

**Tapa**

**Titulo**

**EFECTO DEL SISTEMA PORTADOR  
SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD  
INTRAOCULAR DE FÁRMACOS**

**Lomo**

**LUIS IGNACIO TÁRTARA**

**2013**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**EFECTO DEL SISTEMA PORTADOR SOBRE LA  
BIODISPONIBILIDAD INTRAOCULAR DE  
FÁRMACOS**

---

**Trabajo de Tesis para optar al  
Título de Doctor en Medicina y Cirugía**

**LUIS IGNACIO TÁRTARA**

**CÓRDOBA  
REPÚBLICA ARGENTINA  
2013**

## **COMISIÓN DE SEGUIMIENTO DE TESIS**

**Director:**

**Prof. Dr. Santiago Daniel Palma**

**Integrantes:**

**Prof. Dr. Daniel Alberto Allemandi**

**Prof. Dr. Julio Enrique Enders**

**Artículo 30° del Reglamento de la Carrera de Doctorado en Medicina y Cirugía: “LA FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS OPINIONES DE ESTA TESIS”**

L.I.T.

## DEDICATORIAS

*A mi esposa Fernanda*

*A mis hijos Ramí y Lucí*

*A mis padres Marta y Enzo*

*A mis hermanas Marí, Vero y Lucí*

*...desde lo más profundo del corazón.*

## AGRADECIMIENTOS

*...También deseo expresar mi agradecimiento:*

*A mi director de tesis, Prof. Dr. Santiago D. Palma*

*A los profesores que integran la comisión evaluadora: Prof. Dr. Daniel Allemandi, Prof. Dr. Julio Enders*

*A la Facultad de Ciencias Químicas y a la Facultad de Ciencias Médicas de la UNC*

*A Conicet*

*A mis compañeros de laboratorio y trabajo*

*Al personal docente y no docente de los Departamentos de Farmacia, Orgánica y Físico-química*

*A mis amigos*

*A mi familia*

# ÍNDICE

<b>Capítulo 1: INTRODUCCIÓN</b>	11
1. Aspectos anatómicos y farmacoterapia oftalmológica	13
2. Aspectos fisiológicos y farmacoterapia oftalmológica	16
2.1. Tejidos del ojo como barrera en la terapia de fármacos oculares	16
2.2. La problemática del acceso del fármaco al segmento posterior del ojo	16
2.3. La córnea y el vítreo como reservorio de fármacos	17
2.4. Respuestas consensuadas del ojo	17
3. Sistemas Portadores de Fármacos	18
3.1. Consideraciones relacionadas a la factibilidad de diseño de un nuevo SPF	21
3.2. Sistemas portadores de liberación modificada	22
3.2.1. Clasificación de los Sistemas de Liberación Modificada	23
4. Nuevos Sistemas Portadores de Fármacos desarrollados	25
5. Glaucoma y modelo experimental de hipertensión ocular	32
6. Objetivos generales y específicos	35
<b>Capítulo 2: MATERIALES Y MÉTODOS</b>	36
Materiales	37
1. Excipientes utilizados para la composición de los film bioadhesivos	37
1.1. Carbomer (ácido poli-acrílico)	37
1.2. Carboximetilcelulosa sódica	38
1.3. Polietilenglicoles	40
1.4. Poloxamer	40
1.5. Eudragit	41
2. Complejos de inclusión (complejo ternario)	42
2.1. Formas comunes de ciclodextrinas	42
2.2. Trietanolamina	43
3. Derivados del ácido ascórbico	44
3.1. Laurato de Ascorbilo	44
4. Fármacos	44
4.1. Acetazolamida	44
4.2. Brinzolamida 1%	45
5. Animales	46
Metodología	47
1. Obtención de los sistemas portadores de fármacos	47
1.1. Films Bioadhesivos	47
1.2. Complejo ternario	49
1.3. Cristales líquidos liotrópicos (coageles)	50
2. Análisis por Cromatografía líquida de alta eficacia	51
3. Análisis por espectrofotometría ultra-violeta visible	52
L.I.T.	

4. Capacidad de carga	52
5. Osmolaridad y pH	53
6. Estudios de liberación y permeación	53
7. Medición de Presión Intraocular	56
8. Irritación Ocular	58
9. Toxicidad Ocular	60
10. Estabilidad del fármaco en el film	60
11. Estudios de Homogeneidad	61
12. Estudio de Bioadhesión in vivo	61
Modelo experimental de hipertensión ocular en conejos	63
<b>Capítulo 3: RESULTADOS</b>	<b>65</b>
1. Films bioadhesivos	66
1.1. Estabilidad del fármaco en el film	66
1.2. Test de Homogeneidad	66
1.3. Medición de la liberación de fármaco	67
1.4. Medición de la Presión Intraocular	69
1.5. Irritación Ocular	70
1.6. Bioadhesión in vivo	70
2. Complejos de inclusión con ciclodextrinas	72
2.1. Osmolaridad	72
2.2. Ensayos de permeación corneal	72
2.3. Efecto de los complejos binarios y ternarios sobre la PIO en conejos normotensos	74
2.4. Ensayo de irritación ocular	76
3. Cristales líquidos liotrópicos (coageles)	77
3.1. Capacidad de carga de AZM	77
3.2. Osmolaridad y pH	77
3.3. Liberación del fármaco	78
3.4. Estudios de Permeación Transcorneal	79
3.5. Medición de la Presión Intraocular	80
3.6. Test de irritación ocular	82
4. Modelo experimental de hipertensión ocular	85
<b>Capítulo 4: DISCUSIÓN</b>	<b>87</b>
1. Films bioadhesivos	88
1.1. Mecanismos involucrados en el fenómeno de bioadhesión	88
1.1.1. Interacciones mucoadhesivas	88
1.1.2. Teorías sobre el fenómeno de bioadhesión	89
1.2. Características generales de los materiales que presentan propiedades adhesivas	91
2. Complejos de inclusión con ciclodextrinas	94
3. Cristales líquidos liotrópicos (coageles)	98
4. Modelo experimental de hipertensión ocular	102
L.I.T.	

4.1. Modelos de glaucoma inducidos por hipertensión ocular	103
4.1.1. Hipertensión ocular inducida por láser	104
4.1.2. Inyección de solución salina hipertónica en vena epiescleral	105
4.1.3. Cauterización de la vena epiescleral	106
4.1.4. Ligadura de la vena epiescleral	106
4.1.5. Inyección de sustancias que inducen hipertensión ocular	107
4.2. Adaptación de un modelo experimental de glaucoma en conejos	109
Conclusiones generales	111
<b>Capítulo 5: BIBLIOGRAFÍA</b>	113
Perspectivas	127
Abreviaturas	128
Publicaciones	129

## RESUMEN

**Introducción:** Existen importantes grupos de fármacos que presentan propiedades físico-químicas o biológicas desfavorables, las que comprometen su eficacia o seguridad y en consecuencia requieren nuevas estrategias de formulación para superar tales deficiencias; como ejemplos se pueden citar drogas poco solubles (Acetazolamida), inestables, irritantes, de biodisponibilidad errática, etc, que necesitan alta concentración en el órgano blanco. La anatomía, fisiología y bioquímica del ojo lo convierten en un órgano poco accesible para compuestos extraños. Las formas farmacéuticas tradicionales (soluciones, suspensiones y ungüentos) no alcanzan para resolver una gran cantidad de patologías oculares que se presentan en la actualidad. El desarrollo de sistemas portadores de fármacos (SPF) es una de las estrategias para solucionar este tipo de problemas.

El objetivo central es lograr SPF que superen las barreras protectoras de este órgano sin causar daños tisulares graves ni permanentes.

**Materiales y Métodos:** Los SPF desarrollados fueron films bioadhesivos, complejos de inclusión con ciclodextrinas y cristales líquidos liotrópicos (coageles). En los SPF se determinaron las propiedades biofarmacéuticas in vitro: liberación de fármacos (Acetazolamida), permeación transcorneal; e in vivo: determinación de la presión intraocular (PIO), irritación ocular y bioadhesividad en conejos New Zealand.

**Resultados:** Los films bioadhesivos recubiertos fueron capaces de permanecer adheridos a la conjuntiva ocular o palpebral durante un período prolongado de tiempo (un máximo de 48 horas). Utilizando estos sistemas de anclaje físico se obtuvo un descenso máximo de PIO del 37% a las 4 horas. El contacto prolongado del film en el ojo del conejo no causó irritación alguna.

La aplicación del sistema ternario AZM/HP- $\beta$ -CD/TEA produjo disminución de la PIO (30%), con un descenso máximo a las 2 horas. Todos los complejos evaluados con ciclodextrinas no presentaron efectos irritantes.

Los coageles: COA-AZM 0,1% y COA-AZM 0,4% promovieron la absorción de Acetazolamida, COA-AZM 0,4% mostró un mayor efecto hipotensor en ojos de conejos normotensos (25%). Los efectos observados sobre la irritación ocular para coageles fueron de leves a moderados.

**Conclusión:** Los tres SPF estudiados aumentaron la biodisponibilidad intraocular del fármaco modelo, acetazolamida, en forma tópica sobre la superficie ocular, mediante mecanismos diferentes. Se pudo avanzar en el diseño de nuevas técnicas experimentales para la evaluación de sistemas portadores de fármacos de aplicación oftalmológica, generando de este modo, una nueva área de experimentación en nuestro grupo de investigación.

## SUMMARY

Introduction: There are important groups of drugs that have unfavorable physico-chemical or biological properties compromising their efficacy or safety and, therefore, requiring new formulation strategies to overcome these deficiencies. Examples include poorly soluble drugs (acetazolamide), unstable, irritants, of erratic bioavailability, ecc., requiring high concentration in the target organ. The anatomy, physiology and biochemistry of the eye make it an organ of difficult access to foreign compounds. Traditional pharmaceutical forms (solutions, suspensions and ointments) are insufficient to resolve a large number of current eye diseases. The development of drug delivery systems (DDSs) is one of the strategies to solve these problems.

The main objective is to develop DDSs that overcome the protective barriers of this body without causing serious or permanent tissue damage.

Materials and Methods: The developed DDSs were bioadhesive films, inclusion complexes with cyclodextrins and lyotropic liquid crystals (coagels). In the DDSs, biopharmaceutical properties were determined in vitro: drug delivery (Acetazolamide), transcorneal permeation, and in vivo: determination of intraocular pressure (IOP), eye irritation and bioadhesiveness in New Zealand rabbits

Results: The bioadhesive coated films remained adhered to the ocular or palpebral conjunctiva during a prolonged period of time (maximum 48 hours). Using these physical anchoring systems, a maximum IOP decrease of 37% at 4 hours was obtained. Prolonged contact of the film in the rabbit eye caused no irritation at all.

The ternary system application (AZM / HP- $\beta$ -CD / TEA) IOP produced a PIO decrease (30%), with a maximum obtained at 2 hours. All the tested complexes with cyclodextrins showed no irritant effects. The coageles: COA-COA AZM 0.1% and 0.4% AZM-promoted the Acetazolamide uptake. COA-AZM 0.4% showed a greater hypotensive effect in normotensive rabbit eyes (25%). The effects observed in ocular irritation coageles were from mild to moderate.

Conclusion: The three systems studied increased the intraocular bioavailability of the model drug, acetazolamide, topically on the eye surface through different mechanisms. Progress was made in the design of new experimental techniques for the evaluation of drug carrier systems for ophthalmic application, thereby generating a new area of experimentation in our research group.

Capítulo 1

# INTRODUCCIÓN

Existen importantes grupos de fármacos que presentan propiedades físico-químicas o biológicas desfavorables, las que comprometen su eficacia o seguridad y, en consecuencia, requieren nuevas estrategias de formulación para superar tales deficiencias; como ejemplos se pueden citar drogas poco solubles, inestables, irritantes, de biodisponibilidad errática, que requieren alta concentración en el órgano blanco, etc. El desarrollo de **sistemas portadores de fármacos** (SPF) es una de las estrategias para solucionar este tipo de problemas. La investigación y desarrollo en esta área de las Ciencias Farmacéuticas es un campo de marcado interés científico tecnológico<sup>(1)</sup>.

Los SPF oftálmicos son un interesante desafío para la farmacotecnia moderna. El objetivo de un importante número de investigaciones es lograr sistemas portadores que superen las barreras protectoras de este órgano sin causar daños tisulares graves ni permanentes<sup>(2)(3)(4)(5)</sup>.

A menudo, las formas farmacéuticas tradicionales tales como soluciones, suspensiones y ungüentos no presentan suficiente efectividad terapéutica para resolver una gran cantidad de patologías oculares que se presentan en la actualidad.

Uno de los mayores problemas encontrados en la administración tópica es la pérdida rápida y extensiva de la formulación del área precorneal en virtud del drenaje y del recambio lagrimal<sup>(6)</sup>. Por otra parte, la córnea es una barrera altamente eficiente y esto disminuye notablemente la penetración de fármacos por esta vía. En forma paralela, la administración por vía sistémica no es eficiente debido al pobre acceso a los tejidos intraoculares, a causa de las barreras internas y externas existentes. Las inyecciones subconjuntivales y retrobulbares no producen adecuados niveles de fármaco, mientras que la liberación intracameral o intravítrea son procedimientos invasivos que pueden producir serias complicaciones intraoculares y por lo tanto esto se reserva a ciertas situaciones particulares.

## 1. Aspectos anatómicos y farmacoterapia oftalmológica

El ojo es el órgano encargado de recibir los estímulos luminosos externos, codificarlos y enviarlos a través del nervio óptico a los centros de la visión en la parte occipital del cerebro para que se produzca el complejo fenómeno de la visión. Para tal fin el ojo requiere cierta independencia del medio que lo rodea, logrando mantener sus estructuras inalteradas para una correcta visión. Sin embargo, esta particularidad lo convierte en un órgano de difícil acceso para ciertos fármacos.

El globo ocular está formado por tres capas concéntricas (ver figura 1.1): túnica externa, media o vascular e interna, y en su interior se limitan diferentes compartimentos: cámara anterior, posterior y vítrea.

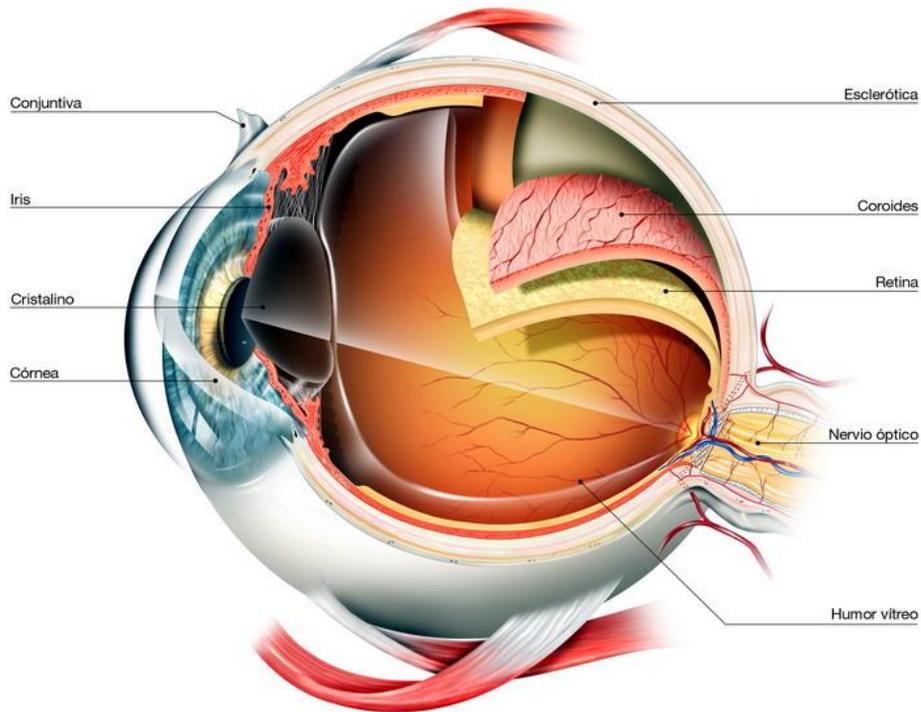
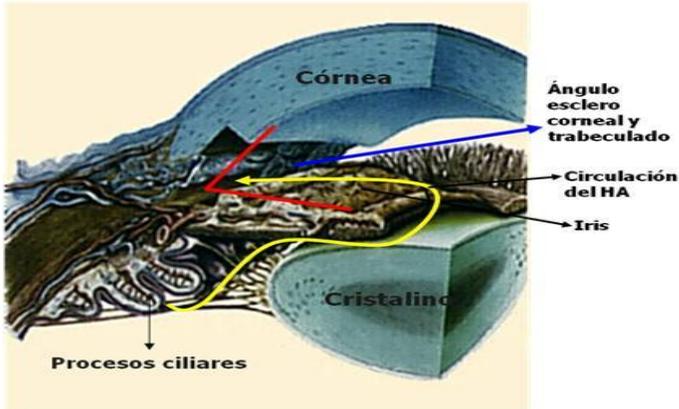


Figura 1.1: Corte esquemático del ojo humano.

La túnica externa es la parte del continente del ojo que le da forma y resistencia, contribuye entre otras cosas al mantenimiento de la presión intraocular. Está constituida por la córnea y la esclera. La córnea es un tejido transparente que ocupa la porción más anterior del ojo. Su epitelio al ser poliestratificado no queratinizado y tener uniones tipo zónula ocludens, *forma una barrera altamente eficiente principalmente para fármacos relativamente hidrofílicos o fármacos con baja lipofiliidad o de gran tamaño molecular*. Es importante su transparencia ya que es la principal estructura refractante del ojo, debido a su avascularidad y la disposición de las fibras de colágeno del estroma.

La túnica media o vascular, denominada úvea, consta de tres porciones bien diferenciadas: iris, cuerpo ciliar y coroides. El cuerpo ciliar (ver figura 1.2) desempeña un papel importante en la nutrición del segmento anterior y mantenimiento de la presión intraocular (PIO) mediante la secreción de humor acuoso. El humor acuoso, circula por la cámara posterior, pasa a través de la pupila hacia la cámara anterior y gran parte atraviesa la malla trabecular hasta el canal de Schlemm, y abandona el ojo por las venas episclerales. Existe aquí otra *barrera hematoacuosa* formada por las uniones estrechas entre las células del epitelio no pigmentado de los procesos ciliares junto a los vasos iridianos no fenestrados, lo que limita el acceso de fármacos por vía sistémica.

La túnica interna o neurosensorial, formada principalmente por la retina, está constituida por dos grupos de capas: el epitelio pigmentario y el neuroepitelio. El epitelio pigmentario, debido a sus uniones estrechas, forma una barrera (*barrera externa de la retina*), e incluso genera una resistencia eléctrica, que impide el acceso de sustancias y fármacos desde la coroides; mientras que la vascularización retiniana, encargada de la nutrición de las capas más internas, es una circulación terminal y el epitelio de los capilares es no fenestrado con uniones estrechas. De esta manera presentan un sistema de autorregulación y de barrera hematorretiniana (*barrera interna retiniana*). Esta barrera no permite el acceso de componentes que puedan provenir a partir de la circulación sistémica.



**Figura 1.2:** Esquema de un corte anatómico del segmento anterior del ojo, donde se observa la circulación normal del humor acuoso (amarillo), secretado por los procesos ciliares y su eliminación por el ángulo esclero-corneal (rojo).

Otro de los elementos extraoculares que protegen al ojo de compuestos y sustancias extrañas son las membranas extraoculares, formadas por la conjuntiva y los párpados. La conjuntiva puede ser considerada como una membrana mucosa que cubre la esclera y la cara interna de los párpados. Las principales funciones son: protección, formación del film lagrimal y depósito para las lágrimas. Los párpados presentan una estructura músculo-membranosa cuya función consiste en mantener la integridad de la superficie corneal, así como la del film lagrimal ya que sus continuos movimientos son muy importantes en el restablecimiento de la película lagrimal.

Como se explicó anteriormente, la administración tópica debe superar el problema de la pérdida rápida y extensiva de la formulación del área precorneal, en virtud del drenaje y del recambio lagrimal. Esto se debe a que el ojo posee un sistema lagrimal que está compuesto por un aparato secretor y uno excretor. El aparato secretor está formado por la glándula lagrimal principal y las glándulas accesorias, que producen el film lagrimal, el cual tiene un grosor de 7 a 10  $\mu\text{m}$ , y está compuesto por tres capas: lipídica, acuosa y de mucina. El volumen lagrimal normal oscila entre 6 a 8  $\mu\text{l}$ , y la producción lagrimal es de aproximadamente 1,2  $\mu\text{l}$  por minuto<sup>(7)</sup>. Por el aparato excretor se elimina el 75% de la lágrima, ya que el 25% restante se evapora<sup>(8)</sup>. Los párpados bombean la lágrima al interior de la cavidad nasal a través del conducto lacrimonasal.

## **2. Aspectos fisiológicos y farmacoterapia oftalmológica**

### **2.1. Tejidos del ojo como barrera en la terapia de fármacos oculares**

La mayoría de los fármacos se administran al ojo a través de la vía tópica, convirtiéndose la córnea, la conjuntiva y la esclera en las principales barreras para la penetración del principio activo dentro del ojo. El epitelio corneal, mediante sus uniones estrechas, dificulta el paso hacia el estroma de sustancias solubles en agua. Contrariamente, sustancias lipofílicas pueden atravesar el epitelio corneal pero se reduce el paso a nivel del estroma.

El epitelio conjuntival también constituye una barrera a la penetración de fármacos, aunque en menor medida que el epitelio corneal<sup>(9)</sup>. Sin embargo, la vasculatura de la conjuntiva absorberá una parte sustancial del fármaco que atravesó el epitelio conjuntival. La porción más anterior de la esclera permite parcialmente la permeación del principio activo, logrando tener acceso a la parte anterior del vítreo.

Los fármacos administrados sistémicamente (vía oral o parenteral) presentan también pobre acceso al humor acuoso y al vítreo, debido a la barrera hematoacuosa de los procesos ciliares y las barreras hematorretinianas interna y externa, evitando que el fármaco llegue al espacio extravascular de la retina y al vítreo<sup>(10)</sup>.

### **2.2. La problemática del acceso del fármaco al segmento posterior del ojo**

Desafortunadamente para ciertas patologías vitreoretinianas el ingreso de fármacos al vítreo es usualmente pobre porque no hay permeación a través del cristalino o entre los procesos ciliares y el cristalino; como así también hay un limitado acceso desde los vasos sanguíneos de la retina o desde los vasos de la coroides. Las inyecciones retrobulbares tampoco permiten un buen acceso debido a que la gran cantidad de vasos de la coroides que produce una barrera fisiológica y el epitelio pigmentario una barrera

mecánica para la permeación del fármaco hacia la retina y vítreo. Las inyecciones subconjuntivales permiten cierta absorción del fármaco hasta el vítreo a través de la pars plana. Durante procesos inflamatorios o lesiones en las membranas oculares (úlceras), las barreras pueden estar alteradas, por lo tanto la penetración de ciertos fármacos puede estar aumentada<sup>(11)</sup>.

### **2.3. La córnea y el vítreo como reservorio de fármacos**

La córnea es un reservorio importante ya que en el epitelio corneal es posible hallar moléculas lipofílicas, mientras que las hidrofílicas son más afines a la capa estromal. De tal forma la córnea puede actuar como reservorio de ciertos tipos de principios activos, particularmente profármacos.

El vítreo puede ser depósito para ciertos compuestos de tamaño molecular relativamente elevado, siempre que no sean activamente captados por la retina o el epitelio pigmentario de la retina<sup>(12)</sup>.

### **2.4. Respuestas consensuadas del ojo**

Este fenómeno es hallado a menudo en estudios de presión intraocular. Es frecuente el descenso de la presión intraocular del ojo no tratado. Aunque esto puede relacionarse al paso sistémico del fármaco, que vía sanguínea llega al ojo contralateral, también se postula la existencia de otros mecanismos, posiblemente un reflejo neuronal a través del cerebro a partir de barorreceptores existentes en el ojo<sup>(13)(14)(15)</sup>.

### 3. Sistemas Portadores de Fármacos

Las formas farmacéuticas tradicionales para uso oftalmológico (soluciones, suspensiones y ungüentos), a menudo no son suficientemente efectivas para tratar satisfactoriamente gran cantidad de patologías oculares. Además, cabe recordar que los medicamentos son aplicados ya sea sobre la superficie del ojo, con el propósito de que el principio activo actúe en afecciones tales como conjuntivitis, blefaritis, queratitis, etc.; o bien para el tratamiento intraocular de patologías como glaucoma, uveítis, endoftalmitis, entre otras; donde es necesaria la permeación de los principios activos a través de la córnea.

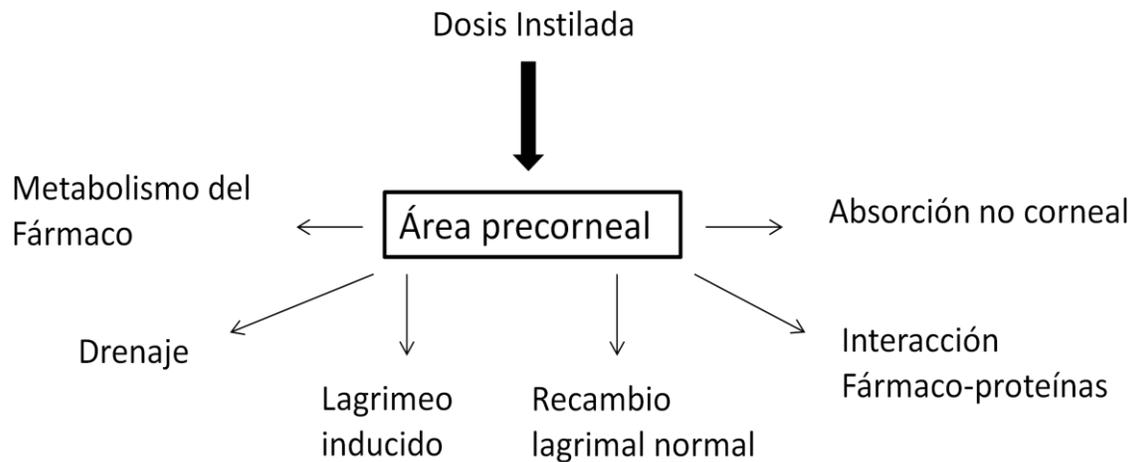
Uno de los mayores problemas encontrados en la administración tópica es la pérdida rápida y extensiva de la formulación del área precorneal en virtud de la dinámica del sistema lagrimal que involucra el drenaje y el recambio lagrimal<sup>(16)</sup>. Se conoce que el volumen normal de la lágrima retenida en el fondo de saco del ojo humano es de aproximadamente 6 a 8  $\mu\text{l}$ , y si no hay parpadeo puede llegar a albergar 30  $\mu\text{l}$  y la producción lagrimal en el estado basal es de 1,2  $\mu\text{l}$  por minuto<sup>(17)</sup>. Por otro lado, usualmente una mínima fracción de lo instilado es absorbida y alcanza tejidos intraoculares (menos del 5%)<sup>(18)(19)</sup>, debido a la eficiente barrera que es la córnea provocando un tiempo de retención de una solución oftálmica muy corto. Consecuentemente, la aplicación tópica oftálmica se realiza en dosis (volúmenes) muy pequeñas y en forma repetitiva (alta frecuencia)<sup>(20)(21)(22)</sup>. Ver figura 1.3 y 1.4.

La investigación en ciencias farmacéuticas se ha centrado por años en la búsqueda de nuevas moléculas que den respuesta terapéutica a enfermedades cuyo tratamiento no se conoce, o bien realizar modificaciones estructurales con el objetivo de lograr acciones terapéuticas más selectivas, duraderas o con menos efectos adversos para el organismo.

En los últimos años el desarrollo de nuevos fármacos (síntesis) no ha sido suficiente para lograr un progreso importante en la efectividad de la farmacoterapia, debido

principalmente a que el comportamiento *in vivo* de ciertos principios activos o más aun, de ciertas formas farmacéuticas, pueden no correlacionarse con los resultados observados primariamente *in vitro*. Distintos factores pueden ser responsables de este fenómeno, entre los cuales se pueden citar:

- a) *Concentración insuficiente* del fármaco en el sitio de acción debido a una pobre absorción, distribución no específica o rápido metabolismo y/o eliminación (por ejemplo péptido y proteínas).
- b) *Propiedades fisicoquímicas* del principio activo que dificultan la formulación. Por ejemplo, una baja solubilidad puede ser determinante a la hora de formular inyectables en soluciones acuosas.
- c) *Alta fluctuación de los niveles plasmáticos* del fármaco debido a una biodisponibilidad errática después de una administración peroral.



**Figura 1.3:** Problemática de la administración tópica oftálmica de un fármaco

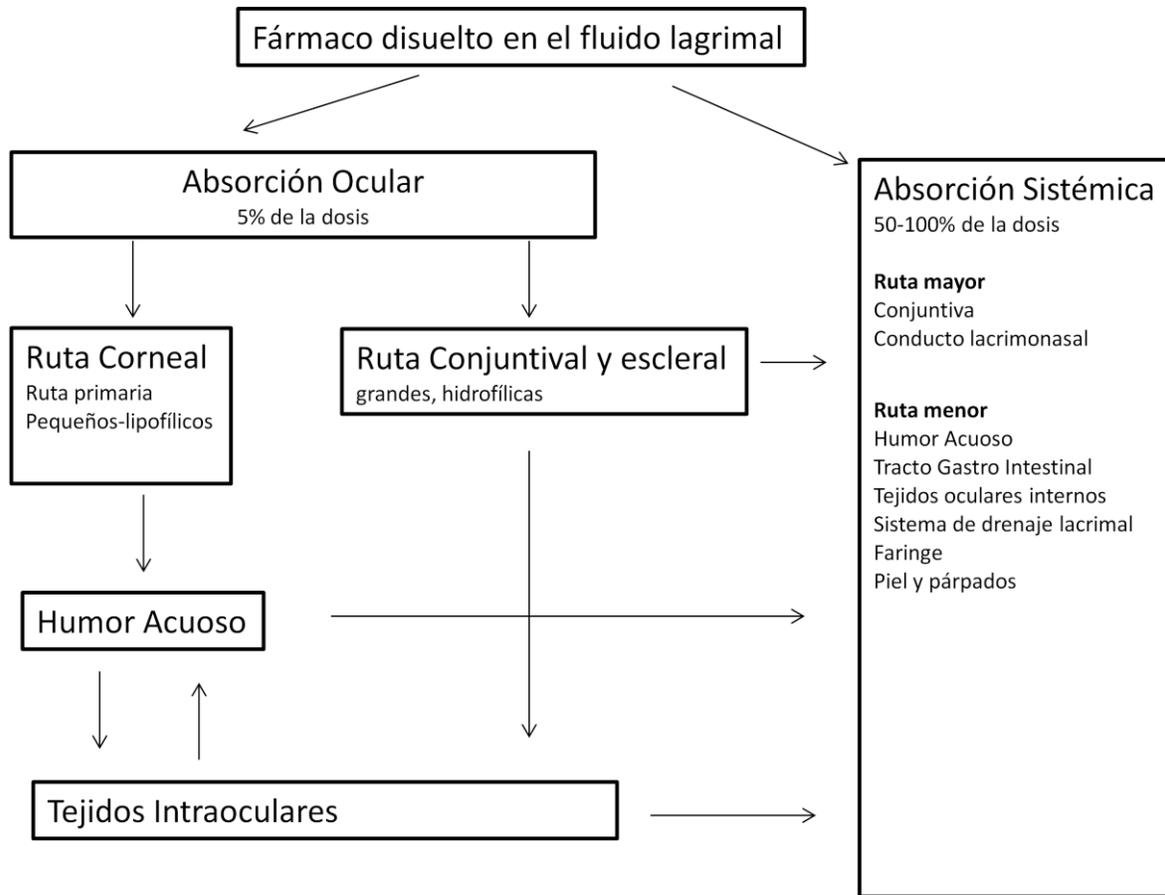


Figura 1.4: Rutas de absorción de un fármaco en el ojo.

