

# XV CONGRESO DE LA FEDERACIÓN FARMACÉUTICA SUDAMERICANA



VIII Congreso de Ciencias Farmacéuticas  
XII Simposio Colombiano de Ciencia y Tecnología Cosmética  
Cartagena de Indias - Colombia • Agosto 16, 17 y 18



Cartagena de Indias, Colombia, 18 de Agosto de 2012

## EL XV CONGRESO DE LA FEDERACIÓN FARMACÉUTICA SUDAMERICANA

### CERTIFICA QUE:

Se presentó el trabajo científico titulado “DESARROLLO DE UN NUEVO SISTEMA DE LIBERACIÓN INTRAVÍTREO, PROFÁRMACO/NANOPARTÍCULA” y fue publicado en las memorias del Congreso realizado entre el 16-18 de agosto de 2012.

Autores:

- Isabel Andueza
- Cesar Luna
- Günther Hochhaus

Cordialmente,

  
**CARLOS EDUARDO JEREZ ZULETA**  
Presidente  
Congreso FEFAS 2012



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA FARMACÉUTICA**

Caracas, 21 de febrero de 2013

Comisión Central del Programa de Estimulo  
a la Innovación e Investigación (PEII)  
Presente.

Por medio de la presente, se hace constar que el trabajo de investigación titulado: **“Desarrollo de un nuevo sistema de liberación intravítreo, Profármaco/Nanopartícula”** perteneciente a los autores Hochhaus Günther, César Luna e Isabel Andueza, fue publicado como resumen en extenso en las memorias del XV Congreso de la Federación Farmacéutica Sudamericana, VIII Congreso de Ciencias Farmacéuticas y XII Simposio Colombiano de Ciencia y Tecnología Cosmética celebrados en la ciudad de Cartagena de Indias, Colombia del 16 al 18 de agosto de 2012.

Para acceder a dicha publicación, se debe ingresar a través de la dirección electrónica [www.fefas2012.com](http://www.fefas2012.com) y digitar en la parte superior de la página los siguientes datos:

Usuario: FEFAS2012 (mayúsculas sin espacios)  
Clave: Septiembre2012 (S en mayúscula y sin espacio)

Sin más que hacer referencia, se despide,

Atentamente,

Prof. Isabel Andueza Galebo  
Jefa del Departamento de Tecnología  
Farmacéutica, Cosmética y de los Alimentos



# DESARROLLO DE UN NUEVO SISTEMA DE LIBERACIÓN INTRAVÍTREO, PROFÁRMACO/NANOPARTÍCULA

Isabel Andueza<sup>1</sup>; Günther Hochhaus<sup>2</sup>, César Luna,

<sup>1</sup>Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia, Caracas, Venezuela

<sup>2</sup>Universidad de Florida, Escuela de Farmacia, Gainesville-Fl., Estados Unidos

isabel.andueza@ucv.ve

## **INTRODUCCIÓN**

La inyección intravítrea es una técnica mínimamente invasiva de demostrada eficacia en el tratamiento de numerosas enfermedades vitreoretinianas. En estos últimos años se ha producido un aumento exponencial de su uso, debido a la aplicación de nuevos fármacos contra el edema macular, alteraciones vasculares retinianas, retinopatía diabética, inflamaciones intraoculares y neovascularización coroidea, entre otras patologías (Gómez-Ulla y cols., 2009). La administración de la inyección intravítrea constituye un riesgo al paciente que aumenta con la frecuencia del tratamiento, pudiendo afectar su visión. En el año 2004 Jager y cols., publicaron los riesgos y complicaciones de este procedimiento, entre los que se encontraban endoftalmítis, desprendimiento de retina, hemorragias intraoculares y cataratas. La selección de esta vía de administración no es aceptada ni agradable por el paciente; sin embargo, hasta el momento, es una forma de lograr el efecto terapéutico a bajas dosis, disminuyendo la toxicidad y efectos adversos de los fármacos. Los otros métodos tradicionales que podrían emplearse en el tratamiento serían tópicos, sistémicos y perioculares, los cuales tienen la desventaja de que el fármaco debe atravesar las barreras fisiológicas oculares dificultando alcanzar los niveles terapéuticos fácilmente y esto implicaría asociar la continua administración con elevadas concentraciones, pudiéndose obtener efectos sistémicos indeseados (Ogura, 2001; Ciulla y cols., 2004).

