

Estudio de seguridad microbiológica, toxicidad y efectividad antimicrobiana en formulaciones oftálmicas de hidroxipropilmetilcelulosa

Safety microbiological study, toxicity and antimicrobial effectivity in ophthalmologic formulation of Hydroxypropylmethylcellulose

¹ISABEL ANDUEZA*, ANA CARVAJAL y NORMA DE CASTRO

Resumen

En el desarrollo y elaboración de los productos oftálmicos se debe evitar la introducción de microorganismos que puedan ocasionar una infección en el paciente o el deterioro de la calidad del producto. Para ello se exige la aplicación de todo lo referente a las Buenas Prácticas de Manufactura, con especial énfasis en el control microbiológico. La esterilidad es uno de los requisitos fundamentales para estos productos tópicos e intraoculares oftálmicos; a éstos últimos, adicionalmente, se les exige prueba de pirógenos. Por otra parte, en el desarrollo de los mismos el estudio de la toxicidad ocular es indispensable a fin de garantizar su seguridad antes de ser aplicado a los pacientes. En este trabajo se evaluaron tanto la calidad microbiológica de diferentes desarrollos oftálmicos con Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), así como también su toxicidad ocular y efectividad antimicrobiana de los agentes de conservación antimicrobiana presentes. En el ensayo de esterilidad se aplicó el método de inoculación directa del medio de cultivo de la USP 30. Para realizar la prueba de pirógenos fue necesario emplear el producto diluido al 50% en una solución de sales isotónicas estéril debido a la alta viscosidad de las dispersiones; esto con la finalidad de poder aplicar el método del aumento de la temperatura del conejo de la USP 30. Por otra parte, en el ensayo de toxicidad se evaluó el grado de irritación de la mucosa ocular del conejo por el Método de Draize modificado. La efectividad antimicrobiana se evaluó de acuerdo con el ensayo establecido por la USP 30. El comportamiento de las dispersiones isotónicas de HPMC evaluadas, cumplen con los ensayos de esterilidad y pirógenos. Los valores obtenidos de irritabilidad en la mucosa ocular del conejo fueron satisfactorios, permitiendo sugerir que no se observará efecto irritante sobre la conjuntiva humana. Ambos agentes de conservación antimicrobiana cumplieron con los ensayos de efectividad, lo que garantizará la esterilidad del producto durante su uso por parte del paciente. Estos resultados preliminares nos permitirán continuar con otros estudios, entre los cuales se encuentran validación de los procesos de manufactura y ensayos aplicados, así como las pruebas de farmacología clínica.

Palabras clave: Esterilidad, pirógenos, efectividad antimicrobiana.

Abstract

The development and elaboration of ophthalmic products should be avoided the introduction of microorganisms that could cause an infection in the patient or deterioration of the quality of the product. For it, is required the application of everything regarding the Good Manufacturing Practices with special emphasis, in the microbiological control. The sterility is one of the fundamental requirements for topics and intraocular ophthalmic products; the last one also require additionally pyrogen test. On the other hand, the ocular toxicity study is necessary in order to guarantee its security before being applied to the patients. In this work we evaluated the microbiological quality of different ophthalmic developments with Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as well as their ocular toxicity and antimicrobial effectiveness of the antimicrobial agents. In the sterility test we applied the direct method of the USP 30. To carry out the rabbit pyrogen test (USP 30) was necessary to dilute the product to 50% with an isotonic sterile salts solution; because the dispersions viscosity was too high. On the other hand, in the ocular toxicity test, the degree of irritation of the ocular mucous membrane of the rabbit by the Method of Draize modified was evaluated. For the antimicrobial effectiveness test we employed the USP 30 method. The sterility and pyrogen test of the isotonic dispersions of HPMC evaluated were conforming. The values obtained of irritability in the ocular mucous membrane of the rabbit were satisfactory, permitting to suggest that it has not irritating effect on the human conjunctive. Both antimicrobial agents are effectives to security the sterility of the product during the patient used. These preliminary results will permit us to continue with other studies like manufacturer process and assays validation, among which those of clinical pharmacology

Key words: Sterility, pyrogens, antimicrobial effectiveness

¹ Dpto. de Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela

* A quién debe dirigir la correspondencia. aduezai@ucv.ve.

Auspiciado: Instituto de Investigaciones Farmacéuticas – UCV.

Introducción

En las formulaciones oftálmicas se emplean con frecuencia sistemas coloidales que contribuyen a solventar problemas de estabilidad que se presentan durante su manufactura y/o dispensación final; también pueden contribuir, por sus características, a ejercer un efecto terapéutico y/o protector en el sitio de aplicación.