Debido a lo antes expuesto una estrategia para sortear estos inconvenientes es el desarrollo de nuevos **sistemas portadores de fármacos**. Se denomina así a una plataforma (materiales y procesos) constituida por la/s molécula/s bioactiva/s (fármaco) y excipientes, con ventajas relativas comparadas con formas farmacéuticas tradicionales.

En los últimos años la cantidad y calidad de publicaciones referidas a este tópico han ido en vertiginoso aumento. No obstante, cabe destacar que no todos los sistemas portadores que se estudian y que aparentan ser exitosos, tienen su punto culminante en el desarrollo de un medicamento.

Como **atributos deseables de un SPF** se pueden mencionar:

1. Posibilidad de variar la velocidad de liberación de fármacos para poder adecuar el sistema a una farmacocinética particular (flexibilidad).
2. Posibilidad de mantener un control preciso de la velocidad de liberación que se observa para cada fármaco (precisión).
3. Baja sensibilidad del sistema ante las variables fisiológicas. (Alta robustez).
4. Que las formulaciones sean fisicoquímicamente estables.
5. Que la estabilidad del fármaco sea mantenida o aumentada.
6. Que el sistema responsable de la modulación de la liberación del principio activo aporte poca masa.
7. Aplicable a un amplio rango y variedad de fármacos.
8. Que el costo sea razonable, en la medida de lo posible.

### **3.1. Consideraciones relacionadas a la factibilidad de diseño de un nuevo SPF:**

#### *a) Capacidad de carga del sistema:*

En general cuando se diseña un nuevo SPF se busca tener la misma dosis de principio activo que en los sistemas convencionales, excepto en los casos que el cambio de vehículo mejore la biodisponibilidad y haga posible la disminución de la cantidad de fármaco a utilizar. Es por ello que determinar la capacidad o efectividad de carga de un sistema portador es fundamental para su evaluación como potencial alternativa para la vehiculización de fármacos.

#### *b) Posibilidad del sistema de dirigir el principio activo a un sitio específico:*

Cuando un SPF logra que el fármaco llegue al sitio de acción sin pasos previos por otros órganos o tejidos, se puede disminuir la metabolización, así como aumentar el efecto del fármaco a igual dosis administrada.

#### *c) Interacción del sistema portador con los sistemas biológicos:*

Si el SPF solo busca mejorar la vehiculización, los excipientes auxiliares deben interaccionar lo mínimo posible con el entorno biológico, pero si el sistema tiende a mejorar o modificar la liberación de los fármacos, probablemente los excipientes tendrán un rol central para lograr el efecto deseado.

*d) Toxicidad aguda y crónica:*

Ausencia de toxicidad aguda y crónica de todos los componentes a los fines de garantizar la seguridad en el uso de la formulación.

*e) Cambio de escala para la producción de la forma farmacéutica:*

Este punto es pocas veces considerado en aquellas publicaciones donde se describen sistemas que se consideran de potencial gran impacto en la industria farmacéutica. Como cualquier producto, un medicamento, puede presentar problemas a la hora de rediseñar los procesos de manufactura a escala industrial.

*f) Estabilidad fisicoquímica del sistema y del fármaco durante su almacenamiento:*

Tanto el principio activo, como el sistema en su totalidad, deben ser estables durante un plazo preestablecido, que sea acorde con la potencial aplicación como producto industrial.

*g) Costos:*

La naturaleza de un SPF necesariamente debe tener un compromiso entre la utilidad de la innovación tecnológica y los costos del producto.

### **3.2. Sistemas portadores de liberación modificada**

Debido a propiedades físico-químicas y biológicas particulares, muchos fármacos ejercen su acción farmacológica durante un tiempo reducido, requiriendo la administración de numerosas dosis diarias. Esto frecuentemente causa errores de administración y poca adhesión al tratamiento por parte del paciente. Un ejemplo muy claro es la repetición en la posología tópica de un medicamento para la mayoría de las

enfermedades oculares, ya que la eliminación de la gota de la superficie ocular es bastante rápida, disminuyendo la biodisponibilidad del fármaco en el sitio de acción. Debido a este inconveniente surge otro concepto importante: el de los *sistemas de liberación modificada* (SLM), que comprenden todos aquellos sistemas que liberan el fármaco en el lugar adecuado durante el tiempo requerido.

Algunas ventajas que ofrecen los SLM en cuanto a su actividad terapéutica son:

- a) Prolongar la acción medicamentosa mediante la liberación sostenida del fármaco.
- b) Liberar el fármaco en un sitio específico para protegerlo o mejorar su absorción.
- c) Mejorar la pauta posológica buscando una administración más cómoda y la reducción del número de tomas/día, en el intento de conseguir una dosis única.
- d) Disminuir o eliminar el riesgo de efectos no deseados (secundarios y tóxicos) de los medicamentos.

### 3.2.1. Clasificación de los Sistemas de Liberación Modificada<sup>(23)</sup>

- a) *Formas farmacéuticas de liberación retardada*: El fármaco no se libera inmediatamente después de la administración, teniendo un tiempo de latencia hasta que la droga es liberada de forma rápida.
- b) *Formas farmacéuticas de liberación regulada*
  - *Formas de acción sostenida*: Son aquellos preparados que entregan inicialmente el medicamento en cantidad necesaria para alcanzar la respuesta farmacológica deseada en forma rápida y luego, en cantidad adecuada para que la velocidad de absorción sea igual a la de eliminación durante un período prolongado, que puede llegar a ser de 10 a 12 horas.
  - *Formas de acción prolongada*: Corresponde a aquellas formulaciones en que el medicamento se entrega inicialmente en la cantidad suficiente para la acción o

en un exceso no perjudicial para el organismo. El medicamento se libera luego, en forma lenta a una velocidad no siempre igual a la de eliminación.

- *Formas de acción repetida:* Estas formulaciones proporcionan inicialmente una dosis simple de principio activo, y a un tiempo posterior, otra dosis similar.

El empleo de estos sistemas es especialmente conveniente para la administración oftálmica, ya que la anatomía, fisiología y bioquímica del ojo lo convierten en un órgano poco accesible para compuestos extraños. De este modo, la racionalidad en el diseño de estos nuevos sistemas se basa en la necesidad de que los sistemas portadores superen las barreras protectoras de este órgano, sin causar daños tisulares graves ni permanentes<sup>(24)(25)(26)(27)</sup>.

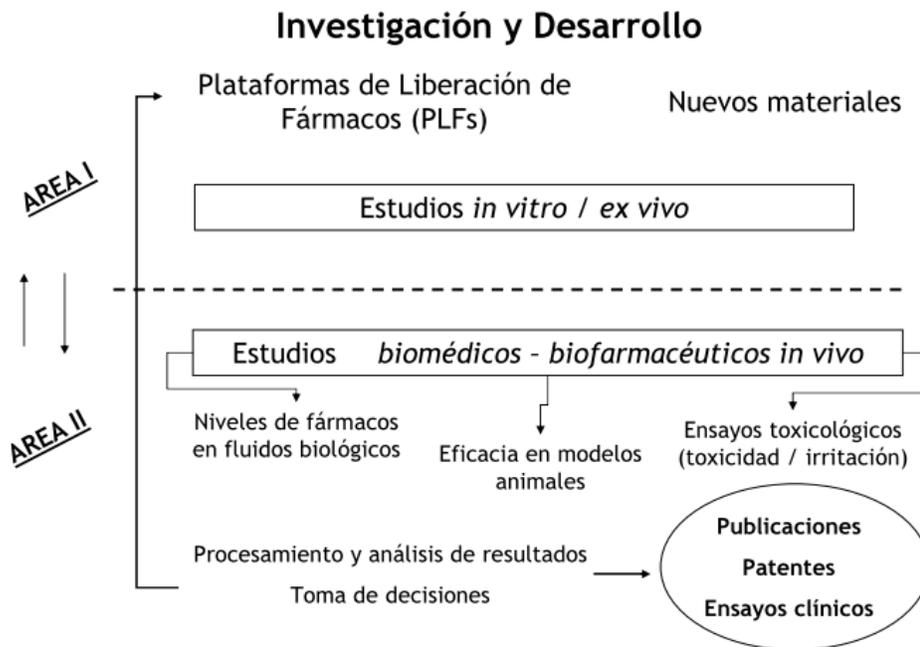
Es claro entonces que la biodisponibilidad y la farmacocinética de fármacos aplicados en forma tópica en la superficie del ojo dependen de tres factores:

- a) La disposición del fármaco en el área precorneal (film lagrimal)*
- b) La permeabilidad del principio activo a través de la córnea y*
- c) La eliminación de los fármacos desde la superficie ocular*

El aumento de la permeación transcorneal es una prometedora estrategia para solucionar problemas de pobre biodisponibilidad de fármacos de uso oftálmico<sup>(28)</sup>. Básicamente, la permeabilidad transcorneal puede incrementarse por dos vías, a) aumento de la lipofilicidad del fármaco por formación de pares iónicos u obtención de prodrogas<sup>(29)</sup>, b) modificación reversible de la membrana (córnea) con compuestos conocidos como promotores de la permeación (enhancers)<sup>(30)(31)</sup>. Estos agentes, dentro de los cuales se encuentran algunos tensioactivos, pueden producir cambios en las membranas celulares por solubilización parcial y remoción de fosfolípidos, y de ese modo aumentar las características de permeación del epitelio corneal<sup>(32)</sup>.

#### 4. Nuevos Sistemas Portadores de Fármacos desarrollados

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el marco de un proyecto de mayor envergadura, que consta de dos áreas paralelas y complementarias. El área I implica el diseño, desarrollo y evaluación *in vitro* de SPF o nuevos materiales de aplicación en tecnología farmacéutica y el área II, contempla la evaluación biomédica y biofarmacéutica de los productos y/o sistemas desarrollados. El siguiente esquema resume lo antes expuesto:



Los SPF desarrollados se diseñaron con la finalidad de mejorar la biodisponibilidad de fármacos cuya permeación es escasa, utilizados en patologías intraoculares. Un ejemplo de un fármaco clase IV (baja solubilidad y escasa permeabilidad)<sup>(33)</sup> es Acetazolamida (AZM), la que por sus características debe ser administrada en forma oral, en altas dosis, para obtener el efecto esperado de reducción de la presión intraocular (PIO) en el glaucoma. Utilizar dosis elevadas conduce a una importante gama de efectos

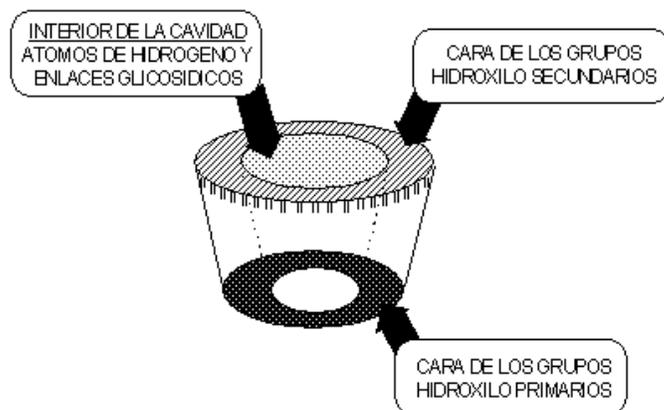
secundarios. Por ello se la reserva solo para los ataques agudos de glaucoma<sup>(34)</sup>. Estos efectos secundarios de AZM se podrían evitar si se administrara de forma tópica. Sin embargo, como se explicó anteriormente, la baja solubilidad acuosa (0,7 mg/ml) y su baja permeabilidad corneal ( $4,1 \times 10^{-6}$  cm/s) limitan la biodisponibilidad ocular del fármaco<sup>(35)</sup>. Por lo tanto, sería de suma utilidad farmacoterapéutica desarrollar una formulación tópica de AZM que permita su absorción intraocular. Este fármaco se propone como modelo para los estudios de biodisponibilidad intraocular<sup>(36)</sup>.

Por este motivo, el diseño de nuevos SPF en oftalmología está orientado a que los mismos:

- a) mejoren la concentración efectiva del fármaco en el film lagrimal*
- b) aumenten la permeabilidad del principio activo (enhancers)*
- c) sostengan el tiempo de contacto del fármaco con la córnea u otro tejido idóneo para la absorción<sup>(37)</sup>.*

Para mejorar la concentración efectiva del fármaco se diseñó un **complejo ternario** compuesto por Hidroxipropil-Beta-Ciclodextrina/Trietanolamina/Acetazolamida.

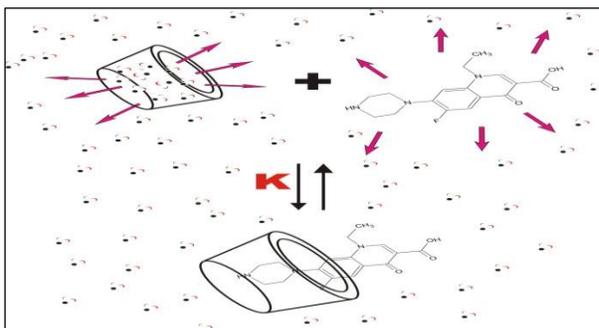
Las Ciclodextrinas (CD) están formadas por residuos de moléculas de glucopiranosas. Como consecuencia de la conformación con que se unen las unidades de glucosa, se forma una estructura que posee todos los grupos hidroxilos orientados hacia el exterior. Los grupos primarios en el borde estrecho del cono y los secundarios situados sobre el borde amplio. El interior de la cavidad consiste en un anillo formado por grupos CH, un anillo de oxígenos glicosídicos y otro anillo de grupos CH. La rotación de los grupos hidroxilos reduce el tamaño efectivo de la cavidad, haciendo que posea un espectro cónico o de cono truncado, más abierto hacia el borde de los grupos hidroxilos secundarios<sup>(38)</sup>. Ver figura 1.5.



**Figura 1.5:** Esquema del espectro cónico de las Ciclodextrinas, con sus grupos hidroxilos primarios y secundarios.

Esta disposición estructural proporciona al interior de la cavidad un carácter lipofílico que es capaz de proteger a huéspedes de las mismas características; mientras que los bordes externos son polares debido a la presencia de los grupos hidroxilos, lo que hace a estos compuestos muy hidrosolubles.

Se ha demostrado que la capacidad de solubilidad de la hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP-β-CD) es significativamente mayor cuando un compuesto básico, trietanolamina (TEA), se incorpora como un tercer componente al complejo HP-β-CD/fármaco<sup>(39)</sup>. Este compuesto orgánico actuaría, aparentemente, disminuyendo la constante de asociación entre la HP-β-CD y la AZM. Por este motivo esta estrategia permite disponer de mayor cantidad de fármaco libre, aumentando la biodisponibilidad del fármaco en la biofase ocular<sup>(40)</sup>. En la figura 1.6 se esquematiza el comportamiento teórico del complejo multicomponente.

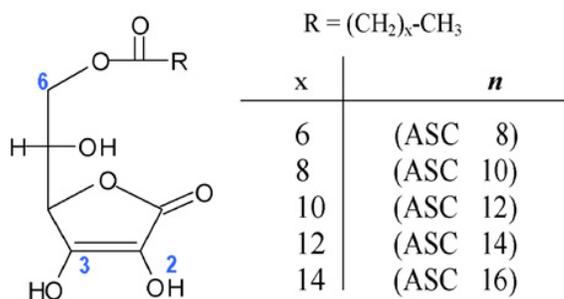


**Figura 1.6** Comportamiento teórico del complejo ternario, donde se puede observar la constante de asociación (K) por arriba de la misma se observa el complejo disociado con Acetazolamida (AZM) libre (derecha) y por debajo, el complejo asociado (Ciclodextrina-AZM). Trietanolamina (puntos) interfiere modificando la constante de asociación, aumentando la biodisponibilidad de la AZM

Como promotor de la permeación (*enhancer*), se trabajó con los **6-O-alkil derivados del ácido ascórbico (ASCn)**, específicamente con el laurato de ascorbilo (ASC<sub>12</sub>) un agente tensioactivo (AT) que fue sintetizado con el objeto de aumentar la lipofilidad de la Vitamina C (VC) y extender sus propiedades antioxidantes a sistemas lipídicos<sup>(41)</sup>.

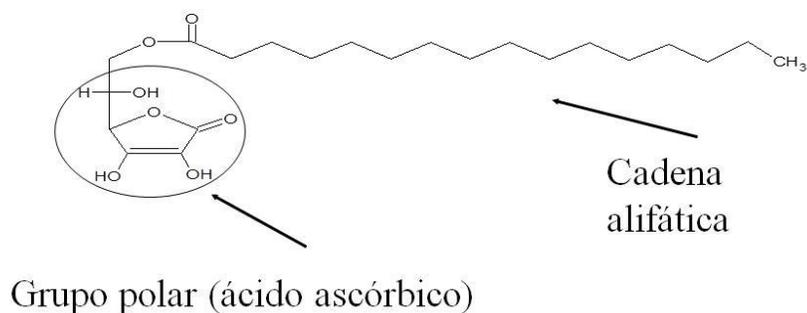
La VC protege eficazmente importantes moléculas orgánicas y biológicas contra la degradación oxidativa. Por lo tanto actúa como un antioxidante natural, eficiente, potente y sobre todo biocompatible y económico. Su uso es limitado por su solubilidad muy pobre en casi todos los solventes, ya sean polares o apolares, con la excepción de agua. Esta es la razón principal por la que, por ejemplo, VC no puede penetrar a través de biomembranas, o es inútil en la estabilización de moléculas hidrofóbicas pequeñas o grandes.

Debido a esto se obtuvieron y caracterizaron derivados lipofílicos de la VC (ASCn). En la figura 1.7 se esquematiza la estructura química de los ASCn.



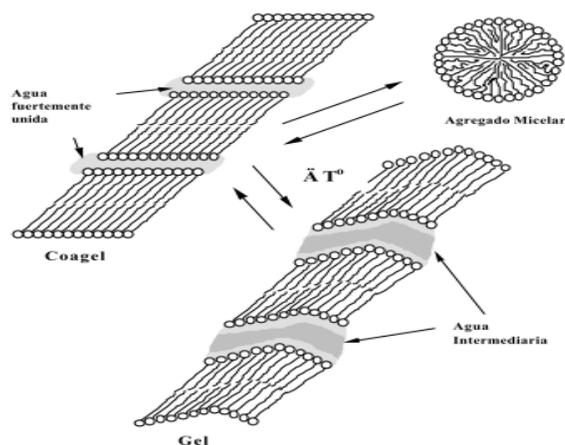
**Figura 1.7.** Estructura química de los 6-O-alkil derivados del ácido ascórbico (ASCn): según el largo de cadena del ácido graso correspondiente al ester, los ASCn presentan propiedades fisicoquímicas diferentes.

La estructura de la molécula (figura 1.8) presenta una porción polar (ácido ascórbico) y una porción apolar (cadena alifática). El largo de la cadena alifática de los ASCn le confiere propiedades fisicoquímicas diferentes.

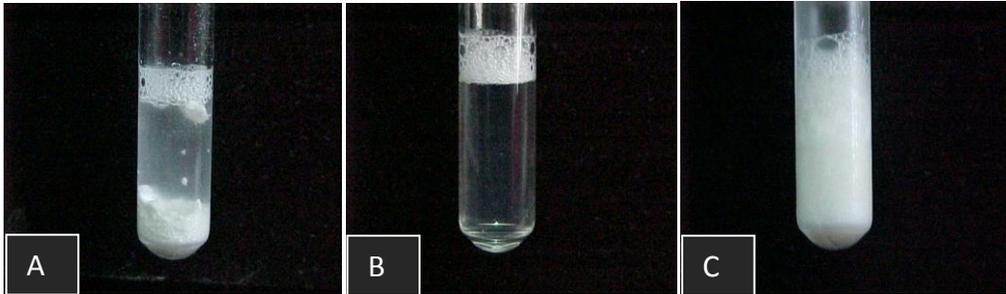


**Figura 1.8.** Molécula de palmitato de ascorbilo: como puede observarse este tipo de moléculas presentan una cadena alifática acoplada a un grupo polar correspondiente al ácido ascórbico.

Los ASCn son insolubles en agua a temperatura ambiente. Cuando se los calienta por encima de una temperatura específica para cada derivado, la solubilidad aumenta hasta alcanzar la concentración micelar crítica. El enfriamiento del sistema no trae aparejado la precipitación del derivado sino la formación de estructuras supramoleculares con características de cristal líquido denominadas coageles<sup>(42)</sup>. Figura 1.9. y 1.10



**Figura 1.9.** Esquema de las estructuras supramoleculares de los coageles de 6-O-alkil derivados del ácido ascórbico (ASCn): como se puede observar dependiendo de la temperatura y del largo de la cadena alifática los ASCn puede presentar estructuras micelares, fases gel o coagel.



**Figura 1.10.** Fotografía de las diferentes fases hasta la formación del coagel: en la fotografía A: suspensión de los derivados en medio acuoso a temperatura ambiente, B: derivado por encima de la Temperatura Micelar Crítica, C: coagel formado a temperatura ambiente.

El estudio de los coageles y su potencial aplicación en los SPF, es parte de la temática principal de este trabajo.

Estos sistemas han demostrado propiedades interesantes desde el punto de vista farmacéutico. Particularmente pueden ser capaces de promover la permeación de fármacos a través de la piel<sup>(43)</sup> y córnea<sup>(44)</sup>, debido a la estructura lamelar de los mismos, la que puede aumentar la solubilización del fármaco en el sistema y las propiedades surfactantes de estos derivados, que podrían desestabilizar, en forma transitoria, las membranas biológicas.

Finalmente, para aumentar el tiempo de contacto del fármaco en la biofase ocular, se desarrolló un sistema bioadhesivo. Hay distintos sistemas bioadhesivos: comprimidos, geles, micro y nano-partículas. En esta investigación se utilizaron *films bioadhesivos* cargados con AZM.

Los sistemas bioadhesivos destinados a la aplicación en las mucosas deben poseer un tiempo de residencia mayor que los geles o los colirios y deben removerse fácilmente de la zona de aplicación<sup>(45)</sup>.

Un film ideal debe ser flexible y elástico, con adecuadas propiedades adhesivas para soportar el estrés provocado por el movimiento normal de la zona y permanecer retenido durante el tiempo deseado. El hinchamiento de la formulación, si existe, no debe

ser demasiado extenso para evitar la incomodidad del paciente, parámetro sumamente crítico en lo que refiere a la administración oftálmica.

Otras consideraciones particulares para los sistemas bioadhesivos de uso oftálmico son:

- 1.- Adherirse rápidamente al sitio de aplicación y permanecer en él durante el tiempo requerido, aumentando el tiempo de contacto y mejorando la biodisponibilidad del fármaco en la superficie.
- 2.- Liberar el fármaco de manera sostenida.
- 3.- No causar inconvenientes al paciente tales como: interferir con la visión normal del individuo, provocar irritación, incomodidad o sensación de cuerpo extraño, etc., lo cual puede conspirar contra la continuidad del tratamiento.
- 4.- Además, los nuevos sistemas desarrollados, deben ser seguros, confiables y eficaces, exigencia común para todo medicamento.

Teniendo en cuenta las características ideales de este tipo de film se seleccionaron polímeros conocidos como Carbomer y Carboximetilcelulosa sódica, que mediante su interacción logra características adecuadas en cuanto a bioadhesión y flexibilidad; un tensioactivo: Poloxamer y un plastificante: Polietilenglicol, que le confieren un hinchamiento acotado<sup>(46)</sup>.

## 5. Glaucoma y modelo experimental de hipertensión ocular

El glaucoma es una neuropatía óptica que se presenta, en la mayoría de los casos, de forma crónica e irreversible. En términos precisos comprende una serie de enfermedades oculares, de diferentes causas pero que tienen como común denominador el aumento de la presión intraocular (PIO). Si la hipertensión ocular (HTO) persiste durante un tiempo suficientemente largo, provoca daños irreversibles en todas las estructuras oculares, lo que se traduce en una disminución característica del campo visual que concluye con la atrofia del nervio óptico y posterior ceguera<sup>(47)</sup>.

Se estima que existen 60 millones de personas en el mundo que padecen glaucoma, y para el año 2020 habrá 80 millones de enfermos con esta patología<sup>(48)</sup>. Si bien es la segunda causa de ceguera en el mundo, se la considera en primer lugar cuando se habla de ceguera irreversible, ya que aproximadamente 6.7 millones de personas tienen dicha ceguera por glaucoma<sup>(49)(50)</sup>.

La PIO está regulada por las modificaciones en la dinámica del flujo del humor acuoso dentro del ojo, la cual está determinada por una adecuada relación entre la producción de humor acuoso en la cámara posterior y la salida del mismo por la malla trabecular ubicada en el ángulo camerular de la cámara anterior (vía convencional). Desde hace algunos años se le ha otorgado mucha relevancia a una segunda vía de salida del humor acuoso a través del espacio supracoroideo, llamada vía no convencional o úveo-escleral, que en condiciones fisiológicas puede evacuar hasta un 30% del humor acuoso y es independiente de los valores de PIO<sup>(51)</sup>.

El aumento de la PIO no es considerada como la única causa del glaucoma, sin embargo la reducción de la misma es el objetivo primario del tratamiento, ya que puede considerarse el factor de riesgo más importante y frecuente en el desarrollo y progresión de esta neuropatía óptica.

El manejo convencional de la patología es principalmente mediante el uso de agentes hipotensores, y solo cuando estos agentes no son suficientes para reducir la PIO, se utiliza la terapia láser o quirúrgica. Por lo tanto, la eficacia de estos sistemas depende de la farmacodinamia del medicamento hipotensor y la capacidad del fármaco de permear la córnea y llegar a su sitio de acción en tiempo y forma (farmacocinética).

Es sumamente importante destacar que el glaucoma es una enfermedad que incrementa su incidencia a medida que aumenta la edad, por lo que la tercera edad es la población que mayor cantidad de medicamentos antiglaucomatosos necesita. Esto, sumado al consumo simultáneo de varios fármacos imprescindibles para otras afecciones, provoca un aumento importante en la probabilidad de aparición de interacciones y efectos secundarios o indeseables. Además, son frecuentes los fallos en el cumplimiento del tratamiento, o errores en la administración como consecuencia de las limitaciones propias de la edad, tales como el deterioro de la función visual, auditiva y mental. Estos problemas pueden ser agravados por el número elevado de medicamentos que se consumen y por los efectos adversos de los mismos. Por estos motivos el mejoramiento de la terapia antiglaucomatosa es un tema sanitario central que puede ser resuelto con tecnologías innovadoras.

Como muchas enfermedades clínicas, el glaucoma es una entidad difícil para investigar en pacientes debido a su fisiopatología. Como tal, los investigadores se basan en modelos animales que reproducen fielmente los aspectos importantes de la condición, con el fin de entender los mecanismos de la enfermedad y desarrollar nuevas terapias. De los modelos animales de glaucoma disponibles, los sistemas en los cuales se emplean roedores son los más atractivos por muchas razones, incluyendo su potencial para experimentación, la manipulación, la vida útil corta, el bajo costo. Sin embargo la estructura y fisiología ocular es relativamente diferente a la de los seres humanos.

Ya fue explicado que la importante asociación del glaucoma con la elevación de la PIO está ampliamente emparentada con la aparición y la progresión de la

enfermedad<sup>(52)(53)(54)</sup>. De hecho que los únicos tratamientos aprobados clínicamente para el glaucoma son el farmacológico y quirúrgico, tendientes ambos a reducir la PIO.

Por lo tanto, uno de los modelos experimentales para desarrollar glaucoma es el provocar hipertensión ocular en los animales. No existe un solo modelo experimental que sea ideal, cada uno de los sistemas existentes se han utilizado con éxito para descubrir importantes aspectos de la patología y podrían ser utilizados para desarrollar nuevas terapias para la enfermedad en el futuro.

Durante el desarrollo de la tesis doctoral se diseñaron distintos modelos experimentales in vivo y ex vivo para una evaluación biofarmacéutica de distintos sistemas oftálmicos de liberación de fármacos. Además se puso a punto un modelo experimental de hipertensión ocular en conejos -animales con una estructura anatómica ocular muy similar a la humana- para futuras evaluaciones de nuevos sistemas portadores de fármacos antiglaucomatosos.

## OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

### 1.- *Objetivo general*

- Evaluar el efecto de diferentes sistemas portadores de fármacos sobre la biodisponibilidad intraocular de fármacos.

### 2.- *Objetivos específicos*

- Diseñar y poner a punto nuevas técnicas de evaluación *in vitro* e *in vivo* de sistemas portadores de fármacos.
- Evaluar la irritación y potencial toxicidad ocular.
- Estudiar la eficacia de cada sistema en modelos animales.
- Determinar *ex vivo* (córnea aislada) los parámetros de permeación desde los diferentes sistemas.
- Poner a punto un modelo experimental de hipertensión ocular en conejos.

Capítulo 2

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## MATERIALES

A continuación se detallan los materiales utilizados durante el desarrollo de la investigación y sus principales características:

### 1.- Excipientes utilizados para la composición de los films bioadhesivos<sup>(55)</sup>

#### 1.1.- Carbomer (ácido poli-acrílico)

Polielectrolito lineal, derivado del ácido acrílico, el cual puede estar entrecruzado con alilazúcares. El grado de entrecruzamiento, el tipo de agente utilizado para tal fin, y los diferentes residuos tóxicos de la síntesis del polímero, dan lugar a los diferentes tipos y aplicaciones de Carbomer, (tabla 2.1):

**Tabla 2.1:** Diferentes tipos de Carbomer y sus respectivas aplicaciones.

Aplicaciones		Ej. Carbomer
Tópica y cosmética	Sólo uso externo	907,910,940,941,980, etc.
Oral y mucosa	Grado farmacéutico (uso interno)	934-P, 971-P, 974-P*

\*P: Polvo

Se seleccionó Carbomer 974P (CB) de BF-Goodrich (Cleveland, OH, USA), como polímeros formadores del sistema. El CB fue seleccionado debido a que este material fue ampliamente estudiado en nuestro grupo de investigación, por lo que se contaba con mucha información en cuanto a sus características como formador de matrices, geles y soluciones; sobre su estabilidad y compatibilidad, como así también acerca de sus propiedades como agente de liberación modificada<sup>(56)(57)(58)(59)</sup>.

Su síntesis genera un producto con bajo contenido de residuos de benceno (<0,01%) por lo que está clasificado como un CB apto para uso interno, de muy baja toxicidad. Los diferentes tipos de CB han sido de gran utilidad en distintos tipos de industrias, desde su desarrollo y síntesis en 1960. Es un polímero hidrofílico, que en contacto con agua se hincha y forma hidrogeles de alta viscosidad a muy bajas

concentraciones (desde 0.1%) y en un amplio intervalo de pH, entre 4,5 y 8. Compatible con principios activos ácidos, neutros y básicos, posee excelentes propiedades como agente estabilizante de suspensiones y emulsiones, excelente apariencia y aceptabilidad por los pacientes, disponibilidad y reproducibilidad lote a lote, lo que garantiza la calidad tanto de la materia prima como del producto elaborado.