Para entenderlo mejor podríamos explicar brevemente la anatomo-fisiología del sistema ocular. A simple vista, pareciera ser un órgano ideal y de fácil acceso para el tratamiento del segmento anterior (córnea, cámara anterior, cámara posterior, iris, humor acuoso, cristalino, y cuerpo ciliar); por el contrario, está bien protegido contra la absorción de cualquier sustancia externa. En primer lugar, se encuentran los párpados y el fluido lagrimal y posteriormente la córnea que forma una eficiente barrera física y biológica. Cuando un material extraño o medicamento se introduce en la superficie ocular, se incrementa inmediatamente el flujo lagrimal, originando una rápida eliminación a través del conducto nasolagrimal, pasando luego a la membrana mucosal de la nariz, orofaringe y tracto gastrointestinal, donde puede ser capaz de llegar concentraciones importantes del fármaco a la circulación sistémica (Bodor y Buchwald, 2005; Urtti, 2006). Es por ello, que la secreción lagrimal refleja, el parpadeo y la escasa permeabilidad de la córnea conducen a una pobre absorción de los fármacos de aplicación tópica y unido a esto, los sistemas enzimáticos y las eficientes rutas de eliminación, determinan su baja biodisponibilidad. En diferentes estudios farmacocinéticos se han reportado que entre el 2 y 5% de la dosis instilada se consigue en la cámara anterior, el resto es depurado (Schoenwald, 1990; Davies, 2000). Por otra parte, en cuanto al segmento posterior del ojo se refiere (retina, coroides, esclera, y humor vítreo), éste está protegido por la barrera hemato-ocular que la constituye: la barrera anterior hemato-acuosa y la barrera posterior hemato-retiniana. La primera limita el acceso de fármacos hidrofílicos desde el plasma al

humor acuoso. La segunda está formada por el epitelio pigmentario de la retina y por la malla de paredes de los capilares de la retina, restringiendo así la penetración en el segmento posterior de los fármacos que son administrados sistémicamente (Urtti, 2006). De esta misma manera, la concentración efectiva de un fármaco en la retina administrado por la vía periocular, se ve afectada por las barreras que debe atravesar (esclera, coroides y el epitelio pigmentario de la retina) y por su estructura química.

Todo lo anterior, nos conduce a pensar en nuevas estrategias que desarrollen fármacos y sistemas transportadores bajo la forma de liberación prolongada con aplicación directa en los tejidos intraoculares, de forma tal, que alcancen concentraciones terapéuticas óptimas, efectos adversos locales y sistémicos mínimos, así como una disminución en la frecuencia de administración. Las nuevas tendencias tecnológicas se enfocan 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, logren alcanzar el sitio específico de acción a una velocidad y régimen de dosificación terapéuticamente controlado y óptimo, liberen el activo mediante reacciones enzimáticas y/o químicas *in vivo*, protejan y estabilicen el fármaco en el ambiente biológico durante todo su recorrido hasta llegar al lugar estimado y por último pero no menos importante, que reduzcan los efectos adversos y tóxicos (De Campos y cols., 2004; Yasukawa y cols., 2005; Bodor y Buchwald, 2005; Prow y cols., 2008; Paolicelli y cols., 2009).

Es por ello, que esta investigación se enfocó en el desarrollo de un sistema de liberación alternativo que combinó polímeros biodegradables, hidrosolubles y compatibles a nivel ocular como el Dextrano (Dex) y el Quitosano (Q). En primer lugar, se seleccionó como fármaco modelo el Hemisuccinato de Metilprednisolona (MPS) para sintetizar un profármaco macromolecular Hemisuccinato de Metilprednisolona- Dextrano (MPS-Dex) como sistema de liberación. Posteriormente, se incorporó en Nanopartículas (NPs) de Quitosano para formar un sistema de liberación híbrido (profármaco/NPs). Por último, las NPs se recubrieron con lactosa de tal manera de crear micropartículas que favorezcan la redispersión de las NPs en agua. Es por ello que el objetivo general de este trabajo fue desarrollar y caracterizar NPs de Q con MPS-Dex por el método de gelificación iónica. Cada una de las etapas del desarrollo de estas nano y micro partículas, conllevó una serie de ensayos y consideraciones necesarias cuya metodología, resultados, discusión y conclusiones se detallan a continuación:

## **METODOLOGÍA**

### *Elaboración de Nanopartículas de Quitosano por Gelificación Iónica.*

Se adaptaron los métodos reportados por Calvo y cols. (1997a,b) y Grenha y cols. (2007), incorporando ciertas modificaciones. Se preparó una dispersión al 0,180% de Q de baja viscosidad con un grado de desacetilación de 92,2% en solución amortiguadora ácido acético/acetato de sodio 0,2M pH=5,5 y una solución acuosa de tripolifosfato sódico (TPP) al 0,25%. La relación final de la mezcla entre Q y TPP para la formación de las NPs fue de 3,6:1 p/p. Se pesó de MPS-Dex, el equivalente a 5mg MPS; se disolvió en una mezcla de acetonitrilo:agua bidestilada 50:50; luego se incorporó la dispersión de Q a una velocidad de 0,5 mL/min. La mezcla se mantuvo en agitación por  $16 \pm 1$ h a  $22^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ . Culminado este período, se agregó la solución de TPP a la misma velocidad (0,5mL/min). Se agitó por siete horas a temperatura de  $22^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ .

### *Purificación de las Nanopartículas*

La dispersión acuosa de las NPs se colocó en una bolsa de diálisis de celulosa sellada por ambos extremos. La bolsa se introdujo en un envase que contenía el medio de purificación Tabla I.

**Tabla I.**

Secuencia de solventes empleados para la purificación de las NPs de MPS-Dex -Q

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

Las NPs purificadas se llevaron a un balón aforado de 100mL y se enrasó con agua bidestilada.

