

Nanosistema Dextrano/Quitosano con potencial aplicación oftalmológica
Nanosystem Dextran/Chitosan with potential ophthalmological application

Isabel C. Andueza¹ y Günther Hochhaus²

¹ **Facultad de Farmacia, Unidad de Formulación, Caracterización y Optimización,
Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.**

E-mail: isabel.andueza@ucv.ve

² **College of Pharmacy, Department of Pharmaceutics, University of Florida,
Gainesville-Fl., Estados Unidos**

Resumen

La administración de productos intravítreo constituye un riesgo al paciente, lo que ha conducido al desarrollo de nuevas estrategias de fármacos y sistemas transportadores que disminuyan la frecuencia de administración. Esta investigación tuvo como objetivo desarrollar y caracterizar nanopartículas de Quitosano como sistema de liberación prolongada, empleando polímeros biodegradables, hidrosolubles y compatibles a nivel ocular, para formar un nanosistema combinado: polímero terapéutico/nanopartícula (hemisuccinato de metilprednisolona Dextrano/Quitosano). Las nanopartículas de quitosano se elaboraron por el método de gelificación iónica empleando tripolifosfato sódico como agente entrecruzante y se dispersaron con lactosa mediante el secado por atomización. Se evaluó morfología, distribución del tamaño de las partículas, contenido y eficacia de captura del fármaco así como, su liberación *in vitro*. Las partículas esféricas presentaron superficies lisas y uniformes donde el pH del medio tuvo influencia en el tamaño de las mismas. El Quitosano fue capaz de encapsular el conjugado fármaco-polímero y crear una nueva formulación con una buena dispersabilidad en agua y de características deseables para el sistema ocular, que podría evidenciar un eficiente nanosistema de liberación prologada *in vivo* que reduzca la frecuencia de administración, ofreciendo una excelente alternativa que proporcione un mayor grado de satisfacción y mejore la calidad de vida para los pacientes.

Palabras claves: Quitosano; nanopartículas; formulación oftalmológica.

Abstract

The recurring uses of intravitreal injections represent a risk to the patient. For this reason it has been necessary to develop new drugs and transportation systems that reduce the frequency of administration. The objective of this research was to develop and characterize Chitosan nanoparticles as a system of drug-delivery through combining two nanosystems: a polymer therapeutic/nanoparticle (dextran-methylprednisolone succinate/chitosan) while using biodegradable and hydrophilic polymers that are compatible with the eye. Chitosan nanoparticles are prepared by ionic gelation using sodium tripolyphosphate as cross-linking agent. The nanoparticles were separate by spray dryer using lactose as dispersing agent. Morphology, particle size distribution, drug content, encapsulation efficiency and release profile were evaluated. The spherical particles were showed uniform and with smooth surfaces. The particles sizes were influenced by changes in pH. Chitosan was able to encapsulate the polymer-drug conjugate and create a new formulation with a good dispersibility in water and beneficial characteristics for the ocular system. This nano-drug delivery could constitute an efficient *in vivo* drug delivery nanosystem that provides controlled and sustained drug delivery with reduce frequency of administration. Consequently, helping to provides higher satisfaction to patients and improve their quality of life.

Key words: Chitosan; nanoparticles; ophthalmologic formulation

Introducción

La inyección intravítrea es una técnica mínimamente invasiva de demostrada eficacia en el tratamiento de numerosas enfermedades vítreo-retinianas. En estos últimos años, se ha producido un aumento exponencial en el uso de las inyecciones intravítreas, debido a la administración de nuevos fármacos contra el edema macular, degeneración macular, alteraciones vasculares retinianas, retinopatía diabética, retinitis pigmentaria, inflamaciones intraoculares y la neovascularización coroidea, entre otras patologías, (Gómez-Ulla y col., 2009). En el año 2004 Jager y col., publicaron los riesgos y complicaciones de este procedimiento, entre los que se encontraban endoftalmitis, desprendimiento de retina, hemorragias intraoculares y cataratas. La selección de esta vía de administración no es aceptada ni agradable por el paciente, por lo que los fármacos requieren ser formulados bajo la forma de liberación modificada, a fin de disminuir su frecuencia en la administración. Por lo demás, las otras vías tradicionales que podrían emplearse para estos tratamientos (tópicas, sistémicas y perioculares), presentan la desventaja de tener que atravesar barreras fisiológicas oculares disminuyendo la probabilidad de conseguir niveles terapéuticos y aumentar la toxicidad y efectos adversos, (Ogura, 2001; Ciulla y col., 2004).

En la actualidad la investigación farmacéutica, está aplicando la nanotecnología para el desarrollo de materiales, dispositivos y sistemas con características y aplicaciones distintas a las ya conocidas. De allí surgió la Nanofarmacia, la cual podría definirse como la preparación y liberación de medicamentos o sustancias terapéuticas ultra pequeñas, con un rango de tamaño molecular o nanométrico en un sitio específico de acción del cuerpo humano, sin afectar órganos y tejidos sanos, (Brayden, 2003; Koo y col., 2005). Esta nueva ciencia se enfoca en el desarrollo de vehículos apropiados con

ciertas características, que involucren la capacidad de regular la distribución y depuración del fármaco después de su administración, lo protejan y estabilicen durante todo su recorrido por el ambiente biológico, (De Campos y col., 2004; Yasukawa y col., 2005; Bodor y Buchwald, 2005; Prow y col., 2008; Paolicelli y col., 2009). Una de las aplicaciones que más promete es la nanoencapsulación de fármacos, (Koo y col., 2005), entre los que se encuentran las Nanopartículas (NPs), y se definen como dispersiones de partículas o partículas sólidas con un rango de tamaño entre 10-1000 nm, donde los fármacos se encuentran disueltos, atrapados, encapsulados o unidos a una matriz que por lo general es polimérica, (Mohanraj y Chen, 2006). Su tamaño tan pequeño, le confiere el papel fundamental de permitir el paso a través de los capilares para lograr llegar a estructuras intracelulares donde el fármaco pueda ejercer su acción, (Mitra y Maitra, 2002).

