTAMIENTO HIDROLÍTICO DEL MPS-Dex EN SOLUCIÓN DE TPP Y EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE ACETATO pH=5,5.

Para evaluar la degradación hidrolítica del conjugado frente a los reactivos empleados en la elaboración de las NPs y establecer la técnica de incorporación del mismo, se procedió a preparar una solución de TPP al 0,25% y una solución amortiguadora de ácido acético/acetato de sodio al 0,2M

proporción 21:79 respectivamente pH = 5,5, a TA. Se verificó el pH de cada una de las soluciones en un pHmetro Corning modelo 430 con un electrodo de Ag/AgCl y empleando el método de la USP 30/NF 25, capítulo general (791).

A 5 mL de cada una de las soluciones anteriores, se le incorporó el MPS-Dex conjugado de 10 kDa (equivalente a alrededor de 5 mg de MPS) previamente disuelto en acetonitrilo:agua bidestilada 50:50. Las mezclas se mantuvieron en agitación moderada por 24 horas y a temperaturas entre 4° - 5°C, durante las primeras 5 horas y posteriormente se continuó a TA. Se tomaron muestras de 1 mL a los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 24 horas y se evaluó la liberación de MP y MPS por el método de HPLC previamente establecido. Los resultados se expresaron en porcentaje de MPS libre/contenido de MPS en el conjugado (MPS-Dex).

ELABORACIÓN DE LAS NPs_{MPS-Dex-Qs}. POR EL MÉTODO DE GELIFICACIÓN IÓNICA

Se adaptaron los métodos reportados por Calvo y cols. (1997a,b) y Grenha y cols. (2007). Se preparó dos dispersiones: la primera constituida por 0,180% (1,8mg/mL) de Qs de baja viscosidad, con un grado de desacetilación de 92,2% en solución amortiguadora de ácido acético/acetato de sodio 0,2M pH=5,5 y la segunda, una solución acuosa de TPP al 0,25%. Para la formación de la NPs se mezclaron ambas soluciones en una proporción entre Qs y TPP de 3,6:1 p/p. Se pesó entre 15mg y 20mg de MPS-Dex 10kDa (equivalente a alrededor de 5mg MPS) y se disolvió en acetonitrilo:agua bidestilada 50:50 y se colocó a una temperatura entre 4° - 5°C. Se incorporó la dispersión de Qs a una velocidad

de 0,5 mL/min empleando una bomba para jeringa (Fischer Scientific). La mezcla se mantuvo en agitación por 16 horas a TA. Culminado este período, se agregó la solución de TPP a la misma velocidad (0,5mL/min) entre 4° - 5°C. Se agitó por siete horas a TA y posteriormente se procedió a la purificación de las NPs. El pH se monitoreó durante todo el proceso, (Calvo y cols., 1997a,b; Grenha y cols., 2007).

PURIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LAS NPs_{MPS-Dex-Qs}

La dispersión acuosa de las NPs, se colocó en una bolsa de diálisis de celulosa sellada por ambos extremos. La bolsa se introdujo en un envase que contenía el medio de purificación. Este permaneció en agitación moderada a TA. La secuencia de lavado se detalla en la Tabla I.

Tabla I. Secuencia de solventes empleados para la purificación de las NPs_{MPS-Dex-Qs}

| Solvente | tiempo (horas) |
|---|----------------|
| Solución amortiguadora de acetato de sodio 0,02 M | 1 |
| Solución amortiguadora de acetato de sodio 0,02 M | 1 |
| Solución amortiguadora de acetato de sodio 0,02 M | 1 |
| Agua bidestilada | 1 |
| Agua bidestilada | 1 |

Las NPs purificadas se colocaron en un balón aforado de 100 mL y se llevó a volumen con agua bidestilada. Posteriormente, se liofilizaron 50 mL de la

Nanosuspensión en un liofilizador FreeZone 6 Labconco Co. por 48 horas a -62°C y 0,370 mBar y se conservaron en frasco de vidrio con tapa entre 4-5°C.

CARACTERIZACIÓN DE LAS NPs_{MPS-Dex-Qs}

MORFOLOGÍA DE LAS NPs

Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Las muestras previamente liofilizadas, fueron espolvoreadas sobre un papel adhesivo de carbón conductivo de doble cara PELCO[®], a fin de que una de las partes se pueda adherir al portamuestra. Previamente a la observación, la superficie de las partículas fue cubierta con carbón para evitar que se carguen con energía estática o se polaricen. Las muestras se colocaron en la cámara de vacío de un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6335F Instrument y se trabajó con un voltaje de aceleración de 2kV. Las micrografías se tomaron a diferentes ampliaciones y se observaron las características morfológicas de las NPs. Por otra parte, se empleó el programa Photoshop para medir los diámetros de las partículas.

DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE LAS NPs

Se evaluaron las Nanosuspensiones antes y después de la diálisis. La distribución del tamaño de las partículas expresado en diámetro volumen medio, se determinó en un analizador de tamaño de las partículas con dispersión de luz dinámica Nanotrak NPA250 Ultra, con sonda externa y

empleando el programa Flex 10.3.7, a $25^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Los datos y las distribuciones fueron obtenidos del promedio de tres corridas por cada muestra.

CARGA ELÉCTRICA SUPERFICIAL DE LAS NPs

Las superficies de las partículas en suspensión desarrollan carga debido a la adsorción de iones o a la ionización de los grupos en la superficie. Una de las formas de conocer esta información es mediante el valor del potencial Zeta (ζ).

Las partículas de MPS, MPS-Dex, NPs de Qs vacías y NPs_{MPS-Dex-Qs} liofilizadas, fueron dispersadas en solución amortiguadora de acetato pH=5,5 y/o agua bidestilada. La movilidad electroforética se midió en un Brookhaven ZetaPlus. Los datos fueron obtenidos del promedio de diez corridas por cada muestra y a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Los resultados se expresaron en mV.

ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO DE MPS EN LAS NPs

Se pesaron tres muestras de las NPs liofilizadas, equivalente a alrededor de 8 mg de MPS-Dex y 2,4 mg MPS (considerando que no hubo pérdida de MPS durante la elaboración de las NPs). Se agregó 2,5 mL de solución amortiguadora de acetato pH=5,5 y se agitó por 24 horas a 40 r.p.m. a TA. Transcurrido el período, se centrifugó a 12.000 r.p.m. por 15 minutos a TA en una microcentrífuga (Fisher Scientific modelo 235C). Se midió 1 mL del sobrenadante y se procedió a realizar la hidrólisis con NaOH 0,02N por 20 minutos. Luego se detuvo la reacción con solución de HCl. El contenido de

MPS se determinó por HPLC siguiendo el procedimiento previamente establecido.

DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA DE CAPTURA DE LA MPS EN LAS NPs

La carga del fármaco dentro de las NPs y la eficiencia de captura fueron determinadas matemáticamente por las ecuaciones que se detallan a continuación. La carga nominal del fármaco se calculó en función de la cantidad de fármaco que podría encontrarse en 100 g de liofilizado asumiendo que no hubo pérdida de fármaco ni de polímero durante el proceso de elaboración de las NPs, (Judefeind y Villiers, 2009).

$$\text{Carga experimental del fármaco (\%)} = \frac{\text{masa del fármaco en la nanopartícula}}{\text{masa de la nanopartícula}} \times 100$$

$$\text{Carga nominal del fármaco (\%)} = \frac{\text{peso del fármaco}}{(\text{peso del fármaco} + \text{peso del polímero})} \times 100$$

$$\text{Eficacia de captura (\%)} = \frac{\text{Carga experimental del fármaco}}{\text{Carga nominal del fármaco}} \times 100$$

Es importante resaltar que para el cálculo de la carga nominal del fármaco, se tomó en cuenta el peso de TPP y del conjugado (MPS-Dex) incorporados, considerando que no hubo pérdida de ellos durante el proceso de elaboración.

*LIBERACIÓN in vitro DEL MPS DURANTE LA INCUBACIÓN DE LAS
NPs_{MPS-Dex-Qs}. CON SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATO*

Se incubaron tres muestras de 10 mg de NPs liofilizadas en 5 mL de solución amortiguadora isotónica de fosfato pH=7,2 a $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ con agitación constante a 40 r.p.m. Se tomaron muestras de 1mL a diferentes tiempos 1, 2, 3, 4, 5 ,6, 7, 24 horas y luego 2, 3, 4, 5, 7 días. Las muestras se filtraron a través de filtro Whatman de 0,02 μm . En cada toma de muestra se repuso el volumen con solución amortiguadora de fosfato, (Dann, 1999). Las concentraciones de MPS y MP liberadas fueron evaluadas por el método de HPLC previamente descrito, (Xu y Hanna, 2007).

*ELABORACIÓN DE MICROPARTÍCULAS COMPUESTAS POR NPs_{MPS-Dex-Qs} /
LACTOSA*

El recubrimiento de las NPs con lactosa, se realizó aplicando la técnica de secado por atomización con aire nebulizado. Se empleó un equipo a escala piloto que emplea temperaturas más bajas ($78^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) que los equipos comerciales lo que disminuye la degradación de las partículas y de los fármacos. Una fotografía del equipo se encuentre en la Figura 7, (Patel, 2010). Se empleó un nebulizador concéntrico con dos puertos; en uno de ellos entra la mezcla a secar y por el otro el aire seco y tibio, ambos a una velocidad de flujo tal, que logre la formación continua de gotículas nebulizadas muy finas.

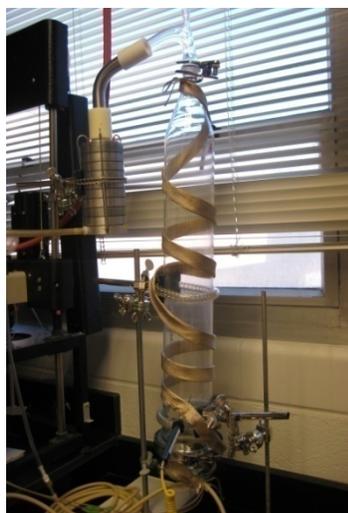


Figura 7. Secador por atomización a escala piloto

A las Nanosuspensiones purificadas, se les incorporó 3% de lactosa extra fina como agente dispersante. Las temperaturas de entrada y de salida del equipo fueron de $78^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ respectivamente, produciendo un aire caliente con flujo de 20L/min. Las micropartículas obtenidas se recolectaron en un muestreador de partículas en cascada de Andersen. Posteriormente fueron recolectadas en frascos ámbar y almacenadas dentro de un desecador a una temperatura de $4^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, (Buchi, 2010).

CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS COMPUESTAS DE NPS_{MPS-Dex-Qs} /LACTOSA

MORFOLOGÍA

Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Las micropartículas elaboradas empleando el método de secado por atomización, fueron dispersadas por un minuto en agua bidestilada, luego se

colocaron pequeñas gotas de la nanosuspensión sobre un papel adhesivo de carbón conductivo de doble cara PELCO[®], se dejó secar a TA y se continuó aplicando el mismo procedimiento descrito para las NPs_{MPS-Dex-Qs}.

Análisis por Microscopía de Transmisión Electrónica (MTE)

Para las muestras analizadas por microscopía de transmisión electrónica, se emplearon microscopios marcas JEOL 200 CX de 200kV. Cada muestra se preparó colocando alrededor de 1 mg de las micropartículas en 3 mL de agua bidestilada hasta completa disolución. La dispersión se colocó dentro en una rejilla de cobre (malla 200) con soporte de carbono PELCO[®]. La rejilla se secó sobre papel de filtro. Las laminillas secas se introdujeron dentro del microscopio con el objeto de visualizar las NPs, (Siebein, 2007; *javeriana.edu*, 2010; *ua.es*, 2011). También se empleó el programa Photoshop para medir los diámetros de las partículas.

DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE LAS PARTÍCULAS

Las micropartículas se dispersaron en agua bidestilada y se procedió a aplicar el mismo procedimiento descrito para las NPs_{MPS-Dex-Qs}.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las nuevas tendencias tecnológicas se enfocan en el desarrollo de sistemas apropiados con características tales, que involucren la capacidad de regular la distribución y depuración del fármaco después de su administración; logren alcanzar el sitio específico de acción a una velocidad y régimen de dosificación terapéuticamente controlado y óptimo; liberen el compuesto activo mediante reacciones enzimáticas y/o químicas *in vivo*; protejan y estabilicen el fármaco en el ambiente biológico durante todo su recorrido hasta llegar al sitio de acción y por último pero no menos importante, que reduzcan los efectos adversos.

Grupos de investigadores conscientes de las dificultades que se presentan en la permanencia efectiva de los fármacos a nivel ocular, debido a las barreras y sistemas protectores, han despertado un gran interés en el empleo de novedosas tecnologías para el desarrollo de formulaciones de liberación oftálmicas, (De Campos y cols., 2004; Yasukawa y cols., 2005; Bodor y Buchwald, 2005; Prow y cols., 2008; Paolicelli y cols., 2009).

Asimismo, las patologías del segmento posterior del ojo, cobran mayor importancia debido a los riesgos que implica la posible degeneración celular de un órgano tan importante como el de la visión, una de las ventanas a todo lo que nos rodea. Por otra parte, la práctica continua de la inyección intravítrea no es agradable para los pacientes y a su vez podría causar complicaciones indeseadas, (El-Samaligy y cols., 1996; Ogura, 2001; Kompella y cols., 2003; Ciulla y cols., 2004).

Es por ello, que esta investigación se enfocó en el desarrollo de un nuevo nanosistema de liberación de fármaco intravítreo alternativo, que combinó polímeros biocompatibles, hidrosolubles y de baja toxicidad ocular como el Dex y Qs. En primer lugar, se sintetizaron dos conjugados de MPS-Dex empleando Dex de distintos pesos moleculares. Los productos obtenidos fueron evaluados a fin de seleccionar, cuál de ellos se utilizaría en la encapsulación de NPs de Qs, para así formar un sistema de liberación híbrido (conjugado/NPs). Por último, las NPs se recubrieron con lactosa de tal manera de crear micropartículas que favorecieran la redispersión de las mismas en agua. Cada una de las etapas del desarrollo de este nanosistema, conllevó a una serie de ensayos y consideraciones necesarias cuyos resultados y discusión se detallan a continuación:

ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Para poder evaluar el contenido del fármaco modelo, fue necesario seleccionar un método analítico que pudiera identificar, separar y cuantificar tanto la MP como MPS. Es por ello, que basándose en el método ya reportado por Mcleod y cols., 1993, se procedió adaptarlo y estandarizarlo mediante los parámetros de: linealidad, exactitud (porcentaje de recuperación), límite de detección y límite de cuantificación. Este método fue adecuado y permitió evaluar y separar apropiadamente la MP que es el fármaco terapéuticamente activo, como al MPS y el isómero 17-hemisuccinato de 6-alfa-metilprednisolona (MP17S) no habiendo interferencia entre los picos cromatográficos de los compuestos. En

el Anexo 1 se puede observar un cromatograma donde se encuentran separados una mezcla de patrones de MP y MPS.

Por otra parte, con base a los resultados obtenidos se pudo demostrar que el método bajo las condiciones de trabajo establecidas, fue lineal para los dos patrones, ya que se obtuvo un coeficiente de correlación mayor a 0,999 y se mantuvo constante durante todos los ensayos.

De igual modo, se calculó el límite de detección (3 desviaciones estándar del blanco) y el límite de cuantificación (10 desviaciones estándar del blanco), encontrándose para la MP 0,049 µg/mL y 0,053 µg/mL y para el MPS 0,025 µg/mL y 0,034 µg/mL. Estos resultados fueron adecuados para detectar las cantidades de corticosteroides en los sucesivos ensayos de cuantificación.

En relación al porcentaje de recuperación para las nueve determinaciones de cada uno de los patrones, se encontró para la MP un rango entre 93-99% con una desviación estándar relativa (DSR) de 3,60% y para el MPS 82-99%, DSR de 9,83. Se observó que en algunos resultados la recuperación era baja; sin embargo, según Horwitz (1982) el porcentaje del coeficiente de variación para la determinación de concentraciones de analitos a niveles de 1 µg/mL puede oscilar entre -20 y + 20%, (Quintana y cols., 2009).

SÍNTESIS DE LOS MPS-Dex CONJUGADOS

El Dex es un polímero de la glucosa muy ramificado, soluble en agua que presenta excelentes propiedades fisicoquímicas en un amplio rango de pH, compatibilidad fisiológica y baja toxicidad. Estos polisacáridos se caracterizan

por presentar un 95% de uniones 1,6-glucopiranosas y 5% de uniones 1,3-glucopiranosas con ramificaciones en los grupos hidroxilos en posiciones 2,3 y/o 4 del anillo de la glucosa, Figura 8, (Larsen, 1989).

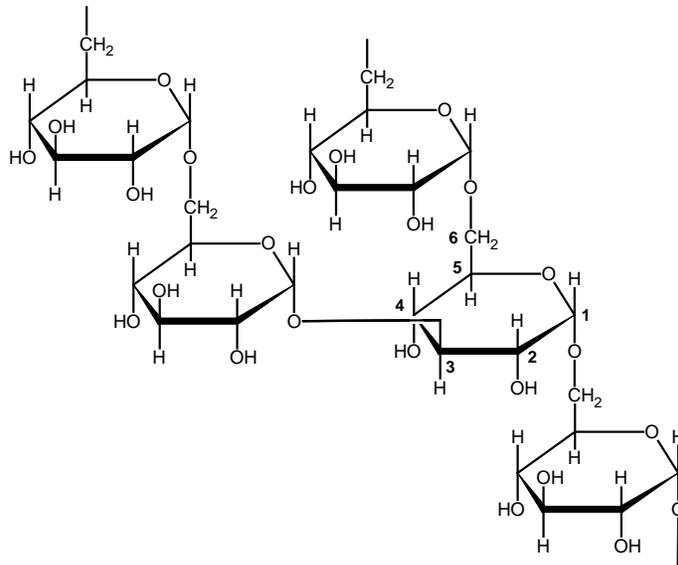


Figura 8. Estructura ramificada del Dex

Para formar un polímero terapéutico con el Dex (conjugado), la unión fármaco-Dex puede ser directa; en otros casos como la MP, requieren del empleo de una cadena hidrocarbonada intermediaria que enlaza el polímero con el agente terapéutico. Este puente o separación tiene importancia tanto en la unión de fármacos de gran volumen que por impedimento estérico no pueden enlazarse con el Dex, como también, en la incorporación de un grupo reactivo terminal al fármaco, para que éste pueda unirse covalentemente, a los grupos hidroxilos libres del Dex, (Mehvar, 2000; Larsen y cols., 2007; Hermanson, 2008). Es por ello, que se empleó MPS para que el grupo carboxílico libre del ácido succínico,

pueda reaccionar con los grupos hidroxilos libres del Dex y formar un enlace éster, Figura 9.

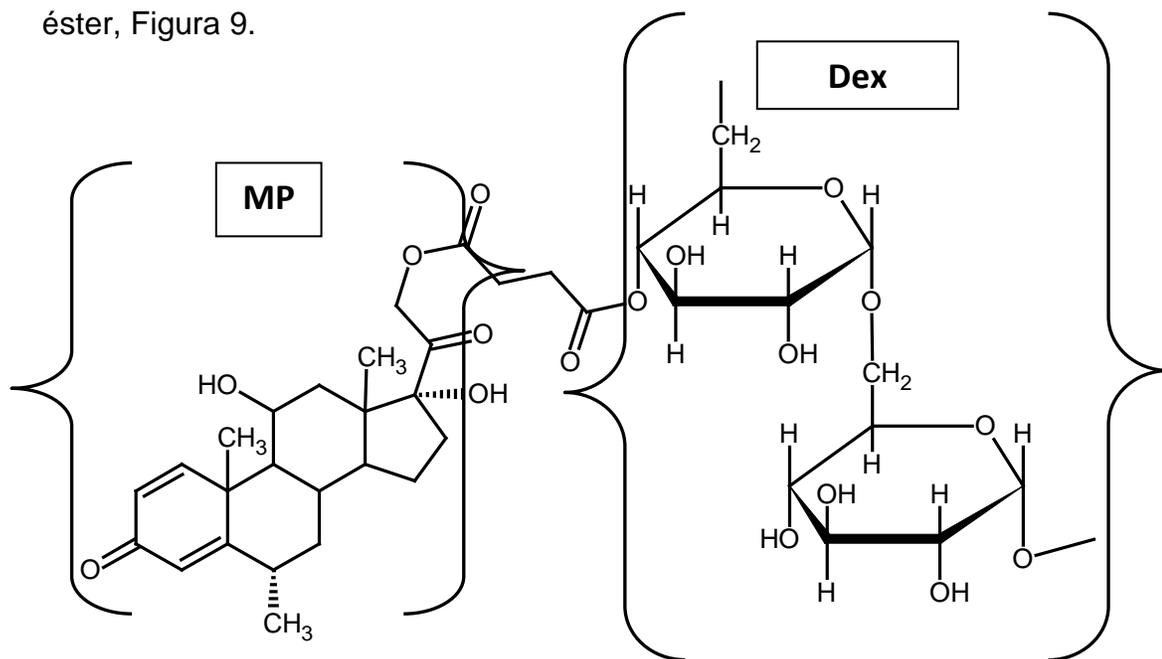


Figura 9. MPS-Dex Conjugado

Este conjugado hasta el momento no ha sido empleado a nivel oftálmico, lo que conllevó a una revisión a fin de, evaluar la posible presencia de enzimas metabólicas que pudiesen liberar la MP *in vivo*. Trabajos anteriores, habían reportado enzimas que favorecían la ruptura de los enlaces éster a nivel intraocular, (Ellis, 1971). Del mismo modo, Lam y cols. (1972), señalaron un aumento de las concentraciones de enzimas hidrolíticas como esterases y fosfatasas ácidas, cuando ocurría desprendimiento de retina. Estos hallazgos nos permitieron considerar el empleo del MPS-Dex como compuesto activo a ser incorporado dentro de las NPs.