Los polímeros de celulosa como sistemas coloidales pueden ser empleados, entre otros, como protectivos y/o viscosantes en las preparaciones oftálmicas. En este mismo campo la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) tiene entre otras aplicaciones la de servir de humectante para los lentes de contacto y como sustituto de las lágrimas naturales (Versura, 1989; Toda, 1996) y en productos viscoelástico (Andueza, 2000; Liesegang, 1986).

Otras de sus aplicaciones es como agente viscoelástico, el cual es producto de aplicaciones intraoculares que se emplean en cirugía oftalmológica. Para su elaboración, requieren las mismas consideraciones que los productos parenterales ya que el sitio de aplicación ha atravesado las primeras barreras protectoras. Por otra parte, las células endoteliales son muy sensibles, por lo que no se deben incluir componentes que tengan efecto tóxico, como los agentes de conservación antimicrobiana. Por ello deben ser envasados bajo la forma de unidosis (Bapatla, 1993).

El desarrollo de las de formulaciones oftálmicas requiere de los mismos principios científicos y tecnológicos que se utilizan para otras formas de dosificación. Por sus características propias del sitio de aplicación, se exige entre otras pruebas esterilidad y toxicidad ocular. En cuanto a la esterilidad se refiere, la presencia de microorganismos en los medicamentos oftálmicos podría ocasionar efectos adversos no solamente en la estabilidad de la fórmula, sino también riesgos para la salud del paciente; por ello, se debe evitar la contaminación durante la manufactura y uso de los productos. En circunstancias como intervenciones quirúrgicas, pos-operatorios o traumatismos, la córnea y la conjuntiva se encuentran muy sensibles a adquirir infecciones (Allwood, 1998). Esto justifica aún más tanto el proceso de esterilización (Pflug, 2000; Sterilizers, 2000), como la incorporación de preservantes en los productos multidosis puesto que es fundamental mantener la esterilidad.

Siempre que sea posible, los productos acuosos son esterilizados en su envase final por calor húmedo, a excepción de aquellos fármacos termosensibles. La Farmacopea Europea, al igual que la Farmacopea de Estados Unidos (USP 30, 2007), recomienda una tem-

peratura mínima de 121 °C mantenida por un período de 15 minutos, a menos que la monografía indique lo contrario.

Es importante señalar que los polímeros usados en el desarrollo de formulaciones oftalmológicas deben ser capaces de resistir el proceso de esterilización, manteniendo su integridad mecánica y su biocompatibilidad.

En estudios anteriores se ha comprobado que una dispersión isotónica unidosis de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) al 2% 4000 cps, preparada en condiciones asépticas y esterilizada por calor húmedo a 121 °C durante 15 minutos, cumple con los requisitos de esterilidad establecidos por la USP. Así mismo, este proceso no tuvo influencia sobre las características físicas, como pH, formación de película, tensión superficial y comportamiento reológico (Andueza, 2004).

Los agentes preservantes son incluidos en las formulaciones multidosis con la finalidad de incrementar la vida útil del producto, ya que retarda el crecimiento bacteriano durante el uso por parte del paciente. Muchos preservativos son en diferentes grados tóxicos al epitelio celular oftálmico y rompen la capa lipídica de la película lagrimal haciéndola inestable; esto puede traer como consecuencia el agravamiento de las patologías de la superficie ocular, ya que la película lagrimal protectora no es capaz de cubrir uniformemente toda el epitelio corneal y superficie conjuntival. Otros efectos adversos de los agentes de conservación antimicrobiana son: incremento de la permeabilidad corneal, disminución de la actividad de las lisozimas en el fluido lagrimal y sensibilización que puede originar alergias oculares (Hedqvist, 1999).

Para estas formulaciones, el cloruro de benzalconio es el agente antimicrobiano estándar de referencia y es el más ampliamente utilizado en nuestro país. Posee una alta eficacia sobre numerosos microorganismos y su mecanismo de acción se basa en la destrucción de la proteína, ocasionando lisis de la membrana citoplasmática. Su estabilidad y efectividad antimicrobiana se encuentra dentro del amplio rango de pH. Se ha reportado que su uso frecuente puede acumularse en el tejido ocular y puede ocasionar muerte celular. Por sus propiedades detergentes, puede actuar fragmentando las paredes celulares (Lopez, 1993). Sin embargo, si se emplea en concentraciones de uso clínico (cuatro a seis veces al día), no se observan efectos adversos significativos (Abelson, 2002; Bapatla, 1993; Turco, 1994).

El cloruro de benzalconio se emplea asociado con el EDTA, es decir, la sal sódica del ácido etilen-

diaminotetracético con la finalidad de aumentar su espectro antimicrobiano, ya que éste es capaz de secuestrar los iones calcio ejerciendo un efecto citotóxico tanto al microorganismo como a las células humanas; así mismo se ha demostrado que el EDTA se absorbe acumulándose en el iris y cuerpo ciliar, de tal manera que altera la permeabilidad de la vasa uvea (túnica vascular del ojo), acelerando indirectamente la eliminación de los fármacos desde el humor acuoso (Lee, 1993). Pacientes con cuadro de ojo seco deben evitar los productos que lo contengan (Kaufman, 2004).