La molécula de CB en estado sólido se encuentra fundamentalmente plegada<sup>(60)</sup>, posee una temperatura de transición vítrea relativamente elevada, 100 a 105°C que disminuye drásticamente cuando se pone en contacto con agua. La molécula se hidrata rápidamente y se despliega, generando un aumento de viscosidad. La neutralización (total o parcial) de los grupos carboxílicos presentes en la molécula de CB genera cargas negativas a lo largo de la misma, produciendo el despliegue total como consecuencia de la repulsión electrostática entre las cargas generadas. Esta reacción es rápida y produce instantáneamente un aumento de viscosidad en la dispersión. En la tabla 2.2 se resumen algunas propiedades fisico-químicas de CB.

**Tabla 2.2:** Propiedades fisicoquímicas de interés de Carbomer 974

Propiedad	Carbomer 974-P.
Peso Molecular	6x10 <sup>6</sup>
Punto de fusión	No funde, descompone a 260° C
Transición Vítrea (Tg)	100 – 105° C
Constante de disociación ácida (pKa)	6,0 (± 0,5)
peso equivalente	81,0 gr (± 0,4)
Toxicidad (DL50)	I.V.: 0,07 gr/kg (en conejos) P.O.: 2,5 gr/kg (en ratas y perros)
Viscosidad	1000 y 4000 mPa.s (sol. 0,2%)

## 1.2.- Carboximetilcelulosa sódica (CMC-Na)

Es un derivado semisintético de la celulosa. En soluciones de hidróxido de sodio se obtiene celulosa alcalina que luego se hace reaccionar con monocloroacetato de sodio para producir CMC-Na. El producto se presenta con diferentes viscosidades (alta, baja y media) y sus características principales se resumen en la tabla 2.3.

**Tabla 2.3:** Propiedades fisicoquímicas de Carboximetilcelulosa sódica.

Propiedades	Carboximetilcelulosa sódica
Peso molecular	90.000-700.000
Constante de disociación ácida (pKa)	4,30
Solubilidad	Insoluble en acetona, etanol. Fácilmente dispersable en agua formando dispersiones coloidales.
Viscosidad (25°C)	5-4500 mPa. S
Toxicidad	No tóxico ni irritante, la OMS no especifica una ingesta diaria aceptable por no considerarse de riesgo para la salud. DL50(ratas, oral): 27gr/kg

La sal sódica es soluble en agua a todas las temperaturas y precipita como ácido a valores de pH menores a 2. También es ampliamente utilizada en formulaciones de uso tópico y oral, principalmente como viscosante. Las soluciones acuosas viscosas son usadas para suspender polvos para aplicación tópica, administración oral y parenteral. También es usada como agente ligante y desintegrante en comprimidos, o agente estabilizante en emulsiones (tabla 2.4). Los grados de mediana viscosidad en concentraciones de 4 a 6% pueden ser usados para preparar geles. La CMC-Na es uno de los principales ingredientes de los adhesivos para parches de ostomía, cuidado de heridas y dermatológicos, donde es usado para absorber el exudado o el agua trans-epidermal y sudor. También es utilizada en productos cosméticos y alimenticios.

Terapéuticamente, 4-10 g de CMC-Na de mediana y alta viscosidad son utilizados como laxantes en dosis divididas.

**Tabla 2.4:** Usos de carboximetilcelulosa sódica en tecnología farmacéutica

Uso	Concentración (%)
Agente emulsificante	0,25 -1
Agente formador de geles	4-6
Inyectables	0,05-0,75
Soluciones orales	0,1-1
Ligante en comprimidos	1-6

Para la formación de los sistemas bioadhesivos diseñados en la presente investigación, se utilizó CMC-Na de ultra alta viscosidad grado 1500-4500 mPa.s (Fluka AG, Buchs SG, Switzerland).

### **1.3.- Polietilenglicoles (PEG)**

Los PEG son un grupo de polímeros formados por la reacción entre óxido de etileno y agua. Existen varios grados según su peso molecular (de 200 hasta 9000). Son compuestos muy utilizados en la industria farmacéutica en un amplio espectro de productos oftálmicos, parenterales, formulaciones tópicas, oral, rectal, etc.

Son esencialmente no irritantes para la piel (muy utilizados como base para pomadas) y pueden combinarse los distintos grados de PEG a los fines de obtener distintas consistencias (a temperatura ambiente por debajo de 600 son líquidos y por encima de 1000 son sólidos). Son muy utilizados como base de supositorios. En formulaciones sólidas (comprimidos), PEG3000 se lo emplea como ligante de la formulación y plastificante de granulados.

Como desventaja poseen una muy alta reactividad química, conferida por sus dos grupos OH terminales (reacciones de esterificación) lo que los hace incompatibles con ciertos antibióticos (penicilina, bacitracina), conservantes (parabenos), colorantes, etc. Como ventaja son esencialmente no tóxicos y no irritantes.

Los PEG necesarios para desarrollar el sistema portador bioadhesivo fueron: PEG 400 y PEG 600, éste último como parte integrante del recubrimiento del film bioadhesivo.

### **1.4.- Poloxamer (POL)**

Es un surfactante no iónico formado por copolímeros de polioxietileno (segmento hidrofílico) y polioxipropileno (segmento hidrofóbico) ampliamente utilizado como agente solubilizante y humectante. Existen distintos tipos de POL químicamente similares que solo se diferencian por el porcentaje relativo de los bloques de propileno y etileno.

Debido a su estructura anfifílica, éstos polímeros tienen propiedades tensioactivas que los hacen útiles en aplicaciones industriales. Entre otras cosas, se pueden utilizar para aumentar la solubilidad en agua de sustancias hidrofóbicas o para aumentar la miscibilidad de dos sustancias hidrofóbicas diferentes. Por esta razón, estos polímeros se utilizan comúnmente en aplicaciones industriales, cosméticos y productos farmacéuticos. También han sido evaluados para diversas aplicaciones de administración de fármacos ya que son considerados no tóxicos y no irritantes.

El tipo de POL requerido fue el 407 que se caracteriza por presentar un rango de fusión 52 a 57°C, su forma física es sólida y tiene un promedio de peso molecular entre 9840 y 14600.

### **1.5.- Eudragit (Eu)**

Es un copolímero lineal constituido por grupos dimetil-amino-metacrilatos y ester de metacrilato. Es utilizado mayoritariamente para el recubrimiento de cápsulas y comprimidos destinados a la vía oral. Dependiendo del tipo de polímero usado los recubrimientos son diferentes.

El Eu RS PO seleccionado para el recubrimiento de films en el presente trabajo, posee baja permeabilidad y se usa para liberación sostenida de fármacos. Es un copolímero de acrilato de etilo, metacrilato de metilo y un bajo contenido de ester del ácido metacrílico con un 5% de los grupos funcionales de amonio cuaternario. Los grupos de amonio están presentes como sales y dan lugar a un aumento del pH independiente de la permeabilidad del polímero. Es un polvo fino de color blanco, insoluble en agua; soluble con alcohol y acetona. Los films preparados a partir de Eu RSPO son ligeramente permeables al agua. Las soluciones son incoloras o ligeramente de color amarillo. Tienen un ligero olor a amina. También son usados en formulaciones tópicas ya que se los considera un material no tóxico y no irritante.

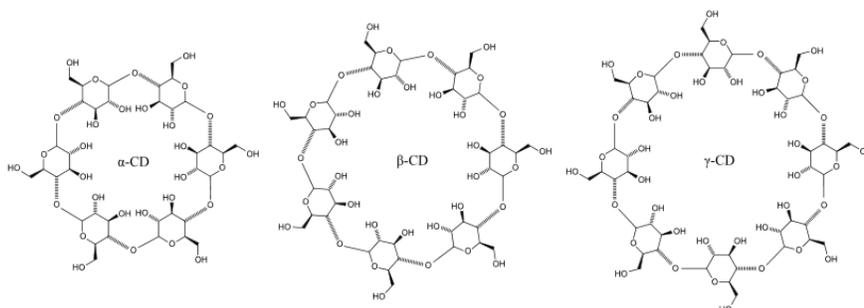
## 2.-Complejos de inclusión (complejo ternario).

### 2.1.- Formas comunes de ciclodextrinas

Las CD son una familia de oligosacáridos cíclicos que se obtienen por degradación enzimática del almidón. La enzima amilasa del *Bacillus macerans* participa en la síntesis, dando un crudo que contiene una mezcla de  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD, junto con pequeñas cantidades de otras CD con más de 8 unidades de glucosa<sup>(61)</sup>. Por precipitación selectiva, la fracción  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD, puede separarse del crudo mediante la adición de determinados solventes orgánicos<sup>(62)</sup>.

La  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD contienen 6, 7 y 8 residuos de glucopiranososa<sup>(63)</sup>, respectivamente, y se las denomina CD nativas. Ver figura 2.1. Las características estructurales y las propiedades fisicoquímicas más importantes de  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD se presentan en la tabla 2.5.

La  $\beta$ -CD es la más comúnmente utilizada especialmente por su costo, aunque es la menos soluble. No debe ser utilizada en las formulaciones parenterales por ser nefrotóxica. Es por esto que se utiliza principalmente en forma de comprimidos y cápsulas. Particularmente para uso oftalmológico se ha demostrado que los derivados  $\beta$ -hidroxi y  $\gamma$ -CD son capaces de solubilizar diversos fármacos lipofílicos insolubles en agua<sup>(64)(65)</sup>, mejorando la absorción ocular, la estabilidad acuosa y reduciendo la irritación local; estas ventajas permiten mejorar la biodisponibilidad de dichos fármacos<sup>(66)</sup>.

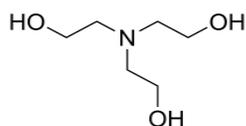


**Figura 2.1:** Esquema de diferentes formas de ciclodextrinas: izquierda:  $\alpha$ -ciclodextrina; centro:  $\beta$ -ciclodextrina; derecha  $\gamma$ -ciclodextrina.

**Tabla 2.5.** Características estructurales y propiedades fisicoquímicas de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -Ciclodextrinas

	Tipos de Ciclodextrinas		
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Peso Molecular	972	1135	1297
Solubilidad en agua, g/100 ml, 25°C	14,5	1,85	23,2
Diámetro de la cavidad, Å	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Volumen de la cavidad, Å <sup>3</sup>	174	262	427
Altura, Å	7,9	7,9	7,9
Moléculas de agua en la cavidad	6	11	17
pKa (por potenciometría) a 25°C	12,332	12,202	12,081
Rango de fusión en °C	255-260	255-265	240-245

## 2.2.- Trietanolamina (TEA)



Trietanolamina, a menudo abreviado como TEA, es un compuesto químico orgánico que es tanto una amina terciaria y un triol. Un triol

es una molécula con tres grupos alcohol. Al igual que otras aminas, TEA es una base fuerte debido al par de electrones en el átomo de nitrógeno. TEA se produce por la reacción del óxido de etileno con amoníaco, también se producen etanolamina y dietanolamina. En farmacia se utiliza como agente alcalinizante y emulsificante. En formulaciones farmacéuticas tópicas puede actuar incluso como principio activo, en inyectables para formación de sales y en preparaciones analgésicas tópicas<sup>(67)</sup>. También sirve como un balanceador del pH en muchos productos cosméticos diferentes, ejemplo: cremas limpiadoras, lociones para la piel, geles para los ojos, cremas hidratantes, champús, espumas de afeitar, etc.

Reacción adversa: ocasionalmente puede producir alergia e irritación local<sup>(68)(69)(70)(71)(72)</sup>.

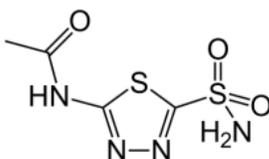
### 3.- Derivados del ácido ascórbico (6-O-dodecildecanoato de ascorbilo)

#### 3.1.- Laurato de Ascorbilo

Los derivados lipofílicos de Vitamina C<sup>(73)</sup> han sido evaluados para su uso potencial en tecnología farmacéutica. En la presente investigación fue sintetizado en nuestro laboratorio el Laurato de ascorbilo (ASC<sub>12</sub>) siguiendo un procedimiento ya informado en otras investigaciones<sup>(74)</sup>. Este implica una reacción de condensación en ácido sulfúrico a 40°C, entre el correspondiente ácido carboxílico y el grupo principal de C6OH L-ácido ascórbico. La pureza se evaluó utilizando cromatografía en capa delgada y análisis elemental. Todos los reactivos fueron de grado analítico. La elección del ASC<sub>12</sub> proviene de la capacidad de solubilización de fármacos poco solubles y su propiedad de promotor de la permeación<sup>(75)(76)</sup>.

### 4.- Fármacos.

#### 4.1.- Acetazolamida (AZM)



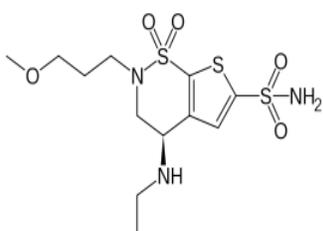
AZM (5-acetamido-1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamida) se obtuvo de Sigma® (99%, EE.UU.). La AZM es un potente y reversible inhibidor de la anhidrasa carbónica, efectivo en el control de secreciones de fluidos, por ejemplo el humor acuoso del ojo, como promotor de la diuresis y para ciertos trastornos convulsivos.

Químicamente es un derivado de la sulfonamida no bacteriostático. Es muy poco soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol y acetona; también posee baja permeabilidad, debido a esto es que se lo considera según la clasificación biofarmacéutica en un fármaco de clase IV. El rango de fusión de la AZM es entre 258-263°C y se acompaña de descomposición<sup>(77)</sup>.

El pico de concentración plasmática se encuentra dentro de las dos horas. La AZM no se metaboliza y el 90% es excretado vía renal. Una vez suministrada vía oral se distribuye ampliamente por todo el organismo, incluido el sistema nervioso central, por lo que produce numerosos efectos adversos<sup>(78)</sup>.

Acetazolamida es utilizada en oftalmología en forma oral (comprimidos de 250 mg), como fármaco muy eficiente para reducir la PIO. Sin embargo, debido a la alta prevalencia de efectos no deseados tales como: depresión, parestesias, trastornos gastrointestinales y acidosis metabólica entre otros, es que no se recomienda su uso en forma prolongada. Por esta razón se la reserva para tratamientos cortos, como ataques agudos de glaucoma o para reducir la PIO previo a una cirugía oftalmológica.

#### 4.2.- Brinzolamida 1% (Azopt®)



Este fármaco ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de la hipertensión ocular en el glaucoma. Es un derivado de la sulfonamida que inhibe la anhidrasa carbónica. La inhibición de esta enzima en los procesos ciliares del ojo produce una disminución de la secreción de humor acuoso, al reducir la formación de los iones bicarbonato, con la subsecuente reducción del transporte de sodio y fluidos.

Brinzolamida es absorbida en forma sistémica al ser aplicada en forma tópica en el ojo tres veces por día. Durante el uso crónico, brinzolamida se acumula en los glóbulos rojos al unirse a la anhidrasa carbónica, pero las concentraciones plasmáticas de brinzolamida y sus metabolitos generalmente están debajo del límite de detección (menos de 10 nanogramos/ml), la eliminación es renal. Como fármaco hipotensor ocular tiene una eficacia de alrededor del 20%<sup>(79)</sup> y está catalogada como categoría C para el embarazo. La seguridad y la efectividad para la brinzolamida 1% no están establecidas para los pacientes pediátricos.

Este fármaco fue incluido en los estudios *in vivo* e *in vitro* para evaluar comparativamente su efectividad con respecto a las formulaciones de acetazolamida desarrolladas en nuestro laboratorio. Se utilizó para tales fines la presentación comercial Azopt® (Brinzolamida 1%, Laboratorios Alcon®)

## 5.- Animales

Se utilizaron conejos albinos tipo New Zealand de 1,8 a 3,0 kg (n=108). Se les proporcionó alimentos y agua a voluntad en un recinto con temperatura controlada ( $21\pm 5^{\circ}\text{C}$ ). Fueron expuestos a ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El procedimiento de manejo animal estuvo conforme a la ARVO (Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología), a European Communities Council Directive (86/609/CEE) resolución sobre el uso de animales en la investigación, y el Comité de ética de protocolos experimentales en el uso de animales en proyectos científicos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

## METODOLOGÍA

### 1.- Obtención de los sistemas portadores de fármacos

#### 1.1.- Films Bioadhesivos

Como componentes principales para la formulación del film se utilizaron: Carbomer 974P, Polietilenglicol 400 y 600; Carboximetilcelulosa sódica de ultra alta viscosidad; Eudragit RSPO y Poloxamer 407. El fármaco utilizado fue *acetazolamida*. Estos materiales poliméricos son usualmente utilizados en la industria farmacéutica, conocidos por su inocuidad y propiedades bioadhesivas.

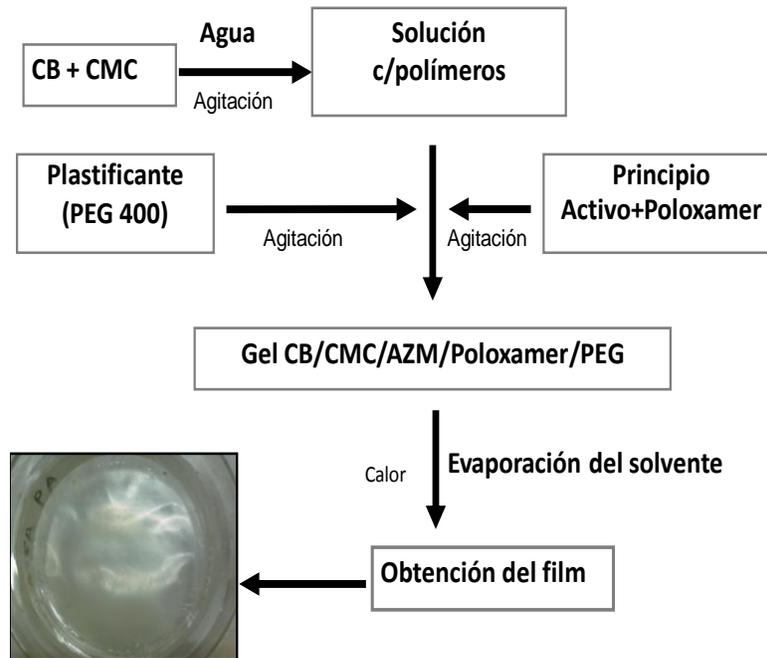
En la tabla 2.6 se destacan las proporciones de los componentes elegidos, tanto para los films sin recubrimiento (Film SR) como para los films recubiertos (film R). De acuerdo a estudios preliminares se consideró conveniente para el recubrimiento una ganancia del 10% del peso del film primario (film SR).

**Tabla 2.6:** Composición de los film seleccionados sin recubrimiento (Film SR) y con recubrimiento (Film R)

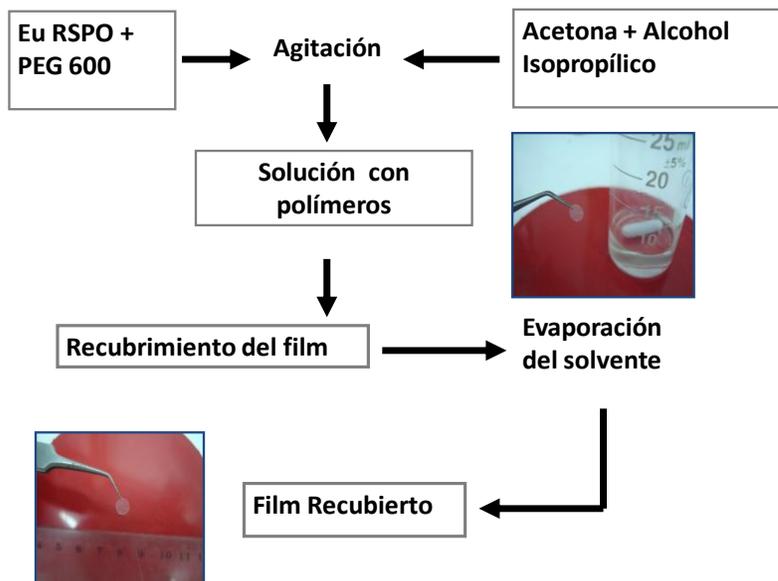
Componentes	Film SR (%)	Film R (%)
<b>Carbomer 974P</b>	30,67	27,9
<b>Carboximetilcelulosa Sódica</b>	30,67	27,9
<b>Poloxamer 407</b>	30,67	27,9
<b>Polietilenglicol 400</b>	4,3	3,9
<b>Acetazolamida</b>	3,7	3,35
<b>Eudragit RSPO</b>		7,36
<b>Polietilglicol 600</b>		1,73

La obtención de este sistema se realizó a través del método de evaporación de solvente<sup>(80)</sup>. En primera instancia se prepara un gel con los constituyentes del film, el cual mediante calor logra la evaporación del agua, dando lugar al sistema final. Este proceso es esquematizado en la figura 2.2.

**Primera Fase**



**Segunda Fase (recubrimiento)**



**Figura 2.2.** Primera y Segunda fase del método de obtención de los films bioadhesivos CB: Carbomer; CMC: carboximetilcelulosa; PEG: polietilenglicol; AZM: acetazolamida; Eu: Eudragit;

El proceso general comprende las siguientes etapas:

a) Se prepara una dispersión de ambos polímeros (CB/CMC-Na 1:1) en agua, con agitación constante hasta la obtención de una dispersión homogénea.

b) Por otro lado se realiza otra dispersión con PEG 400, AZM y POL con agitación.

c) Una vez obtenida una dispersión homogénea en ambos casos, se mezclan y se continúa la agitación por 18 horas.

d) Aplicación de vacío para desgasificar el sistema.

e) Se trasvasa el contenido a un molde adecuado y se lo deja en estufa (45°C) hasta la evaporación total del solvente.

f) Recubrimiento del film

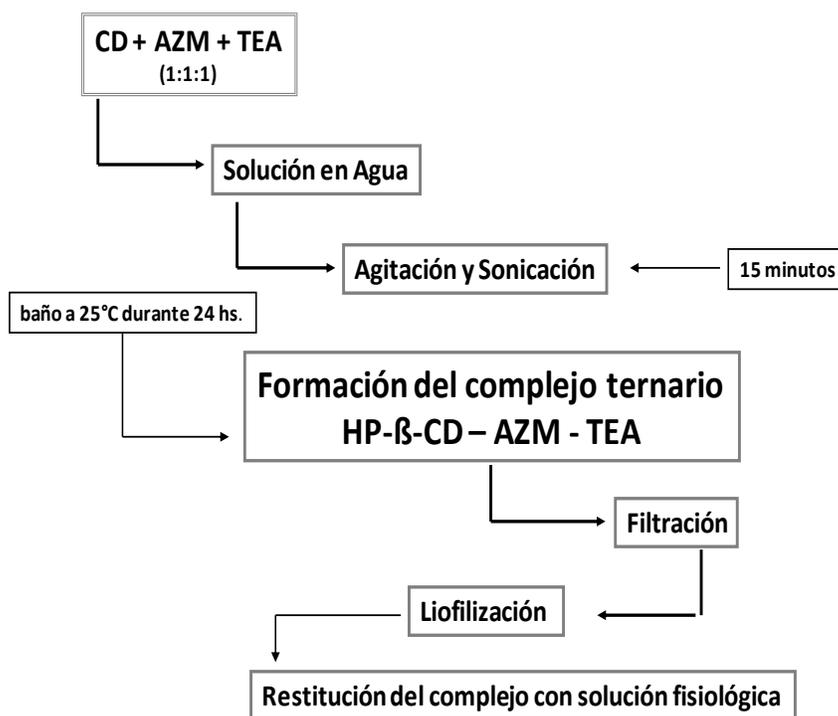
f.1.) Preparación de una dispersión de Eu RSPO (0,3 gr) y PEG 600 (0,07 gr) en partes iguales de Acetona (2,5 ml) y alcohol isopropílico (2,5 ml).

f.2.) Recubrimiento del film mediante inmersión directa del film primario en la solución antes mencionada. Se calculó el recubrimiento como la ganancia en peso porcentual con respecto al film no recubierto.

## 1.2.- Complejo ternario

Se utilizó Hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) (MW=1325 a 1400, el grado de sustitución molar 7,0, Roquette Argentina). TEA se obtuvo de Aldrich®. Todos los experimentos fueron realizados con reactivos y solventes de grado analítico.

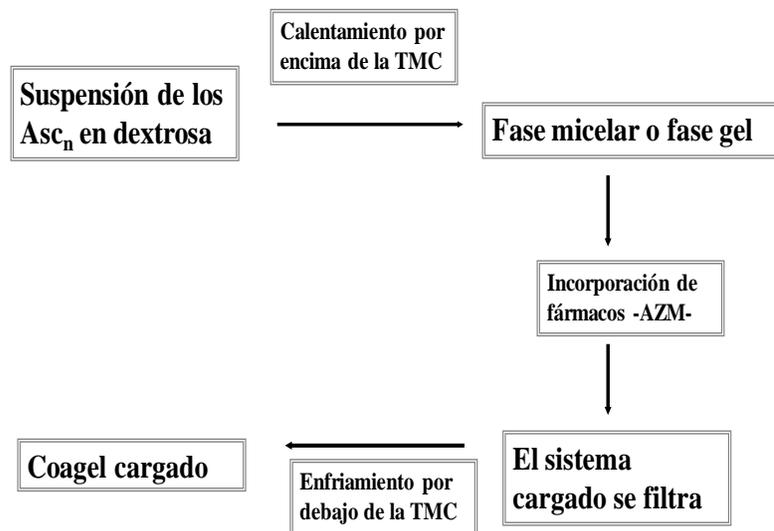
La preparación del complejo binario de AZM/HP- $\beta$ -CD se realizó en proporción de 1:1 molar y el complejo ternario AZM/HP- $\beta$ -CD/TEA en relación molar 1:1:1 por el método de secado por congelación<sup>(81)</sup>. El complejo AZM con TEA se preparó disolviendo cantidades equimolares de AZM y TEA en etanol, el mismo se elimina por vacío después del tratamiento con ultrasonidos durante 1 hora<sup>(82)</sup>. (Ver figura 2.3)



**Figura 2.3.** Método de obtención del complejo ternario. CD: ciclodextrinas; AZM: acetazolamida; TEA: trietanolamina; HP-β-CD—AZM-TEA: complejo ternario.

### 1.3.- Cristales líquidos liotrópicos (coageles)

Los Coageles fueron preparados por calentamiento de una suspensión acuosa conteniendo ASC<sub>12</sub> (2% w/w) y glucosa monohidrato (5% w/w) por arriba de la temperatura micelar crítica (TMC = 47.3 °C, ASC<sub>12</sub>)<sup>(83)</sup> y luego se adicionó AZM en diferentes concentraciones (0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%, 0,5% w/w) antes que la fase gel esté formada. El sistema fue mantenido por sobre la TMC durante dos horas, con agitación suave para lograr la completa solubilización del fármaco. Se permitió que el sistema alcance temperatura ambiente para de este modo obtener el coagel. Ver figura 2.4.



**Figura 2.4.** Método de obtención del coagel cargado con Acetazolamida (AZM). ASCn: 6-O-alkil derivados del ácido ascórbico; TMC: temperatura micelar crítica

## 2.- Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. El equipamiento utilizado consistió en una bomba (Agilent 1100) y un detector de la misma marca (Agilent Technologies, EE.UU.) La cuantificación se realizó a través de determinación de la absorción U.V. del fármaco a una longitud de onda de 245 nm. El sistema cromatográfico fue realizado con una columna de fase inversa LunaTM C18 (250 x 4,6 mm, 5 micras, Phenomenex TM EE.UU.) y con una precolumna de 2 x 8 mm del mismo material. La fase móvil, con un caudal 1 ml/min, consistió en 20% de acetonitrilo y acetato de sodio 0,1 M ajustado a pH 4,5 con ácido acético glacial, filtrada y desgasificada antes de su uso. La columna fue ajustada a 25°C, y el tiempo de retención fue de 5,2 min.

### 3.- Análisis por espectrofotometría ultra-violeta visible

El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia. Todas las sustancias pueden absorber energía radiante. La absorción de las radiaciones UV depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química. Por lo que es de gran utilidad para caracterizar las soluciones en la región ultravioleta-visible del espectro y se rige por una ley de Beer-Lambert que responde a la siguiente expresión matemática:  $A = E \cdot b \cdot C$

Donde A es la Absorbancia, E es el Coeficiente de extinción (Característico de cada sustancia), b es el espesor de la cubeta (cm) y C es la Concentración (moles/l). Una vez seleccionada la longitud de onda máxima a la que absorbe el fármaco (267 nm) se realiza la curva de calibrado, en donde se representan los valores de absorbancia en función de la concentración, se parte de una solución madre de concentración conocida. Se realizan tres determinaciones de cada punto. Es importante destacar que para este intervalo de concentraciones se obtiene una recta que pasa por el origen de coordenadas cumpliendo estrictamente la ley de Beer. Para una muestra de concentración desconocida tan solo hay que medir su absorbancia a la longitud de onda del máximo y extrapolar en la curva de calibrado el valor de la concentración.

### 4.- Capacidad de carga

Las suspensiones de ASC<sub>12</sub> se calentaron por encima de la Temperatura Micelar Crítica hasta formar la fase gel. Entonces, se incorporó AZM a las muestras, luego de 2 horas, las muestras se filtraron, y se dejó al sistema alcanzar la temperatura ambiente. Por último, se pesó una cantidad exacta de coagel cargado, se diluyó en etanol y se midió la absorbancia de AZM en un espectrofotómetro UV. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Al igual que para los coageles y las ciclodextrinas, se seleccionó AZM como fármaco modelo para ser incorporado al film bioadhesivo. La cantidad de AZM incorporada en la formulación fue establecida de acuerdo a los antecedentes de su utilización clínica y a las dosis usualmente utilizadas en fármacos análogos de aplicación tópica (Dorzolamida y Brinzolamida).

## 5.- Osmolaridad y pH

Los valores de pH de las formulaciones se midieron utilizando instrumental Hanna HI 112. Las mediciones de la osmolaridad se realizaron por triplicado con un Osmómetro Osmomat 030-D crioscópico, utilizando una solución de cloruro de sodio como referencia (0,303 osmoles / kg). Se midió pH y osmolaridad de: Laurato de Ascorbilo 2% cargado con AZM 0,1% (COA-AZM 0,1%), Laurato de Ascorbilo 2% cargado con AZM 0,4% (COA-AZM 0,4%), y por último AZM 0,1% solubilizado en ringer (AZM-R).