### *Morfología de las Nanopartículas*

Las muestras fueron colocadas sobre un papel adhesivo de carbón conductivo de doble cara PELCO<sup>®</sup>. Previamente a la observación, la superficie de las partículas fue cubierta 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 liofilizadas y en suspensión acuosa. Por otra parte, se empleó el programa Photoshop para medir sus diámetros.

### *Distribución del Tamaño de las Nanopartículas*

Se empleó un analizador de tamaño de partículas con dispersión de luz dinámica Nanotrak NPA250 Ultra, con sonda externa y empleando el programa Flex 10.3.7 y a una temperatura de  $25^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Las partículas fueron suspendidas en agua bidestilada y sometidas a ultrasonido por 1 minuto previo a su lectura. La distribución se expresó en diámetro volumen medio (Nanotrak, 2007; nanomicroclub, 2011; Dandagi y cols, 2011).

### *Estimación del Contenido del Fármaco en las Nanopartículas*

Se procedió a liofilizar las partículas en un FreeZone 6 Lyofilizador. Labconco Corporation por 48 horas a  $-62^{\circ}\text{C}$  y vacío a 0,370 mBar. Se pesaron tres muestras de NPs, equivalente a 2,4 mg MPS (considerando que no hubo pérdida del fármaco durante su elaboración). Se le agregó 2,5 mL de solución amortiguadora de ácido acético/acetato de sodio pH=5,5 con agitación constante a una temperatura de  $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24h. Transcurrido el período, se centrifugó a 12.000 revoluciones por minuto (r.p.m) durante 15 minutos. Se tomó 1 mL de cada sobrenadante y se procedió a realizar una hidrólisis con NaOH 0,2N por 30 minutos para liberar y cuantificar la

Metilprednisolona (MP) del profármaco. El contenido de MP se determinó por HPLC a 254 nm con un detector de absorbancia dual Waters 2487. Los datos fueron integrados usando el programa Water-Breeze<sup>®</sup>. Se empleó una columna YCM pack pro C18 (5 µm, 105 x 4.6 mm). La fase móvil estaba conformada por 60% de Metanol y 40% de solución amortiguadora de ácido acético/acetato de sodio 0,2M pH = 5,5. Las concentraciones de las curvas de calibración fueron entre 0,2 µg/mL – 20 µg/mL MP con un coeficiente de correlación al cuadrado ( $r^2$ ) superior a 0,998. Los resultados se expresaron en términos de porcentaje de MPS/NPs.

#### *Determinación de la Eficacia de Captura del Fármaco en las Nanopartículas*

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

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

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

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

#### *Liberación in vitro*

La liberación del fármaco fue determinada incubando seis muestras de 10 mg NPs liofilizadas en 5 mL de solución amortiguadora isotónica de fosfato pH=7,4 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 aplicó un muestreo por reposición, se extrajeron alícuotas de 1 mL, con posterior microfiltración a intervalos de 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 HPLC previamente descrito. La curva de calibración fue entre 0,2 – 40 µg/mL con un coeficiente de correlación al cuadrado ( $r^2$ ) superior a 0,998. Los resultados se expresaron en porcentaje MPS.

#### *Incorporación del Agente Dispersante en las Nanopartículas*

A las NPs purificadas y suspendidas en agua bidestilada, se les incorporó 3% de lactosa extra fina como agente dispersante. Las condiciones óptimas de nebulización se obtuvieron aplicándole al líquido una velocidad de flujo de 0,5mL/min con 0,8 L/min de aire seco. Para mejorar el secado de las partículas, la cámara de calentamiento se mantuvo a  $78^\circ \pm 2^\circ\text{C}$  con una ligera presión negativa en el recolector de micropartículas, Asimismo, a la cámara se le introdujo aire atemperado cercano al nebulizador a una velocidad de 15L/min. Este aire provocó la formación de un remolino con suficiente fuerza que evitó el choque y adherencia de las gotas del nebulizado con las paredes de la cámara y así poder depositarse con facilidad en el recolector (Buchi, 2010).

## **RESULTADOS y DISCUSIÓN**

Los criterios para la selección de los componentes y la metodología en esta investigación, se fundamentaron principalmente en la compatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad de los ingredientes a nivel ocular, la no incorporación de los solventes orgánicos por el método de gelificación iónica, así como los diferentes mecanismos que presentan las NPs de Q para atrapar macromoléculas como albúmina de suero de bovino y algunas enzimas. El Q tiene la capacidad de inmovilizar macromoléculas mediante la formación de redes insolubles cuando reacciona con un agente entrecruzante como el TPP y de esta forma se pueden crear sistemas de liberación prolongada (Tang y cols, 2006; Tang y cols, 2007; Fernandes y cols, 2008).