El empleo de los polímeros y macromoléculas en la formación de microesferas y NPs, ha generado gran interés en los nuevos productos oftálmicos, (Kaur y col., 2004). De Campos y col., (2004), cuantificaron y estudiaron el mecanismo de interacción de NPs de Fluoresceína-Quitosa (FI-Qs) en las superficies epiteliales de la córnea y la conjuntiva de conejos machos albinos de Nueva Zelanda. Ellos demostraron, que la interacción de la FI en la superficie ocular fue más efectiva bajo la forma de NPs de Qs. El Qs es un polisacárido lineal derivado de la quitina, que es extraída de los crustáceos marinos. Está compuesta de cadenas de β -(1,4)-D-glucosamina y de N-acetil-D-glucosamina, tiene un carácter básico y baja solubilidad en agua. Trabajos anteriores recomiendan dispersar el Qs en solución acuosa de ácido acético en un rango de pH entre 4 y 6, ya que se requiere de un medio ácido ($\text{pH} < 6,5$), para protonar sus grupos amino, convirtiéndose en un polication con NH_3^+ , y lograr su disolución en agua, (Janes

y col, 2001; Zhang y col, 2002; Tang y col, 2007; Peptu y col, 2010). Una de las ventajas que presenta el Qs en la formación de NPs es su capacidad de inmovilizar grandes moléculas mediante la creación de redes insolubles cuando reacciona con un agente entrecruzante que neutraliza sus cargas. Estos sistemas pueden modificar y/o controlar la liberación de los fármacos, (Tang y col, 2006; Tang y col, 2007; Fernandes y col, 2008).

Recientemente, en el campo de los materiales nanoestructurados, se ha empleado el secado por atomización, el cual consiste en la transformación de una dispersión líquida en un material seco particulado. Este proceso permite modificar propiedades muy importantes en las NPs, como son: la distribución de tamaño, morfología y estado de aglomeración, entre otras, (Mondragón y col, 2013).

Todo lo anterior, nos condujo a evaluar nuevas estrategias que favorecieran una disminución en la frecuencia de administración a nivel ocular. Por consiguiente, esta investigación tuvo como objetivo desarrollar NPs de Qs como sistema de liberación prolongada con posible aplicación intravítrea, empleando un polímero terapéutico modelo como el hemisuccinato de metilprednisolona-Dex (MPS-Dex) 10 kDa.

Materiales y Métodos

Reactivos y materiales

MPS-Dex 10kDa, fue sintetizado en el laboratorio del Departamento de Farmacéuticos de la Universidad de Florida, EEUU. Tripolifosfato sódico (TPP), acetato de sodio; ácido acético glacial, solución amortiguadora de fosfato pH= 7,4, acetonitrilo y metanol grado HPLC, fueron obtenidos de Fisher Scientific, USA. Hidróxido de sodio, ácido clorhídrico,

bolsas de diálisis de celulosa y el Qs (50-190 kDa), fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Lactosa extra fina de EM industry, NY, USA.

Elaboración de NPs de Qs por el método de gelificación iónica.

La formulación se preparó por triplicado, adaptándose los métodos reportados por Calvo y col. (1997a, b) y Grenha y col. (2007), en donde las NPs se forman espontáneamente a temperatura ambiente ($22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) al interactuar las cargas positivas de los grupos amino del Qs con un contra-anión que en este caso es el TPP. Para ello, se preparó una dispersión al 0,180% de Qs de baja viscosidad con un grado de desacetilación de 92,2%, en solución amortiguadora de ácido acético/acetato de sodio pH=5,5 y una solución acuosa de TPP al 0,25%. La relación final de la mezcla entre Qs y TPP para la formación de las $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Qs}}$ fue de 3,6:1 p/p. Se pesó de MPS-Dex 10 kDa, el equivalente a 5 mg de MPS; se disolvió en una mezcla de acetonitrilo:agua bidestilada 50:50; esta solución se mantuvo con agitación magnética moderada entre 4-5°C. Posteriormente se incorporó la dispersión de Qs a una velocidad de 0,5 mL/min. Se continuó con la misma agitación por 16 h \pm 1h a temperatura ambiente. Culminado este período, se agregó la solución de TPP a la misma velocidad y se agitó durante siete horas a la misma temperatura.

Purificación de las NPs

La dispersión acuosa obtenida se colocó en una bolsa de diálisis de celulosa sellada por ambos extremos. La bolsa se introdujo en un envase que contenía el medio de purificación. Se emplearon como medios: solución amortiguadora diluida de acetato de sodio pH 5,5 y agua bidestilada. Las $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Qs}}$ purificadas se llevaron a un volumen de 100mL con agua bidestilada. De la nanosuspensión anterior fueron liofilizados un

volumen de 50 mL en un FreeZone 6 Labconco Co., por 48 horas. El resto del volumen fue empleado para incorporarle a las NPs el agente dispersante.

Incorporación del agente dispersante en las NPs

A 50 mL de la nanosuspensión purificada, se les añadió 3% de lactosa extra fina y se le aplicó la técnica de secado por atomización con aire nebulizado para formar micropartículas compuestas por NPs_{MPS-Dex-Qs}/lactosa. Se empleó un equipo a escala piloto con un nebulizador concéntrico de dos puertos, con una temperatura de secado de $78^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, (Buchi, 2002).