El perborato de sodio es un preservativo oxidativo; destruye numerosos tipos de bacterias y hongos tal como el *Aspergillus niger*. Cuando el perborato de sodio se combina con el agua se convierte en peróxido de hidrógeno, un efectivo agente antimicrobiano. Su mecanismo de acción es mediante la oxidación de la pared y membrana celular, afectando las uniones enzimáticas de la membrana así como la función celular. Una vez que esta sal entra en contacto con el ojo, se descompone en agua y oxígeno por acción de la catalasa y otras enzimas presentes en el saco conjuntival (Grant, 1996). De esta manera no se esperaría la manifestación de efectos tóxicos a nivel ocular. Sin embargo, no se ha reportado su efectividad antimicrobiana en productos oftálmicos.

Estos productos que incluyen agentes antimicrobianos, pueden utilizarse con seguridad en los pacientes cuya cornea es normal, en especial cuando se aplican con poca frecuencia. Es por ello que cada día se estudian nuevas alternativas en la incorporación de estos agentes con miras a evitar efectos citotóxicos, alteraciones en la estructura y fisiología celular del sistema ocular y, a su vez, que sean efectivos en conservar la esterilidad de los productos multidosis.

Por otra parte, la USP exige la realización de la prueba de pirógenos para los productos viscoelásticos empleados en cirugía intraocular. Los pirógenos son a menudo termoestables y resisten la esterilización en autoclave; son capaces de atravesar la mayoría de los filtros, aunque pueden ser retenidos por filtros de profundidad y por sustancias adsorbentes. Los pirógenos actúan a dosis muy bajas, es por ello que el control microbiológico de todo el proceso de manufactura es fundamental a fin de evitar poner en riesgo la vida de los pacientes.

Es importante destacar que la córnea es uno de los tejidos más sensibles del cuerpo, con una gran cantidad de terminaciones nerviosas, razón por la cual cualquier irritación o daño es extremadamente doloroso. Esto nos lleva a tomar en consideración

los estudios de toxicidad ocular de aquellos productos que están destinados a ser aplicados en el ojo, con el fin de garantizar su seguridad antes de ser aplicado a los pacientes.

Por todo lo antes expuesto, se ha desarrollado esta investigación con el objetivo de evaluar la calidad microbiológica y toxicidad de tres formulaciones oftálmicas piloto de hidroxipropilmetilcelulosa, una de ellas libre de agente de conservación antimicrobiana, que se empleará como viscoelástico en cirugía oftalmológica, y las otras son lágrimas artificiales, dirigidas a aliviar la queratoconjuntivitis seca; estas últimas se diferencian en el agente de conservación antimicrobiana incorporado, por lo que adicionalmente se ha evaluado la efectividad antimicrobiana de los preservativos.

Materiales y métodos

Las formulaciones oftálmicas, viscoelástico y lágrimas artificiales, se elaboraron mediante la dispersión de la HPMC en soluciones acuosas empleando el método caliente /frío:

VISCOELÁSTICO

HPMC al 2%: Se procedió a disolver en condiciones asépticas los componentes (Tabla I) previamente pesados en una balanza analítica Mettler AJ 150 DL, en orden creciente de solubilidad en el volumen total de agua recientemente destilada disponible para preparar una dispersión de HPMC al 2%. Para la incorporación del polímero se empleó el método ya reportado (Andueza, 2002).

Tabla I
Solución solvente de sales para
la fórmula viscoelástica de HPMC al 2%

Componente	*Concentración %
Cloruro de calcio	0,048
Cloruro de magnesio	0,030
Cloruro de potasio	0,075
Acetato de sodio	0,390
Citrato de sodio	0,170
Cloruro de sodio	0,490

Cada 2 mL de la dispersión final se envasó en viales de borosilicato de 5 mL de capacidad con tapones de goma y sello de aluminio.

Los envases llenos y sellados se sometieron a esterilización por autoclave Fanem 415, a 120 °C por 15 minutos.

LÁGRIMAS ARTIFICIALES

HPMC al 0,5%:

Se elaboraron dos formulaciones de HPMC al 0,5%, con los mismos componentes como se encuentra descrito en la tabla II, a diferencia del agente de conservación antimicrobiana, en donde la fórmula 1A contenía cloruro de benzalconio con EDTA y la 1B contenía perborato de sodio.