Por otra parte, las condiciones establecidas para la síntesis lograron la formación de los MPS-Dex conjugados de 10kDa y 70kDa, que se comprobaron

mediante resonancia magnética de protón (RMN ^1H) y mediante la determinación del contenido de MP en el conjugado por HPLC.

Los resultados de RMN ^1H fueron las siguientes:

Para la MPS RMN ^1H (δ , ppm): 1,9 (dd, 1H); 2,05 (m, 2H); 2,12 (m, 2H); 4,78 (d, 1H); 5,2 (d, 1H); 5,38 (s, 2H); 5,82 (s, 1H); 6,2 (d, 1H); 7,35 (d, 1H); 12,2 ppm (sa, 1H). Anexos 2-5.

En el caso del Dex se observaron cuatro señales entre 4,4 - 5 ppm, cuyos desplazamientos químicos son característicos de los H unidos a C oxigenados de la cadena del carbohidrato. Anexo 6.

Para el MPS-Dex 10kDa (δ , ppm): 1,9 (dd, 1H); 2,05 (m, 2H); 2,12 (m, 2H); 4,78 (d, 1H); 5,2 (d, 1H); 5,38 (s, 2H); 5,82 (s, 1H); 6,2 (d, 1H); 7,35 (d, 1H).

Es importante señalar que las señales de 1,9 – 2,12 ppm, correspondiente al MPS permanecen como multipletes ensanchados, Anexo 7. Asimismo, se observaron las señales de la zona olefínica pero con ciertas variaciones en su forma: 5,82 (s, 1H); 6,2 (d, 1H); 7,35 (d, 1H). Adicionalmente, aparecen como singletes las señales entre 4,4 y 5 ppm características de la porción del carbohidrato acoplado, Anexo 8. Una evidencia adicional importante es la completa desaparición de los protones libres del grupo carboxílico a 12,2 ppm con singlete ensanchado, lo que es indicativo que la reacción de esterificación entre el hemisuccinato y el Dex se ha completado. Anexo 5 y 9.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE MPS EN LOS CONJUGADOS DE MPS-Dex

Cuando se desea conocer el contenido de MPS en los conjugados de MPS-Dex por HPLC, es necesario realizar una hidrólisis previa a pH 11 con NaOH, a fin de separar el fármaco de la macromolécula y liberar el corticosteroide bajo la forma de MP. Esta hidrólisis básica se completó a los 20 minutos y en ella ocurre la ruptura del grupo éster en posición 21 y se separa la MP del resto de los constituyentes del fármaco terapéutico, lográndose cuantificar por HPLC, Figura 10, (Anderson y cols., 1984).

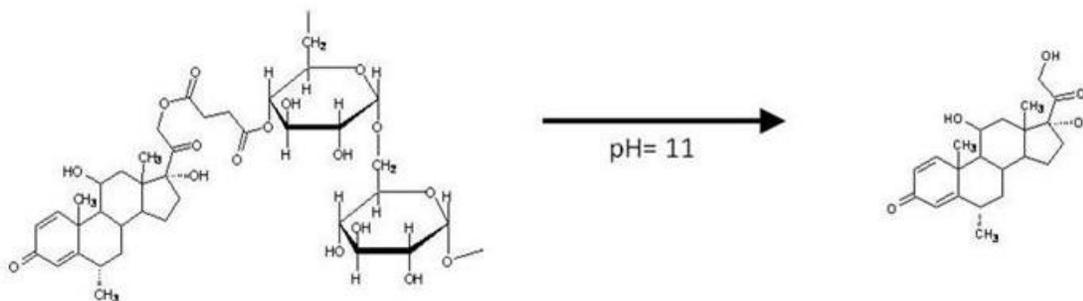


Figura 10. Hidrólisis básica del MPS-Dex en el grupo éster en posición 21.

El contenido de MPS por 100 mg de conjugado fue dependiente del Peso Molecular (PM) del polímero. Para el MPS-Dex 70kDa fue de 10 mg% \pm 0,28, mientras que para el MPS-Dex 10kDa fue de 30 mg% \pm 0,28. Un trabajo realizado por Mehvar en 1999, reportó un porcentaje similar al encontrado por nosotros: 8,5% de MP para el MPS-Dex 70kDa, lo que corresponde a un 10,7% en MPS. Los resultados encontrados son de suma importancia, ya que hasta la

fecha, no se había empleado el Dex 10kDa para sintetizar este fármaco-polímero. Estos resultados tienen concordancia con los reportados por Varshosaz y cols., (2009), en donde sintetizaron conjugados de 21-hemiglutarato de budesonida-Dex, como sistema de liberación para inflamaciones del colon, empleando Dex de diferentes peso moleculares. Ellos encontraron que a menor PM del Dex, mayor grado de sustitución de la Budesonida ($19.33\% \pm 0.84\%$ budesonida/budesonida-Dex 10kDa). Sin embargo, al comparar estos resultados con los obtenidos para la MPS-Dex 10kDa se observó que el contenido de MPS/conjugado fue muy superior. Asimismo, Canevari y cols., (2009), indicaron que el empleo del polímero con menor PM y menos ramificaciones incrementa la carga del fármaco. Esto podría deberse a que cuando se emplea un mayor PM, las estructuras son más voluminosas y ramificadas que producen impedimento estérico y dificulta la interacción efectiva entre los grupos hidroxilos y el grupo carboxílico del compuesto activo, (Varshosaz y cols., 2011). Adicionalmente, cuando se emplea DMSO como solvente, la estructura polimérica se mantiene bien enrollada donde solamente los grupos hidroxilos de la superficie podrían estar disponibles para reaccionar con el fármaco, (Varshosaz y cols., 2009).

Del mismo modo, el número de moléculas acopladas, es un factor de gran importancia a ser considerado en la formulación del producto, ya que estas afectan la solubilidad y el perfil de liberación de los conjugados, (Zou y cols., 2005; Varshosaz y cols., 2011). Es por ello, que nuestros resultados se ajustan a los ya reportados, donde a mayor cantidad de moléculas del fármaco con características lipofílicas unidas al Dex, menor será la solubilidad del conjugado

en agua. Esto se demostró al disolver 5 mg de cada uno de los conjugados con 8 mL de agua bidestilada a TA ($22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$), donde se observó que el MPS-Dex 70kDa se disolvía más rápidamente (1 minuto) que el MPS-Dex 10kDa (6 minutos). Estos resultados preliminares demuestran que este nanosistema fue capaz de modificar una de las propiedades fisicoquímicas más importante para la formulación de la MP como es su solubilidad, ya que este corticosteroide es prácticamente insoluble en agua y al unirse al Dex se ve sustancialmente favorecida. Esta característica es relevante en el desarrollo de fármacos a nivel ocular, donde el principal solvente y vehículo en estas formulaciones es el agua. Del mismo modo, este polímero terapéutico soluble en agua, podría evidenciar una mejor compatibilidad con los fluidos biológicos y con las estructuras intraoculares, donde se le pretende administrar.

LIBERACIÓN in vitro DEL MPS DURANTE LA INCUBACIÓN DEL MPS- Dex CON SOLUCIÓN AMORTIGUADORA ISOTÓNICA DE FOSFATO

Al evaluar el perfil de liberación acumulado del compuesto activo en función del tiempo, a pH fisiológico, se observó que la liberación ocurrió hacia la formación tanto de la MP como del MPS es decir, la hidrólisis se sucedió en los dos grupos éster de la molécula. Los productos de la hidrólisis obtenidos, dependen del pH del medio. A pH = 11, la reacción va dirigida a la formación de la MP exclusivamente, mientras que a pH fisiológico se hidrolizan los dos compuestos (MP y MPS). Asimismo, al alcanzar las primeras 24h se observó, un desplazamiento del equilibrio hacia la formación de la MP y una disminución progresiva de la concentración del MPS. Este resultado es muy satisfactorio

puesto que el MPS liberado se hidroliza progresivamente hacia la MP que es el compuesto activo terapéutico. Durante el período de estudio la liberación de la MP fue cercana al 40%: $38,5\% \pm 2,4\%$ para el MPS-Dex 70 kDa y $31,6\% \pm 3,8\%$ para el MPS-Dex 10 kDa); observándose menor liberación del fármaco en el MPS-Dex 10 kDa, Figura 11. Tomando en consideración el contenido de MPS en los conjugados y su liberación, podemos decir que bajo estas condiciones de estudio, el MPS-Dex 10 kDa, presentó mayor cantidad de moléculas del fármaco unidas al polímero y éstas se liberaron más lentamente, lo que podría favorecer un mejor comportamiento como sistema de liberación. Ahora bien, habría que evaluar si estos hallazgos son consistentes con los futuros estudios *in vivo*.

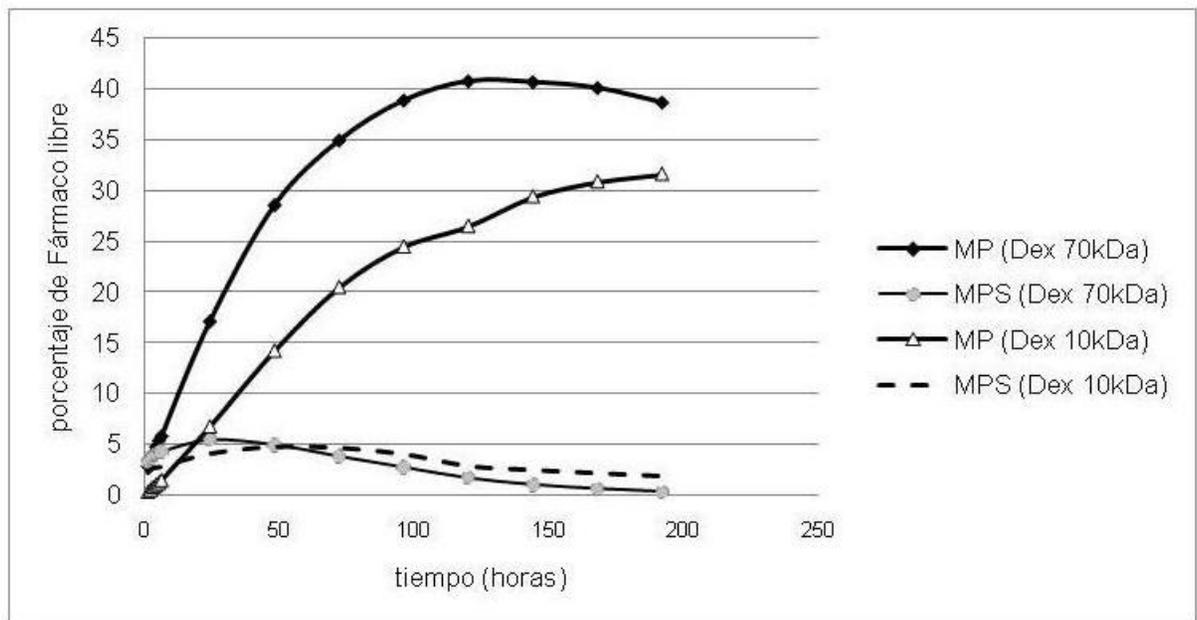


Figura 11. Perfil de liberación acumulado de la MP y el MPS en buffer fosfato isotónico pH= 7,2 a 37°C.

Adicionalmente, Schacht y cols., (1987) al extraer las enzimas lisosomales del hígado de rata, evidenciaron una disminución de la acción enzimática de la dextranasa sobre el Dex, a medida que aumentaba el número de grupos ligandos unidos a la molécula del polímero. Esto trae como consecuencia un retraso en su biodegradabilidad. Todo esto, nos permite considerar la aplicación de este polímero terapéutico a nivel ocular y evaluar a futuro, la liberación del fármaco en el fluido del humor vítreo y en animales de experimentación.

Por otra parte, durante este ensayo se observó en el cromatograma, la aparición de un pico muy cercano a los de la MP y MPS con un tiempo de retención (tr) de 6,375 minutos (Anexo 10). Estos resultados podrían relacionarse con los reportados por Anderson y Taphouse, (1981), en donde separaron la MP, MPS y su isómero MP17S por HPLC. Ellos encontraron que este último compuesto eluia primero, con un tr cercano al de la MP.

Para identificar este nuevo compuesto, se tomaron los analitos empleados para el ensayo de liberación a las 48 y 72 horas y se corrieron en un HPLC con detector de masa (HPLC-MS), encontrándose un PM igual al del MPS (Anexo 11). Estos resultados parecieran indicar que durante la liberación ocurrió la migración del grupo acilo de la posición 21 (MPS) a la posición 17 (MP17S). Otros trabajos, comprobaron que al colocar MP17S en solución amortiguadora pH=7,2, la aparición de la MP y MPS era función del tiempo. Asimismo, la formación de la MP provenía de la hidrólisis del MPS exclusivamente, Figura 12, (Anderson y Taphouse, 1981).

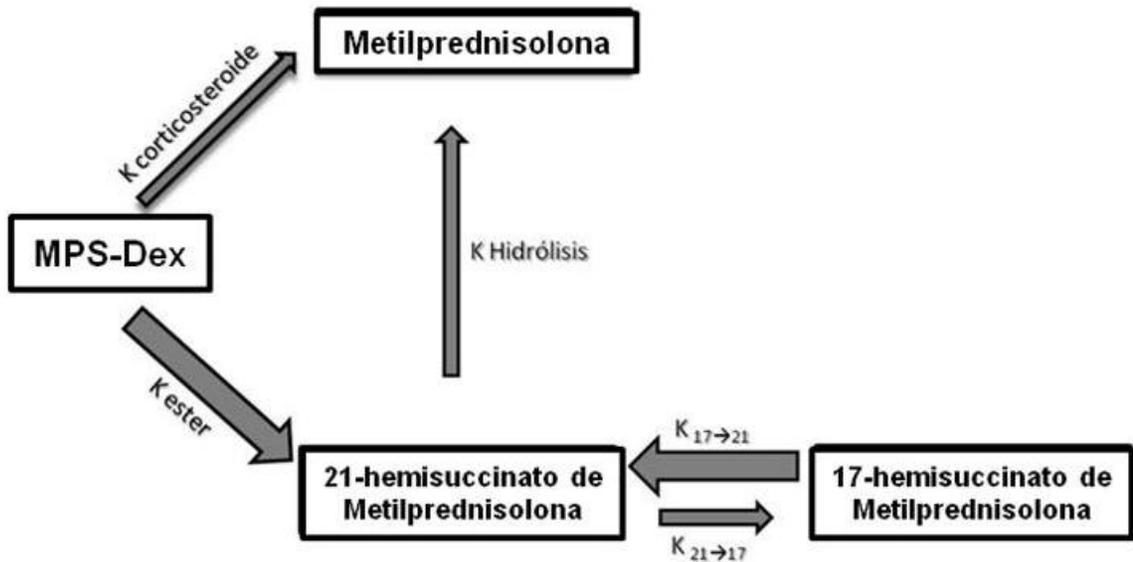


Figura 12. Esquema de la hidrólisis del grupo éster y de la migración del grupo acilo. El grosor de las líneas indica la magnitud relativa de las constantes de velocidad. (McLeod y cols., 1993)

En este mismo sentido, Anderson y cols., en 1984, realizaron un estudio de degradación de la sal sódica del MPS en función del pH. Ellos encontraron que a pHs básicos, la degradación hidrolítica se dirigía hacia la formación de la MP. Mientras que a pHs por debajo de 7,4 (3,6-7,4), observaron tanto esta misma hidrólisis, como la migración del grupo acilo del hemiéster a la posición 17. En la Figura 13, se observa este último mecanismo. Estos resultados previos, en donde se evaluó el comportamiento hidrolítico y la migración del grupo acilo en la sal sódica del MPS, pareciera ser semejante al encontrado en esta investigación para el MPS-Dex sin embargo, habría que continuar realizando más estudios así como, evaluar la liberación y degradación de estos polímeros terapéuticos a nivel ocular. Basándose en los resultados obtenidos, se tomaron como criterios de selección del conjugado, a ser incorporado en las NPs de Qs:

el contenido del fármaco en el conjugado y el porcentaje de fármaco liberado en el tiempo. Considerando, que el MPS-Dex 10kDa presentó mayor contenido de MPS, menor concentración de fármaco liberado y adicionalmente, buena solubilidad en agua, fue el polímero terapéutico seleccionado para desarrollar el nuevo nanosistema de aplicación intravítreo.

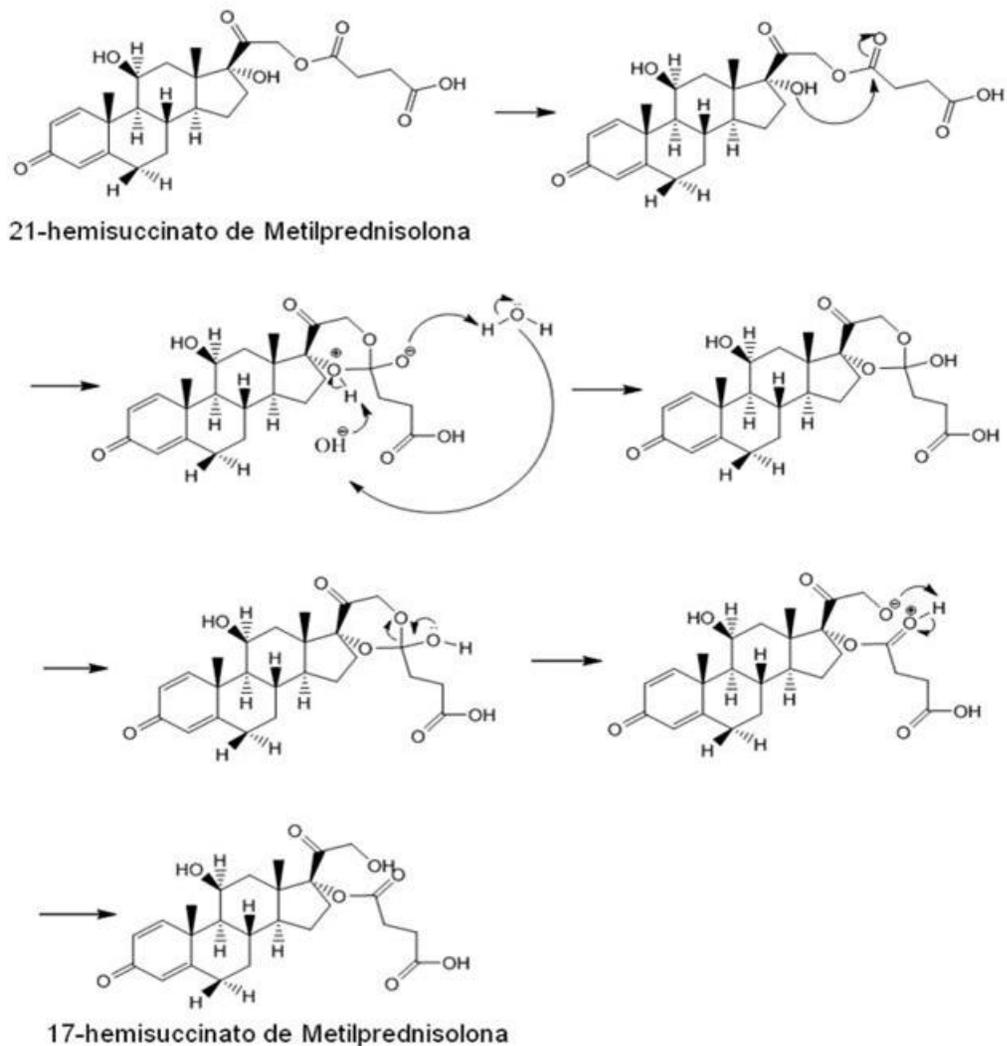


Figura 13. Mecanismo de la migración del grupo acilo del hemiéster de 21 → 17 en buffer fosfato pH=7,2.