Morfología de las NPs

Las muestras liofilizadas, fueron espolvoreadas sobre un papel conductor de carbón de doble cara adhesivo PELCO[®]. Previamente a la observación, las superficies de las partículas fueron cubiertas con carbón. Las muestras se visualizaron en un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6335F Instrument, con un voltaje de aceleración de 2kV. Las micrografías se tomaron a diferentes ampliaciones y se observaron las características morfológicas de las NPs. Por otra parte, también se evaluaron tanto las NPs suspendidas por 12 horas en solución amortiguadora de ácido acético/acetato de sodio pH=5,5, como las micropartículas obtenidas en el secado por atomización. Estas últimas se dispersaron en agua bidestilada durante un minuto. Para su visualización, se colocaron gotículas de ambas nanosuspensiones, sobre diferentes papeles conductivos y se dejaron a temperatura ambiente hasta la completa evaporación del solvente. Posteriormente, se continuó de la manera ya descrita para las muestras liofilizadas. Se empleó el programa Photoshop para medir los diámetros correspondientes.

Distribución del tamaño de las NPs

Las NPs fueron evaluadas antes y después del proceso de diálisis así como, las micropartículas obtenidas en el secado por atomización. Para ello se empleó un analizador de tamaño de partículas con dispersión de luz dinámica Nanotracs NPA250 Ultra, con sonda externa y empleando el programa Flex 10.3.7 y a una temperatura de $25^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Los datos y las distribuciones del tamaño de las partículas, fueron obtenidos del promedio de tres corridas por cada una de las muestras, expresándose los resultados en diámetro volumen medio, (Nanotracs, 2007; Anaspec, 2010; Dandagi y col, 2011).

Carga eléctrica superficial

Para caracterizar la carga superficial de las NPs en un medio dispersante, se emplea el potencial Zeta (ζ). Esta medida está influenciada por la composición de las partículas y del medio dispersante. La carga de MPS-Dex 10 kDa y de las NPs de Qs tanto vacías como cargadas con el compuesto activo, fueron dispersadas en agua bidestilada. La movilidad electroforética de las partículas que es indicativo de la magnitud de su carga, se midió en un Zetameter, Brookhaven ZetaPlus. Los datos fueron obtenidos del promedio de diez corridas por cada muestra, a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Los resultados se expresaron en mV.

Estimación del contenido del fármaco en las NPs

Se pesaron tres muestras de $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Qs}}$ liofilizadas, equivalente a 2,4 mg MPS (considerando que no hubo pérdida del fármaco durante su elaboración). Se les agregó 2,5 mL de solución amortiguadora de ácido acético/acetato de sodio pH=5,5 y se mantuvieron en un agitador horizontal marca Bellco Biothechnology, durante 24 horas a 40 revoluciones por minuto (r.p.m.) y a temperatura ambiente. Transcurrido el período,

las muestras se centrifugaron a 12.000 r.p.m. durante 15 minutos en una microcentrífuga Fisher Scientific modelo 235C. Se midió 1 mL de cada sobrenadante y se procedió a realizar una hidrólisis alcalina para cuantificar el contenido de Metilprednisolona (MP) por el método de cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa previamente validado, (Andueza, 2012).

Determinación de la eficacia de captura del fármaco en las NPs

La carga real del fármaco en las NPs_{MPS-Dex-Qs} y la eficiencia de captura fueron determinadas matemáticamente por las ecuaciones que se detallan a continuación. La carga nominal o teórica del fármaco se calculó en función de la cantidad de fármaco que podría encontrarse en 100 g de NPs liofilizadas asumiendo que no hubo pérdida de fármaco ni de polímero durante su elaboración, (Judefeind y Villiers, 2009).

$$\text{Carga real del fármaco (\%)} = \frac{\text{masa del fármaco en las NPs}}{\text{masa de las NPs}} \times 100$$

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

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

Es importante resaltar que para el cálculo de la carga nominal del fármaco, se tomó en consideración los pesos del TPP y del MPS-Dex incorporados en el proceso de elaboración de las NPs.

Liberación in vitro

La liberación del fármaco fue determinada incubando tres muestras de 10 mg NPs_{MPS-Dex-Qs} liofilizadas en 5 mL de solución amortiguadora isotónica de fosfato pH=7,2 y mantenidas en un baño de agua a $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ con agitación horizontal a 40 r.p.m. (Xu y Hanna, 2007). Se extrajeron alícuotas de 1 mL a diferentes tiempos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24 horas y luego 2, 3, 4, 5 y 7 días. Cada alícuota fue analizada por el método de cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa previamente validado. Los resultados se expresaron en términos de porcentaje de MPS.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Los criterios tomados en esta investigación para el desarrollo del sistema de liberación nanoparticulado, se fundamentaron principalmente en la capacidad que presentan las NPs de Qs para atrapar macromoléculas y del empleo de un polímero terapéutico, a fin de mejorar las propiedades del fármaco madre (MP), (Andueza, 2012). Igualmente, se consideró la compatibilidad, biodegradabilidad, hidrosolubilidad y baja toxicidad a nivel ocular de los reactivos empleados, así como la no incorporación de solventes orgánicos en el método de gelificación iónica, (Tang y col, 2006; Tang y col, 2007; Fernandes y col, 2008).

Elaboración de NPs de Qs por gelificación iónica.

En la gelificación iónica, el polianión (TPP), produce interacciones inter e intramoleculares con la carga positiva de los grupos aminos del Qs. Estas atracciones electrostáticas transforman la dispersión líquida del Qs en gel y bajo ciertas condiciones como el pH de la solución, la velocidad de añadido del agente entrecruzante, el tiempo de reacción y el peso molecular del polímero, dan origen a NPs insolubles en medio

acuoso, (Shu y Zhu, 2000). Todas estas consideraciones fueron estudiadas para obtener las partículas homogéneas y completamente constituidas. En este mismo sentido, la selección de la proporción entre Qs:TPP, para la formación de las NPs_{MPS-Dex-Qs}, fue de gran importancia, ya que involucraba en la síntesis una macromolécula como compuesto activo (MPS-Dex), (Janes y col., 2001; Grenha y col., 2007).