### *Elaboración de Nanopartículas de Quitosano por Gelificación Iónica.*

La gelificación iónica, se basa en la formación de complejos insolubles por atracción de cargas opuestas. En este caso, el TPP cargado negativamente produce interacciones iónicas (inter e intramoléculares) con la carga positiva de los grupos aminos del Q. Estas atracciones electrostáticas crean interacciones físicas, transformando las dispersiones líquidas de los reactantes en gel y bajo ciertas condiciones dan origen a NPs insolubles en medio acuoso. Trabajos anteriores recomiendan dispersiones acuosas de Q en solución de ácido acético en un rango de pH entre 4 a 6, ya que a  $\text{pH} < 6,5$ , el polímero protona sus grupos amino libres ( $\text{NH}_3^+$ ), convirtiéndose en un polication soluble en agua. (Janes y cols, 2001; Tang y cols, 2007; Zhang y cols, 2002; Peptu y cols, 2009). Por otra parte, previo a la elaboración de las NPs, se sintetizó la unión entre la Metilprednisolona con el Dex eficientemente, mediante la formación del enlace éster entre el grupo carboxílico del ácido succínico libre y los hidroxilos del Dex formando así, el profármaco macromolecular MPS-Dex. La degradación de este profármaco y liberación de la MP, se puede lograr químicamente mediante una hidrólisis alcalina, reacción que no es deseada durante la elaboración de las NPs; lo que implicó un estricto control del pH durante todo el proceso. Es por ello, que se decidió hidratar el Q con la solución amortiguadora de ácido acético/acetato de sodio  $\text{pH} = 5,5$  para mantener este parámetro constante y evitar modificaciones cuando la solución alcalina de TPP fuese añadida. Por lo demás, se comprobó que la presencia de la solución amortiguadora, mantuvo invariable el pH durante todo el proceso.

Para elaborar estas partículas de tamaño nanométrico, se consideraron parámetros como proporción Q:TPP, velocidad de añadido del agente entrecruzante, tiempo de reacción y peso molecular de los polímeros, entre otros. En cuanto a la selección de la proporción entre Q:TPP, se basó en trabajos previos de un grupo de investigadores en donde recomiendan el rango 3:1 – 6:1 p/p (Calvo y cols., 1997a; Grenha y cols. 2007), para lograr producir NPs sólidas, de alto rendimiento con enlaces estables. Adicionalmente, Grenha y cols. (2007), emplearon por este método la proporción Q:TPP 3,6:1 p/p, para formar transportadores de proteínas con buenos resultados y con tamaños de partículas de alrededor de 382 nm. Por este motivo, se seleccionó esta relación para la formación de las NPs de MPS-Dex-Q, ya que involucraba el empleo de una macromolécula (Janes y cols., 2001; Grenha y cols., 2007). De igual modo, trabajos previos consideraron como importantes: el tiempo del entrecruzamiento, la velocidad de añadido y el pH de la solución, a fin de obtener partículas homogéneas y completamente formadas. Es por ello que Shu y Zhu.

(2000), demostraron que el añadido lento por gotas, el tiempo de entrecruzamiento de al menos una hora y el pH de la solución de TPP entre 4 y 8, beneficiaron los atributos de NPs de Q.

Por otra parte, es importante destacar que la selección del Q de baja viscosidad y bajo peso molecular, se apoyó en publicaciones anteriores donde reportaron que la encapsulación de los fármacos durante el proceso de gelificación, se vio disminuida por el aumento de la viscosidad del Q (Vandenberg y cols., 2001; Yang y Hon., 2009). Asimismo, Wu y cols. (2005), hallaron que concentraciones bajas (1-3 mg/mL) de Q de baja viscosidad, promovía la encapsulación satisfactoria de Glicirricinato de amonio por este método. Aun mas, el grado de desacetilación del Q empleado (92,2%), favorece la eficacia de encapsulación y disminuye la velocidad de liberación como así lo comprobaron Xu y Du en el 2003. Todas estas consideraciones antes señaladas, se englobaron para obtener las NPs de MPS-Dex -Q.

#### *Purificación de las Nanopartículas*

La diálisis elimina el exceso de reactivos y subproductos solubles. Es un método de purificación suave que no requiere alto impacto, tampoco tiende a formar tantos agregados. En el caso de las NPs de Q, este proceso permitió obtener partículas suspendidas fácilmente redispersables por agitación.

#### *Morfología de las Nanopartículas*

La mayoría de las NPs fueron prácticamente esféricas con una superficie lisa y uniforme, lo que podría indicar que las moléculas de MPS-Dex, Q y TPP interactuaron uniformemente para formar las NPs con diámetros inferiores a 450 nm, Figura 1.

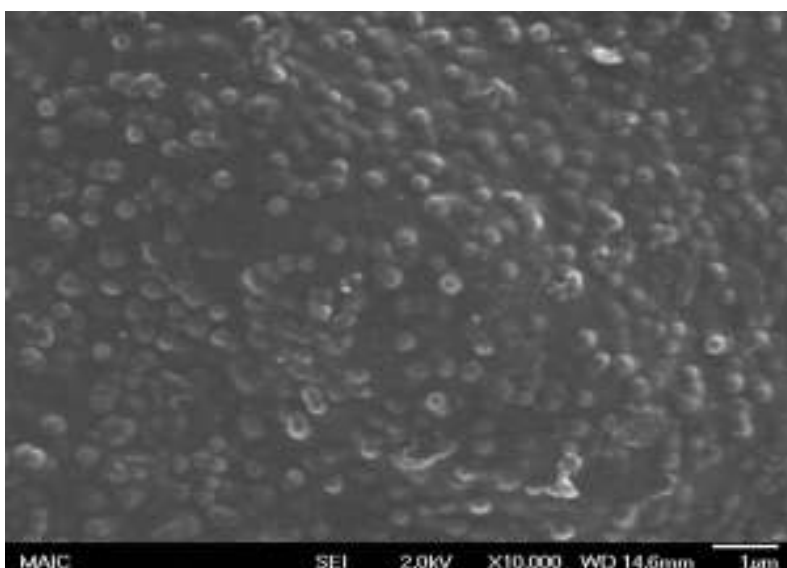


Figura 1. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Micrografía de NPs de MPS-Dex-Q.