COMPORTAMIENTO HIDROLÍTICO DEL MPS-Dex EN SOLUCIÓN DE TPP Y EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE ACETATO pH=5,5.

Como ya se dijo con antelación, la degradación del MPS-Dex es dependiente del pH. Este proceso, no es deseado en la etapa de formación de las NPs ya que, se perdería la estabilidad del conjugado. Para evitarlo, fue fundamental controlar el pH durante todo el proceso de elaboración de las mismas. Pero previo a ello, se realizó un estudio del comportamiento hidrolítico del MPS-Dex 10kDa en función del tiempo, frente a los reactivos involucrados, ya que la solución de TPP presentaba un pH= 9 y la dispersión de Qs en solución amortiguadora, pH= 5,5. Igualmente, para retardar la hidrólisis, se estableció mantener la temperatura entre 4° - 5°C, durante el primer período de la gelificación iónica. Asimismo, este estudio contribuyó a decidir la etapa en la cual se incorporaría el conjugado durante la formación de las NPs. Como se puede observar en las Figuras 14 y 15, el MPS-Dex 10kDa en presencia de solución de TPP, ocurrió una mayor hidrólisis (20% en términos de MPS) que en la solución amortiguadora pH= 5,5 (< 0,8%).

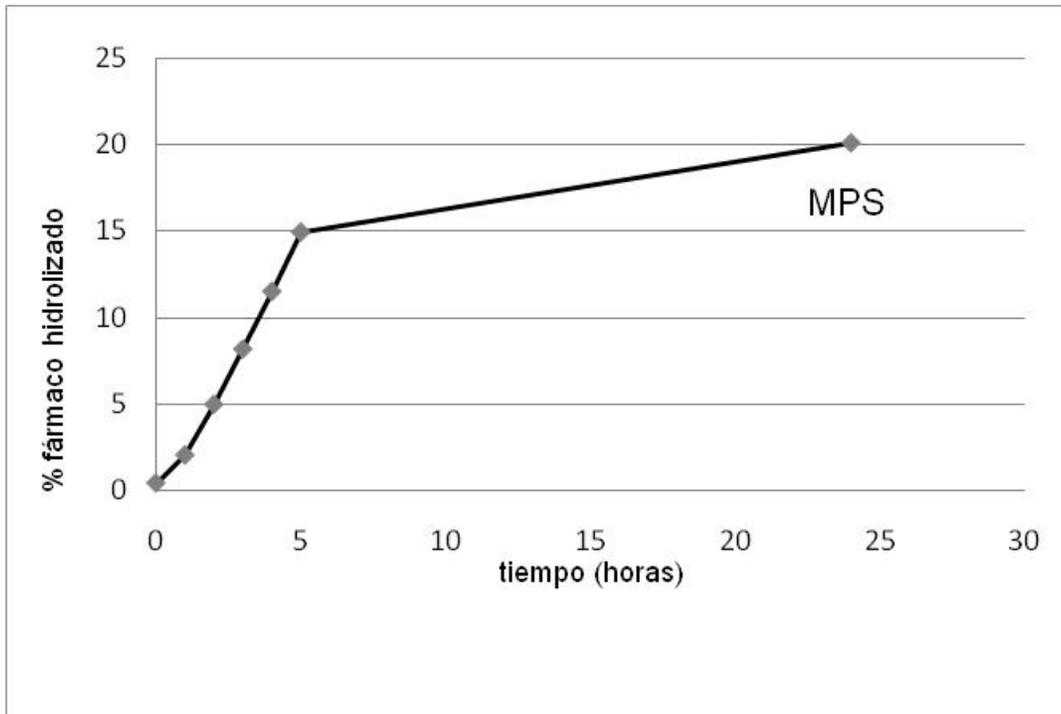


Figura 14. Hidrólisis MPS-Dex 10 kDa en solución de TPP al 0,25%.

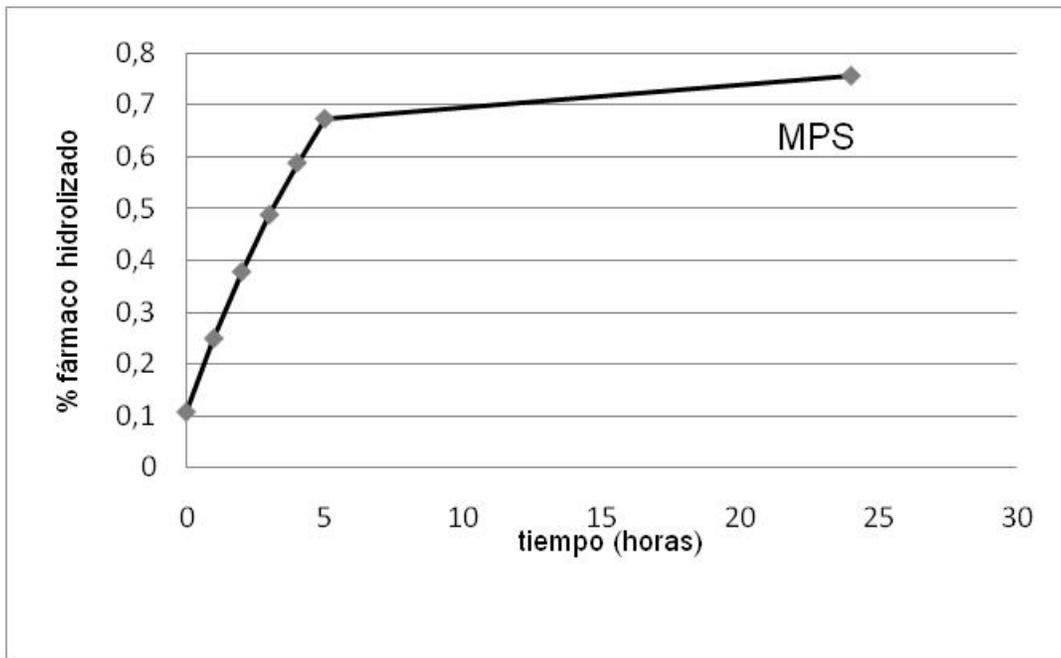


Figura 15. Hidrólisis MPS-Dex 10 kDa en solución de ACh/AcNa 0,2M pH=5,5

Es importante destacar que a ambos pH, se observó que la hidrólisis iba dirigida a la formación de la MP y MPS. En solución de TPP, el equilibrio hidrolítico se dirigió a la formación de mayor proporción de MP libre y a pH ácido hacia la formación del MPS. Estos resultados concuerdan con los ya encontrados donde a pH alcalino, la ruptura ocurre en la posición 21 del hemiéster liberando así el compuesto activo terapéutico. Por lo antes expuesto, se decidió mantener controlado el pH a 5,5 durante todo el proceso y mezclar previamente el MPS-Dex 10 kDa, en la dispersión de Qs a pH= 5,5.

ELABORACIÓN DE $NPs_{MPS-Dex-Qs}$ POR EL MÉTODO DE GELIFICACIÓN IÓNICA

El Qs es un polímero lineal con un alto porcentaje de unidades de glucosamina, tiene carácter básico y carga positiva a pH ácido, lo que mejora su solubilidad en agua y le permite su interacción electrostática y unión a proteínas, polímeros sintéticos, polianiones, componentes de la matriz extracelular y al ADN. Sus características fisicoquímicas, así como su biodegradabilidad, biocompatibilidad y baja toxicidad, lo han convertido en un polímero muy versátil y de gran interés en los nuevos desarrollos de formulaciones farmacéuticas, (Chen y cols., 2007). Trabajos anteriores recomiendan dispersar el Qs en solución de ácido acético con un rango de pH entre 4 y 6, ya que se requiere un medio ácido ($pH < 6,5$) para protonar el grupo amino, formar policationes de NH_3^+ y lograr su disolución en agua, (Janes y cols., 2001; Tang y cols., 2007; Zhang y cols., 2002). En este mismo sentido, como ya se ha comprobado, cambios de pH, tiene influencia en la degradación del MPS-Dex. Tomando en consideración estas dos premisas,

se procedió a disolver el Qs en solución amortiguadora de acetato de sodio pH= 5,5, a fin de mantener constante el pH durante todo el proceso.

Por otro lado, la interacción previa del MPS-Dex con el Qs, fue en virtud de formar en un principio NPs por interacción entre las cargas opuestas de estos dos polímeros, (Chen y cols., 2007; Qi y cols., 2010), y posteriormente inmovilizarlas dentro de los nanogránulos que se formarían con el TPP. La selección de estas técnicas se basaron en trabajos anteriores, donde se demostró la capacidad que tiene el Qs de precipitar bajo la forma de partículas en medio acuoso, cuando interactúa con polímeros o electrolitos con cargas negativas, (Chen y cols., 2007). Aún más, el método de gelificación iónica ha sido usado para atrapar macromoléculas como enzimas y albúmina de suero de bovino, y crear sistemas de liberación prolongada, (Tang y cols., 2006; Tang y cols., 2007; Fernandes y cols., 2008). Estos dos posibles mecanismos propuestos, no fueron comprobados en esta investigación, únicamente se estableció la técnica de elaboración fundamentada en estos trabajos ya publicados, donde NPs de Qs pueden elaborar complejos de coacervación (complejos electrostáticos), mediante la precipitación bajo la forma de partículas, cuando un polímero de carga opuesta, neutraliza las cargas de los grupos catiónicos de la amina (NH_3^+) en el Qs, (Chen y cols., 2007; Qi y cols., 2010). Del mismo modo, el Qs tiene la capacidad de inmovilizar macromoléculas mediante la formación de redes insolubles cuando reacciona con un agente entrecruzante como el TPP, (Tang y cols., 2006; Tang y cols., 2007; Fernandes y cols., 2008).

Es por ello que, tanto los polímeros seleccionados, como la no incorporación de solventes orgánicos y los diferentes mecanismos que presenta el Qs para atrapar macromoléculas, fueron los criterios seleccionados para el desarrollo y evaluación de este sistema de liberación de aplicación oftálmica.

En cuanto a la selección de la proporción entre Qs:TPP, se basó en trabajos previos de un grupo de investigadores en donde recomiendan el rango 3:1 – 6:1, (Calvo y cols., 1997a; Grenha y cols., 2007), para lograr producir estructuras sólidas nanométricas, de alto rendimiento con enlaces inter e intramoleculares estables entre las cargas del TPP y del Qs. Adicionalmente, Grenha y cols. (2007), emplearon por este método la proporción 3,6:1 p/p (Qs:TPP), para formar transportadores de proteínas con buenos resultados y con tamaños de partículas de alrededor de 382 nm. Por este motivo, se seleccionó esta relación para la formación de las $NPs_{MPS-Dex-Qs}$, ya que involucraba el empleo de una macromolécula, (Janes y cols., 2001; Grenha y cols., 2007).

Por otra parte, es importante destacar que la selección del Qs de baja viscosidad y bajo peso molecular, se apoyó en publicaciones anteriores donde reportaron que la encapsulación de los fármacos durante el proceso de gelificación, se vio disminuida por el aumento de la viscosidad del Qs, (Vandenberg y cols., 2001; Yang y Hon., 2009). De igual modo, Wu y cols. (2005), hallaron que concentraciones bajas (1-3 mg/mL) de Qs de baja viscosidad, promovió la encapsulación satisfactoria de Glicirricinato de amonio

por gelificación iónica. Todos estos hallazgos previos, fueron tomados en consideración para el desarrollo de las NPs_{MPS-Dex-Qs}.

Aún más, otros estudios determinaron que el mismo grado de desacetilación del Qs empleado en esta investigación (92,2%), favoreció la eficacia de encapsulación y disminuyó la velocidad de liberación, (Xu y Du, 2003). De la misma manera, el tiempo del entrecruzamiento, la velocidad de añadido y el pH de la solución, son también de suma importancia, a fin de obtener partículas homogéneas y completamente formadas. Shu y Zhu. (2000), demostraron que el añadido lento por gotas, el tiempo de entrecruzamiento de al menos una hora y el pH de la solución de TPP entre 4 y 8, beneficiaron los atributos de NPs de Qs.

Por lo demás, como ya se sabe, la solución de TPP ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) en agua, es alcalina, ya que al disociarse se forman los iones hidroxilos y fosfóricos, sin embargo, su añadido lento sobre la solución amortiguadora, desplaza el equilibrio de disociación del TPP hacia la formación de mayor proporción de iones fosfóricos (P_3O_5^-) que interactúan con el grupo NH_3^+ del Qs predominando así, la interacción iónica por encima de la desprotonación del grupo amino por presencia del ion hidroxilo, Figura 16. La formación de las NPs puede ocurrir por la presencia de ambos iones, sin embargo, controlando el pH se puede lograr la prevalencia de uno sobre el otro. Aún más, la presencia de la solución amortiguadora de acetato de sodio, mantuvo el pH de 5,5 durante todo el proceso.

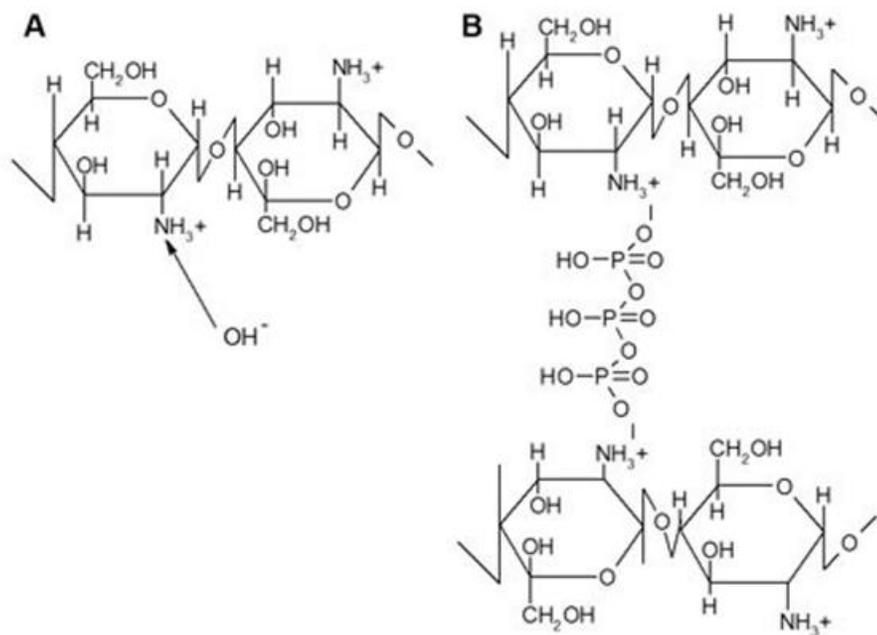


Figura 16. Mecanismo de formación de NPs Qs/TPP. (Bhumkar y Pokharkar. AAPS PharmSciTech. 2006,)

PURIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LAS NPs_{MPS-Dex-Qs}

El proceso de diálisis empleado, fue capaz de eliminar el exceso de reactivos y subproductos solubles. Es un método de purificación lento, pero suave que no requiere alto impacto, lo que disminuye los problemas de formación de agregados y redispersabilidad de las NPs en agua. Esta tendencia se ve realizada por el pequeño tamaño de las NPs y de su carga superficial. Este proceso permitió obtener partículas suspendidas con una tendencia al fenómeno de agregación más prolongado.

CARACTERIZACIÓN DE LAS $NPs_{MPS-Dex-Qs}$ Y MICROPARTÍCULAS DE $NPs_{MPS-Dex-Qs}$ /LACTOSA

MORFOLOGÍA DE LAS $NPs_{MPS-Dex-Qs}$

La mayoría de las NPs fueron prácticamente esféricas con una superficie lisa, lo que indicó que las moléculas de MPS-Dex, Qs y TPP interactuaron uniformemente para formar las NPs con diámetros inferiores a 450 nm, Figuras 17 y 18.

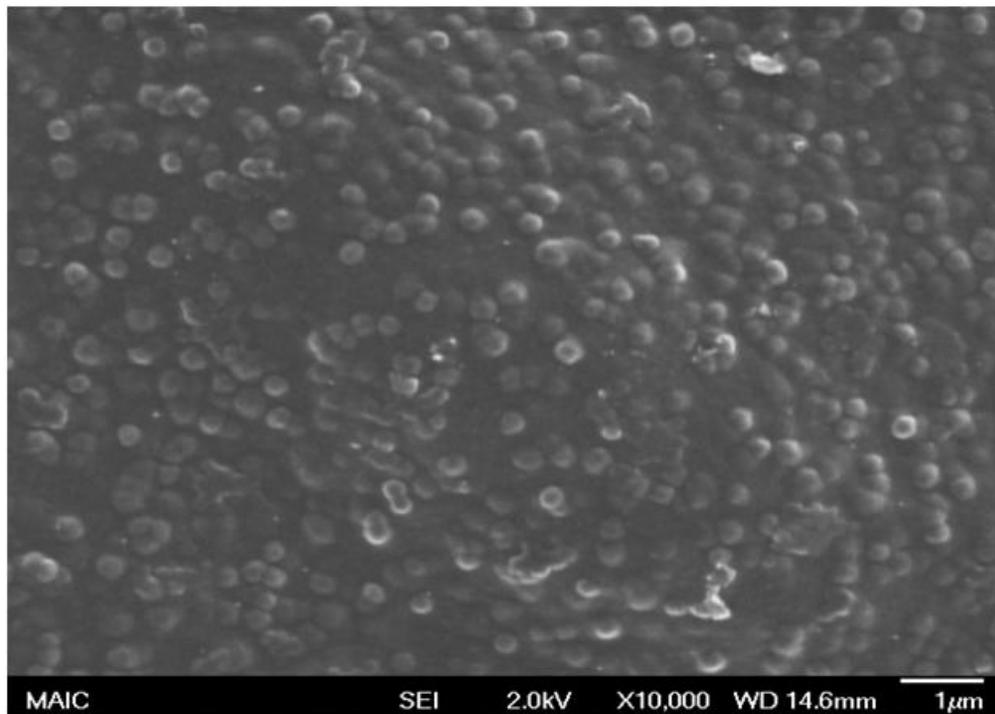


Figura 17. Micrografía (MEB) de $NPs_{MPS-Dex-Qs}$ (Amplificación X10.000).

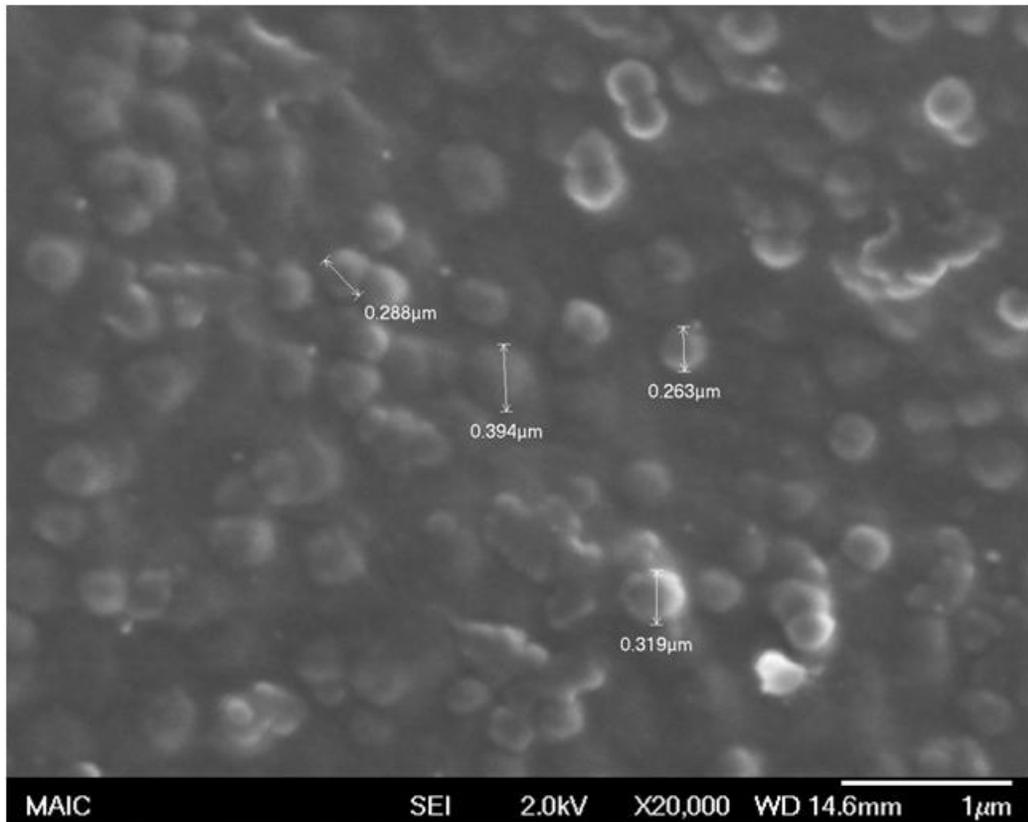


Figura 18. Micrografía (MEB) de $NPs_{MPS-Dex-Qs}$ (Amplificación X20.000).