Purificación de las NPs

Las condiciones establecidas para la diálisis fueron capaces de eliminar el exceso de reactivos y subproductos solubles. Sin embargo, a pesar de ser un método de purificación de bajo impacto, la nanosuspensión, evidenció el fenómeno de agregación en función del tiempo que se observó en las micrografías (Figura 1) y en los estudios de la distribución del tamaño de las partículas.

Incorporación del agente dispersante en las NPs

El secado por atomización con un nebulizador concéntrico de dos puertos, permitió nebulizar gotículas muy finas con la capacidad de suspenderse en el aire caliente, durante su paso por la cámara de secado. Esta técnica permitió recubrir individualmente las partículas, dando origen a micropartículas de NPs_{MPS-Dex-Qs/lactosa} y contribuir de esta manera con una menor agregación y una mejor dispersión en agua.

Morfología de las NPs

La mayoría de las NPs liofilizadas fueron prácticamente esféricas con una superficie lisa y uniforme, lo que podría indicar que las moléculas de MPS-Dex, Qs y TPP interactuaron uniformemente para obtener las NPs con diámetros inferiores a 450 nm. En la Figura 1, se observa la micrografía de las NPs_{MPS-Dex-Qs} después de ser almacenadas en una solución amortiguadora de ácido acético/acetato de sodio pH 5,5. Algunas NPs se hallaban hidratadas donde las más grandes contenían atrapadas en su

interior otras de menor tamaño. Esto podría postular el hecho de que ocurre una primera encapsulación entre MPS-Dex y el Qs por interacción de cargas, formando partículas insolubles de menor tamaño, que posteriormente son encapsuladas con mayor cantidad de Qs debido al añadido del TPP. Sin embargo, sería necesario continuar realizando nuevas evaluaciones, a fin de confirmar este supuesto.

En este mismo sentido, al dispersar en agua bidestilada las micropartículas de $NPs_{MPS-Dex-Qs/lactosa}$, mostraron ser esféricas y con una mejor separación entre ellas, disminuyendo su agregación. Asimismo, presentaron una polidispersión de tamaños comprendidos entre 330- 2750 nm. Esto confirma que la lactosa se va disolviendo en el agua y liberando las $NPs_{MPS-Dex-Qs}$, Figura 3.

Distribución del tamaño de las NPs

Las $NPs_{MPS-Dex-Qs}$ presentaron el fenómeno de agregación, principalmente en ausencia de pH ácido. Al purificar con agua las NPs, se elimina la solución amortiguadora y el pH se elevó de 5,5 a 6,0 – 6,5, pH cercano al pKa del Qs, provocando un aumento del tamaño muy probablemente por desprotonación de los grupos amino, originando la formación de agregados y una distribución del tamaño de las partículas bimodal, Figura 4 y Tabla I. Cuando se evaluó la distribución de tamaño de las nanosuspensiones a pH= 5,5, se observó que las NPs se encontraron fundamentalmente entre 130 - 170 nm. Resultados similares fueron encontrados por Malhotra y col. (2009); donde las NPs de Qs/TPP en proporción 3:1, a pHs de 5 y de 3 para la soluciones de Qs y TPP respectivamente, mostraron tamaños de partículas más bajos 76 ± 1 nm, lo que confirma una vez más que el pH y la proporción de los reactantes, juegan un papel fundamental en el tamaño de las mismas. Por otra parte, las micropartículas de $NPs_{MPS-Dex-Qs/lactosa}$, demostraron una buena dispersión en agua bidestilada y

evidenciando una distribución normal donde el mayor porcentaje se encontraron en el rango de tamaño comprendido entre 100 - 145 nm, Figura 5 y Tabla II.

La elaboración del nuevo nanosistema entre el MPS-Dex y las NPs de Qs, permitió la creación de partículas de tamaños nanométricos. Esto es de suma importancia, ya que algunos trabajos han sugerido que un apropiado tamaño con un rango estrecho, asegura una baja irritación, adecuada biodisponibilidad y compatibilidad con los tejidos oculares, (Barbu y col., 2006; Bucolo y col., 2008; Paolicelli y col., 2009).

Carga eléctrica superficial

La carga neta superficial del polímero terapéutico y de las NPs que está directamente relacionada con el potencial ζ , permitió conocer la probabilidad de ocurrencia de la reacción ya que, atracciones electroestáticas entre especies de electronegatividades diferentes, modifica la carga superficial del compuesto resultante, (Malhotra y col., 2009). Al comparar el potencial ζ entre las NPs vacías y las cargadas con MPS-Dex 10kDa, sugiere que la macromolécula fue incorporada en la matriz Qs/TPP, Tabla III. Esta reducción de la carga podría apoyar el supuesto de posibles interacciones entre las cargas positivas del grupo amino del Qs y la electronegatividad de los átomos presentes en el MPS-Dex así como, la interacción iónica con el TPP.

Estimación del contenido del fármaco y la eficacia de captura en las NPs

El contenido de MPS en las $NPs_{MPS-Dex-Qs}$ encontrado, fue de $1,1\% \pm 0,1$, lo que correspondió a la carga real del fármaco en las NPs. La eficacia de captura en términos de MPS fue de $45 \pm 10 \%$. Estos ensayos preliminares nos sugieren continuar con estos estudios, de tal manera de evaluar si estos resultados son satisfactorios en la obtención del efecto terapéutico y disminución de la frecuencia de administración.