Tabla II
Soluciones diluentes de las fórmulas de lágrimas artificiales de HPMC al 0,5%

Componentes	Fórmula 1A (%)	Fórmula 1B (%)
Cloruro de calcio	0,048	0,048
Cloruro de magnesio	0,030	0,030
Cloruro de potasio	0,075	0,075
Ácido bórico	0,560	0,560
Borato de sodio	0,096	0,096
Cloruro de sodio	0,490	0,490
Cloruro de benzalconio	0,010	
EDTA	0,055	
Perborato de sodio tetrahidratado		0,053

Se procedió a elaborar dispersiones de HPMC al 2% en agua desmineralizada (dispersión concentrada), siguiendo el método de la USP 30 (2007) para el ensayo de viscosidad de la HPMC y se esterilizó por autoclave a 120 °C durante 15 minutos. Posteriormente se prosiguió con la elaboración de las soluciones diluentes estériles, disolviendo cada uno de sus componentes en orden creciente de solubilidad, empleando agua desmineralizada y una balanza analítica Mettler AJ 150 DL. Seguido de ello se realizó una prefiltración con membrana Millipore de 0,5 µm, con posterior filtración esterilizante en membrana Millipore de 0,20 µm y bajo campana de flujo unidireccional horizontal. En esa misma área y cumpliendo con las buenas prácticas de manufactura para estos productos, se procedió a mezclar porciones de la dispersión concentrada de HPMC al 2% con cada una de las soluciones diluentes estériles, de tal manera de obtener dos formulaciones de lágrimas artificiales con la concentración final deseada HPMC al 0,5%. Para finalizar, se envasaron en frascos goteros de vidrio color ámbar de 30 mL previamente lavados y esterilizados.

ESTERILIDAD

Se determinó siguiendo el método directo descrito en la USP 30 (2007). Una vez finalizados los 14 días de incubación, todas las muestras fueron inoculadas con 100 UFC: para el caldo de soya caseína (Difco) con *Candida albicans* ATCC 10231 y para el caldo Tioglicolato (Difco) con esporas de *Clostridium sporogenes* ATCC 19404, de acuerdo con la metodología empleada por el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (Australian Gov, 2006).

EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Se emplearon cuatro de los microorganismos especificados en la USP 30 (2007). Las cepas seleccionadas fueron: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) y *Candida albicans* (ATCC 10231), las cuales fueron mantenidas en perlas de vidrio bajo refrigeración empleando medios selectivos específicos para el crecimiento de cada uno de los microorganismos. Una perla de cada cepa fue inoculada en Caldo Trypticase Soya (Difco), a excepción de la cepa de *Candida albicans*, con la que se empleó Caldo Sabouraud (Difco). Luego se incubaron a 32 °C por 24 horas y posteriormente se subcultivaron en medio sólido. Los crecimientos obtenidos se recogieron con solución salina y fueron diluidos hasta 10⁸ UFC/mL, empleando un estándar nefelométrico de Mac Farland.

Para determinar el número de células por mL de cada suspensión, se realizó un recuento en placas de agar. La selección de los microorganismos, medios de cultivo, preparación de los inóculos y procedimiento empleado se realizó siguiendo el método de la USP 30 (2007): «Ensayo de efectividad antimicrobiana».

Con el fin de evitar un falso negativo debido a la presencia de los preservativos, fue necesario neutralizar los agentes antimicrobianos. Para la formulación que contenía cloruro de benzalconio, se empleó Caldo Lethen (Difco) como solución neutralizante y para la dispersión que contenía perborato de sodio se utilizó Caldo Trypticase Soya con piruvato de sodio al 1% (Ohresser, 2004).

Para validar la neutralización fue necesario evaluar la capacidad y toxicidad de las soluciones empleadas:

ENSAYO DE CAPACIDAD DE LA SOLUCIÓN NEUTRALIZANTE

Se mezcló un volumen de cada una de las dispersiones isotónicas y preservadas de HPMC al 0,5%, con su correspondiente solución neutralizante en

una proporción de 1:10. Inmediatamente se añadió 0,5 mL de cada una de las suspensiones con 1×10^6 células/mL aproximadamente. Se tomaron alícuotas de 1 mL de la mezcla al cabo de 5, 10 y 15 minutos de contacto y se diluyeron con 9 mL del Caldo Trypticase Soya para las bacterias y con 9 mL de Caldo Sabouraud para *Candida albicans*. De cada dilución se sembró 0,1 mL, sobre la superficie de los agares Trypticase Soya y Sabouraud, las placas fueron incubadas a 32 °C por 24 horas para bacterias y 25 °C por 5 días para hongos.

ENSAYO DE TOXICIDAD DE LA SOLUCIÓN NEUTRALIZANTE

Se diluyó la suspensión de cada uno de los microorganismos con agua peptonada hasta obtener 1×10^6 células/mL aproximadamente. Luego se diluyó en una proporción de 1:10 en agua destilada, se toma 1 mL y se le añadió a 9 mL de cada una de las soluciones neutralizantes (Caldo Lethen y Caldo Trypticase Soya con piruvato de sodio al 1%). Se dejaron en contacto y al cabo de 5, 10 y 15 minutos se tomó 1 mL de cada mezcla y se diluyó con 9 mL de Caldo Trypticase Soya (concentración 1:10). Posteriormente se tomó 0,1 mL y se sembró por duplicado en la superficie de los agares Trypticase Soya y Sabouraud. Las placas fueron incubadas a 32 °C por 24 horas para bacterias y 25 °C por 5 días para hongos (Langsrud, 1998).