En la siguiente MEB (Figura 19), se observa las micrografías de las $NPs_{MPS-Dex-Qs}$ recién elaboradas, antes de someterlas al proceso de diálisis y después de su purificación, pero mantenidas a pH 5,5. Algunas de éstas últimas, se observaron hidratadas y con una doble encapsulación (una pequeña NP atrapada dentro de otra más grande). Esto podría postular el hecho de que ocurre una primera encapsulación entre MPS-Dex y el Qs, formando partículas de menor tamaño, que posteriormente son encapsuladas con mayor cantidad de Qs debido a la presencia del TPP. Sin embargo, sería necesario continuar realizando nuevas evaluaciones, a fin de confirmar este supuesto.

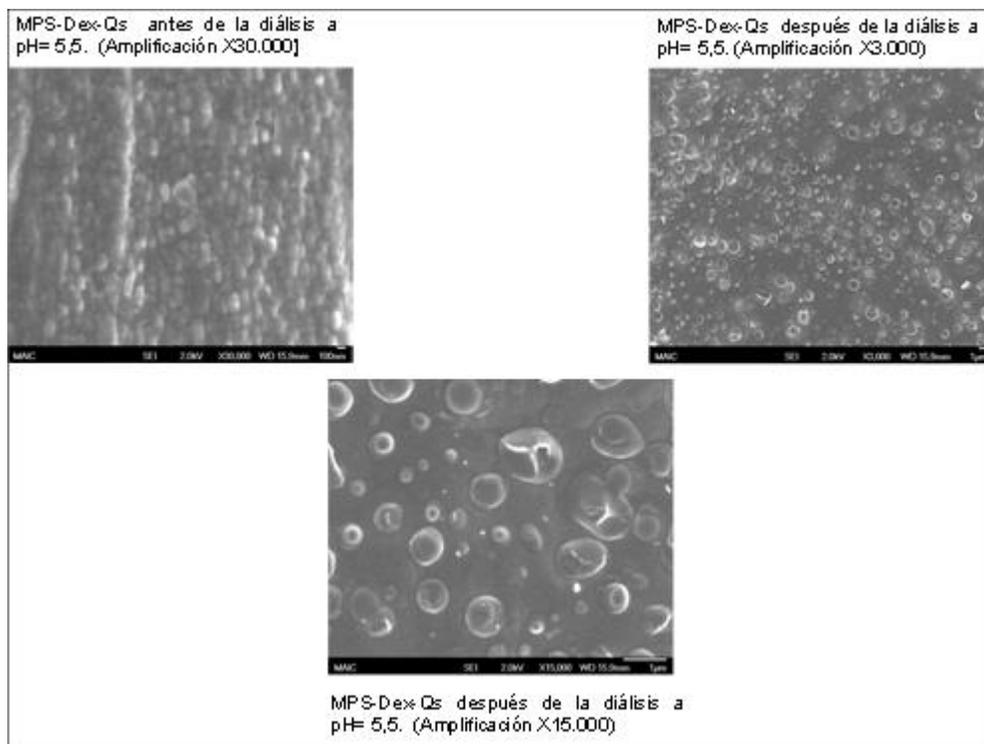


Figura 19. Micrografías (MEB) de $NPs_{MPS-Dex-Qs}$ antes y después del proceso de purificación a $pH=5,5$.

MORFOLOGÍA DE LAS MICROPARTÍCULAS DE $NPs_{MPS-Dex-Qs}$ /LACTOSA

Por otra parte, al secar por atomización las NPs sin el agregado del agente dispersante, las partículas se observaron esféricas con diámetros comprendidos entre 100 nm y 1,5 μm , Figura 20. Es importante resaltar que esta micrografía fue tomada de una mezcla de las partículas encontradas en las placas (etapas) 5, 6 y 7 del impactador de cascada de Andersen que recoge partículas entre 0,5 - 2,5 μm cuando el flujo empleado es de 20 L/min.

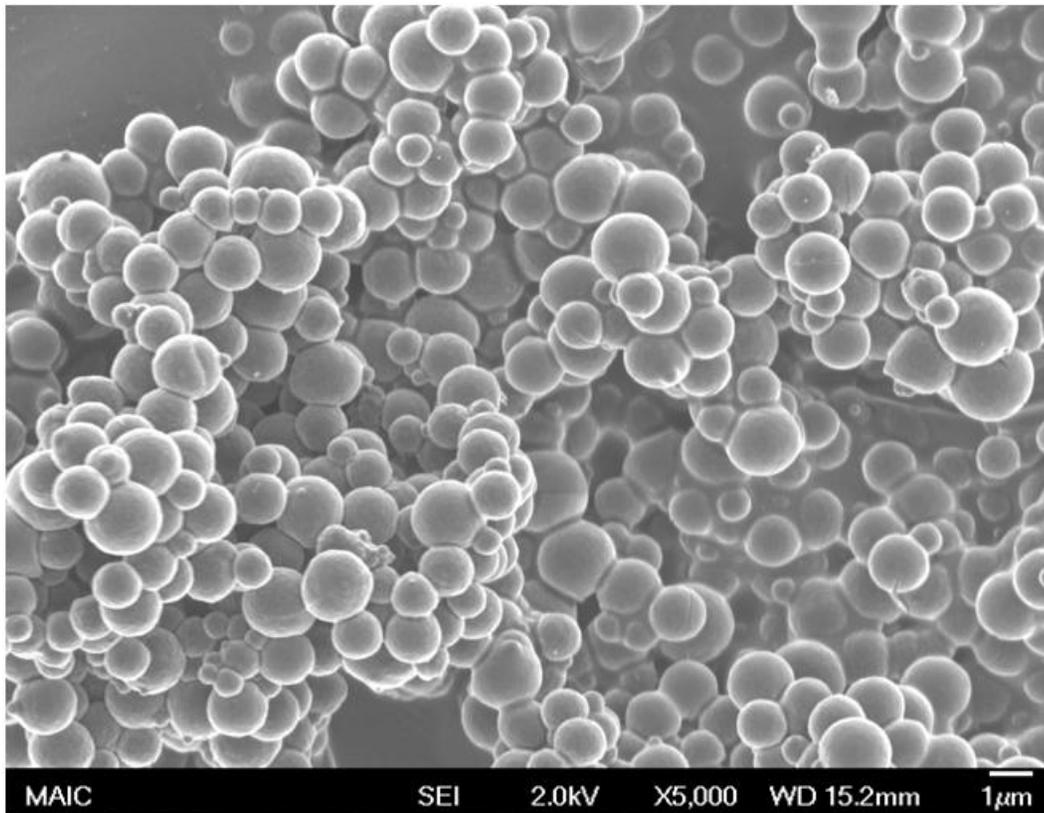


Figura 20. Micrografías (MEB) de $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Qs}}$ secadas por atomización sin lactosa (Amplificación X5.000).

Al dispersar en agua las micropartículas elaboradas en el secado por atomización con lactosa, éstas presentaron una morfología casi esférica, donde las $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Qs}}$ y las micropartículas recubiertas, se encontraron en su mayoría separadas unas de otras con una distribución de tamaño entre 330 – 2750 nm. Esto confirma que el agua va disolviendo la lactosa y libera las NPs evitando la formación de agregados, Figura 21.

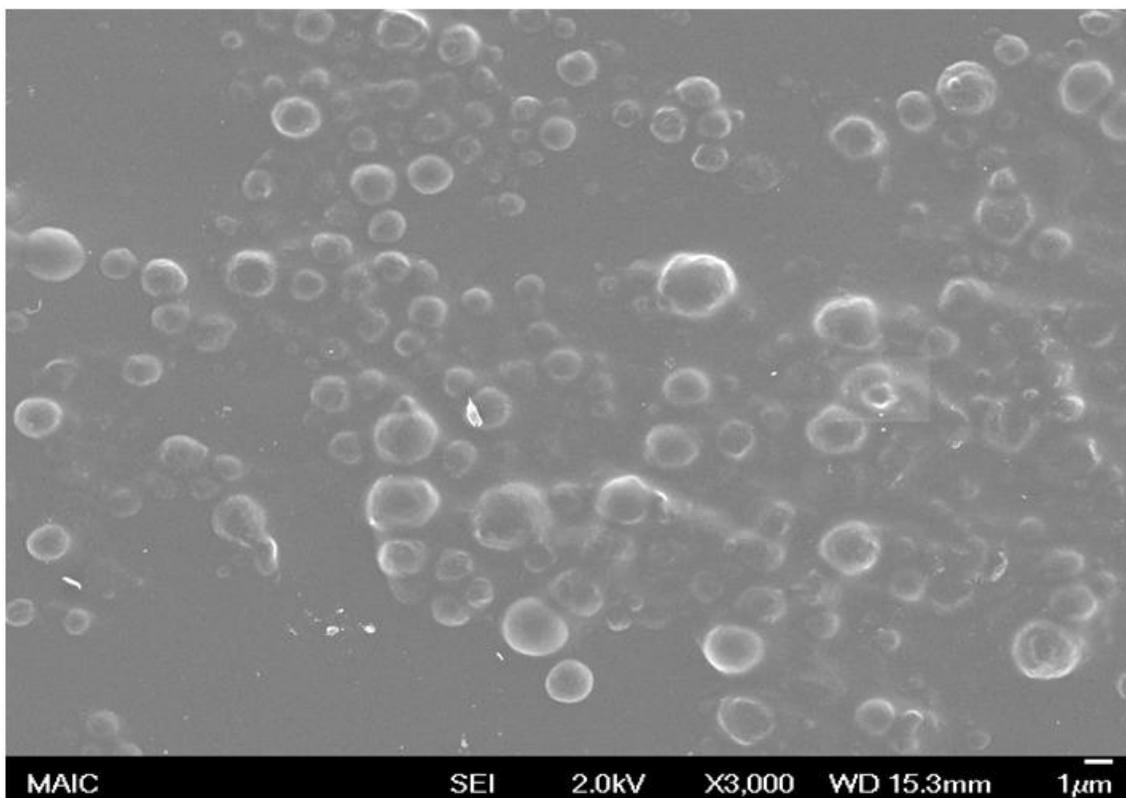


Figura 21. Micrografía (MEB) de micropartículas de $NPs_{MPS-Dex-Qs/lactosa}$, secadas por atomización (Amplificación X3.000).

Por lo demás, el diámetro de las microesferas de MPS-Dex-Qs, se encontraron alrededor de $1.780 \text{ nm} \pm 0,5 \text{ nm}$.

Del mismo modo, en las imágenes por MTE, se observó que las micropartículas se encontraban separadas disminuyendo el fenómeno de agregación, Figuras 22 y 23. El rango de tamaño de las partículas fue entre 13 -180 nm.

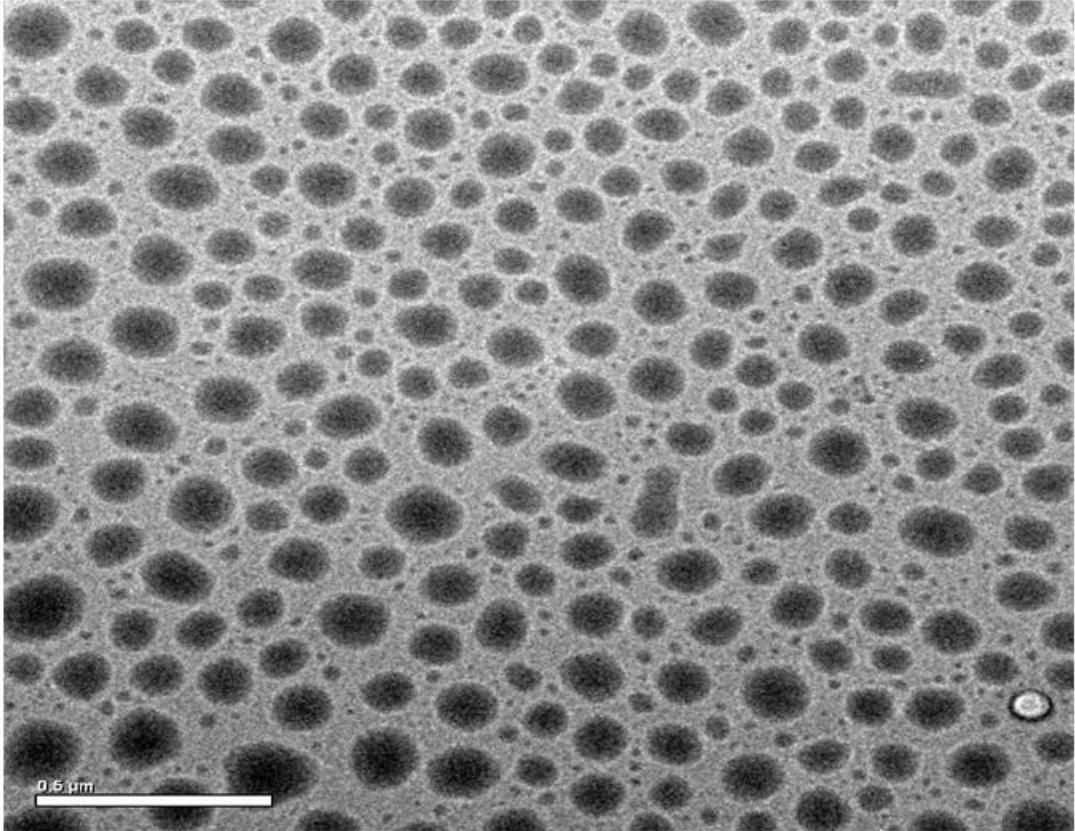


Figura 22. Micrografía (MTE) de micropartículas $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Qs/lactosa}}$ resdispersadas en agua

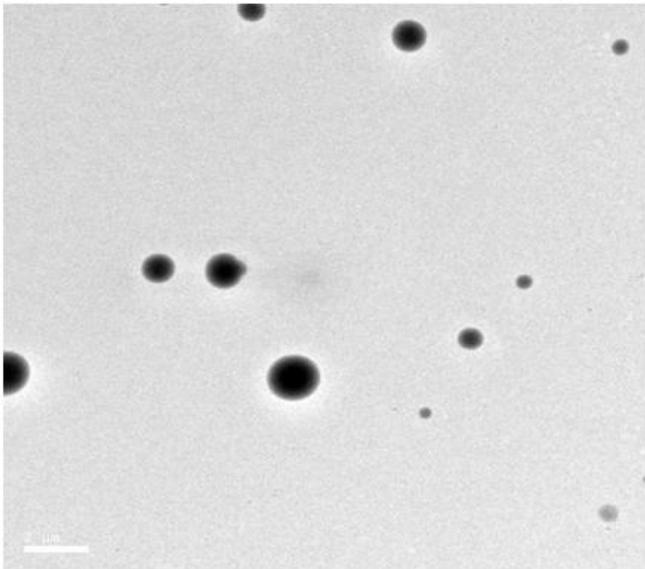


Figura 23. Micrografía (MTE) de micropartículas $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Qs/lactosa}}$ resdispersadas en agua

DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE LAS NPs_{MPS-Dex-Qs}

Las NPs_{MPS-Dex-Qs} presentaron una gran tendencia a la formación de agregados, principalmente en ausencia de pH ácido. Al lavar las NPs por diálisis, se elimina la solución amortiguadora y el pH se elevó de 5,5 a 6,0 – 6,5, pH cercano al pKa del Qs, provocando un aumento del tamaño de las partículas muy probablemente por desprotonación de los grupos amino, originando la formación de agregados y una distribución del tamaño de las partículas bimodal con una mayor dispersión entre ellas, Figura 24 y Tabla II. Cuando el pH se mantuvo durante todo el proceso alrededor de 5,5, el tamaño de las NPs se encontraron fundamentalmente entre 130 - 170 nm. Resultados similares fueron encontrados por Malhotra y cols. (2009); donde elaboraron partículas de Qs/TPP en proporción 3:1 y a pH= 5 para la solución de Qs y pH= 3 para TPP, obteniéndose tamaños de partículas más bajos 76 ± 1 nm, lo que confirma una vez más que el pH y la proporción de los reactivos, juegan un papel fundamental en el tamaño de las partículas.

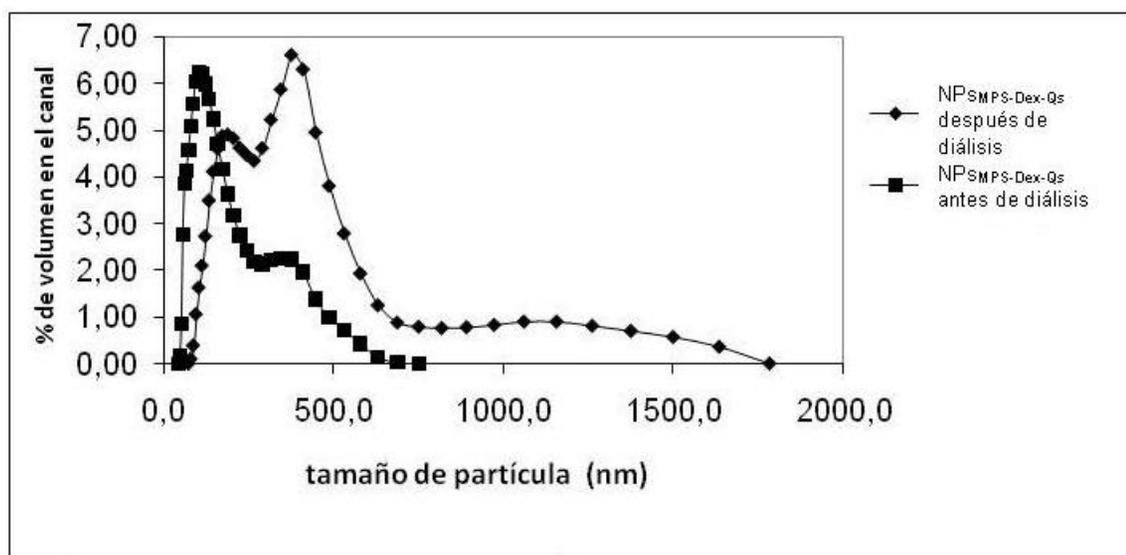


Figura 24. Distribución de tamaño de $NPs_{MPS-Dex-Qs}$

Tabla II. Resumen de los datos obtenidos de la distribución del tamaño de las partículas emitido por el Nanotracs NPA250 Ultra (n=3).

| $NPs_{MPS-Dex-Qs}$ antes de la diálisis | | $NPs_{MPS-Dex-Qs}$ después de la diálisis | |
|---|-------|---|-------|
| Volumen medio (nm) | 154,8 | Volumen medio (nm) | 334 |
| Número medio (nm) | 76,6 | Número medio (nm) | 145,3 |
| Área media (nm) | 111,7 | Área media (nm) | 231,9 |

La formación del nuevo nanosistema entre el conjugado y las NPs de Qs, permitió la formación de partículas de tamaños nanométricos. Este tamaño podría evidenciar *in vivo* un eficiente sistema de liberación ocular. Esto es de suma importancia, ya que algunos trabajos han sugerido que un apropiado tamaño de las partículas con un rango estrecho, asegura una baja irritación, adecuada biodisponibilidad y compatibilidad con los tejidos oculares, (Barbu y cols., 2006; Bucolo y cols., 2008; Paolicelli y cols., 2009).

DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE LAS MICROPARTÍCULAS DE

$NPS_{MPS-Dex-Qs}/LACTOSA$

Por otra parte, las micropartículas de $NPS_{MPS-Dex-Qs}/lactosa$, presentaron una muy buena dispersión en agua bidestilada, ya que al disolverse la lactosa en el medio, separó las NPs eficientemente, minimizando el problema de agregación y evidenciando una distribución normal donde el mayor porcentaje de partículas se encontró entre 100 - 145 nm, Figura 25 y Tabla III.