Liberación in vitro

A pH fisiológico se observó un equilibrio hidrolítico de liberación tanto de MP como MPS. Estos compuestos fueron cedidos de forma continua durante las primeras horas, lo que podría corresponder con una rápida liberación debido a que parte del compuesto activo se encontraba en la superficie de las NPs. A partir de las 24 horas, el proceso se hizo más lento y hacia la formación de mayor concentración del compuesto terapéuticamente activo (MP). Esto podría deberse a que el MPS-Dex se encontraba en las zonas internas de las NPs, y para la liberación de la MP involucra procesos como su hidrólisis del Dex, la difusión a través de las NPs y la erosión de estas últimas. En la Figura 6, se encuentra el perfil de liberación expresado en términos de MPS. Este comportamiento indicó la capacidad que tiene esta formulación para comportarse como módulo de cesión de fármaco *in vitro*, por lo que se debe continuar trabajando en próximos estudios con fluidos oculares para conocer la influencia del medio biológico en el proceso de liberación.

CONCLUSIONES

Todos estos halagadores hallazgos revisten singular importancia, ya que nos permiten afirmar el posible potencial que presenta el desarrollo de formulaciones oftálmicas de polímeros solubles en agua, biocompatibles y biodegradables que beneficien el tratamiento de las enfermedades intraoculares. El Qs fue capaz de encapsular el compuesto fármaco-polímero y crear una nueva formulación de tamaño nanométrico (polímero terapéutico/nanopartícula), con una buena dispersabilidad en agua y con características deseables para el sistema ocular, que podría evidenciar un eficiente sistema de liberación prologada *in vivo* que reduzca la frecuencia de administración,

ofreciendo una excelente alternativa que proporcione un mayor grado de satisfacción y mejore la calidad de vida para los pacientes.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen por el financiamiento para este proyecto a la Universidad Central de Venezuela (CDCH) y a la Universidad de Florida, EEUU (Department of Pharmaceutics).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anaspec, 2010: [en línea]. [consultado 2010 diciembre 20]; disponible en:
<http://www.nanomicroclub.com/events/Amsterdam230210/Anaspec.pdf>
2. Andueza I. Desarrollo de un Nanosistema para la liberación de Fármacos intravítreo [Tesis Doctoral]. Universidad Central de Venezuela; 2012.
3. Barbu E, Verestiuc L, Nevell T, Tsibouklis J. 2006. Polymeric materials for ophthalmic drug delivery: trends and perspectivas. *J. Mater. Chem.* 16: 3439-3443.
4. Bodor N, Buchwald P. 2005. Ophthalmic Drug Design Based on the Metabolic Activity of Eye: Soft Drug a Chemical Delivery Systems *The AAPS J.* 7(4): Article 79 E820-E833.
5. Brayden D. 2003. Controlled release technologies for drug delivery. *Drug. Discov. Today.* 8 (21): 976 - 978.
6. Buchi Training Papers Spray Drying. Copyright© BÜCHI Labortechnik AG. 2002 [en línea]. [consultado 2010 agosto 25]; disponible en:
http://www.buchi.com/Spray_Drying_Theory_of_Operati.962.0.html
7. Bucolo C, Maltese A, Drago F. 2008. When nanotechnology meets the ocular surface. *Expert Rev Ophthalmol.* 3: 325-32.

8. Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. 1997a. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polymer Sci.* 63: 125-132.
9. Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. 1997b. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm Res.* 14: 1431-1436.
10. Ciulla T, Walker J, Fong D, Criswell M. 2004. Corticosteroids in posterior segment disease: an update on new delivery systems and new indications *Curr Opin Ophthalmol.* 15: 211–220.
11. Dandagi P, Patel P, Patil P, Mastiholimath V, gadad A. 2011. Development and Characterization of a Particulate Drug Delivery System for Etoposide. *Indian J. drug deliv.* 3(1): 43-51.
12. De Campos A, Diebold Y, Carvalho E, Sánchez A, Alonso M. 2004. Chitosan Nanoparticles as New Ocular Drug Delivery Systems: *in Vitro* Stability, *in Vivo* Fate, and Cellular Toxicity. *Pharm. Res.* 21 (5): 803-810.
13. Fernandes S, de Oliveira R, Fatibello-Filho O, Spinelli A, Cruz Vieira I. 2008. Biosensor based on laccase immobilized on microspheres of chitosan crosslinked with tripolyphosphate. *Sens. Actuators B.* 133: 202–207.
14. Gómez-Ulla F, Basauri E, Arias L, Martínez-Sanz F. 2009. Manejo De Las Inyecciones Intravítreas. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 84: 377-388.
15. Grenha A; Seijo B; Serra C; Remuñan-López C. 2007. Chitosan Nanoparticle-Loaded Mannitol Microspheres: Structure and Surface Characterization. *Biomacromolecules.* 8: 2072-2079.
16. Jager R, Aiello L, Patel S, Cunningham E Jr. 2004. Risks of intravitreal injection: a comprehensive review. *Retina.* 24: 676-698.
17. Janes K, Calvo P, Alonso M. 2001. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47: 83–97.