Paralelamente se realizó un control inoculando las mismas poblaciones de microorganismos, sustituyendo las soluciones neutralizantes por Caldo Trypticase Soya.

ENSAYO DE EFECTIVIDAD

Se inoculó por separado 10^6 UFC/mL para cada uno de los gérmenes en el contenido completo (un frasco por cada germen) de las dispersiones de lágrimas artificiales preservadas siguiendo el procedimiento de la USP 30 (2007). Posteriormente se procedió a seguir lo establecido para los productos de categoría I, ya que dentro de ellos se encuentran los productos oftálmicos. Se realizaron los recuentos a los 7, 14, y 28 días. Para ello fue necesario neutralizar previamente las muestras inoculadas con cada germen mezclando 1 mL de la muestra con 9 mL de la solución neutralizante correspondiente. Esta mezcla se mantuvo en contacto por 5 minutos y seguidamente, se prepararon diluciones seriadas. A partir de cada dilución se sembró en los agares Lethen y Sabouraud para la dispersión que contenía cloruro de benzalconio. Paralelamente se utilizaron los agares Trypticase Soya y Sabouraud Dextrosa con adición de 1% de piruvato de sodio para las formulaciones que contenían perborato de sodio.

PIRÓGENOS

La dispersión de HPMC al 2% fue diluida al 50% con solución estéril de las mismas sales (Tabla I) y en condiciones asépticas. Esta modificación se realizó con base en la *Farmacopea Británica* (1998), donde permite para la prueba de pirógenos, diluciones de muestras en solución de albúmina, agua para inyección o solución de cloruro de sodio al 0,9% libre de pirógenos.

A la formulación diluida se le determinó la respuesta febril siguiendo el método descrito por la USP 30 (2007).

Toxicidad ocular. Irritabilidad de la mucosa ocular del conejo (método de DRAIZE modificado)

Las formulaciones estériles de HPMC al 2% y al 0,5%, fueron evaluadas por el método de Draize (Draize, 1994), el cual fue modificado por Conquest y colaboradores en 1977, y es el que se aplica en el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, organismo contralor sanitario en Venezuela,

Se seleccionaron tres conejos albinos aptos para el ensayo (con características de ojo normal: sin enrojecimiento, ni descarga entre otros). Se tomó 0,1 mL de la dispersión esterilizada y se instiló en uno de los sacos conjuntivales de cada conejo. El otro ojo se tomó como control. El tratamiento se aplicó sin posterior lavado con solución fisiológica. Se observó el desarrollo de la lesión a los diferentes tiempos: t0, t24h, t48h, t72h, t96h, t7 días después de la aplicación; esto se hizo a simple vista y en presencia de fluoresceína al 2%. Se evaluaron: daños corneales (opacidad), inflamación en el iris, deterioro de la conjuntiva o mucosidad en los párpados (enrojecimiento o quemosis), así como el tiempo de duración de los daños. Las evaluaciones se realizaron en forma individual a cada animal de experimentación.

Este método logró cuantificar mediante la asignación de valores numéricos arbitrarios, las reacciones fisiológicas observadas en partes del ojo (córnea, conjuntiva e iris). Este ensayo modificado por Conquest en 1997, parámetros como enrojecimiento, quemosis, descarga, opacidad corneal.

Resultados y Discusión

La formulación viscoelástica (HPMC al 2% libre de agente de conservación antimicrobiana) que fue sometida a esterilización por calor húmedo, así como las formulaciones de HPMC al 0,5% que fueron sometidas previamente a esterilización con posterior llenado bajo condiciones asépticas, demostraron la ausencia de microorganismos viables; es decir,

cumplen con los requisitos de esterilidad establecidos por la USP 30 (2007).

Existe evidencia que indica que el proceso de esterilización por autoclave (120 °C por 15 minutos) no modifica la estabilidad física de las dispersiones de HPMC al 2% en solución de sales y se logra además la obtención de productos estériles (Fechner, 1985 y Andueza, 2002). Se sabe que al someter el polímero a esterilización en autoclave, éste evidencia cambios físicos dentro de la dispersión, que se manifiestan con aparición de una turbiedad o separación del medio dispersante (Andueza, 2002). Esto se debe a que el aumento de la temperatura disminuye la hidratación del polímero, éste se hace menos soluble y la fuerte interacción polimérica aumenta separándose del disolvente. Para recuperar completamente la estructura polimérica dentro de la dispersión, es necesario mantenerla en reposo por al menos 72 horas después de haberse sometido a este proceso.