Al mantener la suspensión de NPs a pH ácido por 12h, la superficie del Q se rehidrata haciendo que éstas se hinchen y liberen su contenido. Culminado este período se observó una doble encapsulación, donde partículas mas grades contenían atrapadas en su interior partículas de menor tamaño, Figura 2. Esto podría postular el hecho de que al ocurrir un contacto previo entre el MPS-Dex de carga superficial negativa con el Q, se formaron NPs por atracciones electroestáticas que posteriormente se cubrieron con mayor cantidad de Q cuando se le incorporó el agente entrecruzante (TPP). Sin



embargo, sería necesario continuar realizando nuevas evaluaciones, a fin de confirmar este supuesto.

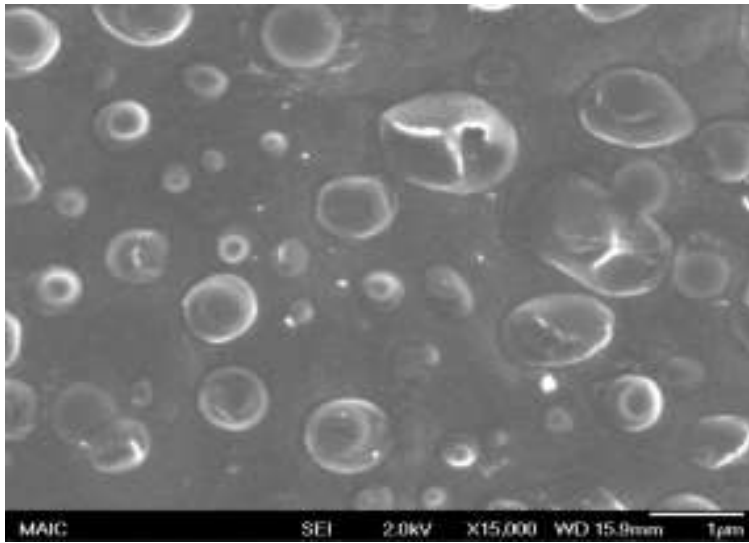


Figura 2. Micrografías (MEB) de NPs de MPS-Dex-Q en suspensión a pH ácido.

Las micropartículas con lactosa presentaron tamaños de  $1.780 \pm 0,5$  nm con una favorable dispersibilidad en agua, encontrándose separadas unas de otras y con una morfología casi esférica y observándose tamaños de partículas polidisperso (330-2750 nm), lo que confirma que la lactosa se va disolviendo en el agua y liberando las NPs, Figura 3.

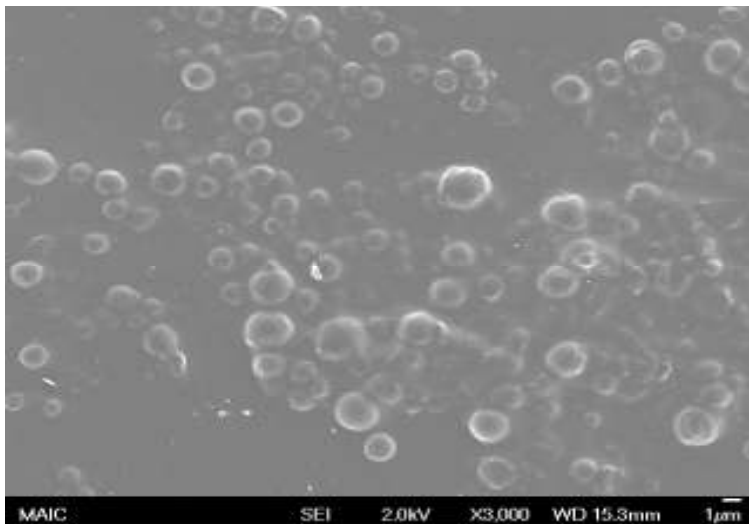
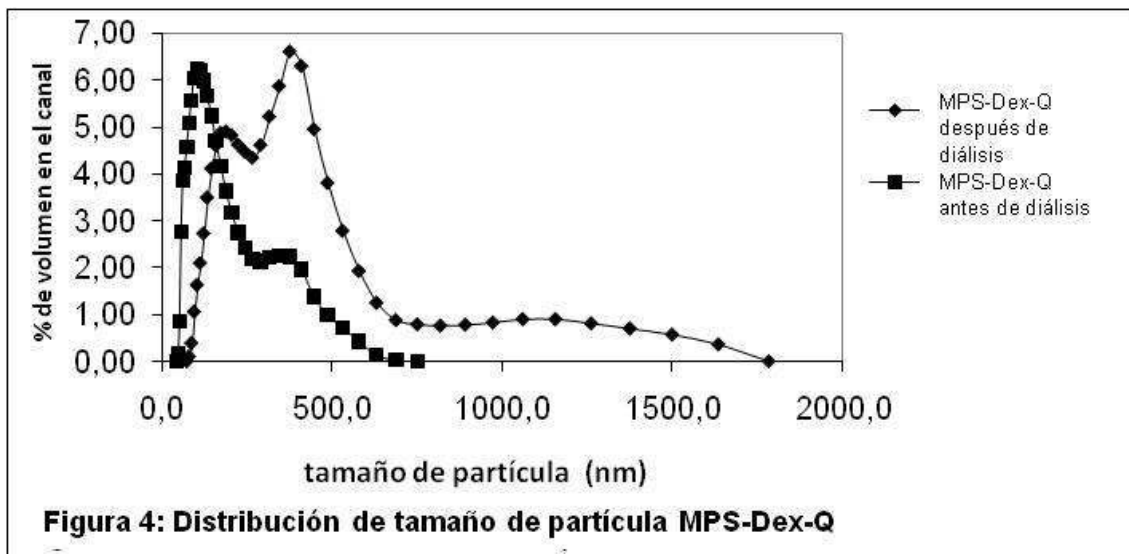