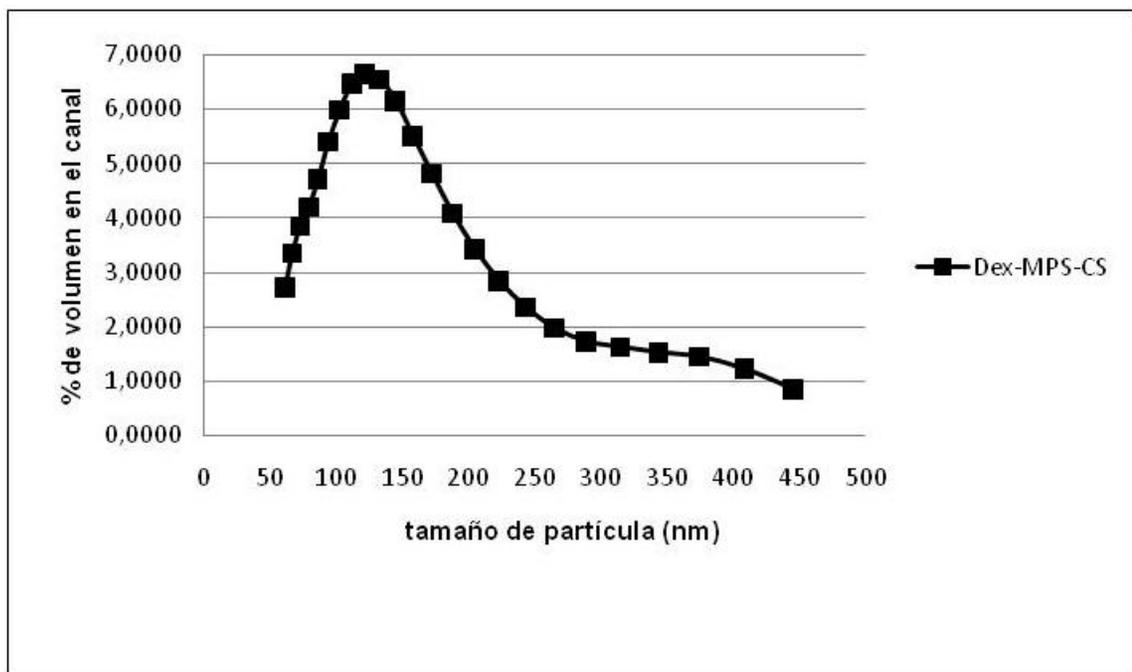


Figura 25. Distribución del tamaño de las micropartículas de $NPS_{MPS-Dex-Qs}/lactosa$.

Tabla III. Comportamiento del tamaño de las NPs_{MPS-Dex-Qs} durante el proceso de elaboración

| MPS-Dex-Qs | Tamaño de las partículas Volumen medio (nm) ± DSR |
|------------------------------------|--|
| NPs antes de la diálisis | 154 ± 12 |
| NPs después de la diálisis | 334 |
| NPs en micropartículas/ lactosa | 128 ± 10 |

CARGA ELÉCTRICA SUPERFICIAL DE LAS NPs_{MPS-Dex-Qs}.

En la Tabla IV, se indican los potenciales ζ de los diferentes componentes involucrados en la síntesis de las NPs.

Tabla IV. Potencial ζ de MPS, MPS-Dex y de las NPs de Qs en diferentes medios de dispersión.

| Nombre | Potencial ζ (mV) ± DSR | Medio de dispersión |
|---------------------------|--|----------------------------|
| MPS | -58 ± 1,44 | Agua bidestilada |
| MPS-Dex 10 kDa | -30 ± 0,59 | Agua bidestilada |
| MPS-Dex 10 kDa | -10 ± 3,02 | AcH/AcNa pH= 5,5 |
| NPs Qs vacía | + 50 ± 1,81 | Agua bidestilada |
| NPs _{MPS-Dex-Qs} | +33 ± 1,97 | Agua bidestilada |
| NPs _{MPS-Dex-Qs} | +14 ± 2,13 | AcH/AcNa pH= 5,5 |

El potencial ζ está directamente relacionado con la carga neta superficial del fármaco, el conjugado y de las partículas; atracciones electroestáticas entre especies de electronegatividades diferentes, modifica la carga superficial del compuesto resultante y es indicativo de la probabilidad de ocurrencia de la

reacción, (Malhotra y cols., 2009). Como se pudo observar el potencial ζ de la MPS disminuyó al encontrarse asociado al Dex. Por otra parte, los valores encontrados entre las NPs vacías y las cargadas con MPS-Dex 10 kDa, sugieren que la macromolécula fue incorporada en la matriz Qs/TPP. Esta reducción de la carga podría apoyar el supuesto de posibles interacciones entre las cargas positivas del grupo amino del Qs y la electronegatividad de los átomos presentes en el conjugado así como, la interacción iónica con el TPP. La disminución del valor de potencial ζ de las NPs en medio ácido, se pudo deber a que bajo esas condiciones, las partículas de Qs pudieron sufrir disolución y erosión que le permitió modificar su carga superficial neta.

ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO DE MPS EN LAS NPs_{MPS-Dex-Qs}.

El porcentaje promedio del MPS en las NPs encontrado, fue de $1,1\% \pm 0,1$, lo que correspondió a la carga experimental del fármaco en las partículas. La presencia del pH ácido durante 24 horas, favoreció la disolución y/o erosión de las estructuras poliméricas de las NPs, favoreciendo la liberación del MPS-Dex y/o sus productos de disociación. La hidrólisis alcalina permitió la cuantificación de la MP que se encontraba en las NPs.

DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA DE CAPTURA DE LA MPS EN LAS

NPs_{MPS-Dex-Qs}.

La eficacia de captura en términos de MPS fue de $45 \pm 10 \%$. Es de hacer notar que, debido a la variabilidad entre las muestras evaluadas se sugiere

continuar estandarizando esta metodología a fin de garantizar la total liberación del conjugado de las NPs como su completa hidrólisis a MP.

LIBERACIÓN in vitro DEL MPS DURANTE LA INCUBACIÓN DE LAS NPs_{MPS-Dex-Qs} CON SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATO

Al evaluar la liberación acumulada del compuesto activo en función del tiempo, a pH fisiológico, se observó el mismo comportamiento ocurrido con el conjugado. La hidrólisis fue dirigida hacia la formación de la MP y del MPS. En la Figura 26, se puede ver que durante las primeras horas las cantidades de MP y MPS son muy cercanas; al alcanzar las primeras 7h se observó, un desplazamiento del equilibrio hacia la formación de la MP.

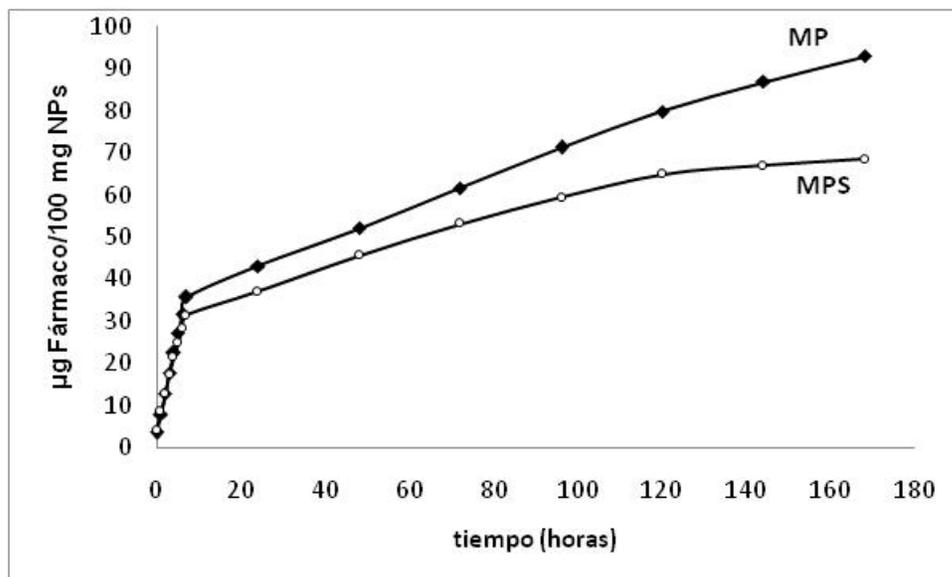


Figura 26. Perfil de liberación de NPs_{MPS-Dex-Qs} en buffer (pH=7,2) a 37°C

La Figura 27, muestra el porcentaje acumulado del compuesto activo liberado expresado en términos de MPS.

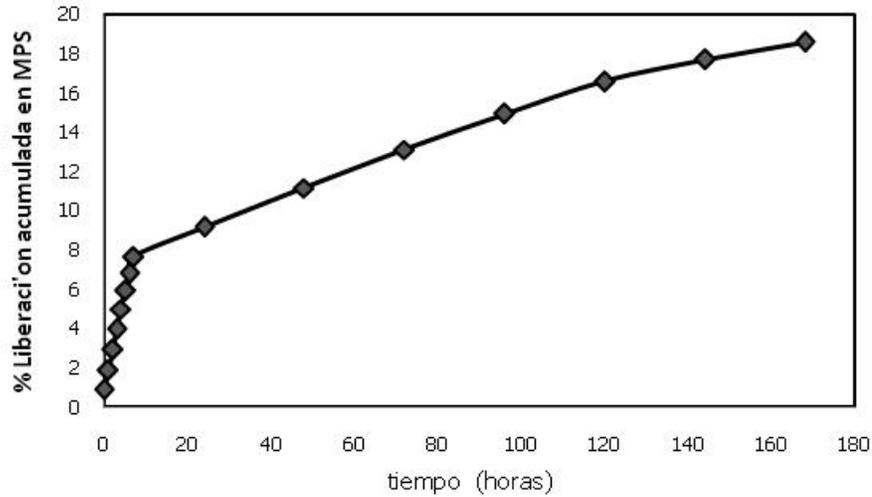


Figura 27. Perfil de liberación de NPs_{MPS-Dex-Qs} en buffer (pH=7,2) a 37°C

Al comparar la liberación del MPS-Dex 10kDa y las NPs_{MPS-Dex-Qs}, se observó claramente que al encapsular el conjugado, la liberación del MPS se hace más lenta con una reducción cercana al 50%, Figura 28.

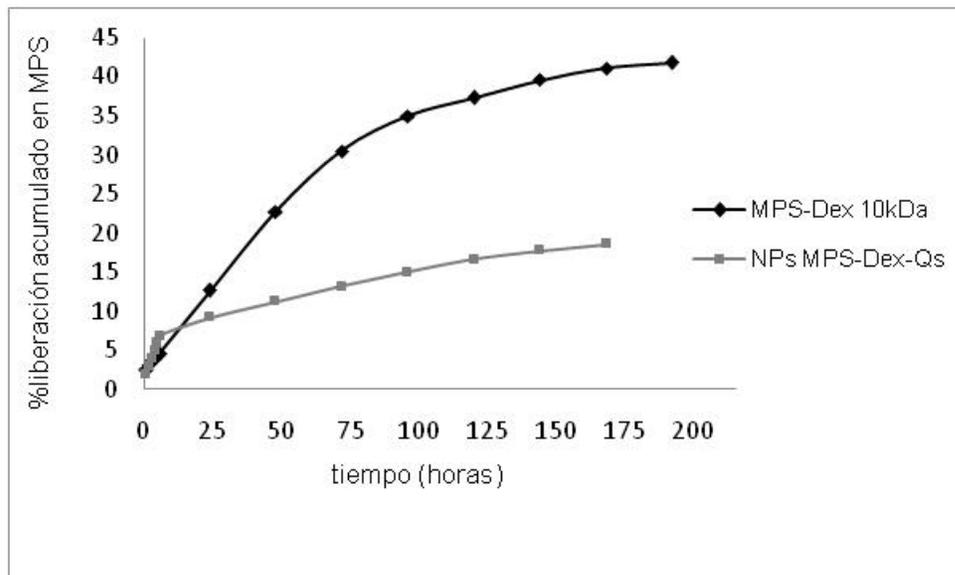


Figura 28. Perfil de liberación del Conjugado y del Nanosistema en buffer pH=7,4 a 37°C

Por otra parte, al igual que en el conjugado, se observó a partir de las 24 horas, la aparición del mismo compuesto que podría ser el isómero del MPS. Esto nos permite pensar que el proceso de encapsulación no modificó el comportamiento de liberación del polímero terapéutico pero sí el tiempo en el cual ésta reacción se sucede. Este isómero del MPS, se comportó dentro del nanosistema, con un pequeño incremento durante los primeros días y posteriormente se mantuvo constante hasta la finalización del estudio.

ELABORACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS COMPUESTAS POR

NPs_{MPS-Dex-QS}/LACTOSA

Trabajos anteriores, se valieron del secado por atomización para incorporar NPs de diferentes polímeros dentro de micropartículas, empleando soluciones de lactosa o manitol como excipiente. Este proceso permitió la formación de micropartículas para liberación pulmonar con tamaño adecuado, (Grenha y cols., 2005; Bailey y Berkland, 2009; Patel, 2010). Tomando esto en consideración, se empleó lactosa para recubrir las NPs_{MPS-Dex-Qs}. Las micropartículas formadas presentaron forma esférica y evidenciaron una dispersión translúcida y transparente al dispersarlas en agua bidestilada como ya se detalló con antelación. Esto sugiere, que el procedimiento permitió mantener separadas las NPs disminuyendo su agregación y mejorando su dispersibilidad en agua.

CONCLUSIONES

- Es posible desarrollar sistemas oftálmicos de liberación con polímeros biocompatibles, biodegradables y solubles en agua.
- El MPS como fármaco modelo, fue capaz de unirse eficientemente al Dex para formar un polímero terapéutico.
- El método de gelificación iónica permitió la encapsulación del conjugado formando $NPs_{MPS-Dex-QS}$, con características deseables para el sistema ocular y capaz de liberar el fármaco sin modificar su comportamiento químico, en un período más prolongado en el tiempo.
- La micropartículas compuestas de $NPs_{MPS-Dex-QS}$ recubiertas de lactosa, incrementaron la dispersibilidad en agua.
- Las características de este nuevo nanosistema (conjugado/NPs), evidenció su posible potencial en el desarrollo de formulaciones intravítrea de administración prolongada, que reduzca la frecuencia de administración, ofreciendo una excelente alternativa que proporcione un mayor grado de satisfacción y mejore la calidad de vida del paciente.

RECOMENDACIONES

Nuestros esperanzadores resultados experimentales preliminares, nos permiten sugerir continuar validando esta metodología a fin de, satisfacer aún más los requerimientos de un nanosistema transportador de liberación intravítrea ideal. Es por ello, que se recomienda a su vez, la realización de estudios *in vivo* e *in vitro*, que demuestren el mecanismo de liberación, su seguridad, respuesta terapéutica y tolerancia ocular, así como beneficios que permitan de modo factible la liberación de cantidades terapéuticas prolongadas del compuesto activo, en el sitio de acción y supere de forma efectiva el corto efecto de las formulaciones convencionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. Agnihotri S, Mallikarjuna N, Aminabhavi T. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J. Control. Release.* 2004; 100 (1): 5-28.
2. Anderson B, Conradi R, Lambert W. Carboxyl group catalysis of acyl transfer reactions in corticosteroid 17 and 21 Monoesters. *J. Pharm. Sci.* 1984; 73 (5): 604-610.
3. Anderson B, Taphouse V. Initial rate studies of Hydrolysis and Acyl migración in Methylprednisolone 21-Hemisuccinate and 17-Hemisuccinate. *J. Pharm. Sci.* 1981; 70 (2): 181-185.
4. Arai K, Kinumaki T, Fujita T. Toxicity of chitosan. *Bull. Tokai Reg. Fish Lab.* 1968; 43: 89-94.
5. Bailey M, Berkland C. Nanoparticle Formulations in Pulmonary Drug Delivery. *Med. Res. Rev.* 2009; 29 (1): 196 -212.
6. Barar J, Asadi M, Mortazavi-Tabatabaei S, Omid Y. Ocular Drug Delivery: Impact of in Vitro Cell Culture Models. *J. Ophth. Vision Res.* 2009; 4 (4): 238-252.
7. Barbu E, Verestiuc L, Nevell T, Tsibouklis J. Polymeric materials for ophthalmic drug delivery: trends and perspectivas. *J. Mater. Chem.* 2006; 16 (34): 3439-3443.
8. Bawa R, Bawa S, Maebius S, Flynn T, Wei C. Protecting new ideas and inventions in nanomedicine with patents. *Nanomedicine.* 2005; 1 (2): 150-158.
9. Bhumkar D, Pokharkar V. Studies on Effect of pH on Cross-linking of Chitosan With Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note. *AAPS PharmSciTech.* 2006; 7 (2): Article 50. (<http://www.aapspharmstech.org>).
10. Bodor N, Buchwald P. Ophthalmic Drug Design Based on the Metabolic Activity of Eye: Soft Drug a Chemical Delivery Systems. *The AAPS J.* 2005; 7 (4): Article 79 E820-E833.
11. Brayden D. Controlled release technologies for drug delivery. *Drug. Discov. Today.* 2003; 8 (21): 976 - 978.
12. Buchi Training Papers Spray Drying. Copyright© BÜCHI Labortechnik AG, 1997 – 2002. [en línea]. [consultado 2010 agosto 25]; disponible en: www.buchi.com/Spray-Drying.69.0.html?&no_cache=1&file=308...

13. Bucolo C, Maltese A, Drago F. When nanotechnology meets the ocular surface. *Expert. Rev. Ophthalmol.* 2008; 3 (3): 325-32.
14. Bu H, Gukasyan H, Goulet L, Lou X, Xiang C, Koudriakova T. Ocular Disposition, Pharmacokinetics, Efficacy and Safety of Nanoparticle-Formulated Ophthalmic Drugs. *Curr. Drug. Metab.* 2007; 8 (2): 91-107.
15. Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato J, Alonso M. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polymer Sci.* 1997a; 63 (1): 125-132.
16. Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato J, Alonso M. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm Res.* 1997b; 14 (10): 1431-1436.
17. Canevari M, Castagliuolo I, Brun P, Cardin M, Schiavon M, Pasut G, Veronese FM. Poly(ethylene glycol)-mesalazine conjugate for colon specific delivery. *Int. J. Pharm.* 2009; 368 (1-2): 171–177.
18. Chen J, Hu P, Li X. Chitosan membrane on nonpenetrating filtering in rabbits. *Acad J. PLA Postgrad. Med. Sch.* 2002; 6 (2): 139–141.
19. Chen Y, Mohanraj V, Wang F, Benson H. Designing Chitosan–Dextran Sulfate Nanoparticles Using Charge Ratios. *AAPS PharmSciTech.* 2007; 8 (4) Article 98. (<http://www.aapspharmstech.org>).
20. Ciulla T, Walker J, Fong D, Criswell M. Corticosteroids in posterior segment disease: an update on new delivery systems and new indications. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 2004; 15 (3): 211–220.
21. Csaba N, Köping-Höggå M., Alfonso M. Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. *Int. J. Pharm.* 2009, [en línea]. [consultado 2009 septiembre 1]; doi:10.1016/j.ijpharm.2009.07.028
22. Dang W, Colvin O, Brem H, Saltzman W. Covalent Coupling of Methotrexate to Dextran enhances the penetration of cytotoxicity into a tissue-like matrix. *Cancer Res.* 1994; 54 (7): 1729-1735.
23. Dann R. Analysis of the Metabolism of Dextran-Methylprednisolone Succinate Using *In Vitro* Models. A Thesis Presented to The School of Graduate Studies Drake University. July 1999.
24. Davies N. Biopharmaceuticals considerations in topical ocular drug delivery. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2000; 27 (7): 558-562.

25. De Campos A, Diebold Y, Carvalho E, Sánchez A, Alonso M. Chitosan Nanoparticles as New Ocular Drug Delivery Systems: *in Vitro* Stability, *in Vivo* Fate, and Cellular Toxicity. *Pharm. Res.* 2004; 21 (5): 803-810.
26. Devika R, Bhumkar D, Pokharkar V. Studies on Effect of pH on Cross-linking of Chitosan With Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note. *AAPS Pharm.Sci.Tech.* 2006; 7 (2): Article 50 1-6. (<http://www.aapspharmscitech.org>).
27. Dextran [en línea]. [consultado 2009 marzo 13]; disponible en: <http://www.scribd.com/doc/15042616/dextran> consultado en el 2009
28. Dhawan S, Singla A, Sinha V. Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan Microspheres Prepared by Different Methods. *AAPS Pharm.Sci.Tech.* 2004; 5 (4): Art. 67: 1-6.
29. Dias C, Anand B, Mitra A. Effect of mono- and di-acylation on the ocular disposition of ganciclovir: physicochemical properties, ocular bioreversion, and antiviral activity of short chain ester prodrugs. *J. Pharm. Sci.* 2002; 91 (3): 660-668.
30. Duncan, R. The Dawning Era of Polymer Therapeutics. *Nature. Rev. Drug. Discov.* 2003a; 2 (5): 347-360.
31. Duncan R. Polymer-drug conjugates. En: Budman D, Calvert H, Rowinsky E, eds. *Handbook of Anticancer Drug Development*. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2003b: 239- 260.
32. Duncan, R. Polymer Conjugates as Anticancer Nanomedicines. *Nat. Rev. Cancer.* 2006, 6 (9): 688–701.
33. Duvvuri S, Majumdar S, Mitra A. Role of Metabolism in Ocular Drug Delivery. *Curr. Drug Metab.* 2004; 5 (6): 507-515.
34. Ellis P. Ocular tissue cholinesterase kinetics of enzyme activity inhibition. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 1971; 69 (1): 358–382.
35. El-Samaligy M, Rojanasakul Y, Charlton J, Weinstein G, Lim J. Ocular Disposition of Nanoencapsulated Acyclovir and Ganciclovir via Intravitreal Injection in Rabbit's. *Eye Drug Deliv.* 1996; 3 (2): 93-97.
36. Elvira C, Gallardo A, San Roman J, Cifuentes A. Covalent Polymer-Drug Conjugates. *Molecules.* 2005, 10 (1): 114-125.