Debido a la termosensibilidad del perborato de sodio presente en las lágrimas artificiales, que se descomponen a temperaturas superiores a 60 °C con liberación de oxígeno, fue necesario modificar el proceso de esterilización (*The Merck Index*, 2001). Por

ello se procedió a emplear el método de esterilización por calor húmedo para las dispersiones concentradas de HPMC al 2% y la filtración esterilizante para las soluciones diluyentes que contenían los agentes antimicrobianos.

Al evaluar la efectividad antimicrobiana se puede observar en la Tabla III que el contacto inicial de los gérmenes con los productos produce una reducción de los mismos, expresados como los números de unidades formadoras de colonias por mL que se encontraron inicialmente en cada una de las suspensiones microbianas empleadas para el ensayo, así como el recuento inicial de cada uno de los frascos inoculados. Esta reducción observada es similar entre ambos preservativos, a excepción del *Staphylococcus aureus* que en presencia de cloruro de benzalconio con EDTA manifiesta una drástica disminución de 5 unidades logarítmicas; esto indica que este agente de conservación antimicrobiana es muy efectivo para este microorganismo. Confirmando la buena efectividad de este preservativos frente a las bacterias grampositivas (Mamoru, 2003).

Los resultados de la efectividad antimicrobiana de las dispersiones evaluadas a diferentes tiempos se detallan en las Tablas IV y V. Se puede observar

Tabla III
Recuento de las suspensiones de gérmenes y de las dispersiones al tiempo inicial (t=0).

Microorganismos	Suspensión UFC*/mL	HPMC al 0,5% en fórmula 1 ^a UFC/mL	Reducción log.	HPMC al 0,5% en fórmula 1B UFC/mL	Reducción log.
<i>E. coli</i>	1,1 x 10 ⁶	7,6 x 10 ⁴	1,16	4,7 x 10 ⁴	1,42
<i>P. aeruginosa</i>	2,0 x 10 ⁶	8,0 x 10 ⁴	1,39	1,3 x 10 ⁵	1,18
<i>S. aureus</i>	1,3 x 10 ⁶	<10	5,11	8,0 x 10 ⁴	1,2
<i>C. albicans</i>	1,5 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁵	1,09	8,3 x 10 ⁴	1,25

* UFC = Unidades Formadoras de Colonias

Tabla IV
Ensayo de efectividad de la dispersión de HPMC al 0,5% en la fórmula 1A

Germen	Recuento t=0 UFC**/mL	Log. t=0	Recuento t=7 días UFC/mL	Reducción logarítmica	Recuento t=14 días UFC/mL	Recuento t=28 días UFC/mL	Reducción logarítmica total
<i>E. coli</i>	7,6 x 10 ⁴	4,88	<10	3,88	<10	<10	3,88
<i>P. aeruginosa</i>	8,0 x 10 ⁴	4,9	<10	3,9	<10	<10	3,9
<i>S. aureus</i>	<10	1	<10	5,11*	<10	<10	5,11*
<i>C. albicans</i>	1,2 x 10 ⁵	5,08	<10	4,08	<10	<10	4,08

* Se tomó el valor del inóculo

** UFC = Unidades Formadoras de Colonias

Tabla V
Ensayo de efectividad de la dispersión de HPMC al 0,5% en la fórmula 2A

Germen	Recuento t=0 UFC*/mL	Log. t=0	Recuento t=7 días UFC/mL	Reducción logarítmica	Recuento t=14 días UFC/mL	Recuento t=28 días UFC/mL	Reducción logarítmica total
<i>E. coli</i>	4,7x 10 ⁴	4,67	<10	3,67	<10	<10	3,67
<i>P. aeruginosa</i>	1,3 x 10 ⁵	5,11	<10	4,11	<10	<10	4,11
<i>S. aureus</i>	8,0 x 10 ⁴	4,9	<10	3,9	<10	<10	3,9
<i>C. albicans</i>	8,3 x 10 ⁴	5,17	<10	4,17	<10	<10	4,17

* UFC = Unidades Formadoras de Colonias

que los recuentos de todos los microorganismos ensayados a tiempos superiores al inicial, fueron menores a 10 UFC/mL; de esta misma manera, al comparar las reducciones logarítmicas entre el tiempo inicial y los siete días de incubación, los valores fueron mayores a tres unidades. Para las bacterias, la reducción logarítmica calculada con respecto al recuento inicial mostró unidades logarítmicas mayores de 1 a los 7 días de incubación y 3 unidades logarítmicas a los 14 días. A partir de los 14 días no se observó ningún incremento. En el caso de *Candida albicans* no se observó ningún aumento durante los 7, 14 y 28 días de incubación con relación al recuento inicial.