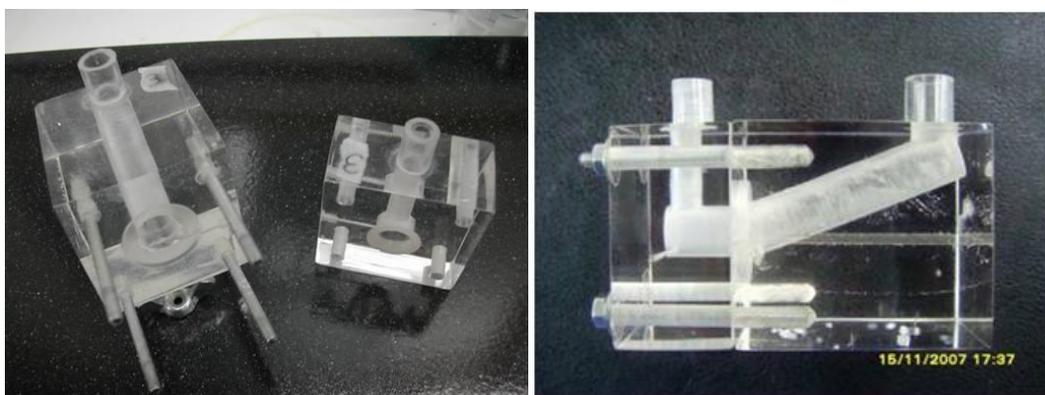
También se midió la osmolaridad de la muestra comercial AZOPT® 1%, de los complejos binarios (AZM/TEA), (AZM/HP-β-CD), y del complejo ternario AZM/HP-β-CD/TEA

## 6.- Estudios de liberación y permeación

Ambos ensayos se realizan en celdas bicompartimentales<sup>(84)</sup> (figura 2.5). Estos dispositivos consisten en dos compartimentos: uno con el medio donador y otro con el medio receptor; 2 y 5 ml respectivamente. El medio receptor contiene una solución de Ringer a un pH neutro. La temperatura del ensayo se mantiene controlada ( $35^{\circ}\pm 0,5$ ), con una constante oxigenación y burbujeo (mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>) a fin de establecer una agitación constante y mantener la viabilidad de la córnea.

La córnea fue obtenida de conejos albinos (2-3 kg). La eutanasia de los conejos se realizó previa sedación profunda con una mezcla de ketamina 0,8 ml/kg (Ketafine® de laboratorio Brouwer) y xilacina 2% 0,1 ml/kg (Kensol® de laboratorio Konig); en segundo

término se los introdujo en una campana de acrílico herméticamente cerrada con 90% CO<sub>2</sub> y 10% O<sub>2</sub>, hasta constatar la muerte del animal. Con instrumental quirúrgico específico se retiraron las córneas con un remanente escleral de 2 mm y las mismas se montaron en las celdas inmediatamente después de la extracción, con el epitelio corneal hacia el medio donador. Posteriormente se colocó la muestra a ensayar en el medio donador (1 ml) y una alícuota de 4 ml de Ringer en el receptor, respetando las condiciones antes mencionadas. Se extrajo del medio receptor 1 ml de muestra en tiempos específicos establecidos y se lo reemplazó por la misma cantidad de ringer fresco.



**Figura 2.5.** Fotografías de una celda bicompartmental. A la izquierda se puede observar la celda desmontada con sus dos compartimentos, y a la derecha la celda ensamblada.

La diferencia entre un ensayo de liberación y otro de permeación radica en que en el primero los compartimentos están limitados por una membrana semi-permeable de acetato de celulosa (Sigma® 12000), que permite caracterizar la cinética y el mecanismo del proceso de liberación del fármaco desde el sistema portador específico. La membrana semipermeable retiene el vehículo en el compartimento donador pero permite la libre difusión del fármaco.

A diferencia de lo anterior, en los estudios de permeación los compartimentos se encuentran separados por córneas aisladas de conejos. El objetivo de este ensayo consiste en determinar la cantidad de fármaco que atraviesa la membrana corneal, evaluando de este modo la permeabilidad del fármaco. La concentración de fármaco (AZM) tanto permeado como liberado se midió por espectrofotometría UV a 267 nm.

En este ensayo se midió la liberación y permeación de AZM a partir de los coageles y del sistema ternario.

El muestreo fue realizado extrayendo 1 ml de la solución del compartimento receptor en los tiempos 15, 30, 45, 60, 90, y 120 minutos, por cuadruplicado; y reemplazado por la misma cantidad con medio fresco. Las muestras se filtraron a través de una membrana microporosa de 0,45 micras, se mantuvieron a -4°C hasta su posterior análisis por HPLC. Las condiciones Sink<sup>(85)</sup> fueron mantenidas durante todo el tiempo del ensayo.

El coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{cap}$ , cm/s) de la AZM se determinó por:

$$P_{cap} = \frac{\Delta Q}{\Delta t \cdot C_0 \cdot A \cdot 60}$$

donde  $C_0$  es la concentración inicial de la AZM en el compartimento donador, y  $A$  es el área de la córnea. Para calcular el coeficiente de permeación aparente en el presente estudio,  $A$ , fue de 0,785 cm<sup>2</sup>.  $\Delta Q / \Delta t$  es la cantidad de fármaco permeado a través de la córnea intacta en función del tiempo. El *lag time* fue calculado por extrapolación de la porción lineal en el eje de las x.

El flujo ( $J$ ) puede ser calculado mediante la fórmula:  $J = C_0 P_{cap}$ .

El diseño experimental para la liberación de los films bioadhesivos fue diferente, debido a las propiedades de los mismos, por lo que no se utilizaron las celdas bicompartimentales. Para este experimento se cortaron discos de 8 mm de diámetro (20 muestras promedio por molde). Se utilizaron discos obtenidos de dos moldes diferentes. Luego de pesar cada disco con microbalanza se recubrieron de la forma ya mencionada y se colocaron en tubos de ensayo conteniendo 5 ml de solución ringer\* bajo agitación durante 5 horas. Cada punto de tiempo evaluado se realizó por triplicado. Pasado este lapso de tiempo, se determinó la concentración de AZM mediante espectrofotometría UV (267 nm).

---

\* La Solución de Ringer fue preparada a partir de (p/v): 0,44 Cloruro de Sodio, 0,368 Fosfato diácido de sodio, 1,51 Fosfato ácido disódico, 6 x 10<sup>-3</sup> nitrato de sodio.

## 7.- Medición de Presión Intraocular

La presión intraocular (PIO) se midió en mm Hg con un tonómetro de aplanación Perkins MK2 (Clement Clarke, Inglaterra) calibrado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Antes de realizar la medición, se colocó un blefarostato infantil para mantener los párpados abiertos durante el examen. Una mezcla de 30  $\mu$ l de anestésico tópico (0,5% de solución de HCl proparacaína) y solución de fluoresceína (0,25% Solución de Grant<sup>®</sup>, Alcon<sup>®</sup> Montevideo-Uruguay) fue aplicada en el ojo del conejo antes de cada medición, para disminuir la molestia refleja que el animal manifiesta al apoyar el tonómetro en la córnea. Los animales fueron sometidos al procedimiento experimental previamente para lograr su ambientación. Todas las mediciones individuales se realizaron por cuadruplicado tomándose la media como dato final. Los intervalos de tiempo fueron determinados según cada sistema utilizado. Una vez finalizado el ensayo, se permitió descansar 7 días a los animales antes del siguiente esquema experimental. Todos los estudios se llevaron a cabo en la misma franja horaria del día.

En el caso específico de los sistemas desarrollados con coageles y los complejos de inclusión con ciclodextrinas se aplicó en ambos ojos una dosis de 50  $\mu$ l de las siguientes formulaciones: CAO-AZM 0,1%, CAO-AZM 0,4% y solución de Ringer (AZM-R) en forma tópica. Para el caso de los sistemas de inclusión se instiló la misma dosis en ambos ojos del complejo ternario (AZM/HP- $\beta$ -CD/TEA), y los complejos binarios (HP- $\beta$ -CD/AZM y TEA/AZM). También se utilizó como control 50  $\mu$ l de Azopt<sup>®</sup> (Brinzolamida, 1% w/v). Cada ensayo fue realizado en ciclos de seis animales (12 ojos), las mediciones tonométricas se realizaron en los tiempos 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 240 minutos. La línea de base normal de PIO de cada animal se estableció antes del tratamiento. Los experimentos se llevaron a cabo siempre en el mismo momento del día.

Para cada sistema portador de fármaco se utilizó el modelo estadístico más adecuado, según el diseño empleado para evaluar la PIO en los conejos normotensos.

Análisis estadístico para coageles y complejos de inclusión con ciclodextrina.

Se ajustó un modelo lineal mixto considerando al conejo como variable aleatoria (conejo), la variabilidad se descompuso en fármaco\_conejo (o sea conejo) y ojo anidado dentro de la misma, incluyendo una covariable. Se aplicaron los criterios de verosimilitud penalizada (AIC y BIC) y las herramientas de diagnóstico para determinar la validez del modelo.

Componentes del modelo:

Factores Fijos: Grupo, Tiempo y su Interacción (Grupo\*Tiempo)

Covariable: PIO (tiempo 0)

Factor Aleatorio: Conejo

El modelo estadístico seleccionado:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_j + \delta_k + \alpha\delta_{jk} + \varphi_l + \beta\chi_{jkl} + \varepsilon_{ijkl}$$

donde:  $j=1\dots 5$ ;  $k=1\dots 7$ ;  $l=1\dots 6$ ;  $\varphi_l \approx N(0, \sigma^2\varphi)$ ;  $\varepsilon_{ijkl} \approx N(0, \sigma^2\varepsilon)$

$\alpha_j = \text{Grupo}$ ;  $\delta_k = \text{Tiempo}$ ;  $\alpha\delta_{jk} = \text{Grupo} * \text{tiempo}$ ;  $\varphi_l = \text{conejo}$ ;  $\beta\chi = \text{PIO}$

Para los films bioadhesivos se diseñó el siguiente esquema de medición de PIO: se ensayaron 3 tipos de films: uno sin fármaco, denominado control, y los otros dos con AZM, de los cuales uno era sin recubrimiento (film SR) y el otro recubierto (film R). El procedimiento para medir la PIO fue el mismo para los tres casos. Cada conejo (n=12) fue sometido a 3 mediciones, la primera se realizó 30 minutos antes de que se aplique el film, la segunda medición en el momento de aplicar el film y la tercera a los 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 o 420 minutos. Por tal motivo se trabajó con subgrupos de conejos en diferentes días, dejando transcurrir por lo menos 7 días antes de que un conejo volviera a ser utilizado. Finalmente se obtienen para cada tratamiento, tres mediciones (n=3) para cada punto de tiempo (10 puntos). El tiempo es luego codificado cómo: -0.5, 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7. Los dos primeros tiempos -0,5 y 0 sirven de control, y se promedian en la base, se designó a esta variable como PIO.

Análisis estadístico para Films bioadhesivos.

Se ajustaron diferentes modelos con el objetivo de seleccionar el más adecuado para realizar inferencias acerca de las medias (comparar medias de la PIO, de cada film, estudiar el efecto del tiempo, etc.). Para la selección se utilizaron los criterios de verosimilitud penalizada (AIC y BIC).

Componentes del modelo:

Factores Fijos: Grupo, Tiempo y su Interacción (Grupo\*Tiempo)

Covariable: PIO (promedio de los tiempos -0,5 y 0)

Factor Aleatorio: Conejo

El modelo seleccionado fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_j + \delta_k + \alpha\delta_{jk} + \varphi_l + \beta\chi_{jkl} + \varepsilon_{ijkl}$$

donde:  $j=1...3$ ;  $k=1...8$ ;  $l=1...12$ ;  $\varphi_l \approx N(0, \sigma^2 \varphi)$ ;  $\varepsilon_{ijkl} \approx N(0, \sigma^2 \varepsilon)$

$\alpha_j = \text{Grupo}$ ;  $\delta_k = \text{Tiempo}$ ;  $\alpha\delta_{jk} = \text{Grupo} * \text{tiempo}$ ;  $\varphi_l = \text{conejo}$ ;  $\beta\chi = \text{PIO}$

## 8.- Irritación Ocular

Para evaluar la irritación que potencialmente podían producir los 3 sistemas bajo estudio se empleó el Test de Draize<sup>(86)</sup>, modificado<sup>(87)</sup>. (Ver tabla 2.7). La principal modificación con respecto al método original es la utilización de un oftalmoscopio binocular indirecto (Neitz® Tokyo Japan) y lupa de aumento de 20 Dioptrías (Nikon® Tokyo, Japan), permitiendo evaluar microlesiones corneales y conjuntivales ayudados con marcadores como la fluoresceína (Solucion de Grant®-Laboratorio Alcon®).

En este test se utilizaron ciclos de 3 conejos New Zealand para cada formulación, con un peso promedio entre 2-2,5 kg. 50 µl de la formulación en estudio (coageles, complejos de inclusión con ciclodextrinas y Azopt®) fue instilado en el saco conjuntival del ojo derecho del conejo. También se colocó Lauril sulfato de sodio al 2% (SDS 2%) como control positivo. El ojo izquierdo se utilizó como ojo control mediante la instilación de una solución salina (NaCl 0,9%). En el caso de los Films se colocó un disco de 4 mm de diámetro en el fondo de saco del ojo derecho.

Durante la pre y post exposición se evaluó la córnea, conjuntiva e iris mediante oftalmoscopia binocular con luz blanca y filtro azul. Las observaciones fueron realizadas a los 30, 60, 120 y 180 minutos, de acuerdo con una escala de puntajes (tabla 2.8), basado en el Test de Draize. En función de lo antes mencionado se pudo clasificar la gravedad de las lesiones oculares de acuerdo a una escala según su intensidad (“score”).

**Tabla 2.7:** Test de Draize

<b>Córnea</b>	
<i>(A) Grado de densidad de la opacidad</i>	<i>Puntaje</i>
Áreas dispersas o difusas con detalles del iris claramente visible.	1
Áreas translucidas fácilmente discernibles, detalles del iris claramente visible.	2
Áreas opalescentes, detalles del iris no visible, tamaño de la pupila apenas discernible.	3
Opacidad, iris invisible.	4
<i>(B) Área de la córnea involucrada</i>	
Un cuarto (o menos) pero no cero.	1
Mayor a un cuarto y menos que un medio	2
Mayor que un medio y menos que tres cuartos .	3
Mayor que tres cuartos hasta toda el área.	4
<b>Puntaje: A x B x 5. (puntaje máximo 80)</b>	
<b>Iris</b>	
<i>(A) Valores</i>	
Pliegues superior a lo normal, congestión, inflamación, inyección ciliar (Alguno, todos o combinación de estos).	1
No reacción a la luz, hemorragia, destrucción severa	2
<b>Puntaje: A x 5. (Puntaje máximo: 10)</b>	
<b>Conjuntiva</b>	
<i>(A) Enrojecimiento (referido solamente a la conjuntiva palpebral)</i>	
Vasos definitivamente inyectados superior a lo normal.	1
Más difuso, rojo carmesi profundo, vasos individuales no fácilmente discernibles.	2
Rojo fuerte difuso	3
<i>(B) Quemosis</i>	
Cualquier inflamación superior a lo normal (incluyendo la membrana nictitante)	1
Inflamación obvia con parcial eversión de los párpados .	2
Inflamación con párpados entrecerrados.	3
Inflamación con párpados entrecerrados a completamente cerrados.	4
<i>(C) Secreciones</i>	
Cualquier cantidad diferente de la normal	1
Secreciones con humectación de los párpados y pelos adyacentes a los párpados.	2
Secreciones con humectación de los párpados y un área considerable alrededor de los ojos .	3
<b>Puntaje: (A + B + C) x 2 (Puntaje máximo: 20)</b>	

**Tabla 2.8:** Grado de irritación acorde al puntaje obtenido en el test de Draize

Puntaje	Irritación
De 0 a 8	Ninguna
De 9 a 20	Leve
De 21 a 40	Leve a moderada
De 41 a 60	Moderada
De 61 a 80	Grave
Mayor de 81	Muy grave
Puntaje máximo	110

## 9.- Toxicidad Ocular

Se realizaron estudios histológicos de córnea. Las córneas fueron retiradas a los 120 minutos después de la aplicación de la muestra y los tejidos fueron procesados para su evaluación microscópica/histológica. La fijación se realizó con 10% de formol en una solución tampón a pH=7.4. Posteriormente se lo lavó con xilol y se incluyó en parafina para luego ser seccionados a 5 micras. Las muestras fueron posteriormente teñidas con hematoxilina y eosina, y examinadas bajo un microscopio (Olympus Bx 41 TF, Tokio, Japan).

Se evaluaron tres series de muestras:

- A- Solución ringer.
- B- Lauril sulfato de sodio al 2%. (SDS 2%)
- C- Coagel al 2%.

## 10.- Estabilidad del fármaco en el film

La estabilidad de la AZM fue evaluada retirando muestras iguales de los films. Estas muestras fueron almacenadas herméticamente a temperatura ambiente con y sin exposición a la luz y en estufa (50°C) con y sin exposición a la luz. Se determinó la concentración de AZM en función del tiempo con espectrofotometría UV-V. (Ver análisis por espectrofotometría ultra-violeta visible). Se graficó la media  $\pm$  ER con un n=3 por cada condición preestablecida.

## 11.- Estudios de Homogeneidad

Para este experimento se utilizaron 6 films de 10 cm de diámetro, cortados en discos de 4 mm de diámetro (35 muestras promedio por molde), cada disco se pesó en microbalanza (microbalance Orion Cahn C-33, Thermo Scientific, Japan), luego se pusieron en tubos de ensayo con 10 ml de ringer y se agitaron durante 3 días. Se realizaron mediciones de AZM liberada con espectrofotometría UV-V (267 nm) a las 72 hs. Se tomó un índice resultado de la relación entre el peso en seco del film y la absorción del fármaco. A Dicho índice ( $H$ ) se le aplicó el test estadístico no paramétrico: Kolmogorov-Smirnov, para calcular el grado de significancia estadística.

$$H = \frac{P}{A}$$

donde  $H$ : es el índice evaluado,  $P$ : es el peso en mg del film,  $A$ : es la absorción

## 12.- Estudio de Bioadhesión *in vivo*

A los fines de estimar la bioadhesión de los films en mucosas oculares de animales se utilizó el siguiente diseño experimental:

Se seleccionaron 12 conejos y se los dividió en 2 grupos de 6 conejos cada uno. En el primer grupo se colocó en el fondo de saco de cada ojo un disco de 4 mm de diámetro de films sin recubrir (film SR), y en el segundo grupo, de la misma forma se insertaron films con recubrimiento (Film R). Se observó el comportamiento de los films, evaluando cambios de tamaño, espesor y adhesión, mediante oftalmoscopia binocular y lente de aumento. Para valorar la adhesión y cambio de forma del film se utilizó una tabla desarrollada en el grupo de trabajo (ver tabla 2.9 y 2.10).

**Tabla 2.9:** Referencia (score) utilizado para ponderar el grado de adherencia *in vivo* del film.

<b>Score de Adherencia</b>	<b>Comportamiento del film en el ojo</b>
<b>0</b>	Se desplaza espontáneamente fuera del ojo.
<b>1</b>	Se mantiene en el fondo de saco, pero no se adhiere a la conjuntiva bulbar o a la palpebral en forma permanente.
<b>2</b>	Se mantiene en el fondo de saco, y se adhiere a una conjuntiva en particular aunque se realice maniobras de movimiento palpebral.
<b>3</b>	Igual al anterior pero en este caso se mantiene el film adherido aunque las maniobras de frotación palpebral sean forzadas.
<b>4</b>	Se mantiene adherido aunque se intente desplazarlo con una espátula.

**Tabla 2.10:** Referencia (score) utilizado para ponderar el cambio de tamaño y espesor del film *in vivo*

<b>Score para tamaño y espesor</b>	<b>Comportamiento del Film en el ojo</b>
<b>0</b>	No presenta variaciones.
<b>1</b>	Aumenta en 1/4 de su tamaño original.
<b>2</b>	Aumenta un 1/2 de su tamaño original.
<b>3</b>	Duplica su tamaño.

## MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTENSIÓN OCULAR EN CONEJOS

Se ha puesto a punto el modelo experimental de glaucoma, basado en la cauterización de las venas episclerales en conejos albinos tipo New Zealand, utilizando como referencia el diseño de Sharma y col. en ratas<sup>(88)</sup>. Este método *en conejos* no ha sido descrito con anterioridad en la literatura.

### **Materiales:**

Animales: Conejo albino tipo New Zealand de 2 a 3 kg de peso (n= 6)

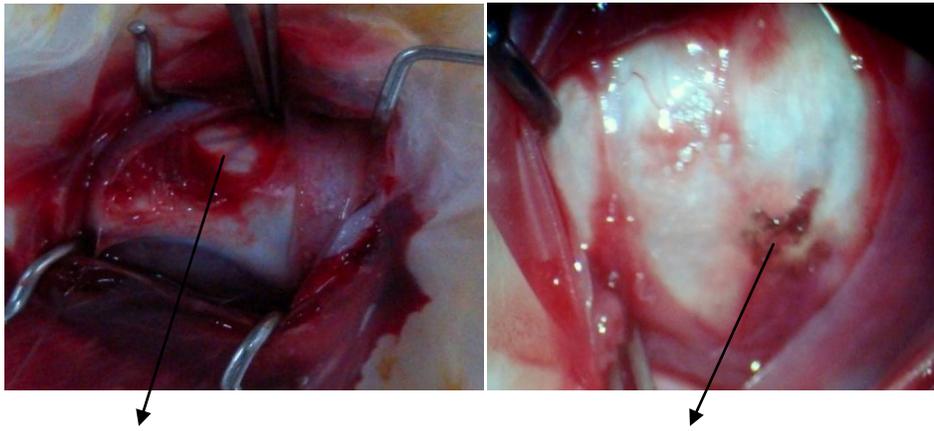
Instrumental: Microscopio quirúrgico Carl Zeiss Germany, cauterio eléctrico, instrumental quirúrgico oftalmológico, tonómetro manual Perkins (Clement Clark).

### **Métodos:**

Se indujo anestesia general con Ketamina 0,8 cc/kg + Xilacina 0,2 cc/kg vía intramuscular. Se aisló el campo quirúrgico. Inmediatamente después de realizar un punto de tracción para exponer la zona quirúrgica, con tijera tipo Westcott se llevó a cabo una peritomía conjuntival de los 360 grados para localizar los músculos rectos y desplazar los mismos con gancho de estrabismo. Con este procedimiento se logra exponer en el campo quirúrgico las cuatro venas episclerales, las cuales fueron debidamente cauterizadas. Ver figura 2.6. Posteriormente se procedió al cierre de conjuntiva con puntos reabsorbibles. Se deja a los conejos con antibioticoterapia y antiinflamatorios en forma tópica. El esquema consistió en operar el ojo derecho de 6 conejos, dejando el contralateral como control.

Medición de PIO: se consideró para cada tiempo el promedio del valor de 4 tomas repetitivas en ambos ojos con tonómetro manual antes de realizar el procedimiento y durante 60 días posteriores al mismo, en intervalos de 7 días.

Para el análisis estadístico se utilizó el ANAVA propuesto por Kruskal Wallis que permite realizar un análisis de varianza no paramétrico a una vía de clasificación.



Venas Epiesclerales sin cauterizar

Venas Epiesclerales cauterizadas

**Figura 2.6:** Fotografías de un ojo de conejo en la que se observa las venas episclerales sin cauterizar (izquierda) y posteriormente cauterizadas (derecha).

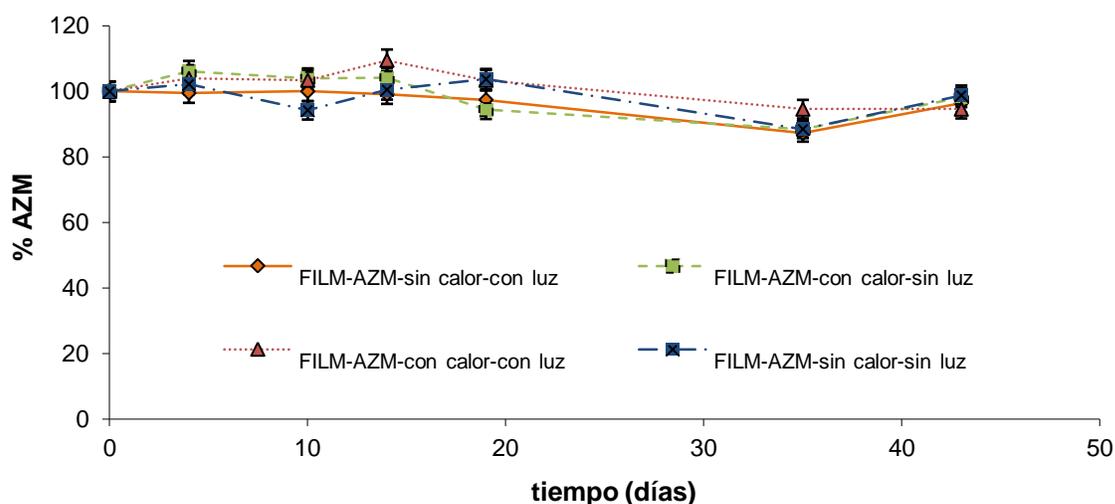
Capítulo 3

# RESULTADOS

## 1. FILMS BIOADHESIVOS

### 1.1.- Estabilidad del fármaco en el film

Acorde al diseño experimental descrito en el capítulo de metodología, los films SR fueron sometidos a condiciones preestablecidas de temperatura y luz, sin observarse degradación del fármaco (AZM) y manteniendo esta condición durante los 45 días de experimentación. Lo dicho anteriormente puede visualizarse en la figura 3.1.



**Figura 3.1:** Test de Estabilidad de Acetazolamida (AZM) en el Film Sin Recubrimiento. Donde se observa que el porcentaje de AZM se mantiene estable durante los días evaluados, en las condiciones experimentales de luz y temperatura. Se graficó la media  $\pm$  ER con un n=3 por cada condición preestablecida.

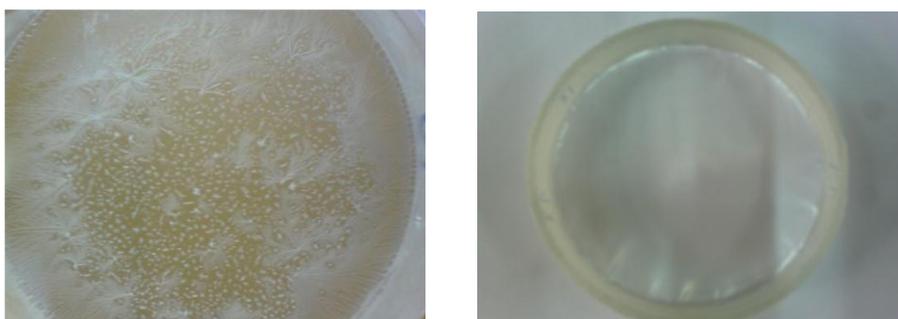
### 1.2.- Test de Homogeneidad

Otra evaluación importante llevada a cabo fue determinar la homogeneidad del fármaco en todo el sistema. Para ello se aplicó el test de homogeneidad descrito en el capítulo de metodología. Todos los films mostraron una significancia mayor a alfa (0,05), lo que no rechaza la hipótesis de uniformidad del sistema, según el test no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov. Ver tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Test de homogeneidad in vitro. En la tabla se detalla el grado de significancia, en todos los casos mayor a  $\alpha$ , por lo tanto no rechaza la hipótesis de uniformidad del sistema. (Kolmogorov-Smirnov).

Film SR	Significancia (p=)
Film 1	0,664
Film 2	0,101
Film 3	0,164
Film 4	0,123
Film 5	0,678
Film 6	0,712

Mediante una inspección visual del film la cantidad máxima que podía ser incorporada en el disco no debía exceder los  $0,382 \text{ mg/cm}^2$  de AZM, ya que superada esa medida, se comenzaba a evidenciar la presencia de cristales del fármaco en la superficie del film, conspirando contra la homogeneidad del sistema. (Ver figura 3.2)



**Figura 3.2:** A la izquierda se observa una fotografía de un film Sin Recubrimiento (Film SR) con  $0,47 \text{ mg/cm}^2$  de Acetazolamida (AZM), que muestra el precipitado del fármaco, en un film visualmente no homogéneo. A la derecha un Film SR con AZM homogéneamente distribuida.

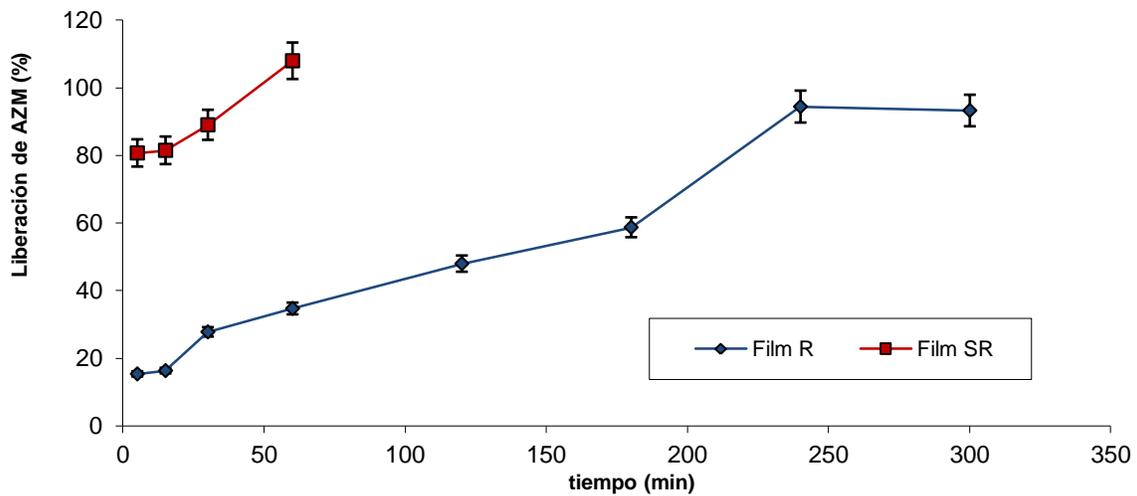
### 1.3.- Medición de la liberación de fármaco.

Los indicadores cuantitativos del proceso de liberación de AZM desde el film seleccionado son presentados en la tabla 3.2. En la misma se puede observar la rápida liberación del fármaco desde el film SR, liberando a los 5 minutos casi la totalidad del principio activo (AZM). En el caso del film R, la liberación mostró un comportamiento diferente, cediendo al medio menos del 30% de AZM a los 30 minutos, alcanzando aproximadamente el 100% en un periodo de 5 horas.

**Tabla 3.2.** Porcentaje liberado de Acetazolamida desde los Films Sin Recubrimiento (Film SR) y Film Recubiertos (Film R) in vitro. n=3

	Film SR	Film R
Tiempo (minutos)	Liberación (%)	Liberación (%)
5	80,7	15,3
15	81,4	16,3
30	89,0	27,7
60	107,9	34,7
120	-	47,9
180	-	58,7
240	-	94,4
300	-	93,2

En síntesis, el Film SR mostró una fase inicial de liberación rápida, cediendo la totalidad del fármaco en sólo 60 minutos. En el caso de los film R, la liberación es sostenida con un bajo porcentaje de la dosis liberada en forma relativamente rápida (*burst effect*). Ver figura 3.3.