37. Enríquez A, Diebold Y, Calonge M, García-Vázquez C, Callejo S, Vila A, Alonso M. Chitosan Nanoparticles as a Potential Drug Delivery System for the Ocular Surface: Toxicity, Uptake Mechanism and In Vivo Tolerance. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006; 47 (4): 1416–1425.
38. Fernandes S, de Oliveira R, Fatibello-Filho O, Spinelli A, Cruz Vieira I. Biosensor based on laccase immobilized on microspheres of chitosan crosslinked with tripolyphosphate. *Sens. Actuators. B.* 2008; 133 (1): 202–207.
39. Fernandez-Urrusuno R, Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato J, Alonso M. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.* 1999; 16 (10): 1576– 1581.
40. Gómez-Gaete C, Tsapis N, Besnard M, Bochot A, Fattal E. Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2007; 331 (2): 153-159.
41. Gómez-Ulla F, Basauri E, Arias L, Martínez-Sanz F. Manejo de las inyecciones intravítreas. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 2009; 84 (8): 377 – 388.
42. Grenha A, Seijo B, Remuñán-López C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2005; 25 (4–5): 427–437.
43. Grenha A; Seijo B; Serra C; Remuñán-López C. Chitosan Nanoparticle-Loaded Mannitol Microspheres: Structure and Surface Characterization. *Biomacromolecules.* 2007; 8 (7): 2072-2079.
44. Hermanson G. *Bioconjugate Techniques.* 2º ed. San Diego, Ca, USA: Elsevier; 2008.
45. Hilborn J. *In vivo* injectable gels for tissue repair. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.* 2011; 3: 589-606. [en línea]. [consultado 2011 diciembre 22];doi: 10.1002/wnan.91
46. Horwitz W. Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. *Anal. Chem.* 1982; 54 (1): 67A-74A.
47. Hussain A, Truelove J. Prodrug Approaches to enhancement of physicochemical properties of drugs IV: Novel Epinephrine Prodrug. *J. Pharm. Sci.* 1976; 65 (10): 1510–1512.
48. Jager R, Aiello L, Patel S, Cunningham E Jr. Risks of intravitreal injection: a comprehensive review. *Retina.* 2004; 24 (5): 676-698.

49. Janes K, Calvo P, Alonso M. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2001; 47(1): 83–97.
50. Järvinen T, Niemi R. Prodrug approaches to ophthalmic drug delivery. En V.J. Stella, R.T. Borchardt, M.J. Hageman, R. Oliyai, H. Maag, J.W. Tilley editors. Volume V: Prodrugs: Challenges and Rewards, Partes 1 y 2. de la American Association of Pharmaceutical Scientists. NY: Springer; 2007.
51. Järvinen T, Poikolainen M, Suhonen P, Vepsäläinen, Alaranta S, Urtili A. Comparison of enzymatic hydrolysis of pilocarpine prodrugs in human plasma, rabbitcornea and butyrylcholinesterase solutions. *J. Pharm. Sci.* 1995; 84 (5): 656-660.
52. Javeriana.edu.2010: [en línea]. [consultado 2010 enero 10]; disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/microelectrans.htm>
53. Judefeind A, Villiers M. en Villiers M; Aramwit P; Kwon G, editors. *Nanotechnology in Drug Delivery* N.Y. American Association of Pharmaceutical Scientists. 2009. Vol. 10, Cap. 5, p. 129-162.
54. Kaur I, Garg A, Singla A, Aggarwal D. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. *Int. J. Pharm.* 2004; 269 (1): 1-14.
55. Kin T, Lindsey J, Aihara M, Anthony T, Weinreb R. Intraocular Distribution of 70-kDa Dextran after Subconjunctival Injection in Mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002; 43 (6): 1809-1816.
56. Kompella U, Bandi N, Ayalasomayajula S. Poly(lactic acid) nanoparticles for sustained release of budesonide. *Drug. Deliv. Technol.* 2001; 1 (1): 29–35.
57. Kompella U, Bandi N, Ayalasomayajula S. Subconjunctival Nano- and Microparticles Sustain Retinal Delivery of Budesonide, a Corticosteroid Capable of Inhibiting VEGF Expression. *IOVS.* 2003; 44 (3): 1192-1201.
58. Koo O, Rubinstein I, Onyuksel H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomed-nanotechnol-Biol-Med.* 2005; 1 (3): 193– 212.
59. Kotadiya R, Patel V, Patel H, Koradiya H. Effect of cross-linking on physicochemical properties of chitosan mucoadhesive microspheres: A factorial approach. *Int. J. G. Pharm.* 2009; 3 (1): 58-59.
60. Lam K, Constable I, Schepens C. Subretinal fluid: Isoenzymes and cytologic studies. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1972; 11 (12): 1037-1043.

61. Larsen C, Østergaard J, Larsen S. Controlled Release - Macromolecular Prodrugs. En V.J. Stella, R.T. Borchardt, M.J. Hageman, R. Oliyai, H. Maag, J.W. Tilley editors. Volume V: Prodrugs: Challenges and Rewards, Partes 1 y 2. de la American Association of Pharmaceutical Scientists. NY: Springer; 2007.
62. Larsen C. Dextran prodrugs - structure and stability in relation to therapeutic activity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1989; 3 (1): 103-154.
63. Madrigal-Carballo S, Porras G, Esquivel M, Vega-Baudrit J, Sibaja M, Tamborero S, Vicent M. Conjugados poliméricos y su utilización como Nanomedicinas anticancerígenas. *Rev. Iberoamer. Polim.*, 2007; 8 (5): 374-390.
64. Maeda H, Seymour L, Miyamoto Y. Conjugates of Anticancer Agents and Polymers: Advantages of Macromolecular Therapeutics in Vivo. *Bioconjugate Chem.* 1992; 3 (5): 351-362.
65. Malhotra M, Kulamarva A, Sebak S, Paul A, Bhatena J, Mirzaei M, Prakash S. Ultrafine chitosan nanoparticles as an efficient nucleic acid delivery system targeting neuronal cells. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2009; 35 (6): 719–726.
66. McLeod A, Friend D, Tozer T. Synthesis and Chemical Stability of glucocorticoid-dextran ester: potencial prodrugs for colon-specific delivery. *Int. J. Pharm.* 1993; 92 (1-2): 105-114.
67. Mehvar R. Simultaneous analysis of dextran-methylprednisolone succinate, methylprednisolone succinate, and methylprednisolone by size-exclusion chromatography. *J. Pharm. Biomed. Ana.* 1999; 19 (5): 785–792.
68. Mehvar R. Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *J. Control. Rel.* 2000; 69 (1): 1–25.
69. Mitra S, Maitra A. Nanoparticulate carriers in drug delivery and targeting. *Proc. Indian Natn. Sci. Acad.* 2002; 4 (1): 349-360.
70. Mohammadpourounghi N, Behfar A, Ezabadi A, Zolfagharian H, Heydari M. Preparation of chitosan nanoparticles containing Naja naja oxiana snake venom. *Nanomed-nanotechnol-Biol-Med.* 2010; 6 (1): 137–143.
71. Mohanraj V, Chen Y. Nanoparticles – A Review. *Trop. J. Pharm. Research.* 2006; 5 (1): 561-573.
72. Nakhilband A, Barar J. Impacts of Nanomedicines in Ocular Pharmacotherapy. *BiolImpacts.* 2011; 1 (1): 7-22.

73. Ogura Y. Drug delivery to the posterior segments of the eye. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 52 (1): 1–3.
74. Pan Y, Li Y, Zhao H, Zheng J, Xu H, Wei G, Hao J, Cui F. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int. J. Pharm.* 2002; 249 (1-2): 139–147.
75. Pang Y, Zhang Y, Zhang Z. Synthesis of an enzyme-dependent prodrug and evaluation of its potential for colon targeting. *World J. Gastroenterol.* 2002; 8 (5): 913-917.
76. Paolicelli P, De la Fuente M, Sánchez A, Seijo B, Alonso M. Chitosan nanoparticles for drug delivery to the eye. *Expert. Opin. Drug Deliv.* 2009; 6 (3): 239-253.
77. Patel G. Development of nanocomposite corticosteroid particles for use in asthma. Trabajo presentado para optar al título de PhD en la Universidad de Florida, USA. 2010.
78. Peer D, Karp J; Langer R. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. *Nat. Nano.* 2007, 2 (12): 751-760.
79. Prow T, Bhutto I, Kim S, Grebe R, Merges C, McLeod A, Uno K; Mennon M, Rodriguez L, Leong K, Luty G. Ocular nanoparticle toxicity and transfection of the retina and retinal pigment epithelium. *Nanomed-nanotechnol-Biol-Med.* 2008; 4 (4): 340-349.
80. Qi J, Yao P, He F, Yu C, Huang C. Nanoparticles with dextran/chitosan shell and BSA/chitosan core—Doxorubicin loading and delivery. *Int. J. Pharm.* 2010; 393 (1-2): 177-185.
81. Quattrocchi O, Andrizzi S, Laba R. Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica, Buenos Aires Argentina: Artes gráficas Farro; 1992.
82. Quintana A, Medina O, De Nobrega J, De Abreu L, Jaimes L. Determinación de residuos de tetraciclinas: 11 oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina en tejido muscular de porcino mediante cromatografía líquida de alta resolución. *Rev. Fac. Farm. UCV.* 2009; 72 (1): 11-22
83. Redell M, Yang D, Lee V. The role of esterase activity in the ocular disposition of Dipivalyl Epinephrine in rabbits. *Int J. Pharm* 1983; 17 (2-3): 299–312.
84. Ringsdorf H. Structure and Properties of Pharmacologically Active Polymers. *J. Polym. Symp.* 1975, 51 (1): 135-153.

85. Roco M. The long view of nanotechnology development: the National Initiative at 10 years. *J. Nanopart. Res.* 2011; 13 (2); 427–445.
86. Salvat S.A, editores. *Diccionario terminológico de ciencias médicas.* 12ª ed. Barcelona, Esp. 1990.
87. Sasaki H, Yamamura K, Nishida K. Delivery drugs of the eye by topical application. *Prog. Retinal Eye Res.* 1996; 15 (2): 583-620.
88. Schacht E, Vandoorne F, Vermeersch J, Duncan, R. Polysaccharides as drug carriers. In: P. Lee and W. Good (Eds.), *Controlled Release Technology*, American Chemical Society, Washington D.C.; 1987. p. 188-200.
89. Schoenwald R. Ocular drug delivery: pharmacokinetic considerations. *Clin. Pharmacokinet.* 1990; 18 (4): 255-269.
90. Shu X, Zhu K. A novel approach to prepare tripolyphosphate:chitosan complex beads for controlled release drug delivery *Int. J. Pharm.* 2000; 201 (1): 51-58.
91. Siebein K.N. Transmission Electron Microscopy at the Major Analytical Instrumentation Center. *Microsc. Microanal.* 2007; 13 (S02): 1708-1709.
92. Stella V, Borchardt R, Hageman M, Oliyai R, Maag H, Tilley J, editor. *Prodrugs: Challenges and Rewards. Parte 1.* de la American Association of Pharmaceutical Scientists. NY: Springer; 2007.
93. Strickley R, Oliyai R. Formulation Challenges of Prodrugs. En V.J. Stella, R.T. Borchardt, M.J. Hageman, R. Oliyai, H. Maag, J.W. Tilley editors. *Volume V: Prodrugs: Challenges and Rewards, Partes 1 y 2.* de la American Association of Pharmaceutical Scientists. NY: Springer; 2007.
94. Tang Z, Qian J, Shi L. Characterizations of immobilized neutral proteinase on chitosan nano-particles. *Proc. Biochem.* 2006; 41 (5): 1193–1197.
95. Tang Z, Qian J, Shi L. Preparation of Chitosan Nanoparticles as Carrier for Immobilized Enzyme. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2007; 136 (1): 77-95.
96. Timmermans J, Zhao Y, Van den Hoven J. Ethics and Nanopharmacy: Value Sensitive Design of New Drugs. *Nanoethics.* 2011; 5 (3): 269–283.
97. ua.es, 2011. [en línea]. [consultado 2010 diciembre 20]; disponible en: http://www.ua.es/es/investigacion/sti/servicios/analisis_instrumental/microscopia/tem.html
98. Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* 2006; 58 (11): 1131–1135.

99. Vandenberg G, Drolet C, Scott S, Noüe J. Factors affecting protein release from alginate-chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/intestinal simulation. *J. Control. Release.* 2001; 77 (3): 297–307.
100. Varshosaz J, Emamia J, Tavakoli N, Fassihi A, Minaiyana M, Ahmadi F, Dorkoosh F. Synthesis and evaluation of dextran–budesonide conjugates as colon specific prodrugs for treatment of ulcerative colitis. *Int. J. Pharm.* 2009; 365 (1-2): 69–76.
101. Varshosaz J, Emami J, Ahmadi F, Tavakoli N, Minaiyan M, Fassihi A, Mahzouni P, Dorkoosh F. Preparation of budesonide–dextran conjugates using glutarate spacer as a colon-targeted drug delivery system: in vitro/in vivo evaluation in induced ulcerative colitis. *J. Drug Target.* 2011; 19 (2): 140–153.
102. Vicent M. Polymer-Drug Conjugates as Modulators of Cellular Apoptosis. *The AAPS J.* 2007; 9 (2): E200-E2007. Article 22 (<http://www.aapsj.org>).
103. Vivek K, Karar P, Ramesh S, Misra S, Gupta S. Nanoparticle Formulation for Hydrophilic & Hydrophobic Drugs *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 2010; 1 (2): 163-169.
104. Wu Y, Yang W, Wang C, Hu J, Fu S. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *Int. J. Pharm.* 2005; 295 (1-2): 235-245.
105. Won C, Chu C. Dextran-estrone conjugate: synthesis and in vitro release study. *Carbohydr. Polym.* 1998; 36 (4): 327–334.
106. Xu Y, Du Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2003; 250 (1): 215-226.
107. Xu Y, Hanna M. Electrospayed bovine serum albumin-loaded tripolyphosphate cross-linked chitosan capsules: Synthesis and characterization. *J. Microencap.* 2007; 24 (2): 143–151.
108. Yang H, Hon M. The effect of the molecular weight of chitosan nanoparticles and its application on drug delivery. *Microchem. J.* 2009; 92 (1): 87-91.
109. Yang H, Wang R, Gu Q, Zhang X. Feasibility study of chitosan as intravitreal tamponade material. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2008; 246 (8): 1097–1105.
110. Yasukawa T, Ogura Y, Sakurai E, Tabata Y, Kimura H. Intraocular sustained drug delivery using implantable polymeric devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005; 57 (14): 2033–2046.

111. Zhang H, Alsarra I, Neau S. An in vitro evaluation of a chitosan-containing multiparticulate system for macromolecule delivery to the colon. *Int. J. Pharm.* 2002; 239 (1-2): 197–205.
112. Zou M, Okamoto H, Cheng G, Hao X, Sun J, Cui F, Danjo K. Synthesis and properties of polysaccharide prodrugs of 5-aminosalicylic acid as potential colon-specific delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005; 59 (1): 155–160.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Ácido pivalico: ácido carboxílico de nomenclatura IUPAC: ácido 2,2-dimetilpropanoico.

Biodisponibilidad: es un término Farmacocinético que determina la cantidad relativa y la velocidad con que un fármaco, administrado bajo una forma farmacéutica, alcanza sin cambios la circulación sistémica, y por lo tanto está disponible para realizar su efecto terapéutico.

Biofarmacia: Ciencia que estudia la influencia de la formulación y la técnica de elaboración de un medicamento sobre su actividad terapéutica.

Cámara anterior: Es el espacio dentro de la estructura ocular comprendido entre la córnea y el iris/cristalino que está cubierto por el humor acuoso.

Cámara posterior: Es el espacio comprendido entre el iris y el cristalino que se encuentra bañado de humor acuoso.

Catarata: Opacidad parcial o total del cristalino.

Célula blanco o Diana: del inglés Target. Son células con receptores específicos donde del fármaco va a hacer su efecto.

Clearance o depuración: Es la depuración o eliminación de un fármaco por unidad de tiempo, generalmente constante dentro de las concentraciones terapéuticas.

Conjugado: Es un nanofármaco formado por un enlace covalente fisiológicamente lábil entre el fármaco y la cadena principal de una macromolécula.

Cromatografía en fase reversa: Es un tipo de cromatografía que permite separar moléculas en base a su polaridad. Consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada.

Degeneración macular: Es una lesión progresiva de la mácula.

Diálisis: Es un proceso de purificación que elimina iones y micromoléculas del medio de dispersión por medio de una membrana semipermeable.

Edema macular: inflamación de la mácula del ojo.

Endoftalmitis: La endoftalmitis es un proceso inflamatorio que afecta a las estructuras oculares internas. En sentido estricto, cualquier inflamación intraocular es una endoftalmitis.

Enfermedades vítreo-retiniana: son aquellas patologías que afectan la retina y el vítreo.

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear: Es una técnica que se emplea para determinar la estructura de los compuestos orgánicos. Se emplea sólo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos) como el ^1H y ^{13}C entre otros.

Esterasa: Enzima hidrolítica del grupo de las hidrolasas, que catalizan la ruptura y formación de los enlaces éster.

Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés Vascular Endothelial Growth): Es una proteína señalizadora que está implicada en la angiogénesis (crecimiento de vasos sanguíneos provenientes de vasos preexistentes). También actúa como vasodilatador e incrementa la permeabilidad vascular.

Farmacocinética: Ciencia que explica la permanencia del fármaco en el organismo, cuantificando todos los procesos que se producen. Estudia los procesos mediante los cuales un fármaco puede ser asimilado por el organismo. En término simplista, es lo que el organismo hace sobre el fármaco (Dosis-Concentración).

Farmacodinámica: Estudia la relación entre la concentración del fármaco y sus efectos bioquímicos y fisiológicos, así como los mecanismos por los cuales se producen estos efectos. Tiene que ver con los efectos del fármaco en el organismo. En término simplista, es lo que el fármaco hace sobre el organismo (Concentración -Efecto).

Fase móvil: es un fluido que es capaz de arrastrar la muestra a través de la columna cromatográfica y separar los componentes de la misma.

Gelificación iónica: Es la técnica que emplea la formación de partículas poliméricas usando un agente iónico de entrecruzamiento.

Glucopiranososa: Es el término que se le da a la glucosa que tiene en su estructura un anillo de seis átomos compuestos por cinco carbonos y uno de oxígeno.

Humor vítreo: Es un líquido gelatinoso y transparente que ocupa el espacio comprendido entre la superficie interna de la retina y la cara posterior del cristalino. El 99% de su composición es agua; el resto son iones, colágeno ácido hialurónico y proteínas.

Imino: Es un grupo funcional o compuesto orgánico con estructura general $>C=NR'$.

Liberación controlada: Sistema que trata de conseguir la cantidad correcta del agente activo, en el momento adecuado y en el lugar preciso. Se emplea para prolongar el tiempo que la dosis terapéutica está presente de forma efectiva utilizando una única dosis, y para eliminar o reducir los efectos secundarios.

Liofilización: Proceso en el cual una dispersión líquida es sometida a congelación y posteriormente es introducida en una cámara de vacío para separar el contenido de agua mediante el proceso de sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso, sin pasar por el estado líquido.

Liposomas: Son vesículas esféricas compuestas de de doble capa de fosfolípidos y consta de dos partes: una hidrosoluble y otra liposoluble.

M Bar: Unidad de presión que expresa directamente la fuerza ejercida por la atmosfera igual a 1000 Din/cm^2 o 100 pascales.