Nuestros resultados indican que las formulaciones evaluadas cumplen con el criterio establecido por la USP 30, no presentándose diferencias entre los agentes de conservación antimicrobiana, por lo que se sugiere el empleo del perborato de sodio por no tener demostrado hasta los momentos efecto tóxico sobre las células oculares.

Se ha determinado que el Caldo Lethen tiene la capacidad para neutralizar desinfectantes, debido a la presencia de lecitina de soya, que actúa como agente emulsificante y neutraliza compuestos de amonio cuaternario como el cloruro de benzalconio (Lethen Caldo, 2008; Langsrud, 1998). Para el perborato de sodio, la literatura no reporta un neutralizante específico. Basándonos en el trabajo de Ohresser y col. (2004), en el que demuestra que la incorporación de una solución de piruvato de sodio al 1% en Caldo Tripticase Soya fue capaz de neutralizar los peróxidos mediante una simple reacción estequiométrica, se sugirió el empleo de este método para neutralizar el perborato de sodio en concentración preservante de 0,053%. Estos resultados preliminares sugieren realizar a futuro la validación correspondiente.

Reacción estequiométrica

Piruvato + Peróxido ↔ Acetato + Dióxido de Carbono + Agua

Así mismo, para las soluciones neutralizantes empleadas fue necesario evaluar su capacidad y toxicidad. Los tiempos evaluados (5, 10, 15 minutos), presentaron igual efecto neutralizante, por lo que se seleccionó el menor tiempo de contacto para realizar la prueba de efectividad antimicrobiana.

En el ensayo de toxicidad se demostró que la solución neutralizante no afecta las células microbianas, es decir, durante el ensayo de efectividad la reducción logarítmica fue debida a la acción letal del preservativo y no de la solución neutralizante.

Todos estas consideraciones demuestran que el perborato de sodio también puede ser empleado como agente de conservación antimicrobiana en las lágrimas artificiales de HPMC, y por sus características al reaccionar con la catalasa ocular se descompone en agua y oxígeno, lo que indica una menor toxicidad que el cloruro de benzalconio asociado con el EDTA. La efectividad fue demostrada en cuatro de las cinco cepas establecidas por la USP 30 (2007), no empleándose el *Aspergillus niger*; sin embargo, en reportes anteriores ya se ha demostrado su efectividad (Grant, 1996). Es importante resaltar que los ensayos se realizaron en lotes piloto (60 frascos de 30 mL), por lo que se continuará con la estandarización y validación de los métodos para mayor cantidad de muestras y diferentes lotes de producción, así como todas las cepas exigidas por la USP 30 (2007).

Con relación a los ensayos de pirógenos, la medida del aumento de la temperatura corporal del conejo cumple con los requisitos de la USP 30 (2007), ya que ninguno de ellos mostró un incremento de 0,5 °C o más de la temperatura inicial.

Ahora bien, debido a la alta viscosidad de la dispersión viscoelástica (alrededor de 4000 cps), impidió su administración directa en la vena marginal de la oreja del conejo. En vista de este inconveniente y basándose en la *Farmacopea Británica* (1998), donde se permiten diluciones de muestras en solución de albúmina, agua para inyección o solución de

cloruro de sodio al 0,9% libre de pirógenos, se procedió a diluir en condiciones asépticas el producto en un 50%, empleando la solución estéril que contenía las mismas sales con que se preparó la dispersión, esto con la finalidad de conservar la isotonía y modificar la formulación sólo en relación con la viscosidad y concentración del polímero. Es importante resaltar que el método exige calentar las muestras a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ antes de proceder a la inyección. Esto favorece la fluidez del producto ya que se ha demostrado que al aumentar la temperatura de las dispersiones poliméricas de HPMC, la viscosidad se ve disminuida (Andueza, 2002); esto favorece aún más su administración y evita la formación de trombos o abscesos en el conejo que puedan influir en los resultados finales del ensayo. Esta modificación al método requiere ser validada y será objeto de estudio en el futuro.

Los valores obtenidos de irritabilidad en la mucosa ocular de conejo según la escala de DRAIZE para la dispersión isotónica de HPMC al 2%, reportaron un promedio total diario de 0,66 en las primeras 24 horas, lo que indica que el producto es levemente irritante, con un efecto de duración leve, no observándose lesión en córnea o en iris. Este resultado se consideró satisfactorio. Por su parte, las fórmulas de HPMC al 0,5% estériles reportaron un promedio total diario de cero (0) en las primeras 24 horas, lo que indica que los productos no son irritantes, no observándose lesiones en córnea o en iris. Este resultado también se consideró satisfactorio.