Figura 3. Micrografía (MEB) de microesferas de MPS-Dex-Q con lactosa, secadas por atomización.

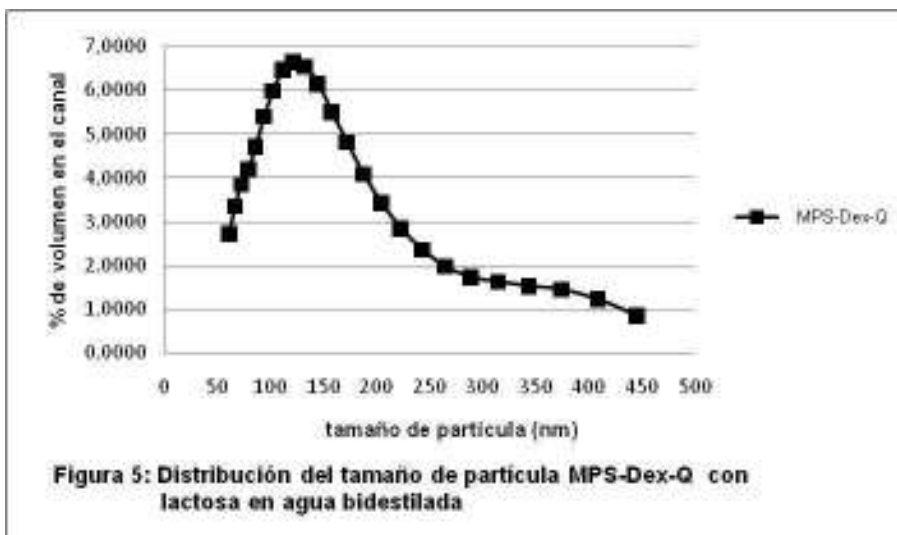
#### *Distribución del Tamaño de las Nanopartículas*

Al mantener las NPs suspendidas en agua una vez finalizada la diálisis, se modifica el pH de 5,5 a 6 -6,5; pH cercano al pKa del Q, provocando un aumento del tamaño de las partículas muy probablemente por desprotonación de los grupos amino, originando

la formación de agregados y observándose una distribución bimodal del tamaño de las partículas, Figura 4.



Trabajos anteriores, se han valido del secado por atomización para incorporar NPs de diferentes polímeros dentro de micropartículas, empleando soluciones de lactosa o manitol como excipiente (Grenha y cols, 2005; Bailey y Berklund, 2009; Patel 2010). Las NPs de MPS-Dex-Q recubiertas de lactosa presentaron una muy buena dispersión en agua bidestilada, ya que al disolverse la lactosa en el medio, separa las NPs eficientemente, minimizando el problema de agregación y evidenciando una distribución normal donde el mayor porcentaje de partículas se encontró entre 100 - 145 nm Figura 5



Estas Nps constituidas por dos macromoléculas (Dex y Q), donde el fármaco se encuentra unido covalentemente a una de ellas (Dex), permitió la formación de partículas de tamaño nanométrico. Esto es de suma importancia, ya que algunos trabajos han sugerido que un apropiado tamaño de partícula con un rango estrecho,