Mácula: Zona de la retina responsable de la visión central y detallada. Se encuentra en el centro de la retina.

MHz: Megahertzios. Un millón de hertzios (Hz). Es una unidad de frecuencia del Sistema Internacional de Unidades. Un hercio representa un ciclo por cada segundo, entendiéndose ciclo como la repetición de un suceso es decir, a la medición de la cantidad de veces por un segundo que se repite una onda.

Microesferas: Es un sistema de liberación formado por pequeñas partículas con diámetros en el rango de los micrómetros ($1\mu\text{m}$ - $1000 \mu\text{m}$). En algunos casos se les denominan micropartículas.

Micrografías: Es la imagen fotográfica obtenida de objetos que no se observa a simple vista. Su observación se logra mediante la ayuda de instrumentos ópticos o electrónicos como el microscopio.

Micropartículas: ver microesferas.

Microscopía: Evaluación mediante el empleo del microscopio. La MEB como la MTE, son unos de los mejores métodos para estudiar la morfología de las formas farmacéuticas sólidas.

Muestreador en cascada de Andersen: Es un impactador en cascada que capta las partículas en una serie de placas. En general, este impactador tiene varios niveles de captación, cada nivel está separado del siguiente por orificios de diferentes diámetros, debajo de cada uno de ellos se coloca la placa recolectora.

Nanocápsulas: Son sistemas nanoparticulados en los cuales los fármacos se encuentran confinados en una cavidad rodeada por una única membrana polimérica, donde el fármaco puede estar disuelto y/o adsorbido en el núcleo y/o superficie de la interface.

Nanoesferas: Son estructuras matriciales sólidas de tamaño nanométrico, en los cuales el fármaco está física y uniformemente dispersado dentro de la matriz y/o adsorbido en la superficie.

Nanopartículas: Sistemas de liberación formado por partículas coloidales de tamaño submicrométrico (menores a $1\mu\text{m}$).

Neovascularización coroidea: Formación de vasos anormales desde la coroides hacia el espacio subretiniano.

Niosomas: es un sistema de liberación de pequeño tamaño en el cual el fármaco se encuentra encapsulado en la vesícula. Esta vesícula está compuesta por una doble capa de surfactante no-iónico.

Peptidasa: Enzima que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas.

Periocular: Zona alrededor del ojo.

Poliplejos: son *complejos* formados por un ácido nucleico (plásmido u oligonucleótido) y un polímero de carga neta positiva.

Potencial ζ : El potencial Zeta o electrocinético es la diferencia de potencial entre los iones del medio de dispersión y los iones de la capa estacionaria de fluido que se encuentra alrededor de la partícula dispersada.

Profármaco: es la derivatización química del fármaco con la finalidad de mejorar una serie de propiedades tales como la biodisponibilidad, especificidad, estabilidad química, problemas de formulación, propiedades organolépticas, entre otras, y con la posterior reconversión a la estructura original conservando su actividad terapéutica deseable, como resultado del metabolismo del fármaco.

Retinitis pigmentaria: Es la degeneraciones progresivas de carácter hereditario que de manera difusa, afectan primariamente a la función de las células fotorreceptoras (conos y bastones) y al epitelio pigmentario de la retina.

Retinopatía diabética: Es una complicación ocular de la diabetes; se origina por el deterioro de los vasos sanguíneos que irrigan la retina.

Secado por atomización: es el proceso de secado de dispersiones líquidas mediante su aspersion en una cámara de aire caliente.

Segmento posterior: llamado bulbo ocular, es la región del ojo que comprende la esclerótica, coroides, retina, cuerpo vítreo y nervio óptico.

Sistemas de liberación: Son dispositivos que aportan mejores pautas posológicas, mejor perfil farmacocinético e incluso reducción de efectos adversos.

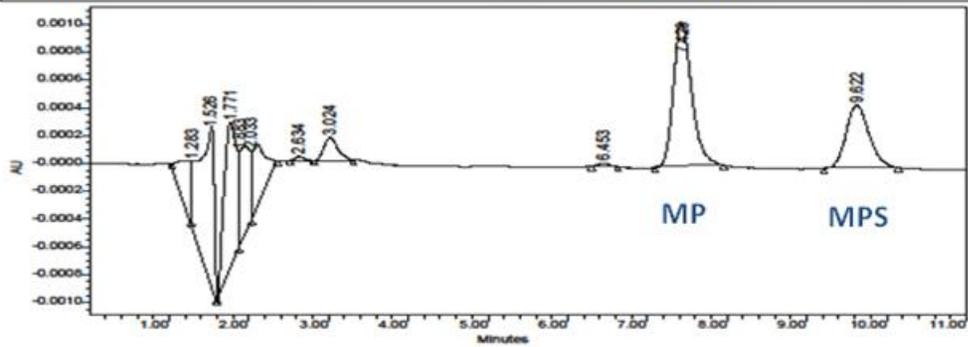
Vitreorretinopatía proliferativa: Se le denomina a la formación de cicatriz en los tejidos oculares: vítreo y retina, donde las células proliferan de forma anormal.

Anexos

Anexo 1

University of Florida
 Project Name: TAC
 Reported by User: Wouter

| SAMPLE INFORMATION | | | |
|--------------------|------------------|------------------|------------------------------|
| Sample Name: | MP-MPH 0.2 ug/mL | Acquired By: | Wouter |
| Sample Type: | Standard | Date Acquired: | 9/16/2009 11:02:01 AM |
| Vial: | 3 | Acq. Method: | mpred |
| Injection #: | 1 | Date Processed: | 9/16/2009 3:51:28 PM |
| Injection Volume: | 50.00 ul | Channel Name: | 2487Channel 1 |
| Run Time: | 11.00 Minutes | Sample Set Name: | MP_MPH Quality control w DEX |



| | RT (min) | Area (V*sec) | % Area | Height (V) | % Height |
|----|----------|--------------|--------|------------|----------|
| 1 | 1.283 | 3454 | 5.08 | 449 | 8.03 |
| 2 | 1.526 | 13500 | 19.87 | 1149 | 20.55 |
| 3 | 1.771 | 11960 | 17.60 | 1062 | 18.99 |
| 4 | 1.883 | 5645 | 8.31 | 704 | 12.59 |
| 5 | 2.033 | 5342 | 7.86 | 510 | 9.12 |
| 6 | 2.634 | 220 | 0.32 | 30 | 0.54 |
| 7 | 3.024 | 1982 | 2.92 | 167 | 2.99 |
| 8 | 6.453 | 222 | 0.33 | 21 | 0.38 |
| 9 | 7.428 | 16571 | 24.39 | 1046 | 18.71 |
| 10 | 9.622 | 9057 | 13.33 | 454 | 8.12 |

Report Method: Untitled

Printed 12:29:17 PM 1/4/2010

Page: 1 of 1

Cromatograma de la mezcla de patrones MP y MPS, concentraciones 0,2 µg/mL, tr_{MP} = 7,428 y tr_{MPS}=9,622

Anexo 2-5

Espectros de Resonancia Magnética nuclear de protones (RMN ^1H) para el
MPS

Anexo 2

T-37C (set 40C), 5 mm TXI CryoProbe, Bruker Avance II 600 Console, Magrex 14.1 T/54 mm AS Magnet
 Advanced Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy, McKnight Brain Institute, University of Florida
 Jim Rocca, MRIS

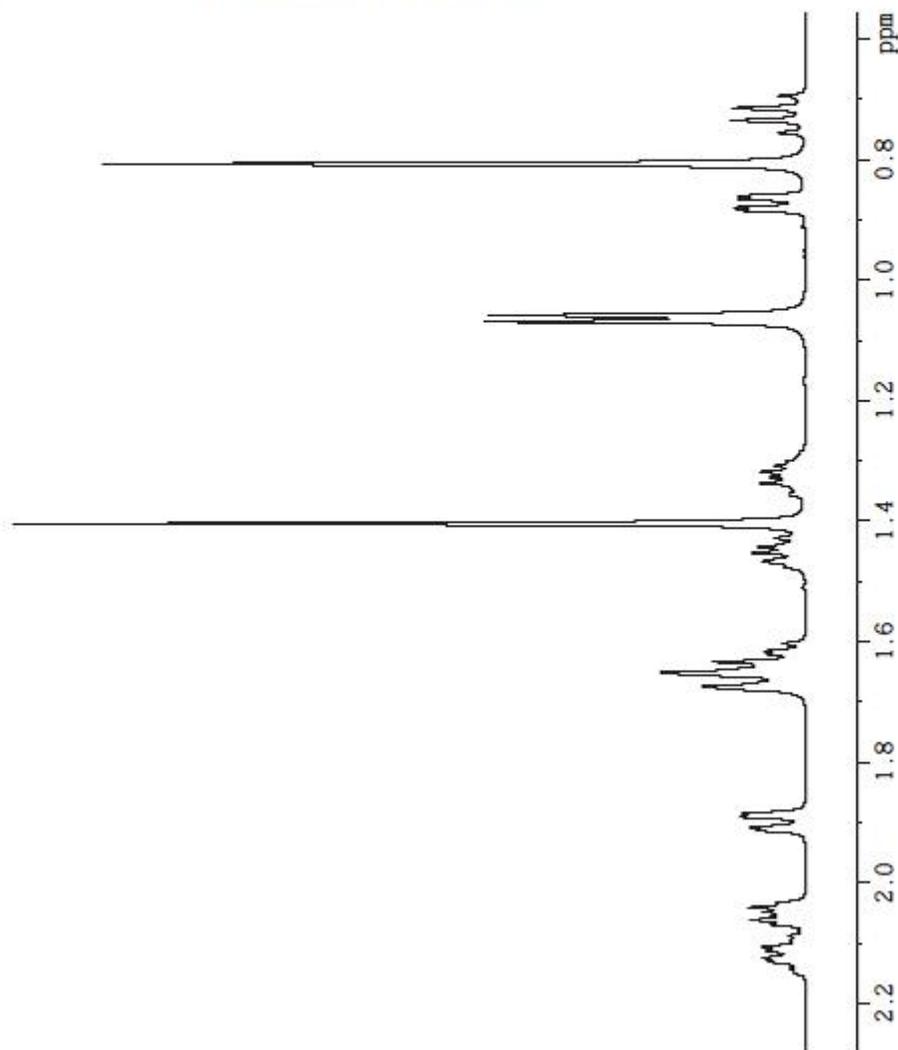
```

Current Data Parameter
NAME      Gf_LAG_Parpl
EXPNO     1
PROCNO    1

F2 ? Acquisition Parameter
Date_     20091029
Time      2.07
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm CPTXI 1H/
PULPROG   zgpg30
TD         32768
SOLVENT   DMSO
NS         4
DS         1
SWH        9615.365 Hz
FIDRES     0.293438 Hz
AQ         1.7039860 sec
RG         8
DW         52.000 usec
DE         6.00 usec
TE         313.2
D1         3.0000000 sec
TD0        1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1      1H
P1        5.00 usec
PL1       3.00 dB
PL1W      7.3812421
SFO1      600.2339015 MHz

F2 ? Processing parameters
SI        32768
SF        600.2330000 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.60 Hz
GB        0
PC        1.00
  
```



Anexo 3

T-37C (set 40C), 5 mm TXI CryoProbe, Bruker Avance II 600 Console, Magrex 14.1 T/54 mm AS Magnet
 Advanced Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy, McKnight Brain Institute, University of Florida
 Jim Rocca, MRS

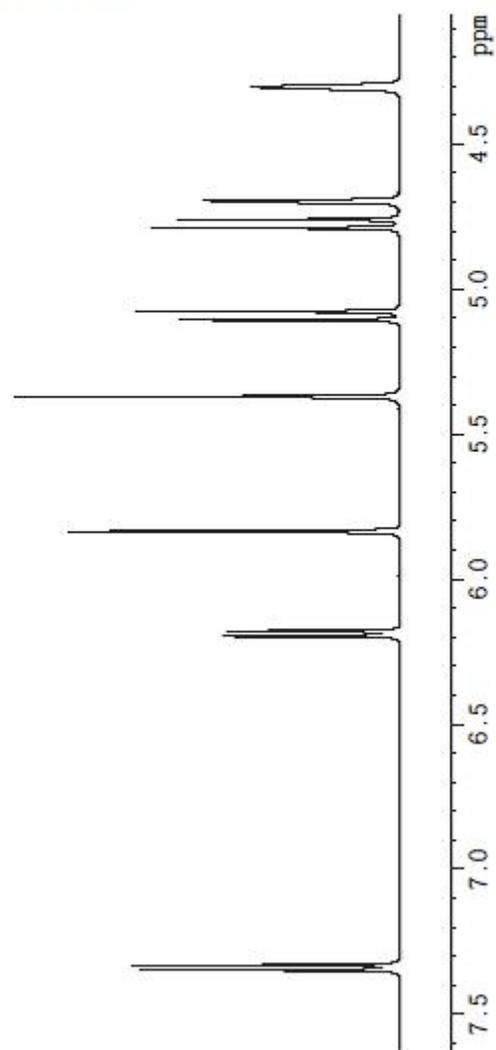
```

Current Data Parameter
NAME      Gf_LAG_Parpl
EXPNO     1
PROCNO    1

F2 ? Acquisition Parameter
Date_     20091029
Time      2.07
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm CPTXI 1H/
PULPROG   zgpg30
TD         32768
SOLVENT   DMSO
NS         4
DS         1
SWH        9615.365 Hz
FIDRES     0.293438 Hz
AQ         1.7039860 sec
RG         8
DW         52.000 usec
DE         6.00 usec
TE         313.2
D1         3.0000000 sec
TD0        1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1       1H
P1         5.00 usec
PL1        3.00 dB
PL1W       7.3812421
SFO1       600.2339015 MHz

F2 ? Processing parameters
SI         32768
SF         600.2330000 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.60 Hz
GB         0
PC         1.00
    
```



Anexo 4

T-37C (set 40C), 5 mm TXI CryoProbe, Bruker Avance II 600 Console, Magrex 14.1 T/54 mm AS Magnet
 Advanced Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy, McKnight Brain Institute, University of Florida
 Jim Rocca, MRS

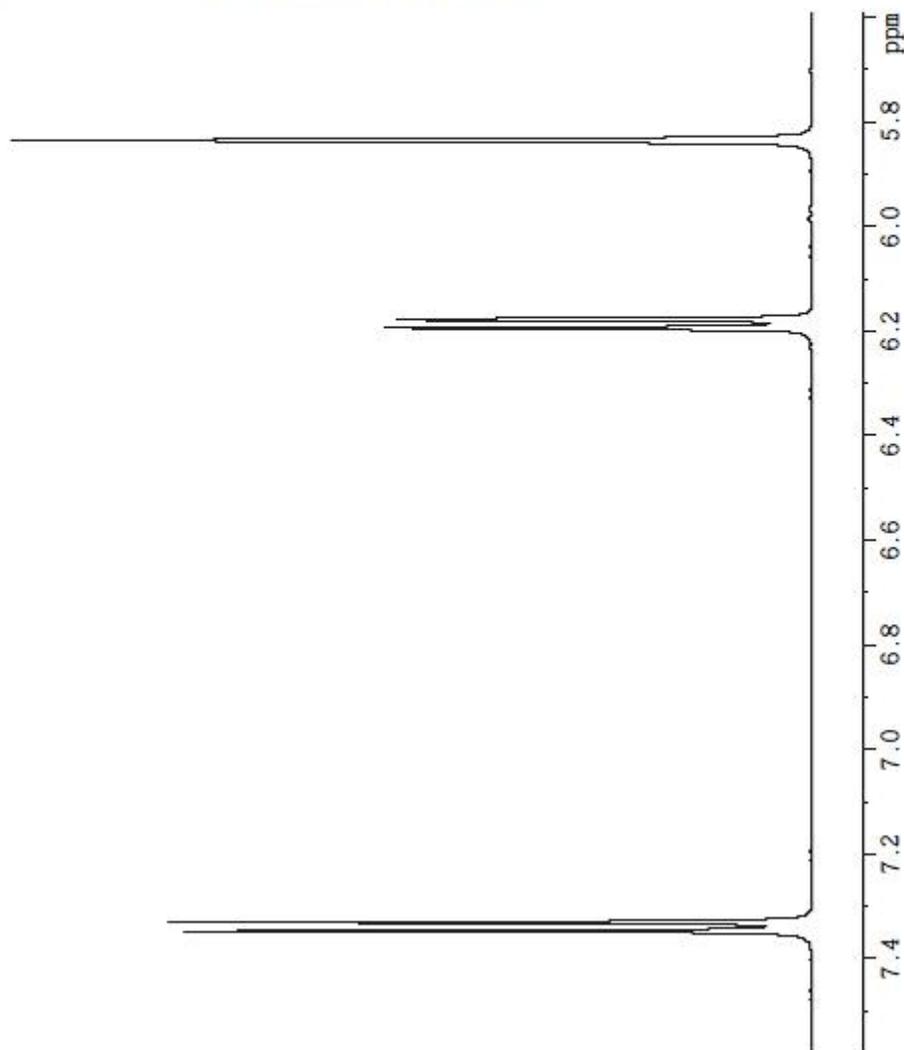
```

Current Data Parameter
NAME      Gf_LAG_Parpl
EXPNO     1
PROCNO    1

F2 ? Acquisition Parameter
Date_     20091029
Time      2.07
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm CPTXI 1H/
PULPROG   zgpg30
TD         32768
SOLVENT   DMSO
NS         4
DS         1
SWH        9615.365 Hz
FIDRES     0.293438 Hz
AQ         1.7039860 sec
RG         8
DW         52.000 usec
DE         6.00 usec
TE         313.2
D1         3.0000000 sec
TD0        1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1       1H
P1         5.00 usec
PL1        3.00 dB
PL1W       7.3912421
SFO1       600.2339015 MHz

F2 ? Processing parameters
SI         32768
SF         600.2330000 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.60 Hz
GB         0
PC         1.00
  
```



Anexo 5

T-37C (set 40C), 5 mm TXI CryoProbe, Bruker Avance II 600 Console, Magrex 14.1 T/54 mm AS Magnet
 Advanced Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy, McKnight Brain Institute, University of Florida
 Jim Rocca, MRS

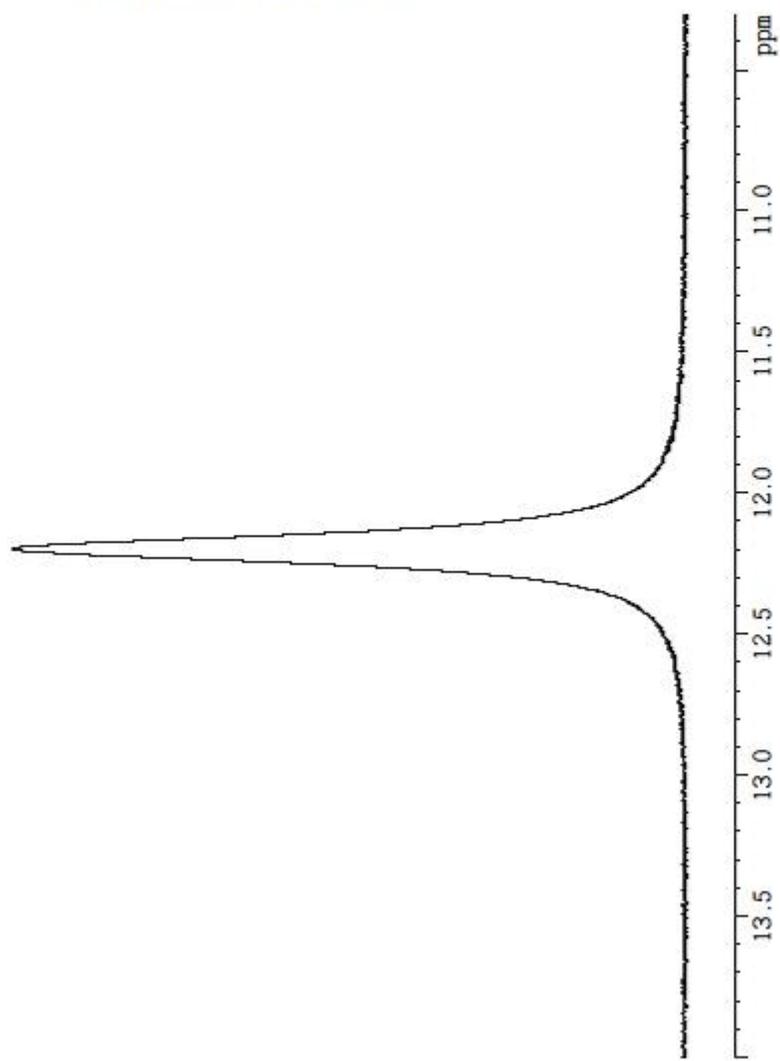
```

Current Data Parameter
NAME      Gf_LAG_Parpl
EXPNO     1
PROCNO    1

F2 ? Acquisition Parameter
Date_     20091029
Time      2.07
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm CPTXI 1H/
PULPROG   zgpg30
TD         32768
SOLVENT    DMSO
NS         4
DS         1
SWH        9615.365 Hz
FIDRES     0.293438 Hz
AQ         1.7039860 sec
RG         8
DW         52.000 usec
DE         6.00 usec
TE         313.2
D1         3.0000000 sec
TD0        1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1       1H
P1         5.00 usec
PL1        3.00 dB
PL1W       7.3812421
SFO1       600.2339015 MHz

F2 ? Processing parameters
SI         32768
SF         600.2330000 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.60 Hz
GB         0
PC         1.00
  