18. Judefeind A, Villiers M. en Villiers M; Aramwit P; Kwon G, editors. Nanotechnology in Drug Delivery N.Y. American Association of Pharmaceutical Scientists. 2009. Vol. 10 Cap 5 pp. 129-162.
19. Kaur I, Garg A, Singla A, Aggarwal D. 2004. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. *Int. J. Pharm.* 269 (1): 1-14.
20. Koo O, Rubinstein I, Onyuksel H. 2005. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomed-nanotechnol-Biol-Med.* 1 (3): 193– 212.
21. Madrigal-Carballo S, Porrás G, Esquivel M, Vega-Baudrit J, Sibaja M, Tamborero S, Vicent M. 2007. Conjugados poliméricos y su utilización como Nanomedicinas anticancerígenas. *Rev. Iberoamer. Polim.* 8 (5): 374-390.
22. Malhotra M, Kulamarva A, Sebak S, Paul A, Bhathena J, Mirzaei M, Prakash S. 2009. Ultrafine chitosan nanoparticles as an efficient nucleic acid delivery system targeting neuronal cells. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 35 (6): 719–726.
23. Mitra S, Maitra A. 2002. Nanoparticulate carriers in drug delivery and targeting. *Proc. Indian Natn. Sci. Acad.* 4 (1): 349-360.
24. Mohanraj V, Chen Y. 2006. Nanoparticles – A Review. *Trop. J. Pharm. Research.* 5 (1): 561-573.
25. Mondragón R, Juliá J.E, Barba A, Jarque J.C. 2013. El proceso de secado por atomización: formación de gránulos y cinética de secado de gotas. *Bol.Soc.Esp.Cerm.Vidr.* 52 (4): 159-168.
26. Nanotracs, 2007: [en línea]. [consultado 2010 enero 31]; disponible en:
http://www.particle-matrix.de/fileadmin/pdf/Nanotracs_en_07.pdf
27. Ogura Y. 2001. Drug delivery to the posterior segments of the eye. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 52: 1 –3.
28. Paolicelli P, De la Fuente M, Sánchez A, Seijo B, Alonso M. 2009. Chitosan nanoparticles for drug delivery to the eye. *Expert Opin. Drug Deliv.* 6(3): 239-253.

29. Peptu CA, Buhus G, Popa M, Perichaud A, Costin D. 2010. Double Cross-linked Chitosan–Gelatin Particulate Systems for Ophthalmic Applications. *J. Bioac Comp Poly.* 25: 98-116.
30. Prow T, Bhutto I, Kim S, Grebe R, Merges C, McLeod, Uno K; Mennon M, Rodriguez L, Leong K, Luty G.A. 2008. Ocular nanoparticle toxicity and transfection of the retina and retinal pigment epithelium. *Nanomedicine: Nanotech. Biol Med.* 4: 340-349.
31. Shu X, Zhu K. 2000. A novel approach to prepare tripolyphosphate:chitosan complex beads for controlled release drug delivery *Int J Pharm.* 201: 51-58.
32. Tang Z, Qian J, Shi L. 2006. Characterizations of immobilized neutral proteinase on chitosan nano-particles. *Proc. Biochem.* 41: 1193–1197.
33. Tang Z, Qian J, Shi L. 2007. Preparation of Chitosan Nanoparticles as Carrier for Immobilized Enzyme. *Appl. Biochem Biotechnol.* 136: 77-95.
34. Xu Y, Hanna M.A. 2007. Electrospayed bovine serum albumin-loaded tripolyphosphate cross-linked chitosan capsules: Synthesis and characterization. *J. Microencap.* 24(2): 143–151.
35. Yasukawa T, Ogura Y, Sakurai E, Tabata Y, Kimura H. 2005. Intraocular sustained drug delivery using implantable polymeric devices *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57: 2033–2046.
36. Zhang H, Alsarra I, Neau S. 2002. An *in vitro* evaluation of a chitosan-containing multiparticulate system for macromolecule delivery to the colon. *Int. J. of Pharm.* 239: 197–205.

Tabla I

Resumen de los datos obtenidos de la distribución del tamaño de las $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Qs}}$ emitido por el Nanotrak NPA250 Ultra.

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

Tabla II.

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

NPs_{MPS-Dex-Qs}	Tamaño de las partículas Volumen medio (nm) \pm DSR
Antes de la diálisis	154 \pm 12
Después de la diálisis	334
En micropartículas/ lactosa	128 \pm 10

Tabla III

Potencial ζ de MPS-Dex y de las NPs de Qs en agua bidestilada

Nombre	Potencial ζ (mV) \pm DSR
MPS-Dex	-30 \pm 0,59
NPs Qs vacías	+ 50 \pm 1,81
NPs _{MPS-Dex-Qs}	+33 \pm 1,97

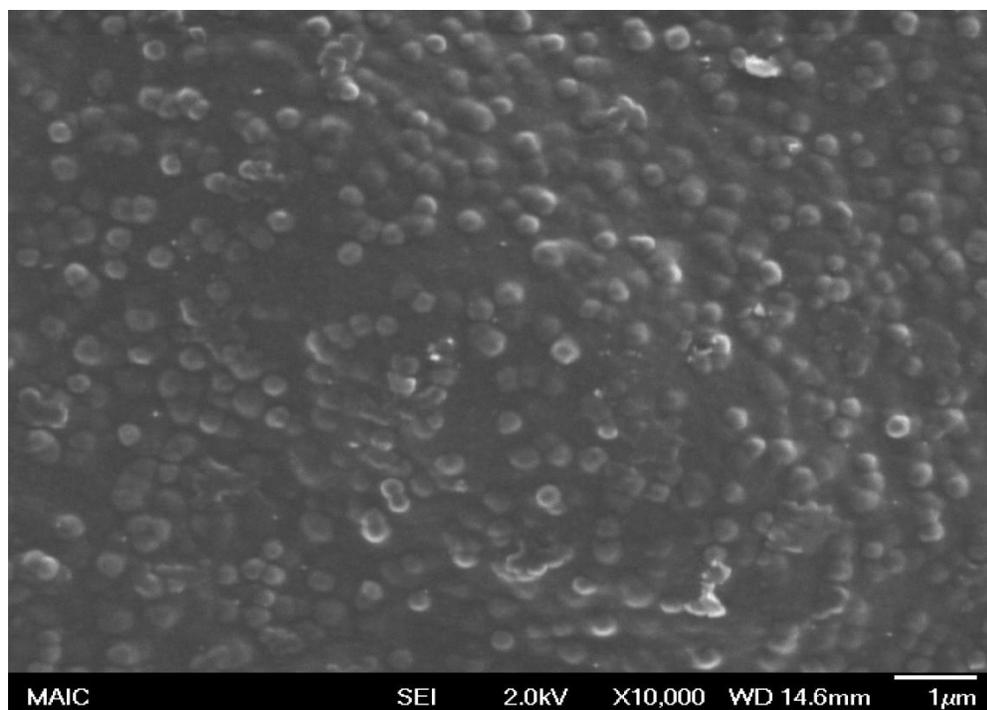


Figura 1. Micrografía de NPs_{MPS-Dex-Qs} liofilizadas.