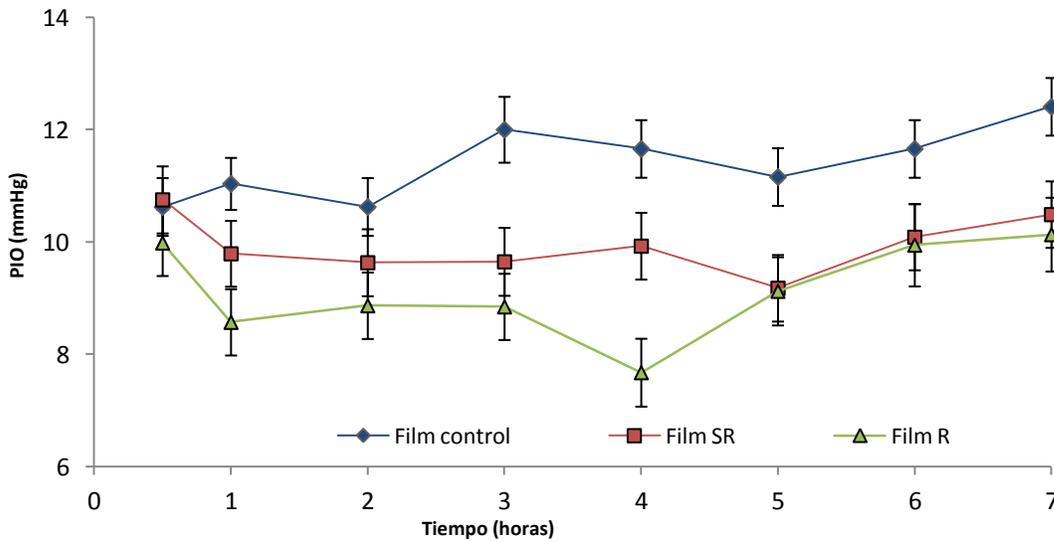


**Figura 3.3:** Liberación in vitro porcentual en función del tiempo ( $\pm$  error estándar) de Acetazolamida desde el Film Sin Recubrimiento (Film SR) n=3 y los Films Recubiertos (Film R) n=3.

### 1.4.- Medición de la Presión Intraocular

Al comparar las medias se observa que existe diferencia significativa para las medias de los grupos (film R, Film SR, control), siendo el promedio de PIO más bajo para el grupo con recubrimiento (film R), y el más alto para el grupo control. En el caso del factor tiempo, los valores más altos se encuentran en los tiempos 7, 6, 0.5 y 3 y los más bajos en 5, 1, 4 y 2. Existe diferencia significativa entre los grupos para todos los tiempos, sin embargo no se observa una diferencia significativa para los últimos tiempos a partir de la cuarta hora entre el grupo con recubrimiento y sin recubrimiento.

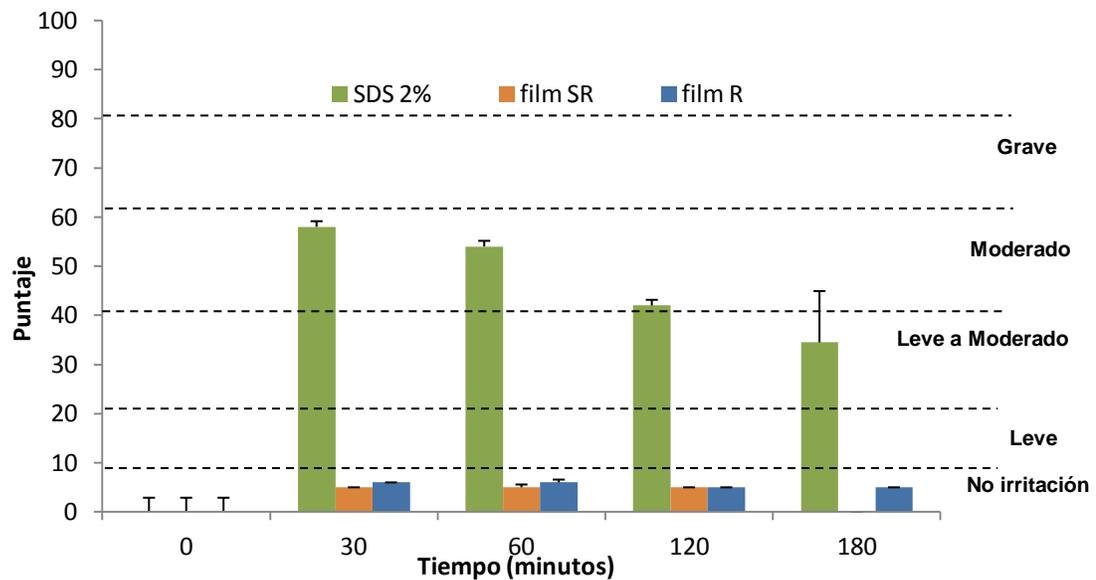
El descenso máximo hallado fue a los 240 minutos (37%) siendo más marcado en el caso de los films R. Después del descenso máximo se observa un aumento de la PIO paulatino hasta los 420 minutos, aunque no se alcanzó el valor promedio de la PIO normal. Ver figura 3.4.



**Figura 3.4:** Curva de presión intraocular en conejos normotensos (n=12). Se expresan las medias y el error estándar de las mismas. Las muestras seleccionadas fueron film control sin fármaco hipotensor (Film control), Film sin recubrimiento (Film SR) y Film con recubrimiento (Film R).

### 1.5.- Irritación Ocular

Ningún film SR o R produjo irritación alguna al cabo de 3 horas de examinación. Mientras que las lesiones producidas por el SDS 2% (control positivo) se catalogaron como moderadas. Ver figura 3.5.



**Figura 3.5:** Test de Irritación ocular en conejos albinos. (n=3). Media  $\pm$  error estándar. La irritación moderada causada por el Lauril sulfato de sodio (SDS 2%) contrasta con la nula irritación observada en los ojos a los que se le aplicaron los films bioadhesivos recubiertos (film R) y los no recubiertos (film SR)

### 1.6.- Bioadhesión *in vivo*.

En la figura 3.6 se puede observar la fotografía de un film adherido a la conjuntiva bulbar superior de un ojo de conejo. En este estudio se logró demostrar que la adherencia para los films no recubiertos fue moderadamente mayor que la de los films con recubrimiento. La variación de tamaño y grosor también se ve modificada debido a este proceso, experimentando en los film R menor variación de tamaño que los films SR. En la tabla 3.3 se pueden observar los resultados que muestran que el promedio de tiempo máximo de permanencia de los films SR y R fueron de 3 y 2 días respectivamente, con una

calidad de adherencia aceptable para los requerimientos deseados. (Ver valores de referencias de adhesión en tabla 2.9). Los film SR presentaron además un mayor aumento de tamaño en comparación con el film R (ver valores de referencias en tabla 2.10).

**Tabla 3.3.** Valor promedio de adherencia y variación de tamaño en función del tiempo, obtenido para los film sin recubrimiento (film SR) y con recubrimiento (Film R) en ojos de conejo (n=12).

	Adh. 30 min	Adh. 24 hs	Adh. 48 hs	Adh. 72 hs	Variac. Tamaño
<b>Film SR</b>	3	2	2	2	2
<b>Film R</b>	3	2	1	0	1



**Figura 3.6:** En la fotografía se observa la adhesión del film a la conjuntiva ocular.

## 2. COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINAS

### 2.1.- Osmolaridad

Al determinar la osmolaridad de las formulaciones se pudo observar que todas fueron prácticamente iso-osmóticas y se consideró, por lo tanto, que el ajuste de la osmolaridad no era necesario. La falta de irritación ocular luego de la administración confirma este resultado. Los resultados correspondientes se observan en la Tabla 3.4.

**Tabla 3.4:** Valores de osmolaridad de los diferentes Complejos binarios: Acetazolamida/Trietanolamina (AZM/TEA) y Acetazolamida/Hidroxipropil  $\beta$  Ciclodextrina (AZM/HP- $\beta$ -CD-); del complejo ternario: Acetazolamida/Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina/trietanolamina (AZM/HP- $\beta$ -CD/TEA) y la muestra comercial (AZOPT®)

Formulaciones	Osmolaridad (osmol/kg)
AZOPT® 1%	0.335
AZM/TEA	0.392
AZM/HP- $\beta$ -CD	0.298
AZM/HP- $\beta$ -CD/TEA	0.318

### 2.2.- Ensayos de permeación corneal

El flujo es una medida directa de la cantidad de fármaco que atraviesa la membrana corneal por unidad de tiempo, y mediante la fórmula que se postula a continuación es posible calcular el coeficiente de permeabilidad aparente:

$$P_{Cap} = \frac{Flujo}{Sup_{exp} \cdot C_i}$$

donde  $C_i$  es la concentración inicial del fármaco y  $Sup_{exp}$  es la superficie expuesta para la absorción. El  $P_{Cap}$  representa una medida directa del grado de absorción del fármaco y refleja su velocidad de transporte a través de la membrana corneal. Depende tanto del

flujo como de la superficie expuesta para la absorción. La  $Sup_{exp}$  que corresponde a la superficie disponible para la permeación fue calculada mediante la fórmula:

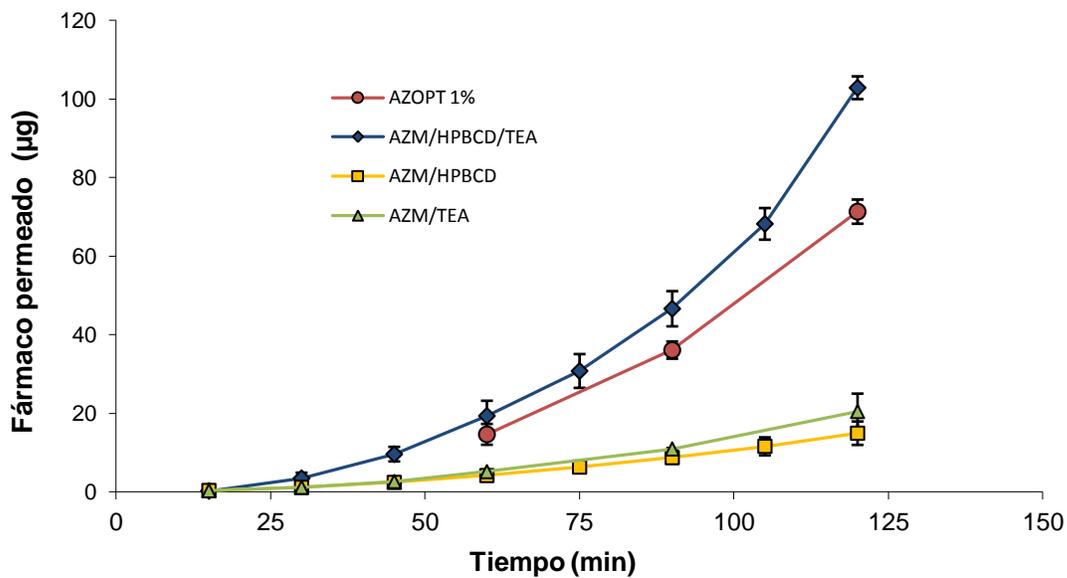
$$Sup = \pi \cdot r^2. Sup_{exp} = 3,14 \times (0,5\text{cm})^2 = 0,785\text{cm}^2$$

Donde: r es el radio promedio de la membrana corneal.

El *lag time* del fármaco (tiempo que tarda el fármaco en saturar la córnea y llegar al compartimiento receptor) fue calculado a partir de la intersección de los valores de la línea de regresión con el eje x. Se pudo corroborar que al terminar el estudio, la concentración final de AZM se encontraba por lo menos 20 veces por debajo de la solubilidad máxima en el medio receptor.

La figura 3.7 muestra los perfiles de permeabilidad transcorneal (*ex vivo*) de la muestra comercial Azopt®, y de los complejos binario y ternario con AZM.

Los datos de permeación de AZM y la formulación comercial Azopt® se muestran en la tabla 3.5.



**Figura 3.7:** Perfiles de permeación transcorneal en µg, expresados como media ± error estándar (n=4), *ex vivo*. El complejo ternario: AZM/HPBCD/TEA, compuesto por Acetazolamida (AZM), Hidroxipropil β ciclodextrina (HPBCD) y trietanolamina (TEA), fue el de mayor liberación seguido por la muestra comercial (AZOPT 1%) y los complejos binarios (AZM/HPBCD y AZM/TEA).

**Tabla 3.5.** Comparación de las diversas formulaciones: Complejo ternario (Acetazolamida –AZM- Hidroxipropil  $\beta$  ciclodextrina –HP $\beta$ CD- y trietanolamina –TEA-), los complejos binarios (AZM/TEA y AZM/HP $\beta$ CD) y la muestra comercial AZOPT 1%; sometidas a estudios de permeabilidad *ex vivo* usando córnea de conejo en términos de porcentaje de permeabilidad, tiempo de espera, velocidad del flujo y coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{cap}$ )

Formulación	Porcentaje de permeación	Lag time (min)	Velocidad del flujo (mg/min)	Coefficiente de permeabilidad aparente, $P_{cap}$ (cm/s) ( $\times 10^{-5}$ )
AZM/HP $\beta$ CD/TEA	9.958 $\pm$ 0,280	60	1.363 $\pm$ 0,356	3,262 $\pm$ 0.237
AZM/TEA	1.486 $\pm$ 0.330	60	0.179 $\pm$ 0,380	0.392 $\pm$ 0.133
AZM/HP $\beta$ CD	1.455 $\pm$ 0,290	60	0.255 $\pm$ 0,186	0.370 $\pm$ 0.019
AZOPT® 1%	0.713 $\pm$ 0.017	60	0.945 $\pm$ 1,960	0.201 $\pm$ 0.019

El análisis de los datos de la tabla precedente, indicó que el complejo ternario AZM/HP- $\beta$ -CD/TEA es el más eficiente en la permeación, de acuerdo con los valores del porcentaje permeado de AZM, de la velocidad del flujo de permeación (steady-state flux) y del coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{cap}$ ). Los complejos binarios AZM/TEA y AZM/HP- $\beta$ -CD mostraron una menor permeación que el primero. Por otra parte, la permeación de Azopt® (Brinzolamida) fue menor que los complejos estudiados. Todas las formulaciones mostraron un *lag time* (tiempo de espera) similar de alrededor de 60 minutos.

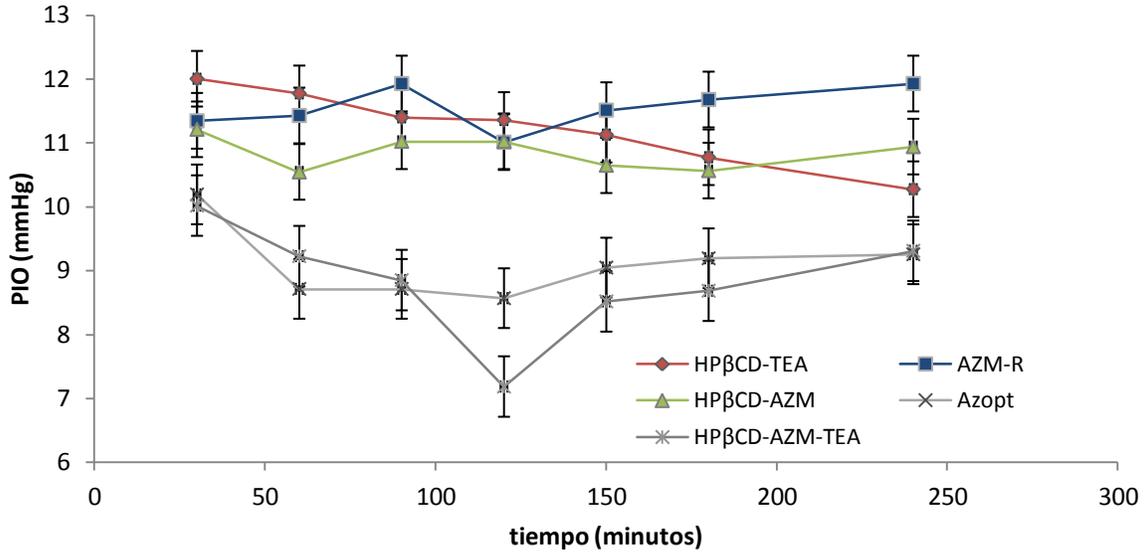
### 2.3.- Efecto de los complejos binarios y ternario sobre la PIO en conejos normotensos.

Los resultados de los efectos de las formulaciones sobre la PIO se presentan en las figuras 3.8 y 3.9. Como se puede observar en la figura 3.8, la aplicación del sistema ternario AZM/HP- $\beta$ -CD/TEA produjo una notable disminución de la PIO en conejos normotensos (n=6), con un descenso máximo a las 2 horas, posterior a la instilación de la formulación.

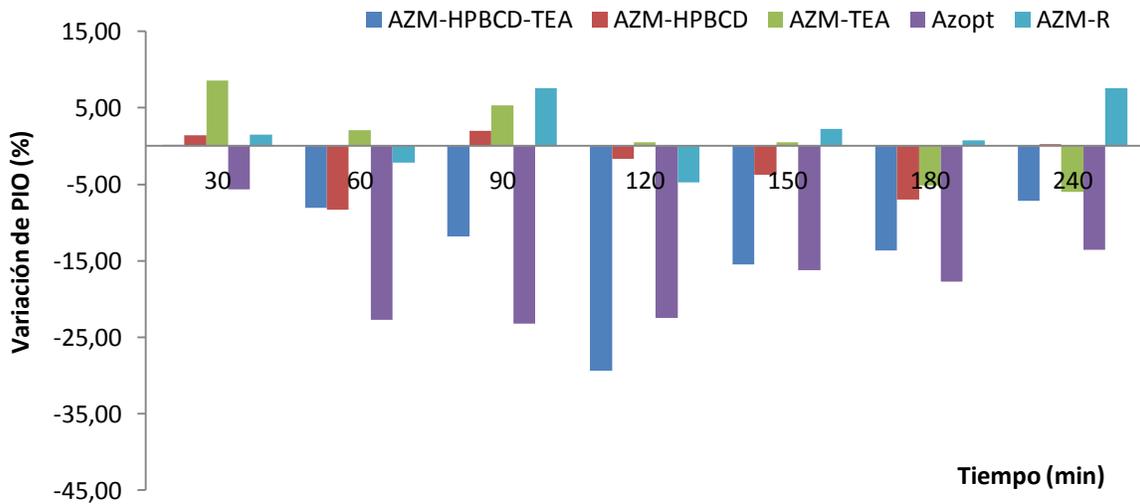
El efecto del complejo ternario logró una reducción de aproximadamente el 30% de la PIO (fig. 3.9). Este efecto de reducción se observó durante al menos cuatro horas.

Los complejos binarios al igual que la AZM 0,1% dispersa en ringer (AZM-R), no mostraron una disminución significativa de la PIO, por lo menos en el tiempo de

experimentación (Fig. 3.8). Por otra parte, 50  $\mu$ l de Azopt<sup>®</sup>, produce una reducción de la PIO en el conejo, de aproximadamente 23% (Fig. 3.9), lo que se asemeja al porcentaje de descenso encontrado en la literatura<sup>(89)</sup>.



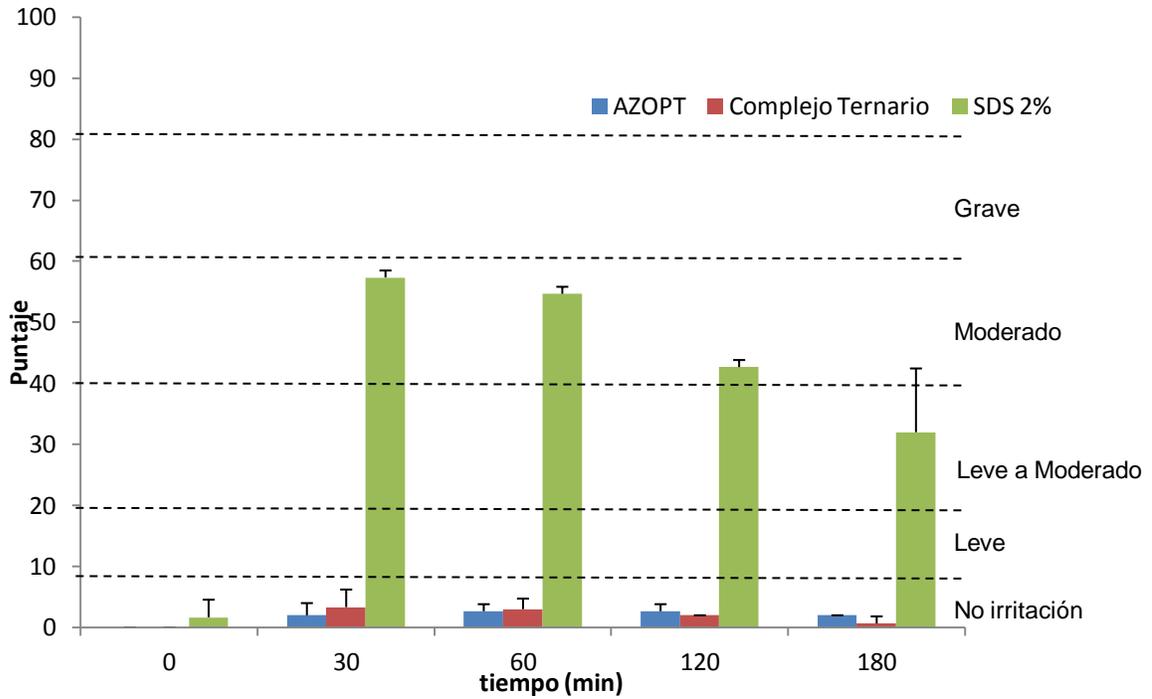
**Figura 3.8:** Curva de presión intraocular (mmHg) expresado en medias con su correspondiente error estándar, después de la aplicación tópica de las diferentes formulaciones: Complejo ternario (Acetazolamida –AZM- Hidroxipropil  $\beta$  ciclodextrina –HP $\beta$ CD- y trietanolamina -TEA-), los complejos binarios (AZM/TEA y AZM/HP $\beta$ CD), AZM libre en ringer (AZM-R) y la muestra comercial (AZOPT 1%); en ojos de conejos normotensos. n=12



**Figura 3.9:** Variabilidad porcentual de la presión intraocular después de la aplicación tópica de las diferentes formulaciones: Complejo ternario (Acetazolamida –AZM- Hidroxipropil  $\beta$  ciclodextrina –HP $\beta$ CD- y trietanolamina -TEA-), los complejos binarios (AZM/TEA y AZM/HP $\beta$ CD), AZM libre en ringer (AZM-R) y la muestra comercial (Azopt) en conejos normotensos. n=12

## 2.4.- Ensayo de irritación ocular

Ninguno de los animales de experimentación mostró irritación ocular al cabo de 3 horas de examinación. Los valores hallados nunca sobrepasaron el nivel de “no irritación” mostrado en la figura 3.10. Mientras que las lesiones producidas por el SDS 2% (control positivo) se catalogaron como moderadas.



**Figura 3.10:** Resultados del test de irritación ocular en conejos albinos (media  $\pm$  error estándar, n=3). La irritación moderada causada por el Lauril sulfato de sodio (SDS 2%) contrasta con la nula irritación observada en los ojos a los que se le aplicaron el complejo ternario y la muestra comercial AZOPT.

### 3. CRISTALES LÍQUIDOS LIOTRÓPICOS (COAGELES)

#### 3.1.- Capacidad de carga de AZM

La capacidad de carga para este sistema nanoestructurado se podría definir como la cantidad máxima de fármaco solubilizado que puede incorporar dicho sistema, sin sobrepasar el punto de saturación. Los resultados de la capacidad de carga del coagel para AZM se muestran en la Tabla 3.6.

Los coageles fueron saturados con AZM a temperatura superior a la TMC, y luego del enfriamiento, dependiendo de la solubilidad del fármaco y la concentración ASC<sub>12</sub>, se esperaba que la AZM precipitara. Sin embargo, en las pruebas de ASC<sub>12</sub> con concentraciones de 0,5% al 2%, se corroboró que después del enfriamiento del sistema, la AZM no precipitó. La mayor solubilidad de AZM se observó en el coagel al 2%, y en comparación con las soluciones de AZM y ringer, la solubilidad aparente se incrementó 4 veces.

**Tabla 3.6.** Capacidad de Carga in vitro de los Coageles (ASC 12) para Acetazolamida (AZM)

<i>Concentración de ASC 12 % peso/peso</i>	<i>Capacidad de Carga mg (AZM) /100 g (coagel)</i>
0,5	180,27
1	270,96
1,5	360,23
2	410,58

#### 3.2.- Osmolaridad y pH

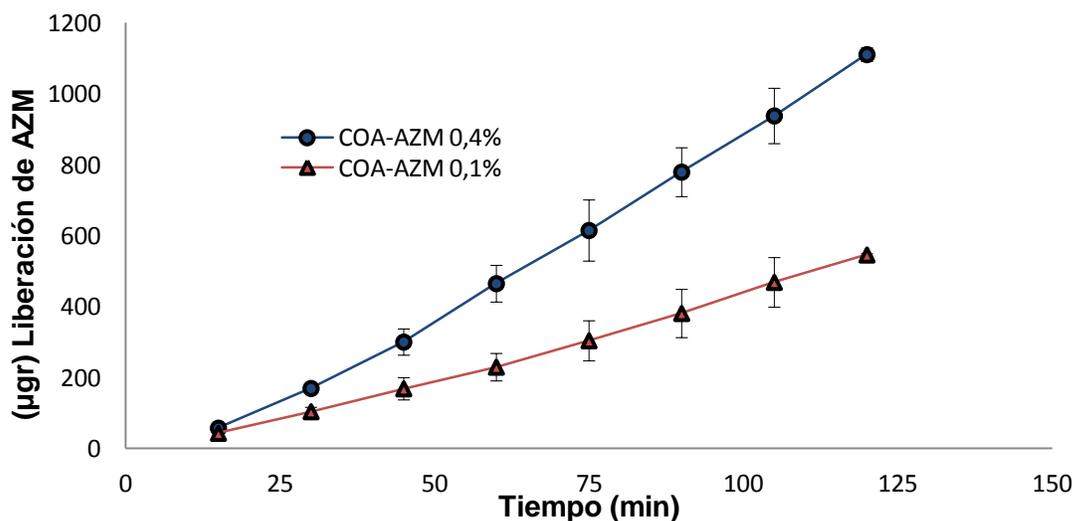
Las formulaciones obtenidas fueron ligeramente hipotónicas y de pH ácido, (ver tabla 3.7) aunque posteriormente en estudios de toxicidad animal no se evidenció un daño histológico de la superficie ocular.

**Tabla 3.7:** Resultados de pH y osmolaridad de las diferentes formulaciones *in vitro*. Donde COA-AZM 0,1% es el coagel cargado con acetazolamida (AZM) al 0,1%, COA-AZM 0,4% es coagel cargado con AZM al 0,4% y AZM-R es AZM libre en ringier.

Formulaciones	pH	Osmolaridad (osmol/kg)
COA-AZM 0.1%	3.37	0.208
COA-AZM 0.4%	3.85	0.262
AZM-R	7.74	0.247

### 3.3.- Liberación del fármaco

Este estudio fue realizado para evaluar el efecto sobre la liberación de AZM del cargado del coagel. Como se puede ver en la figura 3.11, tanto COA-AZM 0,1% como COA-AZM 0,4% pudieron modular la liberación de AZM del sistema. En ambos casos se observó una liberación con perfil cercano a orden cero. Según lo esperado, la liberación del fármaco, como se muestra en la tabla 3.8, fue mayor para COA-AZM 0,4%.



**Figura 3.11:** Liberación de acetazolamida (AZM) *in vitro*. En la figura se puede observar las medias resultantes según el tiempo por lo cual se determinó la cinética de liberación diferencial del sistema coagel cargado con AZM al 0,4% (COA-AZM 0,4%) y el coagel cargado con AZM al 0,1% (COA-AZM 0,1%). n=4

**Tabla 3.8.** Parámetros de liberación in vitro para Acetazolamida (AZM) en diferentes concentraciones (0,1% y 0,4%), vehiculizada en los coageles (COA) y de AZM libre en ringer (AZM-R)

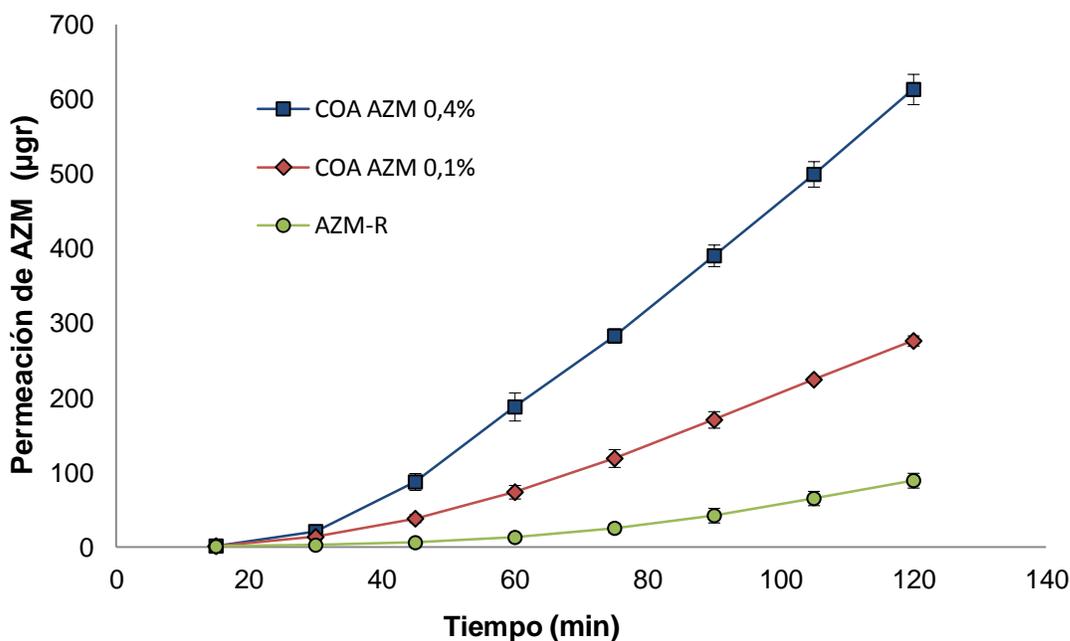
	AZM-R	COA-AZM 0.1%	COA-AZM 0.4%
<b>Parámetros de liberación de AZM</b>			
Velocidad de liberación (µg/min)	5.992 ± 1.350	4.813 ± 0.882	10.163 ± 1.530
Liberación de AZM (después de 2 hs)(µg)	652.27 ± 35.5	545.841 ± 3.125	1,110.973 ± 18.892
Liberación de AZM (después de 2 hs)(%)		54.585 ± 4.657	27.774 ± 2.829

### 3.4.- Estudios de Permeación Transcorneal

Los resultados de la permeación de AZM a través de la córnea están presentados en la tabla 3.9 y figura 3.12. En dichos gráficos se puede observar que la permeación de AZM fue mayor cuando fue vehiculizada en coageles, comparado con la solución de ringer y AZM, lo que se evidencia en la velocidad del flujo de permeación (1.43 mg/min) y en el coeficiente aparente de permeación ( $P_{cap}$ ), ( $3.04 \text{ cm/s} \cdot 10^{-5}$ ).

**Tabla 3.9.** Coeficiente aparente de permeación ( $P_{cap}$ ), flujo en estado de equilibrio, permeación de acetazolamida (AZM) después de 2 hs, tiempo de latencia y porcentaje de permeación de AZM ex vivo, en diferentes concentraciones 0,1% y 0,4%, vehiculizada en los coageles (COA); de AZM libre en ringer (AZM-R) y de la muestra comercial (Azopt®-Brinzolamida).