```



Anexo 6

Espectro de Resonancia Magnética nuclear de protones (RMN ^1H) para el Dex

Anexo 6

T-37C (set 40C), 5 mm TXI CryoProbe, Bruker Avance II 600 Console, Magnex 14.1 T/54 mm AS Magnet
 Advanced Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy, McKnight Brain Institute, University of Florida
 Jim Rocca, MRS

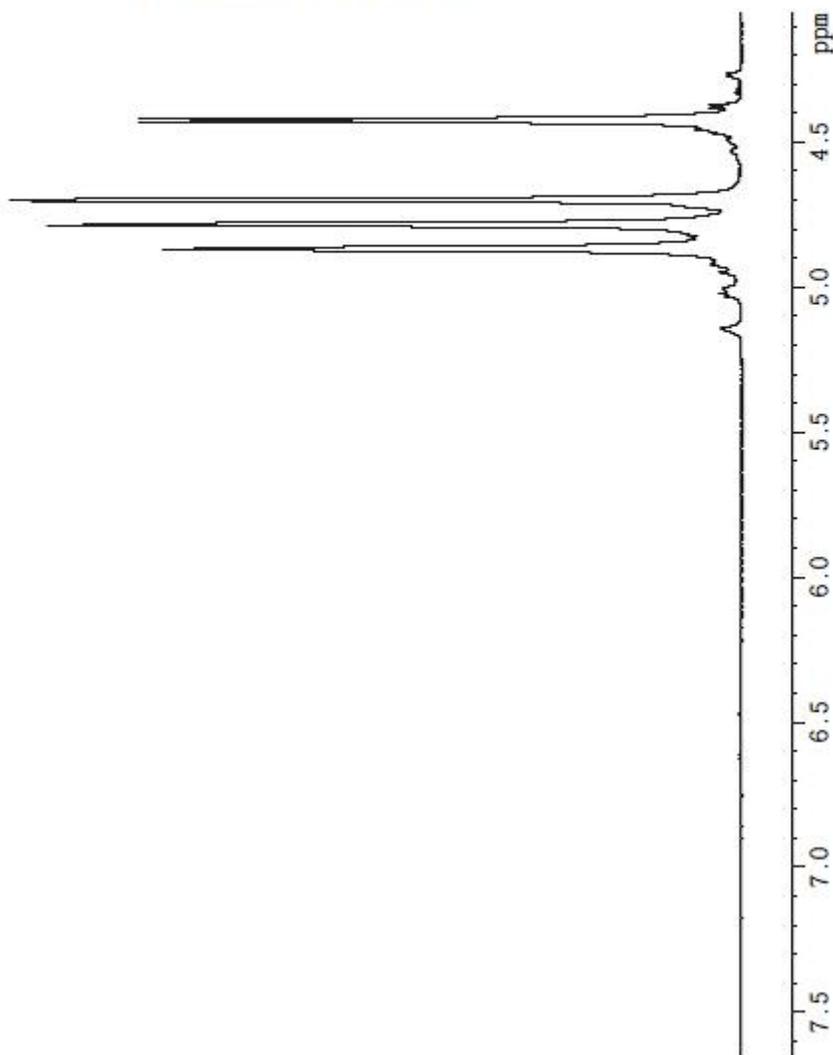
```

Current Data Parameter
NAME          Gil_LAG_Green
EXPNO         1
PROCNO        1

F2 ? Acquisition Parameter
Date_         20091028
Time         20.56
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm CPTXI 1H/
PULPROG       zgpg30
TD            32768
SOLVENT       DMSO
NS            4
DS            1
SWH           9615.385 Hz
FIDRES        0.293438 Hz
AQ            1.7039860 sec
RG            8
DE            52.000 usec
TE            313.2
D1            3.0000000 sec
TD0           1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1          1H
P1            5.00 usec
PL1           3.00 dB
PL1W         7.3812421
SFO1          600.2339015 MHz

F2 ? Processing parameters
SI            32768
SF            600.2500000 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            0.60 Hz
GB            0
PC            1.00
    
```



Anexo 7-9

Espectros de Resonancia Magnética nuclear de protones (RMN ^1H)
para el MPS-Dex

Anexo 7

T-37C (set 40C), 5 mm TXI CryoProbe, Bruker Avance II 600 Console, Magrex 14.1 T/54 mm AS Magnet
 Advanced Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy, McKnight Brain Institute, University of Florida
 Jim Rocca, MRIS

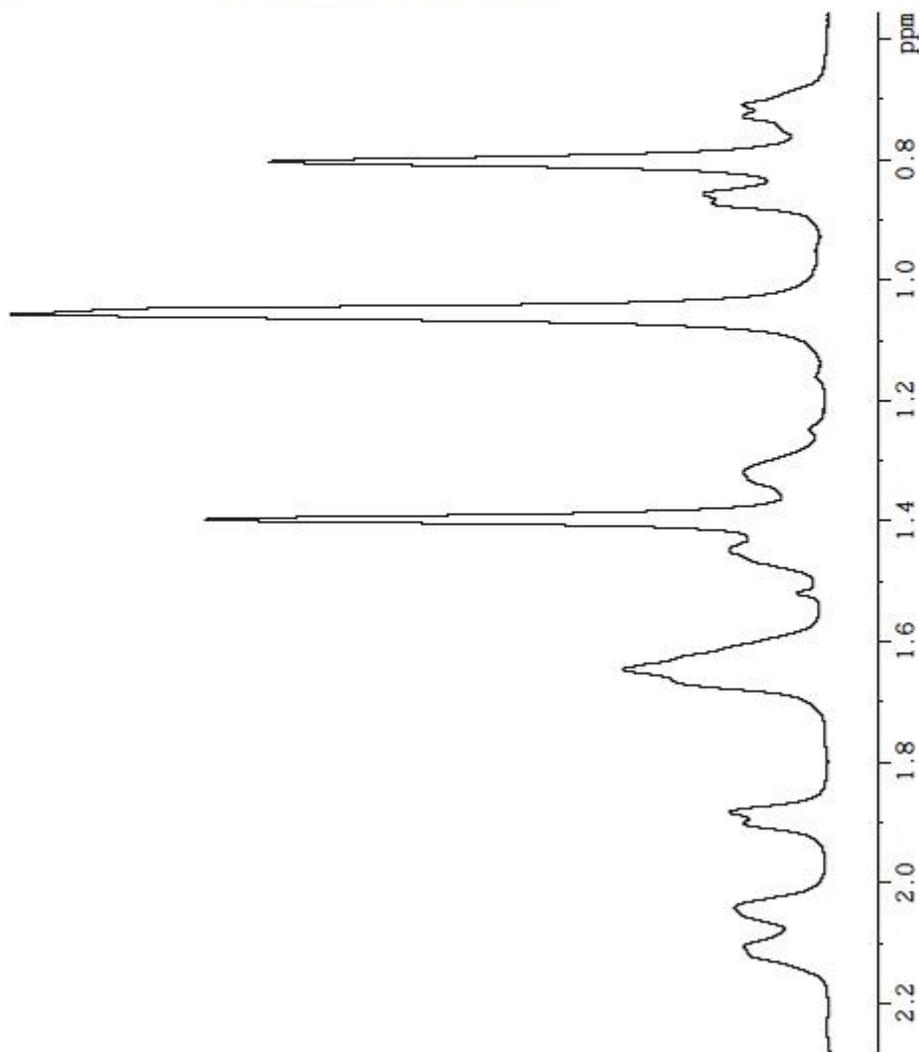
```

Current Data Parameter
NAME          GILLAG_Blue
EXPNO        37
PROCNO       1

F2 ? Acquisition Parameter
Date_        20091028
Time        14.14
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm CPTXI 1H/
PULPROG      zgpg30
TD           32768
SOLVENT      DMSO
NS           4
DS           1
SWH          9615.365 Hz
FIDRES       0.293438 Hz
AQ           1.7039860 sec
RG           8
DWD          52.000 usec
DE           6.00 usec
TE           313.2
D1           3.0000000 sec
TD0          1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1         1H
P1           5.00 usec
PL1          3.00 dB
PL1W         7.3812421
SFO1         600.2339015 MHz

F2 ? Processing parameters
SI           32768
SF           600.2330000 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           0.60 Hz
GB           0
PC           1.00
  
```



Anexo 8

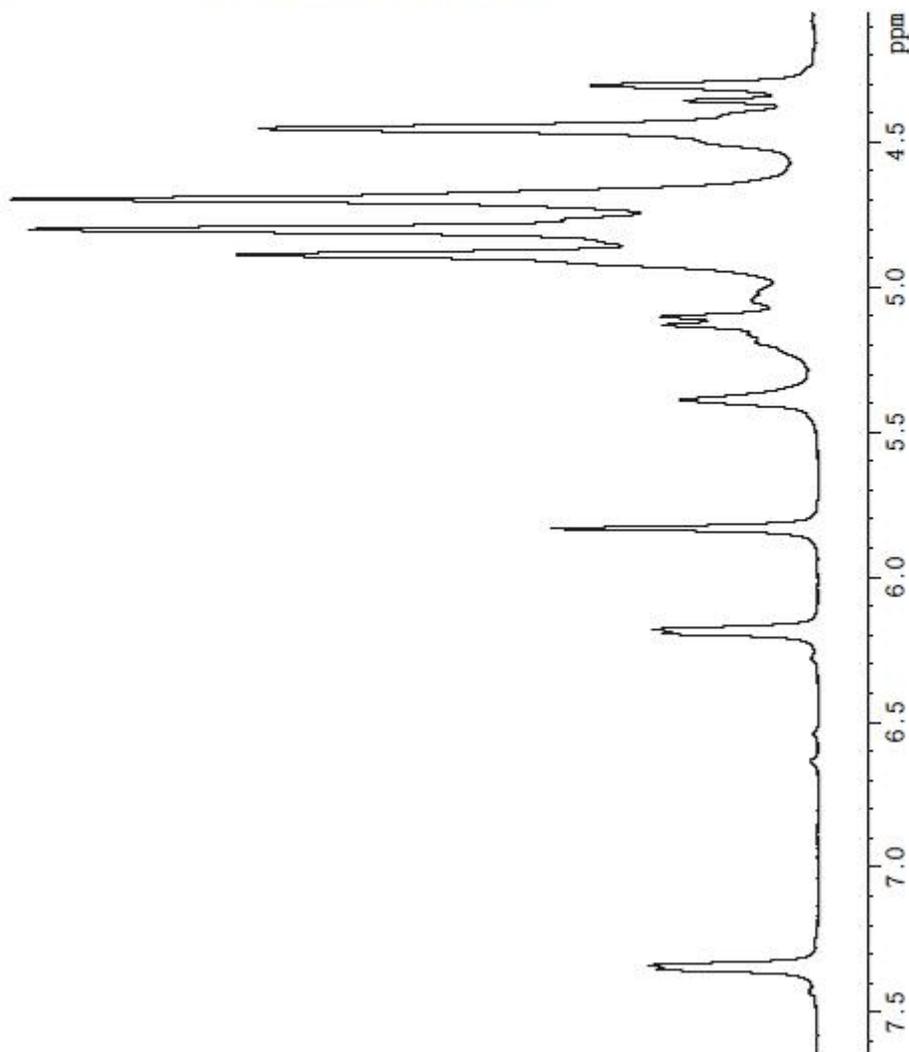
T-37C (set 40C), 5 mm TXI CryoProbe, Bruker Avance II 600 Console, Magrex 14.1 T/54 mm AS Magnet
 Advanced Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy, McKnight Brain Institute, University of Florida
 Jim Rocca, MRS

Current Data Parameter
 NAME GILLAG_Blue
 EXPNO 37
 PROCNO 1

F2 ? Acquisition Parameter
 Date_ 20091028
 Time 14.14
 INSTRUM spect
 PR/BD 5 mm CPTXI 1H/
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT DMSO
 NS 4
 DS 1
 SWH 9615.365 Hz
 FIDRES 0.293438 Hz
 AQ 1.7039860 sec
 RG 8
 DW 52.000 usec
 DE 6.00 usec
 TE 313.2
 D1 3.0000000 sec
 TDO 1

CHANNEL f1
 NUC1 1H
 P1 5.00 usec
 PL1 3.00 dB
 PL1W 7.3812421
 SFO1 600.2339015 MHz

F2 ? Processing parameters
 SI 32768
 SF 600.2330000 MHz
 WTW EM
 SSB 0
 LB 0.60 Hz
 GB 0
 PC 1.00



Anexo 9

T-37C (set 40C), 5 mm TXI CryoProbe, Bruker Avance II 600 Console, Magrex 14.1 T/54 mm AS Magnet
 Advanced Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy, McKnight Brain Institute, University of Florida
 Jim Rocca, MRIS

```

Current Data Parameter
NAME          GILLAG_Blue
EXPNO         1
PROCNO        1

F2 ? Acquisition Parameter
Date_         20091028
Time         14.14
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm CPTXI 1H/
PULPROG       zgpg30
TD            32768
SOLVENT       DMSO
NS            4
DS            1
SWH           9615.365 Hz
FIDRES       0.293438 Hz
AQ           1.7039860 sec
RG           8
DWB          52.000 usec
DE           6.00 usec
TE           313.2
D1           3.0000000 sec
TD0          1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1          1H
P1            5.00 usec
PL1           3.00 dB
PL1W         7.3812421
SFO1         600.2339015 MHz

F2 ? Processing parameters
SI           32768
SF           600.2330000 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           0.60 Hz
GB           0
PC           1.00
  
```



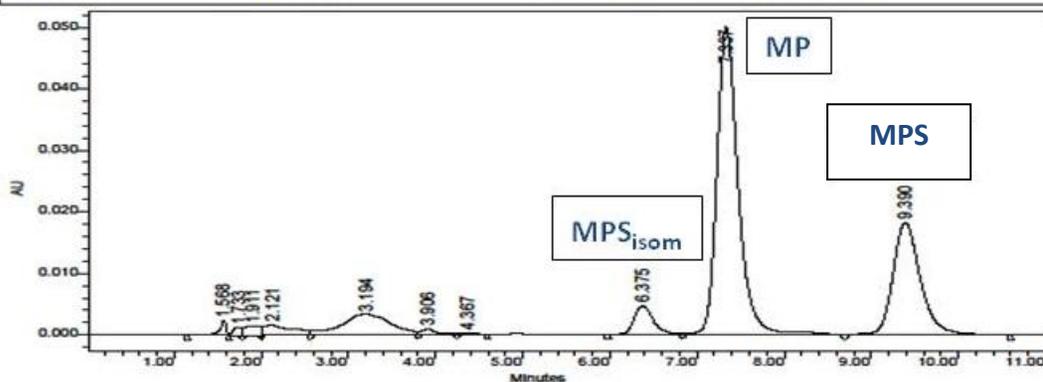
Anexo 10

University of Florida

Project Name: TAC
Reported by User: Wouter

Breeze

| SAMPLE INFORMATION | | | |
|--------------------|-------------------------|------------------|------------------------|
| Sample Name: | Hydro PBS 10-12 (2) 48h | Acquired By: | Wouter |
| Sample Type: | Unknown | Date Acquired: | 12/15/2009 4:51:09 PM |
| Vial: | 25 | Acq. Method: | mpred |
| Injection #: | 1 | Date Processed: | 12/16/2009 12:04:01 PM |
| Injection Volume: | 50.00 ul | Channel Name: | 2487Channel 1 |
| Run Time: | 11.00 Minutes | Sample Set Name: | Hydro D_MPH PBS |



| | RT (min) | Area (V*sec) | % Area | Height (V) | % Height |
|----|----------|--------------|--------|------------|----------|
| 1 | 1.568 | 11819 | 0.78 | 2351 | 2.80 |
| 2 | 1.733 | 9034 | 0.59 | 1332 | 1.59 |
| 3 | 1.911 | 17971 | 1.18 | 1443 | 1.72 |
| 4 | 2.121 | 39198 | 2.58 | 1662 | 1.98 |
| 5 | 3.194 | 131708 | 8.66 | 3312 | 3.95 |
| 6 | 3.906 | 10104 | 0.66 | 868 | 1.04 |
| 7 | 4.367 | 1154 | 0.08 | 95 | 0.11 |
| 8 | 6.375 | 69212 | 4.55 | 4636 | 5.53 |
| 9 | 7.337 | 838516 | 55.14 | 49918 | 59.56 |
| 10 | 9.390 | 392111 | 25.78 | 18198 | 21.71 |

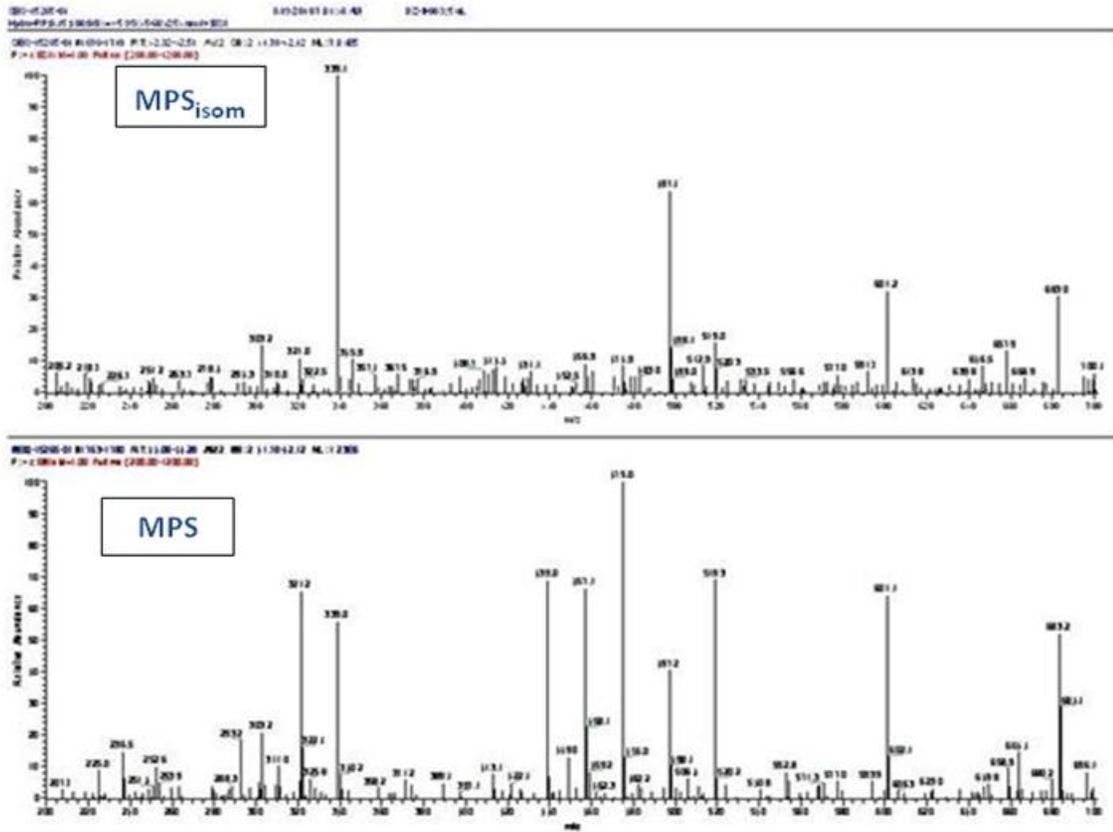
Report Method: Untitled

Printed 6:26:09 PM 11/10/2010

Page: 1 of 1

Cromatograma de la hidrólisis del MPS-Dex 10kDa a las 48 horas, en buffer fosfato pH=7,2. MP; MPS y MPS_{isom} (isómero del 21-hemisuccinato de 6-alfa-metilprednisolona).

Anexo 11



Cromatograma de masa de la MPS (abajo) y su isómero (arriba). Corresponde a la inyección de las 48 horas después de incubar el MPS –Dex 10 kDa en buffer fosfato pH= 7,2.