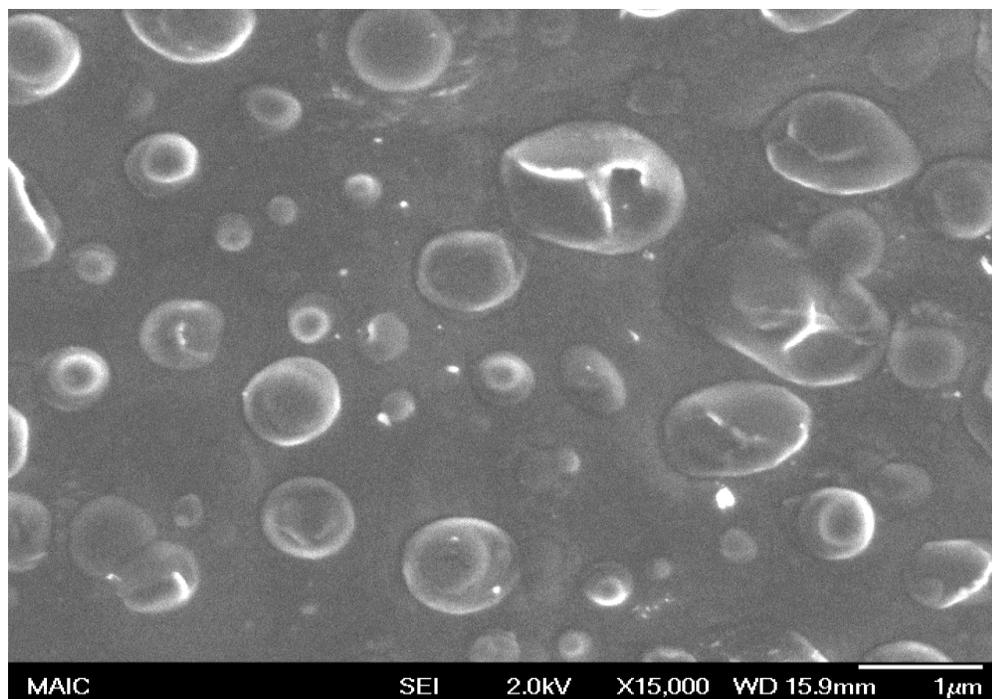


Figura 2. Micrografía de $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Qs}}$ suspendidas a pH ácido.

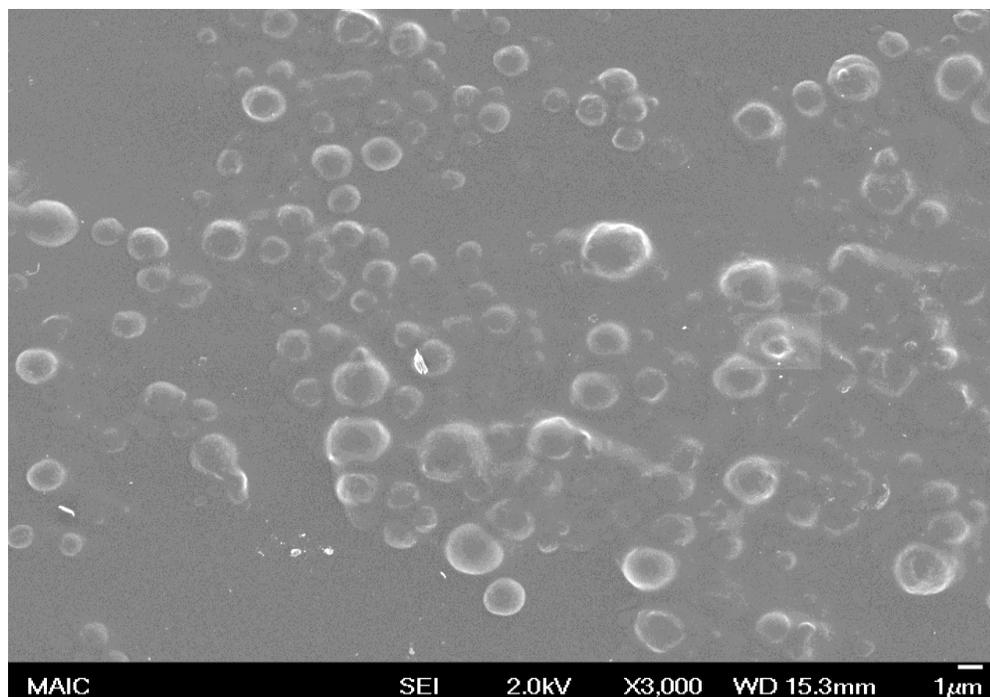


Figura 3. Micrografía de una dispersión acuosa de micropartículas de $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Q}_S}$ /lactosa, secadas por atomización.