Parámetros de Permeación de AZM	AZM-R	COA-AZM 0.1%	COA-AZM 0.4%	Brinzolamida (Azopt®)
$P_{cap}$ (cm/s)( $10^{-5}$ )	3.04 ± 0.08	7.21 ± 0.23	3.73 ± 0.09	0.201 ± 0.019
Flujo en estado de equilíb.(mg/min)	1.43 ± 0.08	3.41 ± 0.11	6.99 ± 0.15	0.945 ± 1.960
Permeación de AZM (después de 2 hs) (µg)	89.90 ± 3.91	276.35 ± 6.51	613.37 ± 20.35	70.097 ± 1.750
Tiempo de Latencia (min)	60	45	45	60
Permeación de AZM (%)	8.92 ± 0.99	27.64 ± 0.65	15.33 ± 0.44	0.713 ± 0.017

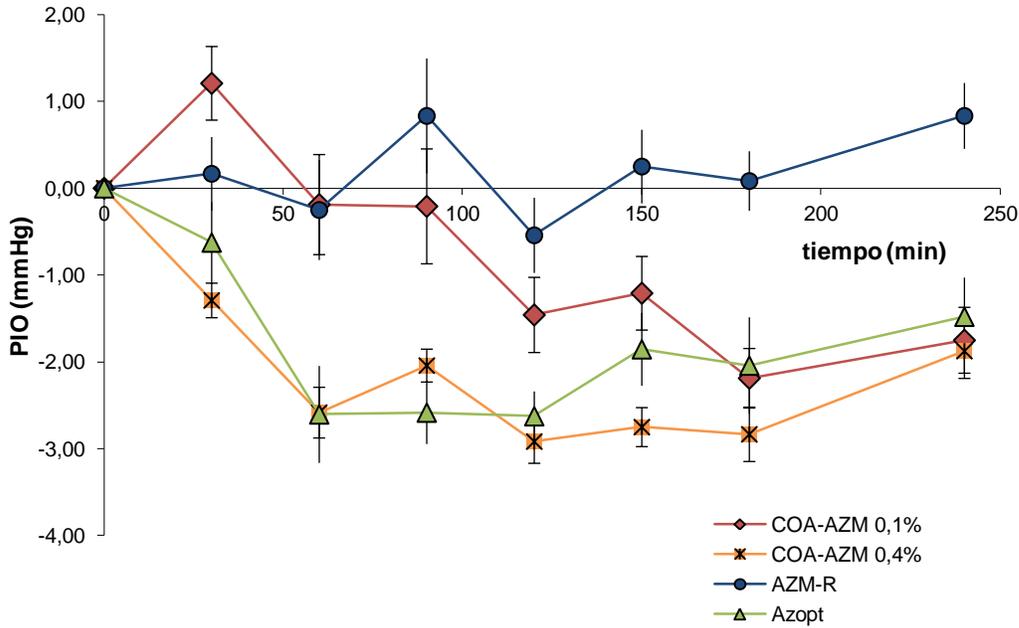


**Figura 3.12:** Cada punto del gráfico corresponde a la media en  $\mu\text{g}$  de permeación de acetazolamida a través de córnea aislada de conejo, de las diferentes formulaciones: COA-AZM 0,1% es el coagel cargado con acetazolamida (AZM) al 0,1%, COA-AZM 0,4% es coagel cargado con AZM al 0,4% y AZM-R es AZM libre en ringer.  $n=4$

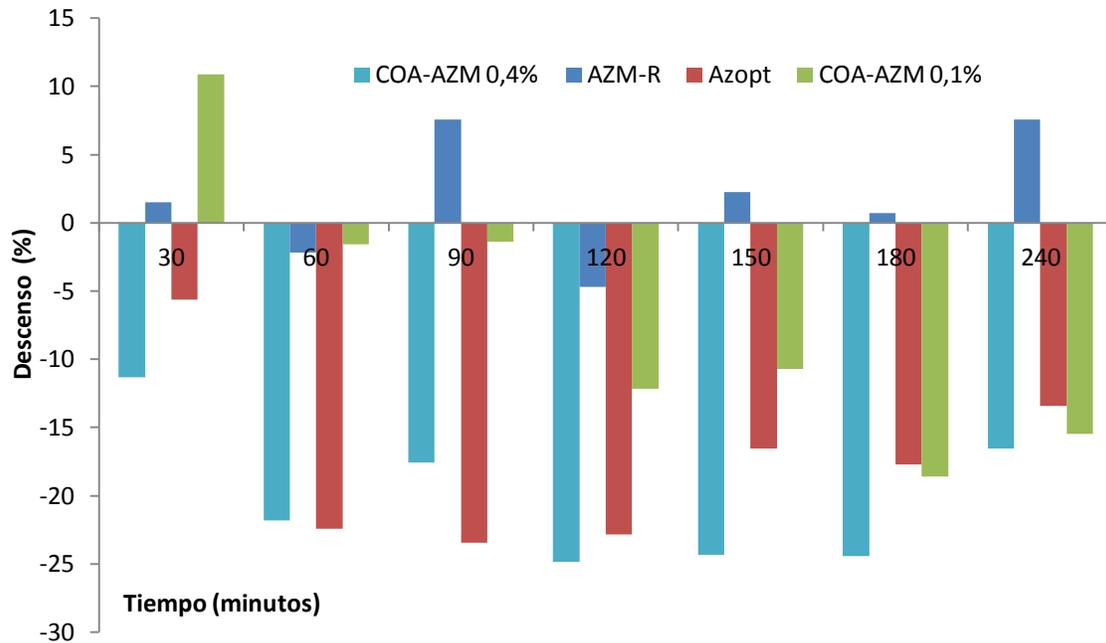
### 3.5.- Medición de la Presión Intraocular

Basado en los resultados de los estudios de permeación, se usó COA-AZM 0,1% y COA-AZM 0,4% para evaluar la respuesta terapéutica según la concentración del fármaco. Las diferencias encontradas en la permeación de AZM fueron correlacionadas con el efecto hipotensor del fármaco.

En la figura 3.13 se muestran los resultados concernientes al descenso de PIO después de la administración de las formulaciones estudiadas. En el caso de CAO-AZM, la capacidad de reducción de la PIO fue proporcional a la concentración de AZM, mientras que AZM-R no mostró un efecto hipotensor significativo. La máxima diferencia del efecto hipotensor se observó después de dos horas desde la administración tópica para COA-AZM 0,4% ( $24,84\% \pm 2.02\%$ ). Ver figura 3.14.



**Figura 3.13.** Descenso de presión intraocular (mmHg) en ojos de conejos normotensos producida por las diferentes concentraciones (0,1% y 0,4%) de acetazolamida (AZM) vehiculizada en los coageles (COA); de AZM libre en ringer (AZM-R) y de Brinzolamida (Azopt). Cada punto de la figura corresponde a la media  $\pm$  error estándar con un n=12.



**Figura 3.14.** Porcentaje de descenso de la presión intraocular en ojos de conejos normotensos producida por las diferentes concentraciones (0,1% y 0,4%) de acetazolamida (AZM) vehiculizada en los coageles (COA); de AZM libre en ringer (AZM-R) y de Brinzolamida (Azopt). n=12.

Con respecto al efecto hipotensivo de brinzolamida (Azopt®), éste fue similar a lo observado para COA-AZM 0,4% durante las primeras dos horas post-administración. Sin embargo, este efecto disminuyó rápidamente para brinzolamida después de las dos horas, mientras que en el COA-AZM 0,4%, alcanzó el pico máximo a las dos horas y se mantuvo en valores similares hasta completar el estudio.

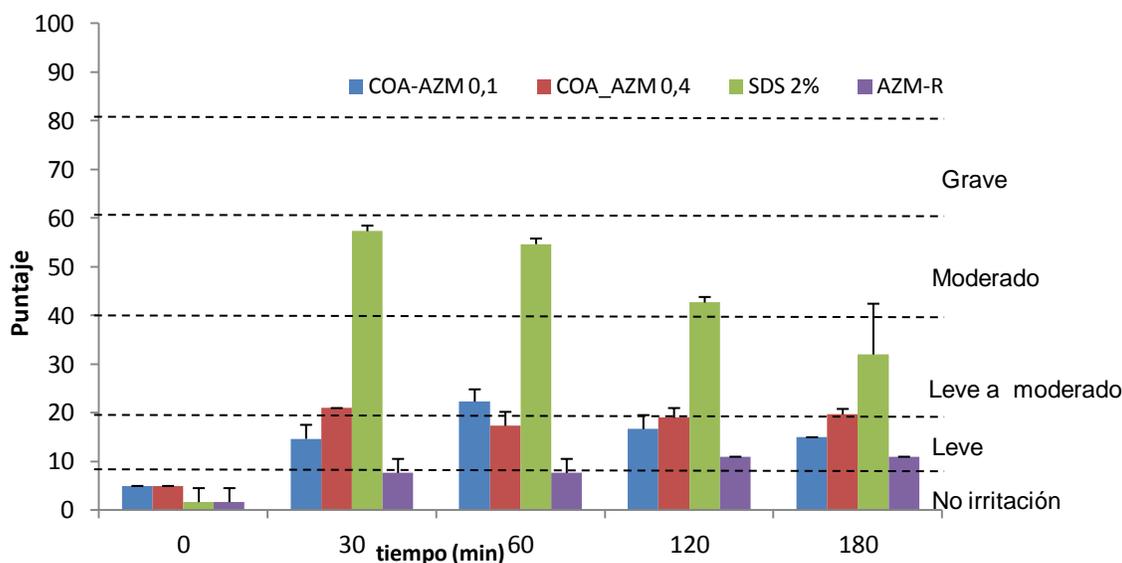
El comportamiento de los COA-AZM 0,1% fue muy diferente en comparación con las dos formulaciones anteriores. Su descenso máximo fue a las tres horas post-administración; y al cabo de cuatro horas, el valor se igualó a los valores observados para COA-AZM 0,4% y brinzolamida al mismo tiempo.

El modelo estadístico mixto empleado resultó ser el apropiado, observando la existencia de diferencias significativas entre medias de los grupos para cada uno de los tiempos.

### **3.6.- Test de irritación ocular**

Finalmente, para evaluar los potenciales efectos irritantes de las formulaciones, se realizó el test de irritación ocular en conejos albinos con oftalmoscopio binocular, para estudiar párpados, conjuntivas, córneas, cámara anterior e iris. Los resultados se presentan en la figura 3.15. Para llevar este estudio a cabo, tal como se describe en el capítulo de metodología, se cuantificó la irritación (ver tabla 3.10) pudiendo clasificar la agresión.

En todos los casos, la intensidad de la irritación fue dependiente del tiempo. Como control positivo se utilizó una solución de lauril sulfato de sodio al 2% (SDS 2%) que produjo una lesión moderada a los 30 minutos post-administración. A pesar de que la irritación fue disminuyendo gradualmente, a los 180 minutos seguía siendo considerable. Por otro lado, el efecto irritante de AZM-R fue prácticamente insignificante durante el período de tiempo en el que se examinó el ojo del conejo (180 minutos). Por último, en el caso de la COA-AZM 0,1% y COA-AZM 0,4%, se observó un efecto irritante de leve a moderado, teniendo su máximo punto de irritación a los 60 minutos.



**Figura 3.15:** Resultados del test de irritación ocular en conejos albinos. Las barras indican la media  $\pm$  error estándar del nivel de irritación de cada formulación estudiada: COA-AZM 0,1: coagel cargado con acetazolamina al 0,1%, COA-AZM 0,4: coagel cargado con acetazolamina al 0,4%; SDS 2%: Lauril sulfato de sodio al 2% y AZM-R: acetazolamida libre en ringer. (n=3)

**Tabla 3.10:** Test de irritación ocular. Media (n=3) de la valoración de la irritación ocular en conejos en función del tiempo. COA-AZM 0,1%: coagel cargado con acetazolamina al 0,1%, COA-AZM 0,4%: coagel cargado con acetazolamina al 0,4%; SDS 2%: Lauril sulfato de sodio al 2% y AZM-R: acetazolamida libre en ringer

Formulación/Tiempo	0	30	60	120	180
COA-AZM 0,1%	5	16	24	18	15
COA-AZM 0,4%	5	21	17	20	20
SDS 2%	0	58	54	42	35
AZM-R	2	8	8	11	11

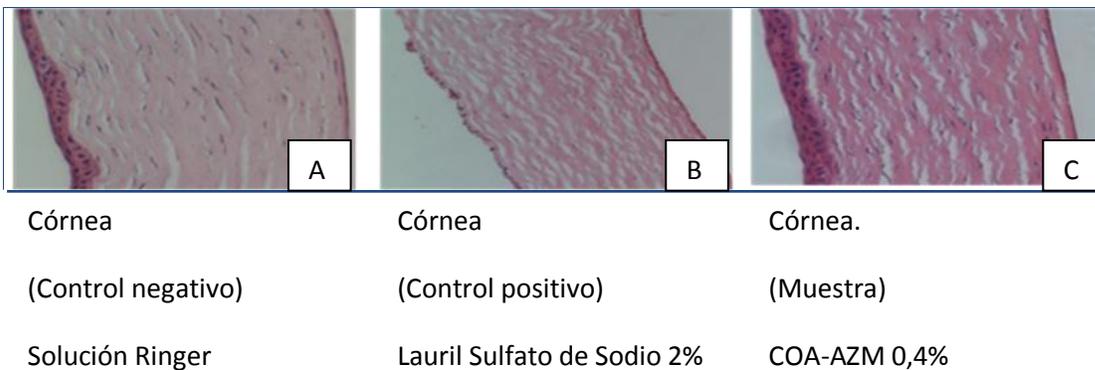
Debido al efecto irritante moderado que se observaba al instilar los sistemas con coageles en la superficie ocular, se decidió investigar a nivel microscópico si existía daño en el epitelio corneal.

Al examinar las muestras se obtuvieron los siguientes resultados: (ver figura 3.16)

- A.** Se observa la histología propia de la córnea de conejo normal, la cual consiste en una estructura transparente de múltiples capas. La superficie anterior está cubierta por epitelio plano estratificado no queratinizado. La mayor parte de la

córnea está compuesta por estroma, fibras colágenas de disposición regular y fibroblastos entremezclados, cuyos núcleos se ven fácilmente. La superficie posterior de la córnea está revestida por un epitelio plano a cúbico simple.

- B. Cuando aplicamos SDS 2%, luego de un intervalo de 180 minutos, se constató que la capa epitelial más externa de la córnea se encontraba dañada o ausente, exponiendo en algunos sectores incluso el estroma corneal. Por lo tanto, se evidenció una lesión tipo ulcerativa de córnea.
- C. Al aplicar COA 2% en el mismo intervalo de tiempo se observó que las capas de la córnea, principalmente la más externa, se encontraba inalterada evidenciando ausencia de lesión corneal.



**Figura 3.16:** Estudio histológico ex vivo, en córnea de conejo. En la fotografía se puede observar en el preparado histológico B: la disminución de la capa epitelial del tejido corneal.

## 4. MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTENSIÓN OCULAR

Se logró elevar la PIO y mantenerla en valores superiores a los normales en 5 de los 6 ojos tratados. Ver figura 3.17 y 3.18. Dos conejos presentaron complicaciones tales como hemorragias intraoculares y aumento del diámetro corneal.

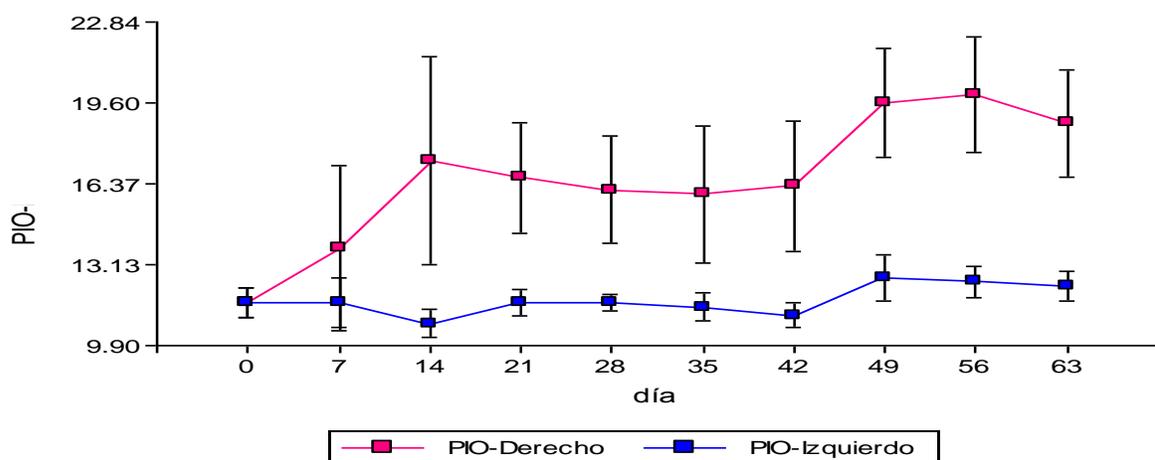
El promedio de PIO en el ojo operado (OD) fue de 17,61 mmHg (ES±2,13), y en el ojo control (OI) 11,8 mmHg (ES±0,36)

El pico promedio de PIO se presenta en las semanas 49-56. (OD: 19,9 mmHg ES±2,3 y OI: 12,4mmHg ES±0,61 mmHg).

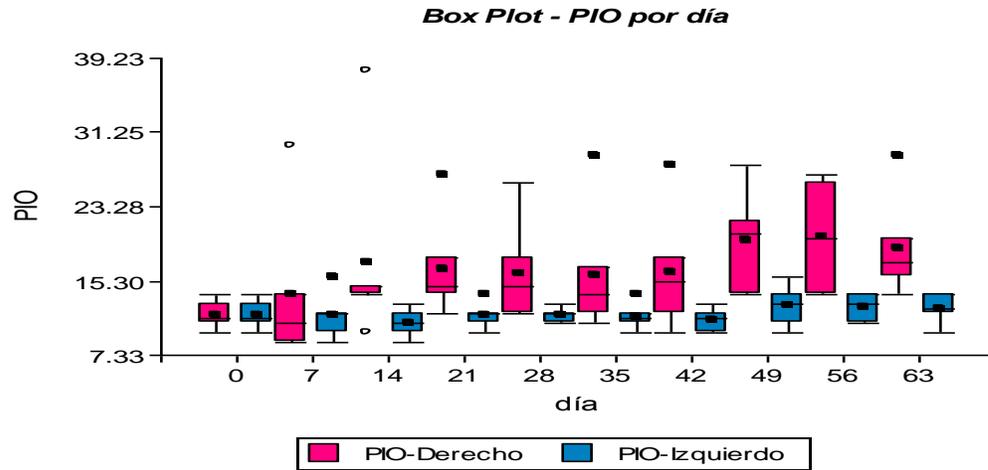
No se observó una diferencia significativa de aumento de la PIO hasta después del día 14. (Día 7  $p=0,436$  y día 14  $p=0,181$ -  $\alpha=15\%$ )

Dos conejos no presentaron un aumento significativo de la PIO ( $p=0,256$  y  $p=0,86$  -  $\alpha=5\%$ ).

Dos ojos sufrieron complicaciones oculares: hemorragia intraocular y neovascularización corneal, y en otro conejo se observó aumento del diámetro corneal y del tamaño ocular, post incremento de la PIO (bftalmus). Esta última complicación se consideró como relativa, ya que es un proceso conocido en los glaucomas congénitos.



**Figura 3.17:** Media  $\pm$  error estándar (n=6), que grafica la variabilidad de la presión intraocular (mmHg) luego de la cauterización de las venas episclerales. PIO-derecho (rojo) corresponde a los ojos tratados, PIO-izquierdo (azul) corresponde a los ojos contralaterales-controles.



**Figura 3.18:** Figura que grafica las medias y la dispersión de la presión intraocular en mmHg de los conejos intervenidos. En rojo los valores del ojo tratado, en azul el ojo contralateral-control

Capítulo 4

# DISCUSIÓN

## 1. FILMS BIOADHESIVOS

El término bioadhesión describe la capacidad de ciertas macromoléculas, sintéticas o naturales, de adherirse a los tejidos del organismo<sup>(90)</sup>. Esta definición es probablemente suficiente para identificar el fenómeno de la simple adhesión. En efecto, todo material puede adherirse a un tejido biológico, sobre todo a las mucosas, gracias a la naturaleza viscosa de la capa que la recubre, sin que en ello intervengan uniones específicas propias del polímero y del tejido. Por lo tanto no habrá bioadhesión real sin que se establezca una interrelación entre grupos funcionales de los polímeros y los tejidos biológicos o interpenetración de cadenas.

Es por esto que el término bioadhesión, en su definición más estricta, y la que atañe a este trabajo de Tesis, hace referencia a la formación de uniones interfaciales entre dos superficies biológicas o entre una superficie biológica y una sintética<sup>(91)</sup>.

En los sistemas bioadhesivos de administración de fármacos (SBAF), el término bioadhesión es comúnmente utilizado para describir las interacciones adhesivas entre los materiales que constituyen el sistema, ya sean de origen natural o sintético, y los tejidos biológicos llamados blandos. Estos tejidos están representados por las mucosas y es por esto que en muchos casos el término bioadhesión será considerado como sinónimo de mucoadhesión.

### 1.1. Mecanismos Involucrados en el Fenómeno de Bioadhesión

#### 1.1.1. Interacciones mucoadhesivas

Para que el fenómeno de la bioadhesión se lleve a cabo, las moléculas de ambas superficies intervinientes deben formar uniones o interacciones a través de la interfaz. Estas uniones se pueden formar por interacciones de diversos tipos según sea la

naturaleza del compuesto, ya que la mucosa está formada mayormente por mucina. Dichas interacciones responsables de la mucoadhesión son: *físicas o mecánicas*: que dan lugar a uniones semi-permanentes; y *enlaces químicos*: que dan origen a enlaces muy estables. La interacción entre dos de estas moléculas es el resultado de fuerzas de atracción y repulsión y la cuantía de estos dos fenómenos determina si interaccionan o no, por lo tanto, para que pueda ocurrir mucoadhesión, la interacción atractiva debe ser mayor que la repulsión no específica<sup>(92)(93)(94)(95)</sup>. Las interacciones atractivas provienen de las fuerzas de Van der Waals, atracción electrostática, enlaces de hidrógeno e interacción hidrofóbica. Las interacciones repulsivas ocurren por la repulsión electrostática y estérica.

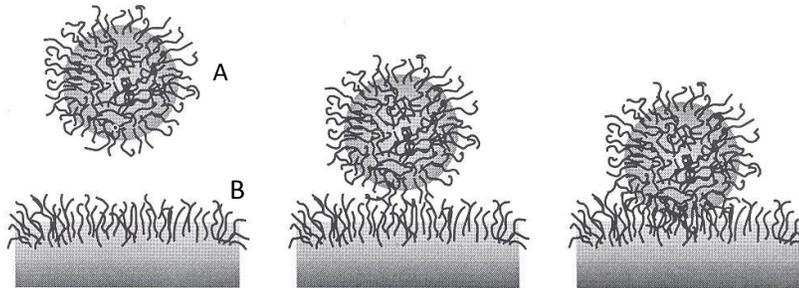
En suma, el proceso de mucoadhesión involucra a tres zonas: a) la superficie del sistema mucoadhesivo, b) la superficie de la mucosa biológica y c) la capa interfacial entre las dos superficies, la cual está integrada originariamente por mucus. Un íntimo contacto entre el mucus y la sustancia bioadhesiva inicia el proceso que es seguido por interdifusión (entrelazamiento) e interpenetración de ambas fases (mucus y sustancia adhesiva) formando varios enlaces que comprenden interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. (Ver figura 4.1).

### **1.1.2. Teorías sobre el fenómeno de bioadhesión**

*Teoría electrónica*: Esta teoría sugiere que ocurre una transferencia de electrones cuando se pone en contacto el material bioadhesivo y su sustrato biológico<sup>(96)(97)</sup>, debido principalmente a las diferencias en sus estructuras electrónicas. Esto causa la formación de una doble capa de cargas eléctricas en la interfaz bioadhesivo-sustrato biológico. La adhesión se produce debido a las fuerzas atractivas que se crean a través de esta doble capa eléctrica.

*Teoría de adsorción*: establece que las uniones bioadhesivas que se forman entre un polímero y la mucosa o tejido son consecuencia de la formación de interacciones de Van der Waals, puente hidrógeno y fuerzas relacionadas. Se sabe que estas fuerzas de por

sí, individualmente son débiles, sin embargo la sumatoria de cada una de estas interacciones se convierte en una fuerza adhesiva considerable.



**Figura 4.1.** Esquema representativo de la interpenetración molecular de un polímero bioadhesivo (A) con las glicoproteínas del mucus (B)

*Teoría de mojado (wetting):* Esta teoría se aplica sobre todo a sistemas líquidos y considera las energías superficiales e interfaciales. Implica la capacidad de un líquido de expandirse espontáneamente sobre una superficie como requisito previo para el desarrollo de la adherencia.

*Teoría de difusión:* El concepto de interpenetración y “enredo” de las cadenas del polímero y la mucina produce una fuerza adhesiva semi-permanente. La penetración de las cadenas poliméricas dentro de la capa de mucus y viceversa depende del gradiente de concentración y del coeficiente de difusión como así también del largo de la cadena polimérica y de la movilidad de las mismas.

Ninguna de estas teorías da una descripción completa del mecanismo de mucoadhesión. El fenómeno total de mucoadhesión es el resultado combinado de todas estas teorías.

## 1.2. Características generales de los materiales que presentan propiedades adhesivas

La adecuada selección de los materiales es uno de los pasos más importantes para el diseño racional de sistemas terapéuticos. Es así, que los materiales a utilizar en el diseño de SBAF, deben poseer ciertas características particulares, las cuales van a posibilitar la formación de las uniones adhesivas entre las mucosas y el sistema:

*Peso molecular:* en general, se ha demostrado que la fuerza bioadhesiva de los materiales de tipo poliméricos aumenta cuando sus pesos moleculares se encuentran por encima de los 100.000 Da. Es claro que cada polímero se comporta de manera distinta e individual en cuanto a esta característica<sup>(98)</sup>.

*Flexibilidad:* el fenómeno de bioadhesión comienza con la difusión de las cadenas poliméricas en la región interfacial. Por lo tanto es de suma importancia que estas cadenas poliméricas tengan un grado sustancial de flexibilidad para lograr la interacción deseada con los componentes de la mucina.

*Capacidad de formar puentes hidrógeno:* la formación de estos enlaces es de gran importancia para la formación de las uniones adhesivas. Por ende, la presencia de grupos capaces de lograr la formación de estas interacciones (-COOH, -NH, etc.) es fundamental en las cadenas poliméricas.

*Densidad de entrecruzamiento:* el tamaño promedio de poro, el peso molecular promedio del polímero y la densidad de entrecruzamiento son tres parámetros importantes que interrelacionan los parámetros estructurales de la red polimérica. Si la densidad de entrecruzamiento es demasiado alta, la difusión de agua a través del polímero va a ser lenta, lo que podría causar un hinchamiento insuficiente del polímero y así disminuir notablemente la interpenetración de las cadenas poliméricas de la matriz con las de la mucina<sup>(99)</sup>.

*Carga:* para este parámetro es posible postular que aquellos polímeros no-iónicos van a poseer menores propiedades adhesivas que los polímeros iónicos.

*Concentración:* este es un factor determinante para los fenómenos de bioadhesión. Una aproximación simple podría ser que a mayor cantidad de cadenas poliméricas del adhesivo, mayor va a ser la cantidad de entrelazamientos con las cadenas poliméricas de la mucina. Cuando la concentración del polímero adhesivo es baja, el número de interpenetraciones por unidad de volumen en la interfaz polímero-mucina es muy bajo, por lo cual la fuerza de adhesión también es baja.

*Hidratación:* la hidratación del polímero es requerida para que el mismo se expanda y aumente la movilidad de sus cadenas para provocar la interpenetración polimérica con el mucus. Sin embargo existe un punto crítico de hidratación en donde el hinchamiento y la bioadhesión son óptimos. Superado este punto, el hinchamiento es demasiado y la bioadhesión disminuye.

*Los factores ambientales* se deben tener en cuenta, ya que de cierta forma, van a brindar el entorno para que un SBAF actúe. Hay que considerar por ejemplo: el pH del medio que rodea al polímero, que puede alterar su estado de ionización y por ende sus propiedades de adhesión. Otro punto importante a considerar es la renovación del epitelio, sitios con alto recambio celular provocan que el tiempo de residencia en el sitio de aplicación sea limitado. Aquellas mucosas que sufren estrés permanente causan una disminución importante del tiempo de adhesión.

Para evaluar las propiedades del film bioadhesivo diseñado, se desarrollaron experimentaciones *in vitro e in vivo*, considerando los mecanismos involucrados en el fenómeno de bioadhesión y las características generales de los materiales empleados. Particularmente para este sistema bioadhesivo se pudo determinar que el film mejora la biodisponibilidad del fármaco mediante un doble mecanismo, por un lado aumentando el tiempo de permanencia en el sitio de administración, ya que son capaces de permanecer adheridos a la conjuntiva ocular o palpebral durante un período prolongado de tiempo, film R: 48 horas y film SR: 72 horas, evitando el masivo barrido del fármaco de la biofase ocular, y por el otro, proveyendo una liberación sostenida en el tiempo (film R). Para

obtener un patrón de liberación de AZM acorde a lo requerido para este tipo de sistemas, se aplicó una cobertura polimérica utilizando Eu RSPO (polímero insoluble pero permeable) que permite regular la cesión de fármaco en forma sostenida en el tiempo. Esta capa polimérica recubre a todo el film y si bien está descrito que Eu-RSPO posee pobres propiedades de bioadhesión, en esta Tesis se ha demostrado suficiente adhesión para mantener el sistema en el área de aplicación. Al evitar una liberación masiva en el sitio de aplicación se logró reducir la concentración del principio activo disponible en la superficie ocular evitando su rápida eliminación por los mecanismos naturales del ojo, de forma similar a lo que ocurre con colirios oftálmicos.

Es por ello que las propiedades de adhesión y modulación de la liberación del fármaco, son importantes para la eficacia terapéutica observada en este sistema farmacéutico. De hecho que el descenso máximo de PIO del 37%, medido a las 4 horas, demuestra dicha eficacia; aunque no se haya logrado sostener dicho descenso en el tiempo.

Es necesario destacar que el contacto prolongado del film en el ojo del conejo, no ha causado irritación. Propiedad más que importante a la hora de desarrollar un sistema.

Desde el punto de vista del diseño del film se puede afirmar que es relativamente sencillo de obtener, económico y escalable, características importantes a la hora de evaluar su procesamiento a nivel industrial.

Se concluye que el nuevo sistema portador diseñado comparte propiedades adecuadas para un film bioadhesivo de uso oftálmico, mostrando además un efecto hipotensor importante en ojos de conejos normotensos, sin proporcionar irritación.

## 2. COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINAS

El primer registro sobre ciclodextrinas (CD) fue publicado en 1891 por el científico francés Villiers. Sin embargo, su descripción, preparación y aislamiento se debe a Schardinger, entre 1903 y 1911. En 1935, Freudenberg descubrió la  $\alpha$ -CD y más tarde en los años 50, Cramer describe todas las características básicas, tanto estructurales como fisicoquímicas de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD, incluyendo estructura química, tamaño de cavidad, solubilidad, reactividad, capacidad complejante y efecto sobre la estabilidad química de moléculas huéspedes<sup>(100)</sup>.

Las CD son moléculas receptoras que pueden incluir una gran variedad de moléculas huéspedes, de tamaño compatible con las dimensiones de su cavidad. Cuando la cavidad de la CD es ocupada por una molécula de otra sustancia, se forma un *complejo de inclusión*.