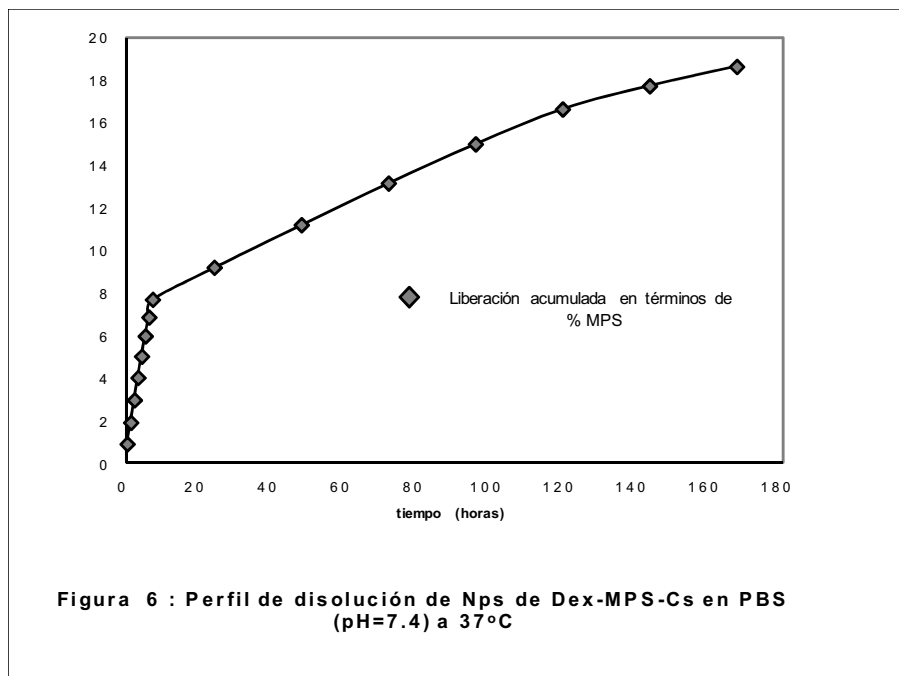
asegura una baja irritación, adecuada biodisponibilidad y compatibilidad con los tejidos oculares (Barbu y cols., 2006; Bucolo y cols., 2008; Paolicelli y cols., 2009). Este tamaño podría evidenciar *in vivo* un nuevo y eficiente sistema de liberación ocular.

#### *Estimación del Fármaco y Eficacia de Captura en las Nanopartículas*

El porcentaje promedio de MPS en las NPs encontrado, fue de  $1,1\% \pm 0,1$ , lo que correspondió a la carga experimental del fármaco en las partículas y la eficacia de captura en términos de MPS fue de  $45 \pm 10 \%$ . Estos ensayos preliminares tan alentadores nos sugieren continuar con estos estudios, a fin de estandarizar y validar la metodología de este nuevo sistema de liberación intravítreo, de tal manera de poder garantizar los resultados encontrados en futuros estudios *in vivo*.

#### *Liberación in vitro*

La liberación de la MPS a pH fisiológico en función del tiempo evidenció un equilibrio hidrolítico hacia la formación tanto de la MP como de la MPS. Transcurrida 24 horas y siguientes, el equilibrio comienza a desplazarse a la formación del compuesto farmacológicamente activo (MP). La Figura 6, muestra el perfil de liberación acumulado expresado en términos de MPS. Este comportamiento químico indicó la capacidad que tiene el sistema para comportarse como módulo de cesión prolongada de fármaco *in vitro*, por lo que se debe continuar trabajando en estudios con fluidos oculares para conocer la influencia de los sistemas enzimáticos y químicos biológicos 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 favorezcan el tratamiento de las enfermedades intraoculares. El Quitosano fue capaz de encapsular el profármaco macromolecular y crear un sistema de liberación profármaco/nanopartícula con características deseables para el sistema ocular y con una buena dispersibilidad en agua. Su tamaño tan pequeño 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 de 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 (Departamento de Farmacia).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bailey M, Berkland C. Nanoparticle Formulations in Pulmonary Drug Delivery. *Med. Res. Rev.* 2009; 29 (1): 196 -212.
2. Barbu E, Verestiuc L, Nevell TG, Tsibouklis J. Polymeric materials for ophthalmic drug delivery: trends and perspectivas. *J. Mater. Chem.* 2006; 16: 3439-3443.
3. Bodor N, Buchwald P. Ophthalmic Drug Design Based on the Metabolic Activity of Eye: Soft Drug a Chemical Delivery Systems *The AAPS J.* 2005; 7(4): Article 79 E820-E833.
4. Buchi Training Papers Spray Drying. Copyright© BÜCHI Labortechnik AG, 1997 – 2002. [en línea]. [consultado 2010 agosto 25]; disponible en: [www.buchi.com/Spray-Drying.69.0.html?&no\\_cache=1&file=308](http://www.buchi.com/Spray-Drying.69.0.html?&no_cache=1&file=308).
5. Bucolo C, Maltese A, Drago F. When nanotechnology meets the ocular surface. *Expert Rev Ophthalmol.* 2008; 3: 325-32.
6. Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polymer Sci.* 1997a; 63: 125-132.
7. Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm Res.* 1997b; 14: 1431-1436.
8. Ciulla T, Walker J, Fong D, Criswell M. Corticosteroids in posterior segment disease: an update on new delivery systems and new indications *Curr Opin Ophthalmol* 2004; 15: 211–220.
9. Dandagi P, Patel P, Patil P, Mastiholmath V, gadad A. Development and Characterization of a Particulate Drug Delivery System for Etoposide. *Indian J. drug deliv.* 2011; 3(1): 43-51.
10. Davies NM. Biopharmaceuticals considerations in topical ocular drug delivery. *Clin Exp. Pharmacol Physiol.* 2000; 27: 558-562.
11. De Campos A, Diebold Y, Carvalho E, Sánchez A, Alonso M. Chitosan Nanoparticles as New Ocular Drug Delivery Systems: *in Vitro* Stability, *in Vivo* Fate, and Cellular Toxicity. *Pharm. Res.* 2004; 21 (5): 803-810.
12. Fernandes S, de Oliveira R, Fatibello-Filho O, Spinelli A, Cruz Vieira I. Biosensor based on laccase immobilized on microspheres of chitosan crosslinked with tripolyphosphate. *Sens. Actuators B.* 2008; 133: 202–207.