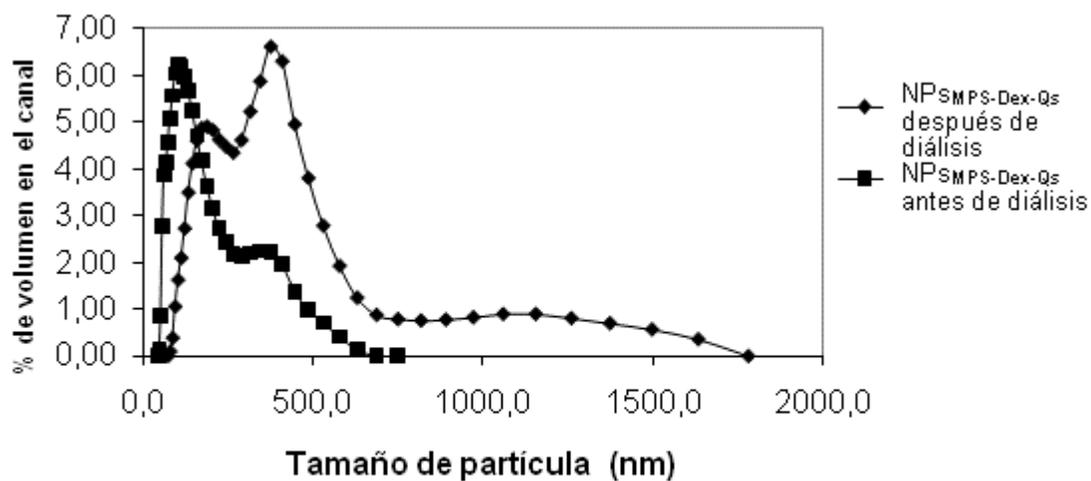


Figura 4. Distribución de tamaño de $\text{NPs}_{\text{MPS-Dex-Qs}}$

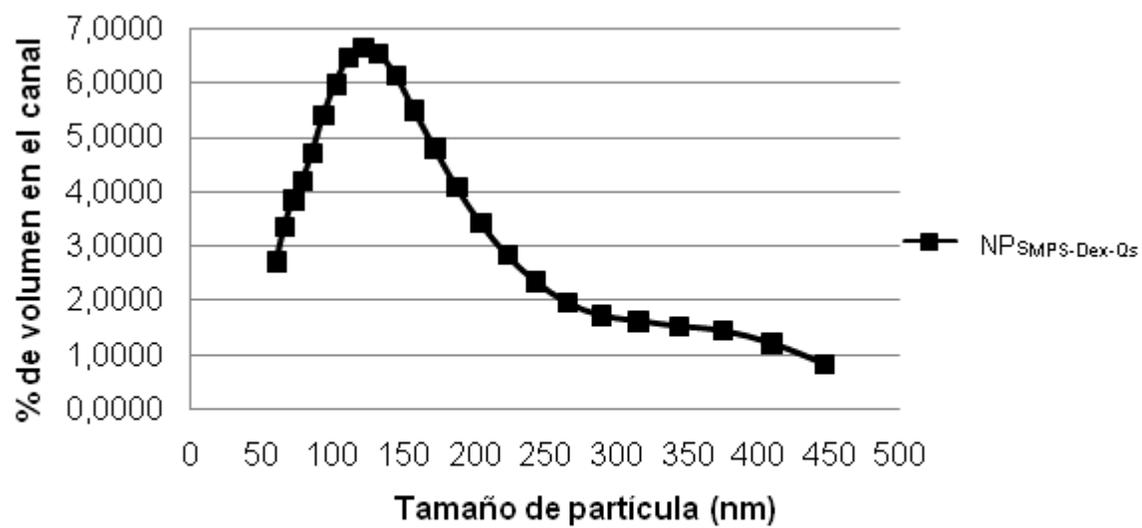


Figura 5. Distribución del tamaño de las micropartículas de NPs_{MPS-Dex-Qs}/adosa.

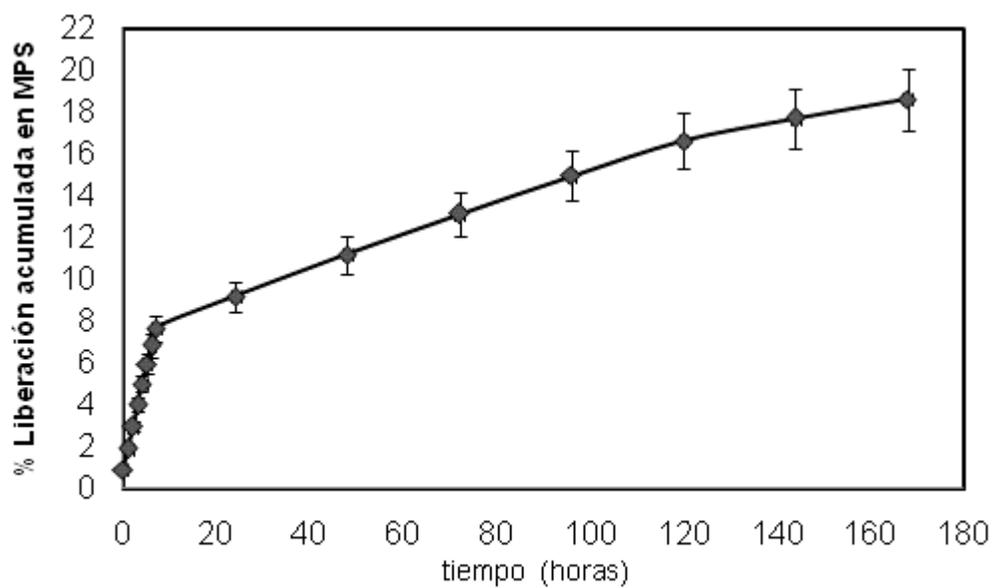


Figura 6. Perfil de liberación de NPs_{MPS-Dex-Qs} en buffer (pH= 7,2) a 37°C