La principal aplicación farmacéutica de las CD nativas y sus derivados, se ha basado en su capacidad para *solubilizar huéspedes* pocos solubles en agua. En muchos casos, la solubilidad aumenta con el incremento de la concentración de CD. No obstante, el grado de solubilización depende de la constante de formación del complejo en solución, en las condiciones estudiadas. Esta capacidad se debe a que las CD en agua se disponen en forma de un cono truncado, cuya cara interna de la cavidad es hidrofóbica y la exterior es hidrofílica, pudiendo albergar fármacos pocos solubles en agua como la AZM, formando el complejo de inclusión.

Otra propiedad importante de las CD es su efecto sobre la *estabilidad* química de los huéspedes. Mediante encapsulación molecular, la CD protege a la molécula huésped del ataque de diferentes sustancias reactivas. La CD por lo tanto, puede reducir o prevenir hidrólisis, oxidación, fotodegradación, polimerización, descomposiciones enzimáticas, etc. También pueden utilizarse para convertir fármacos líquidos en polvos microcristalinos, para prevenir interacciones fármaco-fármaco y fármaco-excipientes, para *reducir la*

---

irritación gastrointestinal y ocular, y para disminuir o eliminar sabores y olores desagradables<sup>(101)(102)(103)</sup>.

Las CD, por lo tanto, tienen la capacidad de incrementar la solubilidad aparente en agua, aumentar la estabilidad, reducir la irritación provocada por ciertos fármacos y optimizar la biodisponibilidad de principios activos problemáticos.

En el caso de fármacos pocos solubles en agua, es importante utilizar cantidades adecuadas de CD, suficientes para conseguir el efecto deseado, puesto que la adición de altas concentraciones de CD puede reducir la disponibilidad del fármaco<sup>(104)(105)</sup>.

Las CD nativas para uso oftálmico tienen una solubilidad algo limitada en agua, debido a esto es que se han sintetizado diferentes derivados más solubles en agua. Los derivados más empleados en oftalmología incluyen la  $\beta$ -hidroxipropilo y  $\gamma$ -ciclodextrina, la metil  $\beta$ -ciclodextrina y sulfobutiléter  $\beta$ -ciclodextrina<sup>(106)</sup>.

Existen varias formas para aumentar la disponibilidad de fármacos tópicos oculares en formulaciones acuosas de CD. Una es mediante la inclusión de una pequeña cantidad de un polímero soluble en agua. Los polímeros pueden mejorar el acomplejamiento del principio activo con las CD a través de la formación de complejos ternarios o co-complejos<sup>(107)</sup>, por lo tanto se puede reducir la cantidad de CD que se necesita en la formulación, mientras que simultáneamente se mejora la adsorción del complejo fármaco-ciclodextrina en la superficie ocular. Otra forma descrita con efectos positivos similares en el aumento de la solubilización de la CD, es gracias a la adición de ciertos ácidos de bajo peso molecular o hidroxiacidos<sup>(108)(109)</sup>.

Es conocido que la liberación del fármaco suele verse facilitada por el desplazamiento provocado por la competencia de materiales endógenos. Este desplazamiento del fármaco de la cavidad de la CD por sustancias exógenas y endógenas en el sitio de absorción sería responsable del aumento de biodisponibilidad del fármaco<sup>(110)</sup>.

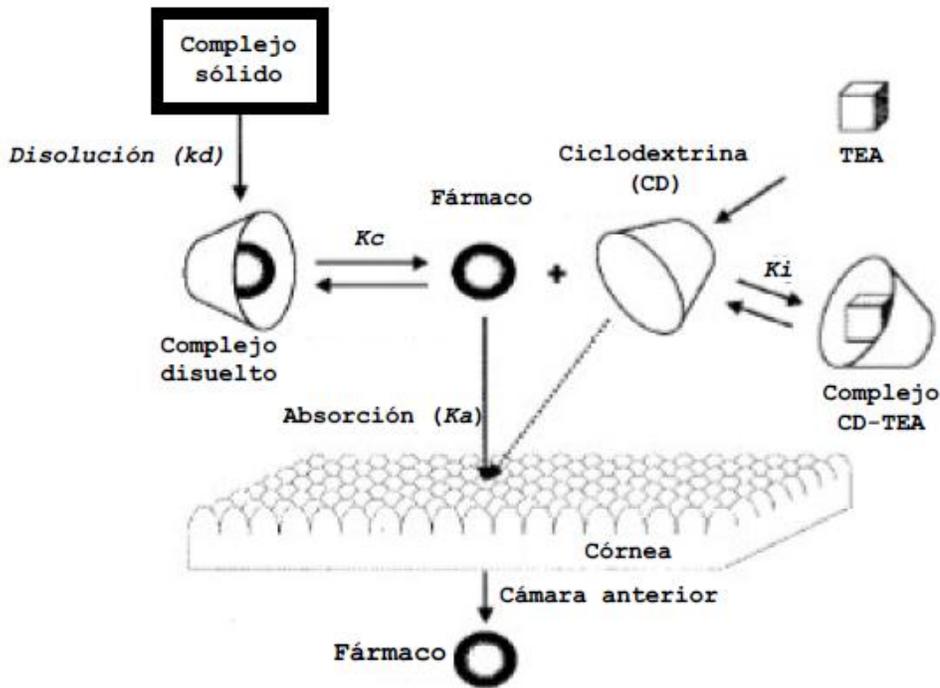
---

En la presente Tesis se empleó como tercer componente un compuesto orgánico, TEA, para mejorar la biodisponibilidad de AZM en la superficie ocular. En estudios realizados a los complejos mediante resonancia magnética nuclear indicaron claramente que AZM interactúa con HP- $\beta$ -CD. Estos resultados sugieren una inclusión más o menos completa de la AZM en la cavidad de HP- $\beta$ -CD. Otros ensayos indicaron que la unión aparente de AZM/HP- $\beta$ -CD decrece sistemáticamente a medida que aumenta la concentración de TEA. Dicho de otra manera, el aumento de la concentración de TEA sugiere una interacción más débil de AZM con HP- $\beta$ -CD en presencia de TEA. Por lo tanto, estos datos parecen indicar que TEA en el sistema ternario, produce una disminución en la afinidad de la HP- $\beta$ -CD por la AZM, aunque TEA no se encontraría dentro de la cavidad de HP- $\beta$ -CD, lo que presentaría una interacción externa. Esta localización dificulta la entrada de la AZM en la cavidad de HP- $\beta$ -CD debido a un impedimento estérico. En definitiva, la TEA produce un cambio en el equilibrio y "fuerza" a la AZM a permanecer en el ambiente acuoso, aumentando la concentración del fármaco libre en la biofase ocular y mejorando por lo tanto su biodisponibilidad<sup>(111)</sup>. Ver figura 4.2.

Los estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* se desarrollaron para caracterizar estos complejos de inclusión con ciclodextrinas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se puede concluir que el complejo ternario: AZM/HP- $\beta$ -CD/TEA presentó una alta eficacia para disminuir la PIO, ya que logró una reducción del 30% a las 2 horas de la administración. Es importante destacar que la concentración de Azopt® 1% (medicamento análogo comercial de AZM) es 10 veces mayor que en el caso de las formulaciones bajo estudio y su reducción a la misma hora fue del 23%. Esta importante reducción de la PIO se debe a dos factores preponderantes, por un lado la estrategia de formación de los complejos de inclusión (AZM/HP- $\beta$ -CD) que permite el aumento de la solubilidad aparente del fármaco sin realizar cambios en la estructura molecular, y por otro lado, a la mayor permeación encontrada de AZM. Las CD hidrofílicas, tales como la HP- $\beta$ -CD, son moléculas relativamente grandes y en condiciones normales no son capaces de penetrar las membranas biológicas lipofílicas, tales como la córnea del

ojo, por lo que es necesario la previa disociación fármaco/CD, aumentando la concentración de fármaco libre en la superficie corneal disponible para su absorción. Esto sumado a la ausencia de irritación, amerita posteriores estudios relacionados al diseño de un colirio.



**Figura 4.2.** Esquema representativo del mecanismo de acción del complejo ternario. La alteración en la constante de equilibrio ( $K_c$ ) producido por Trietanolamina (TEA), entre el fármaco y la Ciclodextrina (CD), mejora la biodisponibilidad del fármaco (Acetazolamida)

En líneas generales se deberá evaluar el método de esterilización así como el uso de conservantes, la incorporación de agentes viscosantes y los estudios de estabilidad correspondiente.

### 3. CRISTALES LÍQUIDOS LIOTRÓPICOS (COAGELES)

Los agentes tensioactivos (AT) son moléculas que se ubican en las interfases y pueden cambiar las propiedades de las mismas. Un término muy utilizado para nombrar estos compuestos es la palabra surfactante, la cual no aparece en muchos diccionarios. No solamente por ser un término técnico, sino principalmente porque es una contracción de la frase en inglés *surface active agent*.

Otra expresión alternativa es anfifilo, palabra que sugiere que estas moléculas tienen cierta afinidad tanto por solventes o medios polares como apolares. Este comportamiento es consecuencia de la estructura química de estos compuestos, que poseen una parte de su estructura de naturaleza polar y otra de naturaleza apolar.

La literatura contiene un número importante de reportes donde está claramente demostrado que los surfactantes pueden influenciar sobre la velocidad y la cantidad absorbida/permeada de ciertos principios activos<sup>(112)</sup>. Sin embargo, también se ha reportado que la inclusión de surfactantes en las formulaciones puede tener un efecto contrario<sup>(113)</sup>.

Los AT conforman uno de los grupos más importantes de excipientes auxiliares utilizados en diferentes formas farmacéuticas<sup>(114)</sup>. Tienen la propiedad de ubicarse en las interfases (líquido-líquido, líquido-sólido, líquido-gas) o formar diferentes tipos de agregados supramoleculares en solución, de allí su gran utilidad en tecnología farmacéutica.

Por otra parte, estos compuestos tienen aplicaciones bien definidas en formas farmacéuticas sólidas como comprimidos, cápsulas y supositorios, con el fin de mejorar la disolución de principios activos poco solubles e hidrofóbicos, a través de un aumento de la humectabilidad de estos compuestos en medio acuoso.

En la presente tesis se trabajó con una nueva serie de compuestos derivados del ácido ascórbico (vitamina C). El prototipo fue el laurato de ascorbilo, 6-O-dodecanoato de ascorbilo (ASC<sub>12</sub>). Este compuesto fue sintetizado con el objeto de aumentar la lipofilidad de la vitamina C y extender sus propiedades antioxidantes a sistemas lipídicos. Si bien la estructura de la molécula presenta una porción polar (ácido ascórbico) y una porción apolar (cadena alifática), la baja solubilidad del compuesto limita sus propiedades tensioactivas.

Los ésteres del ácido ascórbico son insolubles en agua a temperatura ambiente. Cuando se los calienta por encima de una temperatura específica para cada derivado, la solubilidad aumenta hasta alcanzar la concentración micelar crítica. El enfriamiento del sistema no trae aparejado la precipitación del derivado sino la formación de las estructuras supramoleculares con características de cristal líquido denominadas coageles<sup>(115)</sup>.

La incorporación de AZM en los coageles parece mejorar la biodisponibilidad ocular de este fármaco, debido a la determinación indirecta de PIO. Los coageles COA-AZM 0,1% y COA-AZM 0,4% promovieron la absorción de AZM, probablemente a través de un mecanismo de aumento de la permeación y del tiempo de retención del sistema como consecuencia de la viscosidad del coagel.

En los ensayos de permeación transcorneal, los COA-AZM 0,1% mostraron un aumento tres veces mayor en comparación con la de solución AZM-R para la misma concentración de fármaco. Ese incremento fue incluso mayor en el caso de COA-AZM 0,4%, principalmente debido a la alta cantidad de fármaco disponible para la absorción. En el caso de AZM-R la permeación del fármaco fue muy lenta como consecuencia de las propiedades fisicoquímicas de la AZM.

En este ensayo, también se evaluó la permeación de brinzolamida (Azopt®). Se conoce que brinzolamida es intrínsecamente más permeable que AZM y es un fármaco más hidrofílico, lo que implica que el efecto promotor del coagel es realmente notable.

Una concentración inferior de AZM no facilita la rápida liberación del fármaco debido al gradiente de baja concentración que impulsó el proceso de difusión. En este contexto, es importante analizar los resultados teniendo en cuenta la concentración relativa del fármaco de cada formulación. La permeación de AZM del COA-AZM 0,4% y la de brinzolamida fueron inicialmente similares. Aunque la concentración de COA-AZM 0,4% fue de 2,5 veces menor que la concentración de brinzolamida, el primero fue capaz de permear el fármaco de manera más eficiente.

El aumento de la permeación se correlaciona con el efecto hipotensor hallado en los ojos de conejos, donde COA-AZM 0,4% mostró una mayor acción hipotensora, en comparación con la formulación comercial Azopt® (Brinzolamida 1%), principalmente debido al efecto prolongado del primero. El aumento de la concentración del fármaco en la superficie ocular no es suficiente para explicar el mayor efecto hipotensor. Ejemplo claro de eso es la solución AZM-R, en la que AZM está inmediatamente disponible para la absorción y sin embargo, la permeación y la acción hipotensora son menores. De este modo, la capacidad promotora (enhancer) de la absorción de ASCn fue también evidente en este caso.

Por lo tanto, las propiedades de permeación, junto con su capacidad para la modulación de la liberación del fármaco, podrían ser relevantes para la eficacia terapéutica de los sistemas farmacéuticos observados (COA-AZM).

El bajo pH observado puede ser agresivo para la córnea y conjuntiva ocular, sin embargo, el film lagrimal presenta una alta capacidad buffer restaurando el pH normal rápidamente, aproximadamente en 30 segundos, después de la administración de la formulación en conejos. El bajo pH, provoca una irritación leve a moderada en ojos de conejos. Al realizar estudios ex vivos de toxicidad se pudo comprobar que los coageles no producían lesiones en el epitelio corneal.

La evaluación de la mayor permanencia de los coageles en el sitio de administración no fue incluida entre los objetivos de este estudio. Sin embargo,

estimamos que estos sistemas son capaces de mantenerse en el fondo de saco conjuntival por un período prolongado de tiempo, como consecuencia de su mayor viscosidad.

A partir de estos resultados, es posible inferir que estos sistemas pueden ser administrados a seres humanos, aunque deben llevarse a cabo estudios más detallados.

#### 4. MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTENSIÓN OCULAR

El glaucoma es una neuropatía óptica crónica y progresiva que a menudo conduce a la ceguera. Como muchas enfermedades, es una condición clínica generalmente difícil de investigar en pacientes debido a su fisiopatología. Como tal, los investigadores se basan en modelos animales que reproducen fielmente los aspectos importantes de la condición, con el fin de entender los mecanismos de la enfermedad y desarrollar nuevas terapias. De los modelos animales de glaucoma disponibles, los más atractivos son aquellos sistemas empleados con roedores, debido a muchas razones, incluyendo su potencial para experimentación, la manipulación, la vida útil corta, el bajo costo y la estructura y fisiología ocular, que es relativamente comparable a los seres humanos.

Existe una amplia variedad de modelos de glaucoma en roedores. La fuerte asociación del glaucoma con la elevación de la PIO está ampliamente unida con la aparición y la progresión del glaucoma<sup>(116)(117)(118)</sup>, de hecho que el único tratamiento aprobado clínicamente es el farmacológico y quirúrgico, tendientes ambos a reducir la PIO. Por lo tanto, uno de los modelos para desarrollar glaucoma es el provocar hipertensión ocular (HTO) en los animales.

No existe un solo modelo experimental que sea ideal, cada uno de los sistemas existentes se ha utilizado con éxito para descubrir importantes aspectos de la patología y podrían ser utilizados para desarrollar nuevas terapias para la enfermedad en el futuro.

Se ha demostrado que el grado y duración de la elevación de la PIO en una amplia variedad de modelos de glaucoma tiene una relación positiva con relación a la pérdida de células ganglionares de la retina (CGR), y por lo tanto con el daño del nervio óptico y el déficit funcional.

Con el fin de interpretar los datos obtenidos en modelos de HTO, es muy importante determinar con exactitud y precisión la medición de la PIO en animales vivos. El método más directo disponible para medir la PIO en los roedores es por manometría líquida mediante un transductor de presión, después de la canalización de la cámara anterior<sup>(119)</sup>. Si bien esta técnica es considerada como el método de referencia por la precisión, tiene ciertas limitaciones, ya que al ser un método invasivo, debe ser realizado bajo anestesia general, condición que puede influenciar la PIO del animal<sup>(120)(121)</sup>.

Un método no invasivo, que permite superar las limitaciones de las técnicas invasivas, es el uso de tonómetro de indentación (Schiotz), de aplanación (Goldmann), el neumotonómetro y la tonometría por rebote (Icare®).

#### **4.1. Modelos de glaucoma inducidos por hipertensión ocular**

Hay un número de técnicas experimentales que se pueden utilizar para elevar crónicamente la presión intraocular de los animales en un plazo relativamente corto de tiempo y con un mayor control sobre la extensión de la patología. Estas incluyen la fotocoagulación con láser en la malla trabecular (MT), la inyección de solución salina hipertónica en las venas episclerales, cauterización de las venas episclerales y la inyección de sustancias en la cámara anterior para obstruir el flujo de salida del humor acuoso.

Cada método tiene una cinética determinada de aumento de la PIO, y una curva de aprendizaje diferente; lo que condiciona los parámetros que debe considerar el investigador a la hora de proponer el método más adecuado para un escenario experimental en particular.

#### 4.1.1. Hipertensión ocular inducida por Láser.

Ueda et al.<sup>(122)</sup> indujeron HTO en ratas Wistar mediante la utilización de fotocoagulación con láser en la MT e inyección de tinta india, en la cámara anterior, unas semanas antes del tratamiento con el láser de argón. Las partículas de carbono, acumuladas en el ángulo de la cámara anterior, absorben la energía láser generando cicatrices debido al calentamiento focal. Los autores informaron que fueron necesarios por lo menos 3 tratamientos con el láser, espaciados por 7 días de diferencia, logrando un aumento de la PIO de al menos 25mmHg y fue capaz de mantenerse la PIO  $\geq 20$  mmHg por 12 semanas.

En un intento de optimizar los parámetros de la aplicación del láser, Levkovitch-Verbin et al.<sup>(123)</sup> aumentaron la intensidad del láser de argón en ausencia de inyección de pigmento en la cámara anterior. Aquí, se informó que la fotocoagulación en la MT produce una elevación de la PIO que alcanzó un promedio máximo de 34 mmHg, y se mantuvo por 3 semanas.

El grupo liderado por Grozdanic<sup>(124)</sup> indujo HTO en ratones con diodo láser fotocoagulando la MT y las venas epiesclerales después de la inyección intracameral de indocianina verde, produciendo elevación de la PIO en una media de 30 mmHg que persistió durante al menos 30 días. El tratamiento con láser de argón de los vasos epiesclerales y la MT en los mismos ratones, sin la inyección intracameral de indocianina verde, produce efectos similares durante 4 semanas.

Kevin C. Chan<sup>(125)</sup> realizó una variación de la técnica, induciendo HTO en ratas Sprague-Dawley mediante la fotocoagulación con láser de argón de las venas epiesclerales y las venas limbares de la superficie ocular del ojo derecho. La elevación lograda de la PIO es de 1,6 veces por encima del nivel normal, con un período de permanencia de HTO de un máximo de 12 semanas.

Hay varias limitaciones para el uso del láser para inducir HTO. En primer lugar, para el desarrollo de los modelos discutidos es necesario un láser de argón o diodo montado en una lámpara de hendidura, elementos que requieren una inversión significativa. En segundo lugar, es necesaria la presencia de pigmento en el ángulo de la cámara ya que del mismo depende la absorción de la energía láser y la extensión del daño producido a la MT, esto implica que los parámetros de la administración del láser deben ser ajustados individualmente para cada cepa de animales investigados. En tercer lugar, mientras que es posible alargar el tiempo de HTO mediante repetición de los tratamientos con láser, cada aplicación produce un cierto nivel de degeneración de la córnea por lo que el número de repeticiones en el tratamiento es limitado.

Aunque existen diversos enfoques para inducir HTO en los roedores a través de tratamiento con láser, los resultados han sido generalmente consistentes y demuestran la gran utilidad de este modelo. Por lo tanto la fotocoagulación con láser en las vías de salida del humor acuoso produce un nivel moderado de la HTO, que se correlaciona con la pérdida de CGR, y la degeneración del nervio óptico.

#### **4.1.2. Inyección de solución salina hipertónica en vena epiescleral**

La PIO puede estar elevada en ratas después de la esclerosis de la MT mediante la inyección de una solución salina hipertónica en la vena epiescleral<sup>(126)</sup>. Esta técnica resulta en una elevación moderada de la PIO a los 7-10 días, con un nivel considerable de la variabilidad entre 0 y 30 mmHg en comparación con los ojos controles.

En algunos casos, las inyecciones repetidas son necesarias para elevar la PIO después de un tratamiento inicial<sup>(127)</sup>. Sin embargo, la hipertensión ocular tiende a persistir por períodos más largos de tiempo (200 días)<sup>(128)</sup>, en comparación con la HTO inducida por láser.

Este modelo ha demostrado que produce pérdida progresiva de CGR y por lo tanto la degeneración del nervio óptico. En comparación con otros modelos de glaucoma en

roedores, la inyección de solución salina hipertónica requiere un equipo menos especializado, sin embargo la técnica quirúrgica es difícil y requiere un entrenamiento significativo.

#### **4.1.3. Cauterización de la vena epiescleral**

La cauterización de dos o más venas epiesclerales puede elevar crónicamente la PIO en las ratas. En este modelo, el número de venas epiesclerales cauterizadas se correlaciona con el grado de elevación de la presión. La cauterización de una vena no muestra cambios de la PIO, mientras que la cauterización de dos o tres venas muestra resultados de aumento de la PIO en un promedio de 20 mmHg y el tiempo de permanencia de la HTO es de aproximadamente 2 meses<sup>(129)</sup>.

La cauterización de cuatro venas produjo un aumento de PIO cerca de 60 mmHg. Esta elevación de la PIO produce una pérdida de CGR a una velocidad de aproximadamente 4% por semana<sup>(130)</sup>.

Esta técnica también se ha aplicado exitosamente en ratones<sup>(131)</sup>. *Sin embargo no se han encontrado publicaciones referidas al uso de esta técnica en conejos.*

#### **4.1.4. Ligadura de la vena epiescleral.**

Otra técnica llevada a cabo por Saiyuu Yu<sup>(132)</sup> y col. para establecer un modelo confiable de glaucoma, consistió en la ligadura de las venas epiesclerales en los ojos de ratas Wistar, el cual puede inducir HTO con características morfológicas similares al glaucoma. La elevación de la PIO fue constatada al día siguiente llegando hasta 30 mmHg en los ojos operados y persistió por lo menos 7 meses después del procedimiento con PIO de 25 mmHg. También ha sido demostrada la escasa variabilidad en los patrones de elevación de la PIO y se ha detectado, en forma selectiva, los cambios morfológicos en las CGR.

El procedimiento quirúrgico consistió en ligar el tronco de tres venas episclerales y una rama de la cuarta vena episcleral, con nylon 10-0 (Alcon quirúrgico®) en el ojo derecho.

La ventaja de este modelo es que puede inducir HTO inmediatamente después de la operación y conservarla durante varios meses. Como desventaja debe considerarse la dificultad del procedimiento quirúrgico y la necesidad de instrumental adecuado.

#### **4.1.5. Inyección de sustancias que inducen hipertensión ocular**

Estas técnicas apuntan a bloquear las vías de salida del humor acuoso, después de la inyección de una variedad de sustancias en la cámara anterior, con la posterior elevación de la PIO.

Se realizan inyecciones intracamerulares semanales de por ejemplo una matriz extracelular de ácido hialurónico en ratas, lo que produce una HTO sostenible durante 10 semanas<sup>(133)</sup>.

La inyección de microesferas (10  $\mu\text{m}$ ) de látex con o sin adición de hidroxipropilmetilcelulosa, también provoca un bloqueo del drenaje en la MT y por lo tanto eleva la PIO<sup>(134)</sup>. En estos casos se requieren de seis a nueve inyecciones repetidas semanales, para que el aumento sea sostenido. Si bien esta técnica es simple y relativamente barata, la necesidad de las repetidas inyecciones para obtener un aumento significativo de la PIO, la convierte en una técnica muy laboriosa. Además son frecuentes los efectos secundarios tales como anomalías corneales y/o inflamación intraocular.

La inyección de perlas de poliestireno (Polybead Microspheres®) de 2 a 6  $\mu\text{m}$ , en cámara anterior de ratones, seguido de la inyección de sustancia viscoelástica, también permitió conseguir una elevación promedio del 50% de la PIO durante 12 semanas, con respecto al ojo control<sup>(135)</sup>.

Otra técnica empleada por Kuribayashi y col. es la inducción de HTO mediante inyección intravítrea de 0,1 ml de NaCl 5%<sup>(136)</sup>, demostrándose una elevación prolongada de la PIO en conejos, provocada por un gradiente de osmolaridad dependiente de la solución hipertónica.

Otro método para inducir HTO en conejos albinos New Zealand es con inyecciones subconjuntivales semanales de 0,7 ml de suspensión de betametasona<sup>(137)</sup> (Celestone Cronodose, Schering-Plough, Madrid, España) que contiene fosfato sódico de betametasona (3 mg/ml) y acetato de betametasona (3 mg/ml). Esta formulación proporciona una liberación sostenida de la betametasona. La HTO se logró durante 4 semanas.

La administración sistémica del Antígeno S, considerado como el Antígeno uveitogénico más potente descrito, fue descubierto y aislado a partir de homogeneizados de retinas bovinas y caracterizado en 1977<sup>(138)</sup>. Se ha utilizado para modelos de glaucoma inflamatorio en roedores<sup>(139)</sup>. En este caso se observó un aumento de la PIO de 35 mmHg durante 2 semanas. La elevación de la PIO se atribuyó al cierre del ángulo esclero-corneal junto a un incremento en la producción de humor acuoso y la dificultad de salida del mismo. Hay que destacar que la inflamación marcada, tanto en las cámaras anterior y posterior, es un componente importante de la patogenia de este modelo por lo que la interpretación de los resultados obtenidos usando antígeno S deben ser tenidos en cuenta acorde a la fisiopatogenia de este modelo.

Percicot y col.<sup>(140)</sup> indujeron HTO crónica mediante una única inyección de  $\alpha$ -quimotripsina en la cámara posterior del ojo de conejos albinos New Zealand. Al mes de la inyección se obtuvo una HTO en promedio superior a 25 mmHg, medidos por tonometría de contacto. Se observó en un 10% del total de los animales complicaciones como inflamación intraocular grave.

Otro método indirecto de HTO en conejos albinos New Zealand, es el empleado por J. Santafé y col.<sup>(141)</sup>, mediante la administración de 60 ml de agua corriente por kg de

peso por medio de la intubación orogástrica con un catéter número 12. Los resultados mostraron un aumento discreto de la PIO entre los 30 y 90 minutos después del procedimiento (aumento de PIO de  $4.67 \pm 0.71$  mm Hg).

#### **4.2. Adaptación de un modelo experimental de glaucoma en conejos**

En la presente investigación doctoral se puso a punto en conejos, un modelo experimental conocido de hipertensión ocular, mediante la cauterización de las venas episclerales. Dicho método logra alterar el mecanismo fisiológico de circulación del humor acuoso, provocando un aumento de la resistencia de drenaje postrabecular del mismo, y como la producción del acuoso no varía y el drenaje por consiguiente disminuye, la consecuencia es un esperado aumento de la PIO.

Como se puede observar en el capítulo de resultados, mediante la cauterización antes descrita hemos podido aumentar en forma consistente la PIO en conejos durante un período de tiempo considerable. El desarrollo de esta metodología nos permitirá ejecutar experimentos posteriores en conejos hipertensos donde será posible establecer entre otros parámetros la pauta de dosificación para sistemas farmacéuticos innovadores, la eficacia real del producto desarrollado y las potenciales complicaciones inherentes.

En nuestro modelo hemos podido detectar complicaciones derivadas de la cirugía llevada a cabo, las cuales estimamos menores y subsanables con el aumento del número de animales de experimentación. Particularmente en cuanto a este último punto se considera una debilidad de la metodología puesta a punto la escasa cantidad de animales utilizados, por lo cual se propone como perspectiva de este trabajo de tesis afianzar el modelo aumentando el número de animales utilizados.

Numerosas publicaciones referidas a sistemas portadores conteniendo agentes hipotensores oculares, han sido objeto de análisis en este trabajo de Tesis, siendo el uso de animales normotensos un déficit encontrado en la literatura científica internacional.

Por este motivo se cree que la puesta a punto de este modelo es un aporte significativo a los potenciales desarrollo a la terapia glaucomatosa.

## CONCLUSIONES GENERALES

En la presente Tesis Doctoral se desarrollaron y evaluaron tres Sistemas Portadores de Fármacos de uso oftalmológico. En ese sentido se utilizó un mismo principio activo modelo, Acetazolamida, elegido por su baja solubilidad y permeabilidad corneal que condiciona su uso en formas farmacéuticas tópicas de uso ocular.

Una vez evaluados y caracterizados individualmente, se decidió compararlos y ponderar sus similitudes, diferencias, ventajas y desventajas.

En relación a lo dicho anteriormente, como conclusiones generales, se puede destacar lo siguiente:

- Los tres Sistemas Portadores de Fármacos estudiados aumentaron la eficacia del fármaco modelo mediante mecanismos diferentes.
- Se pudo avanzar en el diseño de nuevas técnicas experimentales para la evaluación de sistemas portadores de fármacos de aplicación oftalmológica, generando de este modo, una nueva área de experimentación en nuestro grupo de investigación.
- El modelo experimental de hipertensión ocular fue puesto a punto exitosamente en conejos albinos.

En forma particular es importante remarcar que:

- La incorporación de Acetazolamida en los coageles mejoró la biodisponibilidad ocular de este fármaco, siendo este dato obtenido de forma indirecta midiendo el descenso de la presión intraocular.
- Los coageles: COA-AZM 0,1% y COA-AZM 0,4% promovieron la absorción de Acetazolamida, probablemente por medio de un mecanismo de mejora de la

permeación y un aumento en el tiempo de retención del sistema, como consecuencia del aumento de la viscosidad del coagel.

- COA-AZM 0,4% mostró un mayor efecto hipotensor en ojos de conejos normotensos, en comparación con la formulación comercial Azopt® (Brinzolamida 1%).
- Los efectos observados sobre la irritación ocular para coageles fueron de leves a moderados.
- La aplicación del sistema ternario AZM/HP-β-CD/TEA produjo una notable disminución de la PIO (30% con respecto al control) en conejos normotensos, con un descenso máximo a las 2 horas después de la instilación de la formulación.
- El complejo binario AZM-HP-β-CD no mostró un efecto de reducción de presión intraocular, lo que refuerza la importancia del componente ternario.
- Todos los complejos evaluados con ciclodextrinas no presentaron efectos irritantes en ojos de conejos.
- Los films bioadhesivos recubiertos fueron capaces de permanecer adheridos a la conjuntiva ocular o palpebral durante un período prolongado de tiempo (un máximo de 48 horas).
- Utilizando estos sistemas de anclaje físico se obtuvo un descenso máximo de PIO del 37% a las 4 horas.
- El contacto prolongado del film en el ojo del conejo no causó irritación alguna.