13. Gómez-Ulla F, Basauri E, Arias L, Martínez-Sanz F. Manejo De Las Inyecciones Intravítreas. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2009; 84: 377-388.
14. Grenha A, Seijo B, Remunan-Lopez C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur J Pharm Sci* 2005; 25 (4–5): 427–437.
15. Grenha A; Seijo B; Serra C; Remuñan-López C. Chitosan Nanoparticle-Loaded Mannitol Microspheres: Structure and Surface Characterization. *Biomacromolecules.* 2007; 8: 2072-2079.
16. Jager RD, Aiello LP, Patel SC, Cunningham ET Jr. Risks of intravitreal injection: a comprehensive review. *Retina.* 2004; 24: 676-698.
17. Janes KA, Calvo P, Alonso MJ. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 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 p. 129-162.
19. nanomicroclub, 2011: [en línea]. [consultado 2010 diciembre 20]; disponible en: <http://www.nanomicroclub.com/events/Amsterdam230210/Anaspec.pdf>
20. Nanotracs, 2007: [en línea]. [consultado 2010 enero 31]; disponible en: [http://www.particle-matrix.de/fileadmin/pdf/Nanotracs\\_en\\_07.pdf](http://www.particle-matrix.de/fileadmin/pdf/Nanotracs_en_07.pdf)
21. Ogura Y. Drug delivery to the posterior segments of the eye. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 52: 1–3.
22. Paolicelli P, De la Fuente M, Sánchez A, Seijo B, Alonso M.J. Chitosan nanoparticles for drug delivery to the eye. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2009; 6(3): 239-253.
23. Patel G. Development of nanocomposite corticosteroid particles for use in asthma. Trabajo presentado para optar al título de Doctor en Filosofía en la Universidad de Florida, USA. 2010.
24. Peptu CA, Buhus G, Popa M, Perichaud A, Costin D. Double Cross-linked Chitosan–Gelatin Particulate Systems for Ophthalmic Applications. *J. Bioac Comp Poly.* 2009: 1-20.
25. Prow T.W, Bhutto I, Kim S.Y, Grebe R, Merges C, McLeod, Uno K; Mennon M, Rodriguez L, Leong K, Luty G.A. Ocular nanoparticle toxicity and transfection of the retina and retinal pigment epithelium. *Nanomedicine: Nanotech. Biol Med.* 2008; 4: 340-349.
26. Schoenwald RD. Ocular drug delivery: pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet.* 1990; 18: 255-269.
27. Shu X.S, Zhu K.J. A novel approach to prepare tripolyphosphate:chitosan complex beads for controlled release drug delivery *Int J Pharm.* 2000; 201: 51-58.
28. Tang ZX, Qian JQ, Shi LE. Characterizations of immobilized neutral proteinase on chitosan nano-particles. *Proc. Biochem.* 2006; 41: 1193–1197.
29. Tang ZX, Qian JQ, Shi LE. Preparation of Chitosan Nanoparticles as Carrier for Immobilized Enzyme. *Appl. Biochem Biotechnol.* 2007; 136: 77-95.
30. Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery *Adv. Drug Del. Rev.* 2006; 58: 1131–1135.
31. Vandenberg GW, Drolet C, Scott SL, No"ue JD, Factors affecting protein release from alginate-chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/intestinal simulation. *J. Control. Release* 2001; 77: 297–307.
32. Wu Y, Yang W, Wang C, Hu J, Fu S. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *Int. J. Pharm.* 2005; 295: 235-245.
33. Xu Y, Du Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int J Pharm.* 2003; 250: 215-226.
34. Xu Y, Hanna M.A. Electrospayed bovine serum albumin-loaded tripolyphosphate cross-linked chitosan capsules: Synthesis and characterization. *J. Microencap.* 2007; 24(2): 143–151.
35. Yang H, Hon M. The effect of the molecular weight of chitosan nanoparticles and its application on drug delivery. *Microchem. J.* 2009; 92 (1): 87-91.
36. Yasukawa T, Ogura Y, Sakurai E, Tabata Y, Kimura H. Intraocular sustained drug delivery using implantable polymeric devices *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005; 57: 2033–2046.
37. Zhang H, Alsarra IA, Neau SH. An in vitro evaluation of a chitosan-containing multiparticulate system for macromolecule delivery to the colon. *Int. J. of Pharm.* 2002; 239: 197–205.