Capítulo 5

# BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> Daar S, et al. Top ten biotechnologies for improving health in developing countries. *Nat Genet.* 32: 229-232. 2002.
- <sup>2</sup> Nanjawade BK, Manvi FV, Manjappa AS. In situ-forming hydrogels for sustained ophthalmic drug delivery, *J Control Release.* 122 (2): 119-134. 2007.
- <sup>3</sup> Choy YB, Park JH, Prausnitz MR. Mucoadhesive microparticles engineered for ophthalmic drug delivery. *J Phys Chem Solids.* 69 (5): 1533-1536. 2008.
- <sup>4</sup> Aggarwal D, Kaur IP. Improved pharmacodynamics of timolol maleate from a mucoadhesive niosomal ophthalmic drug delivery system. *Int J Pharm.* 290 (1): 155-159. 2005.
- <sup>5</sup> Gan L, Gan Y, Zhu C, Zhang X, Zhu J. Novel microemulsion in situ electrolyte-triggered gelling system for ophthalmic delivery of lipophilic cyclosporine A. *Int J Pharm.* 365 (1): 143-149. 2009.
- <sup>6</sup> Shulin D. Recent developments in ophthalmic drug delivery. *PSTT.* 1 (8): 328-335. 1998.
- <sup>7</sup> Hart WM. *ADLER Fisiología del ojo.* 9na Edición. Madrid. Mosby/Doyma Libros. 48. 1994.
- <sup>8</sup> Kansky JJ. *Oftalmología Clínica.* 3era Edición. Madrid. Ed. Mosby-Doyma Libros. 19. 1996.
- <sup>9</sup> Maurice D, Mishima S. Ocular Pharmacokinetics, in *Pharmacology of the eye.* Sears M.L. Ed. Springer-Verlag, Berlin. 19. 1984.
- <sup>10</sup> Gerosky DH, Edelhauser HF. Drug Delivery for Posterior Segment Eye Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41: 961-964. 2000.
- <sup>11</sup> Edman P. *Biopharmaceutics of ocular drug delivery,* Ed. CRC press. 20. 1992.
- <sup>12</sup> Bito LZ, Salvador EV. Intraocular fluid dynamics III. The site and mechanism of prostaglandin transfer across the blood intraocular fluid barriers. *Exp Eye Res.* 14: 233. 1972.

- <sup>13</sup> Belmonte C, Simon J, Gallego A. Effects of intraocular pressure changes on the afferent activity of ciliary nerves. *Exp Eye Res.* 19: 331. 1974.
- <sup>14</sup> Gallego R, Belmonte C. Nervous efferent activity in the ciliary nerves related to intraocular pressure changes. *Exp Eye Res.* 12: 342. 1971.
- <sup>15</sup> Krakau C, Wilke K. Effects of loading of the eye on the intraocular pressure and on the episcleral venous pressure. *Acta Ophthalmol.* 52: 107. 1974.
- <sup>16</sup> Shulin D. Recent developments in ophthalmic drug delivery. *PSTT.* 1 (8): 328-335. 1998.
- <sup>17</sup> Dikstein S, Maurice DM. The metabolic basis to the fluid pump in the cornea. *J Physiol.* 221 (1): 29-41. 1972.
- <sup>18</sup> Del Amo EM, Urtti A. Current and future ophthalmic drug delivery systems. *Drug Discovery Today.* 13 (3): 135-143. 2008.
- <sup>19</sup> Lee VHL, Robinson JR, Mechanistic and quantitative evaluation of precorneal pilocarpine disposition in albino rabbits. *J Pharm Sci.* 68: 673–684. 1979.
- <sup>20</sup> Lee VHL, Robinson JR. Topical ocular drug delivery recent developments and future challenges. *J Ocul Pharmacol.* 2 (1): 67–108. 1986.
- <sup>21</sup> Maurice DM, Mishima S. Ocular pharmacokinetics. M.C Sears. *Handbook of Experimental Pharmacology Topically.* Springer–Verlag, Berlin–Heidelberg. 69: 19-116. 1984.
- <sup>22</sup> Järvinen T, Järvinen K, Urtti A. Ocular absorption following in topical delivery. *Adv Drug Del Rev.* 16: 3–19. 1995.
- <sup>23</sup> *Farmacopea Nacional Argentina.* 7ma Edición. 227. 2003.
- <sup>24</sup> Nanjawade BK, Manvi FV, Manjappa AS. In situ-forming hydrogels for sustained ophthalmic drug delivery. *J Control Release.* 122 (2): 119-134. 2007.
- <sup>25</sup> Choy YB, Park JH, Prausnitz MR. Mucoadhesive microparticles engineered for ophthalmic drug delivery. *J Phys Chem Solids.* 69 (5): 1533-1536. 2008.
- <sup>26</sup> Aggarwal D, Kaur IP. Improved pharmacodynamics of timolol maleate from a mucoadhesive niosomal ophthalmic drug delivery system. *Int J Pharm.* 290 (1): 155-159. 2005.

- <sup>27</sup> Gan L, Gan Y, Zhu C, Zhang X, Zhu J. Novel microemulsion in situ electrolyte-triggered gelling system for ophthalmic delivery of lipophilic cyclosporine A. *Int J Pharm.* 365 (1): 143-149. 2009.
- <sup>28</sup> Rojanasakul Y, Liaw J, Robinson JR. Mechanisms of action of some penetration enhancers in the cornea: laser scanning confocal microscopic and electrophysiology studies. *Int J Pharm.* 66: 131–142. 1990.
- <sup>29</sup> Lee VHL, Li VHK. Prodrugs for improved ocular drug delivery. *Adv Drug Del Rev.* 3: 1–38. 1989.
- <sup>30</sup> Green K. The effect of preservatives on corneal permeability of drugs. In: Edman P. Editor, *Biopharmaceutics of Ocular Drug Delivery*. CRC Press. Boca Raton. 43–59. 1993.
- <sup>31</sup> Liaw J, Robinson JR. Ocular penetration enhancers. In: Mitra AK. Editor. *Ophthalmic Drug Delivery Systems*. Marcel Dekker. Inc. New York. 369–381. 1993.
- <sup>32</sup> Hochmana J, Artursson P. Mechanisms of absorption enhancement and tight junction. *Int J Pharm.* 29 (3): 253-267. 1994.
- <sup>33</sup> Granero GE, Longhi MR, Becker C, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, Shah VP, Stavchansky S, Dressman JB. Arends DMJ Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: acetazolamide. *Pharm Sci.* 97 (9): 3691-9. 2008.
- <sup>34</sup> Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, et al. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. *Int J Pharm.* 248: 1–14. 2002.
- <sup>35</sup> Duffel MM, Ing IS, Segarra TM, et al. N-substituted sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors with topical effects on intraocular pressure. *J Med Chem.* 29: 1488–1494. 1986.
- <sup>36</sup> Aggarwal D, Pal D, Mitra AK, Kaur IP. Study of the extent of ocular absorption of acetazolamide from a developed niosomal formulation, by microdialysis sampling of aqueous humor. *Int J Pharm.* 338 (1–2): 21-26. 2007.
- <sup>37</sup> Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 15;58. (11): 1131-35. 2006.
- <sup>38</sup> Connors K. The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chem Rev.* 97: 1325-57. 1997.

- <sup>39</sup> Granero G, Garnero C, Longhi M. The effect of a basic substance and pH on cyclodextrin complexation of sulfisoxazole. *Eur J Pharm Sci.* 20: 285-293. 2003.
- <sup>40</sup> Palma S, Tártara L, Quinteros D, Allemandi D, Longhi M, Granero G. An efficient ternary complex of acetazolamide with HP- $\beta$ -CD and TEA for topical ocular administration. *J Control Release.* 138: 24-31. 2009.
- <sup>41</sup> Wade A, Weller PJ. *Handbook of Pharmaceutical Excipients.* 2th Ed. American Pharmaceutical Association. Washington. USA. 1994.
- <sup>42</sup> Köhler U, Yang PW, Weng S, and Mantsch HH. Structure and Polymorphic Phase Behavior of Ascorbyl Palmitate in Water. *Canadian Journal of Spectroscopy.* 33 (5): 122-127. 1988.
- <sup>43</sup> Saino V, Monti D, Burgalassi S, Tampucci S, Palma S, Allemandi D, Chetoni P. Optimization of skin permeation and distribution of ibuprofen by using nanostructures (coagels) based on alkyl vitamin C derivatives. *Eur J Pharm Biopharm.* 76 (3): 443-449. 2010.
- <sup>44</sup> Tártara I, Quinteros D, Saino V, Allemandi D, Palma S. Improvement of Acetazolamide Ocular Permeation Using Ascorbyl Laurate Nanostructures as Drug Delivery System. *J Ocul Pharmacol Ther.* 28 (2): 102-109. 2012.
- <sup>45</sup> Anders R, Merkle H. Evaluation of laminated mucoadhesive patches for buccal drug delivery. *Int J Pharm.* 49: 231-240. 1989.
- <sup>46</sup> Cole M, Whateley T. Interaction of Nonionic Block Copolymeric (Poloxamer) Surfactants with Poly (Acrylic Acid). Studied by Photon Correlation Spectroscopy. Whateley. *Journal of colloid and interface science.* 321. 180: 421–427. 1996
- <sup>47</sup> LatinSalud.com. *Glaucoma.* [En línea]. (Acceso: 17 de diciembre de 2006). Disponible en: [www.latinsalud.com/articulos/00332.asp](http://www.latinsalud.com/articulos/00332.asp)
- <sup>48</sup> Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol.* 90 (3): 262-267. 2006.
- <sup>49</sup> Varma R, Ying-Lai M, Francis B, Nguyen B, Deneen J, Wilson M, Azen S. Prevalence of open-angle glaucoma and ocular hypertension in Latinos: the Los Angeles Latino Eye Study. *Ophthalmology.* 111 (8): 1439-48. 2004.

- <sup>50</sup> Olver J, Cassidy L. *Ophthalmology at a Glance*. Massachusetts. Blackwell Science Ltd. 78. 2005.
- <sup>51</sup> Alm A, Nilsson S. Uveoscleral outflow. *Exp Eye Res*. 88 (4): 760-8. 2009.
- <sup>52</sup> Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ, et al. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch. Ophthalmol*. 120 (6): 701–13 (discussion 829–30). 2002.
- <sup>53</sup> Gordon MO, Beiser JA, Brandt JD, et al. The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma, *Arch. Ophthalmol*. 120: 714–720. (2002).
- <sup>54</sup> Le A, Mukesh BN, McCarty CA, Taylor HR. Risk factors associated with the incidence of open-angle glaucoma: the visual impairment project. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44: 3783–3789. (2003).
- <sup>55</sup> Wade A, Weller PJ. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 2da edición. American Pharm Association. The Pharm. Press. Londres. 1994.
- <sup>56</sup> Jimenez-Kairuz A, Allemandi DA, Manzo RH. Mechanism of lidocaine release from carbomerlidocaine hydrogels. *J Pharm Sci*. 91 (1): 267-72. 2002.
- <sup>57</sup> Vilches AP, Jimenez Kairuz A, Alovero F, Olivera ME, Allemandi D, Manzo RH. Release kinetics and up-take of model fluoroquinolones from carbomer hydrogels. *Int J Pharm*. 246 (1-2): 17-24. 2002.
- <sup>58</sup> Jimenez Kairuz A, Allemandi D, Manzo RH. Equilibrium properties and mechanism of kinetic release of metoclopramide from carbomer hydrogels. *Int J Pharm*. 250 (1): 129-136. 2003.
- <sup>59</sup> Jimenez-Kairuz A, Allemandi DA, Manzo RH. A strategy to improve the chemical stability of a model basic drug by ion pairing with acid groups of polyelectrolytes. *Int J Pharm*. 269: 149-156. 2004.
- <sup>60</sup> BFGoodrich Specialty Chemicals. *Carbopol. Technical Bulletin*. 17. 1994.
- <sup>61</sup> Bender M, Komiyama M. *Cyclodextrin Chemistry*. Springer-Verlag. Berlin. 505. 1978.

- <sup>62</sup> Muñoz Botella S, del Castillo B, Martín M. Las ciclodextrinas: características y aplicaciones de la formación de complejos de inclusión. *Ars Pharmaceutica*. 36: 187-198. 1995.
- <sup>63</sup> Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins I. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci*. 85: 1017–25. 1996.
- <sup>64</sup> Loftsson T, Järvinen T. Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 36: 59-79. 1999.
- <sup>65</sup> Loftsson T, Stefánsson E. Cyclodextrins in eye drop formulations: enhanced topical delivery of corticosteroids to the eye. *Acta Ophthalmol Scand*. 80. 144-150. 2002.
- <sup>66</sup> Del Valle E. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem*. 39: 1033–1046. 2004.
- <sup>67</sup> Goskonda S, Lee J. Triethanolamine. En Rowe R, Sheshey P, Owen S. (Eds) *Handbook of pharmaceutical excipients*. Fifth edition. London. Pharmaceutical press. 794-795. 2006.
- <sup>68</sup> Hamilton TK, Zug KA.. Triethanolamine allergy inadvertently discovered from a fluorescent marking pen. *Am J Contact Dermat*. 7 (3): 164–5. 1996.
- <sup>69</sup> Chu CY, Sun CC. Allergic contact dermatitis from triethanolamine in a sunscreen. *Contact Dermatitis*. 44 (1): 41–2. 2001.
- <sup>70</sup> Schmutz JL, Barbaud A, Tréchet P. Contact allergy to triethanolamine in ear drops and shampoo. *Ann Dermatol Venereol*. 134 (1): 105. 2007.
- <sup>71</sup> Gamer AO, Rossbacher R, Kaufmann W, Van Ravenzwaay B. The inhalation toxicity of di- and triethanolamine upon repeated exposure. *Food Chem Toxicol*. 46 (6): 2173–83. 2008.
- <sup>72</sup> Lessmann H, Uter W, Schnuch A, Geier J. Skin sensitizing properties of the ethanolamines mono-, di-, and triethanolamine. Data analysis of a multicentre surveillance network. *Contact Dermatitis* 60 (5): 243–55. (2009)
- <sup>73</sup> Lo Nostro P, Capuzzia G, Pinelli P, et al. Self-assembling and antioxidant activity of some vitamin C derivatives. *Colloids Surf. A: Physicochem Eng Aspects*. 167: 83–93. 2000.
- <sup>74</sup> Capuzzi G, Lo Nostro P, Kulkarni F, et al. Interactions of 6-O-stearoylascorbic acid and vitamin K1 in mixed Lang-muir films at the gas–water interface. *Langmuir*. 12: 5413–5418. 1996.

- <sup>75</sup> Saino V, Monti D, Burgalassi S, Tampucci S, Palma S, Allemandi D, Chetoni P. Optimization of skin permeation and distribution of ibuprofen by using nanostructures (coagels) based on alkyl vitamin C derivatives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 76 (3): 443-449. 2010.
- <sup>76</sup> Tártara I, Quinteros D, Saino V, Allemandi D, Palma S. Improvement of Acetazolamide Ocular Permeation Using Ascorbyl Laurate Nanostructures as Drug Delivery System. *J Ocul Pharmacol Ther*. 28 (2): 102-109. 2012.
- <sup>77</sup> Analytical Profiles of drugs substances and excipients. Ed Harry G Brittain. Klaus Florey. vol 22: 4. 1993.
- <sup>78</sup> Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. *Int J Pharm*. 6; 248. (1-2): 1-14. 2002.
- <sup>79</sup> Silver LH, et al. Brinzolamide. *Am J Ophthalmol*. 126: 400. 1998.
- <sup>80</sup> Llabot JM, Palma SD, Manzo RH, Allemandi DA. Design of novel antifungal mucoadhesive films Part II. Formulation and in vitro biopharmaceutical evaluation. *Int J Pharm*. 336 (2): 263–268. 2007.
- <sup>81</sup> Fang S, Numajiri D, Kobayashi H, et al. Physicochemical and crystallographic characterization of mefenamic acid complexes with alkanolamines. *J Pharm Sci*. 93 (1): 144-154. 2004.
- <sup>82</sup> Gaspar de Araújo MV, Barbosa Vieira EK, et al. Sulfadiazine/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and molecular modelling. *Bioorg Med Chem*. 15; 16 (10): 5788-94. 2008.
- <sup>83</sup> Palma S, Manzo R, Allemandi D, Fratoni L, LoNostro P. Drugs Solubilization in Ascorbyl-Decanoate Micellar Solutions *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 212: 163-173. 2003.
- <sup>84</sup> Camber O. An in vitro model for determination of drug permeability through the cornea. *Acta Pharm Suec*. 22 (6): 335–342. 1985.
- <sup>85</sup> Dissolution Discussion Group. A user's perspective on dissolution. Philadelphia. Ed. Vankel. 1: 245. 2002.

- <sup>86</sup> Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther.* 82: 377-390. 1944.
- <sup>87</sup> Tártara I, Quinteros D, Saino V, Allemandi D, Palma S. Improvement of Acetazolamide Ocular Permeation Using Ascorbyl Laurate Nanostructures as Drug Delivery System. *J Ocul Pharmacol Ther.* 28 (2): 102-9. 2012.
- <sup>88</sup> Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno A, Walsh J, Sharma SC. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp Eye Res.* 61: 379–382. 1995.
- <sup>89</sup> Kenneth S and the Brinzolamide Primary Therapy Study Group. The Efficacy and Safety of Brinzolamide 1% Ophthalmic Suspension (Azopt®) as a Primary Therapy in Patients With Open-Angle Glaucoma or Ocular Hypertension. Original Research Article. *Surv Ophthalmol.* 44 (2): 155-162. (2000).
- <sup>90</sup> Chickering III DE, Mathiowitz W. Definitions, mechanisms and theories of bioadhesion. En: Mathiowitz E, Chickering III DE, Lehr CM, Bioadhesive drug delivery systems. Capítulo 1, Marcel Dekker Inc. New York. 1. 1999.
- <sup>91</sup> Salamat-Miller N, Chittchang M, Johnston TP. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 57: 1666-91. 2005.
- <sup>92</sup> Mathiowitz E, Chickering III DE, Lehr CM. Bioadhesive drug delivery systems. Capítulo 1, Marcel Dekker Inc. New York. 1999.
- <sup>93</sup> Duchêne D, Ponchel G. Bioadhesion of solid oral dosage forms, why and how. *European Journal of solid oral dosage forms, why and how. European Journal of Pharm. and Biopharm.* 44: 15-23. 1997.
- <sup>94</sup> Rodríguez IC, Cerezo A, Salem I. Bioadhesive delivery systems. *Ars Pharmaceutica.* 41 (1): 115-128. 2000.
- <sup>95</sup> Haas J, Lehr CM. Developments in the area of bioadhesive drug delivery systems. *Expert Opin Biol Ther.* 2 (3): 287-8. 2002.
- <sup>96</sup> Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Deliv Rev.* 3;57 (11): 1556-68. 2005.

- <sup>97</sup> Ahuja RP, Ali J. Mucoadhesive drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 23: 489–515. 1997.
- <sup>98</sup> Tiwari D, Goldman D, Sause R, Madan PL. Evaluation of polyoxyethylene homopolymers for buccal bioadhesive drug delivery device formulations. *AAPS PharmSci.* 1 (3): 13. 1999.
- <sup>99</sup> Gu JM, Robinson JR, Leung HS. Binding of acrylic polymers to mucin/epithelial surfaces: structure–property relationships. *Crit Rev Ther Drug Carr Syst.* 5 (1): 21–67. 1998.
- <sup>100</sup> Loftsson T, Duchene D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* 1;329 (1-2): 1-11. 2007.
- <sup>101</sup> Muñoz Botella S, del Castillo B, Martín M. Las ciclodextrinas: características y aplicaciones de la formación de complejos de inclusión. *Ars. Pharmaceutica.* 36: 187-198. 1995.
- <sup>102</sup> Connors K. The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chem. Rev.* 97: 1325-1357. 1997.
- <sup>103</sup> Loftsson T, Brewster M. Pharmaceutical Applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci.* 85: 1017-25. 1996.
- <sup>104</sup> Loftsson T, Järvinen T. Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 1;36 (1): 59–79. 1999.
- <sup>105</sup> Loftsson T, Duchene D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* 1;329 (1-2): 1-11. 2007. .
- <sup>106</sup> Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* 39: 1033–1046. 2004.
- <sup>107</sup> Kristinsson JK, Fridriksdottir H, Thorisdottir S, Sigurdardottir AM, Stefansson E, Loftsson T. Dexamethasone-cyclodextrine-polymer co-complexes in aqueous eye drops. Aqueous humor pharmacokinetics in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37 (6): 1199-203. 1996.
- <sup>108</sup> Redenti E, Szente L, Szejtli J. Drug-cyclodextrin-hydroxy acid multicomponent systems: properties and pharmaceutical applications. *J Pharm Sci.* 89: 1–8. 2000.
- <sup>109</sup> Redenti E, Szente L, Szejtli J. Cyclodextrin complexes of salts of acidic drugs: thermodynamic properties, structural features, and pharmaceutical applications. *J Pharm Sci.* 90: 979–986. 2001.

- <sup>110</sup> Uekama K, Hirayama F, Irie T. Cyclodextrin drug carrier Systems. *Chem Rev.* 98: 2045-2076. 1998.
- <sup>111</sup> Palma S, Tártara L, Quinteros D, Allemandi D, Longhi M, Granero G. An efficient ternary complex of acetazolamide with HP- $\beta$ -CD and TEA for topical ocular administration. *J Control Release.* 138 (1): 24-31. 2009.
- <sup>112</sup> Montenegro L, Carbone C, Condorelli G, Drago R, Puglisi G. Effect of oil phase lipophilicity on in vitro drug release from o/w microemulsions with low surfactant content. *Drug Dev Ind Pharm.* 32 (5): 539-48. 2006
- <sup>113</sup> Dal Zorro M, Franceschinis E, Punchina A, Realdon N. Effect of the surfactant on the availability of piroxicam as a poorly hydrosoluble drug from suppositories. *Pharmazie.* 67. (1): 37-45. 2012.
- <sup>114</sup> Wade A, Weller PJ. Handbook of pharmaceutical excipients. 2da edición. American Pharm. Association. The Pharm Press. Londres. 1994.
- <sup>115</sup> Köhler U, Yang PW, Weng S, Mantsch HH. Structure and Polymorphic Phase Behavior of Ascorbyl Palmitate in Water. *Canadian Journal of Spectroscopy.* 33 (5): 122-127. 1988.
- <sup>116</sup> Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ, et al. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 120: 701–713. 2002.
- <sup>117</sup> Gordon MO, J.A. Beiser JA, J.D. Brandt JD, et al. The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 120: 714–20. 2002.
- <sup>118</sup> Le A, Mukesh BN, McCarty CA, Taylor HR. Risk factors associated with the incidence of open-angle glaucoma: the visual impairment project. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44: 3783–3789. 2003.
- <sup>119</sup> John SW, Hagaman JR, MacTaggart TE, Peng L, Smithes O. Intraocular pressure in inbred mouse strains. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38 (1): 249-53. 1997.

- <sup>120</sup> Jia L, Cepurna WO, Johnson EC, Morrison JC. Effect of general anesthetics on IOP in rats with experimental aqueous outflow obstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41 (11): 3415–9. 2000.
- <sup>121</sup> Johnson TV, Fan S, Toris CB. Rebound tonometry in conscious, conditioned mice avoids the acute and profound effects of anesthesia on intraocular pressure. *J Ocul Pharmacol Ther.* 24 (2): 175–85. 2008.
- <sup>122</sup> Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, et al. Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink. *Jpn J Ophthalmol.* 42 (5): 337–44. 1998.
- <sup>123</sup> Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME, Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43 (2): 402–10. 2002.
- <sup>124</sup> Grozdanic SD, Betts DM, Sakaguchi DS, Allbaugh RA, Kwon YH, Kardon RH. Laser-induced mouse model of chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44 (10): 4337–4346. 2003.
- <sup>125</sup> Chan KC, Fu Q, Guo H, So K, Wu EX. GD-DTPA enhanced MRI of ocular transport in a rat model of chronic glaucoma. *Exp Eye Res.* 87 (4): 334–41. 2008.
- <sup>126</sup> Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res.* 64 (1): 85–96. 1997.
- <sup>127</sup> Fortune B, Bui BV, Morrison JC, et al. Selective ganglion cell functional loss in rats with experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45 (6): 1854–62. 2004.
- <sup>128</sup> Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res.* 64 (1): 85–96. 1997.
- <sup>129</sup> Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno A, Walsh J, Sharma SC. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp Eye Res.* 61 (3): 379–382. 1995.
- <sup>130</sup> Laquis S, Chaudhary P, Sharma SC. The patterns of retinal ganglion cell death in hypertensive eyes. *Brain Res.* 16;784 (1-2): 100–4. 1998.

- <sup>131</sup> Ruiz-Ederra J, Verkman AS. Mouse model of sustained elevation in intraocular pressure produced by episcleral vein occlusion. *Exp Eye Res.* 82 (5): 879–84. 2006.
- <sup>132</sup> Saiyuu Yu, Teruyo Tanabe, Nagahisa Yoshimura. A rat model of glaucoma induced by episcleral vein ligation. *Exp Eye Res.* 83 (4): 758-70. 2006.
- <sup>133</sup> Moreno MC, Marcos H, Croxatto JO, et al. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid. *Exp Eye Res.* 81 (1): 71–80. 2005.
- <sup>134</sup> Urcola JH, Hernandez M, Vecino E. Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res.* 83 (2): 429–437. 2006.
- <sup>135</sup> Cone FE, Gelman SE, Son JL, Pease ME, Quigley HA. Differential susceptibility to experimental glaucoma among 3 mouse strains using bead and viscoelastic injection. *Exp Eye Res.* 91 (3): 415-424. 2010.
- <sup>136</sup> Orihashi M, Shima Y, Tsuneki H, Kimuraa I. Potent Reduction of Intraocular Pressure by Nipradilol Plus Latanoprost in Ocular Hypertensive Rabbits. *Biol Pharm Bull.* 28 (1): 65-68. 2005.
- <sup>137</sup> Melena J, Santafe J, Segarra J. The Effect of Topical Diltiazem on the Intraocular Pressure in Betamethasone-Induced Ocular Hypertensive Rabbits. *J Pharmacol Exp Ther.* 284 (1): 278–282. 1998.
- <sup>138</sup> Wacker WB, Donoso LA, Kalsow CM, Yankeelov JA, Organisciak DT. Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J Immunol.* 119 (6): 1949-1958. 1977.
- <sup>139</sup> Mermoud A, Baerveldt G, Mickler DS, Wu GS, Rao NA. Animal model for uveitic glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 232 (9): 553–560. 1994.
- <sup>140</sup> Percicot CL, Schnell CR, Debon C, Hariton C. Continuous Intraocular Pressure Measurement by Telemetry in Alpha-Chymotrypsin-Induced Glaucoma Model in the Rabbit: Effects of Timolol, Dorzolamide, and Epinephrine. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 36 (4): 223-8. 1996.

<sup>141</sup> Santafé J, Martínez de Ibarreta MJ, Segarra J, Melena J. The effect of topical diltiazem on ocular hypertension induced by water loading in rabbits. *Gen Pharmacol.* 32 (2): 201-205. 1999.

## **PERSPECTIVAS**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se plantean las siguientes perspectivas:

- I – Diseñar y evaluar formas farmacéuticas conteniendo los Sistemas Portadores de Fármacos estudiados ajustando las variables farmacotécnicas tales como pH, isotonicidad, esterilidad, estabilidad entre otros factores.
- II – Estudiar el efecto de los Sistemas Portadores de Fármacos en conejos hipertensos mediante la utilización de regímenes posológicos adecuados.
- III – Evaluar la utilización de los Sistemas Portadores de Fármacos estudiados para otros fármacos de impacto en terapéutica oftálmica.

## ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ASC <sub>12</sub>	Laurato de Ascorbilo – 6-O-dodecanoato de ascorbilo
ASC <sub>n</sub>	6-O-alkil derivados del ácido ascórbico
AT	Agente tensioactivo
AZM	Acetazolamida
AZM-R	Acetazolamida al 0.1% solubilizado en solución Ringer
CB	Carbomer 974
CD	Ciclodextrinas
CGR	Células ganglionares de la retina
CMC-Na	Carboximetilcelulosa sódica
COA-AZM 0,1%	Laurato de Ascorbilo 2% cargado con 0,1% de acetazolamida
COA-AZM 0,4%	Laurato de Ascorbilo 2% cargado con 0,4% de acetazolamida
Eu	Eudragit
Film R	Film con recubrimiento
Film SR	Film sin recubrimiento
HP-β-CD	Hidroxipropil-Beta-Ciclodextrina
HPLC	Cromatografía Líquida de alta eficacia (performance)
HTO	Hipertensión intraocular
IAC	Inhibidores de la Anhidrasa Carbónica
MT	Malla trabecular
P <sub>cap</sub>	Coefficiente aparente de permeación
PEG	Polietilenglicoles
PIO	Presión intraocular
POL	Poloxamer
SBAF	Sistemas bioadhesivos de administración de fármacos
SDS 2%	Lauril sulfato de sodio al 2%
SLM	Sistemas de liberación Modificada
SPF	Sistemas Portadores de Fármacos
TEA	Trietanolamina
VC	Vitamina C

## PUBLICACIONES

1. *Improvement of Acetazolamide Ocular Permeation Using Ascorbyl Laurate Nanostructures as Drug Delivery System.* **Tártara I**, Quinteros D, Saino V, Allemandi D, Palma S. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics.* 28 (2): 102-109. (2012),
2. *Tratamiento de la Degeneración Macular Asociada a la Edad.* Real JP, **Tártara I**, Allemandi D, Granero G, Palma SD. *Revista Europea de Farmacia Clínica. Aten Farm* 13 (3): 160-71. (2011)
3. *Síndrome de ojo seco.* **Luis I. Tártara**, Juan Manuel Llabot, Daniel A. Allemandi, Santiago D. Palma. *Revista Europea de Farmacia Clínica. Aten Farm;* 12(3): 172-81. (2010)
4. *Variaciones paquimétricas luego de la facoemulsificación.* Romina Figueroa Rosales, Andrea Picco, Eduardo Gómez Demmel, **Luis Ignacio Tártara.** *Oftalmología clínica y experimental (ISSN 1851-2658);* 3 (3): 105-108. (2009).
5. *An efficient ternary complex of acetazolamide with HP- $\beta$ -CD and TEA for topical ocular administration.* Santiago D. Palma, **Luis I. Tártara**, Daniela Quinteros, Daniel A. Allemandi, Marcela R. Longhi, Gladys E. Granero. *J Control Release.* (2009) 38 (1): 24-31. (2009).
6. *Uso racional de tecnologías sanitarias: Tratamiento del Glaucoma.* **Luis Ignacio Tártara**, Alvaro Jiménez Kairuz, Daniel Alberto Allemandi y Santiago Daniel Palma. *Latin American Journal of pharmacy.* 27 (2): 297-302. (2008)
7. *Acetazolamida de Aplicación Tópica: Estudios Preliminares.* **Luis Ignacio Tártara**, Daniela Alejandra Quinteros, Verónica Saino, Rubén Hilario Manzo, Daniel Alberto Allemandi y Santiago Daniel Palma. *Oftalmología Clínica y Experimental* 1(2) 15-18. (2007)
8. *Diseño de medicamentos para uso oftálmico: tendencias tecnológicas.* Palma S, **Tártara I**, Manzo R, Allemandi D. *Médico Oftalmólogo.* 20 (1): 20-4. (2007)