Se conoce que existen diferencias entre el ojo del conejo y el humano (Sharpe, 1985). En efecto, el conejo posee un tercer párpado, produce menos lágrimas, el pH de la lágrima es más alcalino y la capa córnea es más delgada que la humana. Esto permite sugerir que la superficie ocular del conejo es más sensible que la humana y por lo tanto el método de Draize sobreestima la capacidad irritante de un producto en el ojo del humano (Freeberg, 1984). Es por ello que nos atrevemos a afirmar que las pre-formulaciones evaluadas en los conejos presentarán un efecto irritante igual o menor sobre la conjuntiva y córnea humana, cumpliendo así con el requisito de atoxicidad.

Conclusiones

Los resultados preliminares obtenidos en cuanto a calidad microbiológica, toxicidad ocular y efectividad antimicrobiana de las formulaciones evaluadas, empleando procedimientos previamente establecidos y tomando en consideración las buenas prácticas de manufactura, señalan que estas formulaciones

pueden llegar a ser seguras y confiables realizando la validación de los procesos de manufactura, así como de los ensayos respectivos. Esto a su vez nos permitirá seguir evaluando y considerando diferentes parámetros, a fin de obtener las formulaciones definitivas y posteriormente corroborar su eficacia con estudios de farmacología clínica.

Agradecimientos

A Laboratorios Farma S.A. por el suministro de algunos insumos y permitirnos el uso de sus instalaciones para realizar esta investigación. Al Instituto Nacional de Higiene «Rafael Rangel», por su colaboración en la realización de los ensayos. Al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas de la Universidad Central de Venezuela, por su aporte económico bajo el proyecto N° IIF 01/2001.

Referencias bibliográficas

- Abelson M, Washburn S. 2002. The Downside of Tear Preservatives. *Review of Ophthalmology* 9(5): 102-104, 106.
- Allowood G. 1998. *Principles and Practices of Desinfection, Preservation and Sterilization*, 3th edition. Editado por AD Russell. WB Hugo & GAJ Ayliffe, pp. 657-665.
- Andueza I, Ávila G, Attías D. 2000. Caracterización Física de hidroxipropilmetilcelulosa con potencial aplicación oftalmológica: pH, Tensión Superficial, Característica de la película. *Rev Soc Quím Méx* 44(3): 224-228.
- Andueza I, Ávila G, Attías D. 2002. Efecto de la esterilización por calor húmedo sobre algunas propiedades físicas de una dispersión isotónica de hidroxipropilmetilcelulosa. *Rev Fac Farm* 65(2):46-55.
- Andueza I, Avila G, Attias D. 2004. Influencia de la esterilización sobre el comportamiento reológico y pH de una dispersión isotónica de hidroxipropilmetilcelulosa. *Rev Soc Quím Méx* 48: 220-224.
- Andueza I, Ávila G, Attías D. 2002. Caracterización reológica de hidroxipropilmetilcelulosa con potencial aplicación oftalmológica. *Rev Soc Quím Méx* 44 (3): 229-232.
- Australian Government, Dep. of Health and Ageing Therapeutic Goods Administration. TGA guidelines for sterility testing of therapeutic goods. (En línea). 2006. (Consultado en enero 2007). Disponible en: www.tga.gov.au/docs/pdf/sterilit.pdf.
- Bapatla K, Lorenzetti O. 1993. 2nd ed. *Development of Ophthalmic Formulations*. In: *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, vol. 2. Avis KA, Liberman HA, Lachman L, editors. Marcel Dekker, Inc; New York, pp. 541-582.
- British Pharmacopoeia. 1998. *Test for Pyrogens*. London The Stationery Office. Vol. II, pp. A172 – A173.

- Conquest P, Durand G, Laillier J, Blazonnet B. 1977. Evaluation of ocular irritation in the rabbit: objective versus subjective assessment. *Toxicol Appl Pharmacol* 39:129-139.
- Draize J, Woodwatd G, Calvery H. 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 82:377 – 389.
- Fechner PU. 1985. Preparation of 2% HPMC for viscous surgery. *Am Intraocular Implant Soc J* 11: 606-607.
- Freeberg F, Griffith J, Bruce R, Bay P. 1984. Correlation of animal test methods with human experience for household products. *J Tox Cutaneous and Ocular Tox.* 1: 53-64.
- Grant R, Ajello M, Vlass E. 1996. Salt mater or high tech? A look at to new rinsing solutions for lenses. *Optician* 212:38 – 41.
- Hedqvist B. (En línea). 1999. Dry eyes – remarks on local therapy (Citado en Oct. 2007) Disponible en la web: www.sjogrensyndrom.se/100_site/spdfs/s24.pdf
- Kaufman P, Alm A. 2004. Adler, fisiología del ojo. Aplicación clínica. 10° edición, Editado por Elsevier España S.A. pp. 96-97.
- Langsrud S, Sundheim G. 1998. Factors influencing a suspension test methods for antimicrobial activity of disinfectants. *J Ap Micro* 85:1006-1012.
- Lee V. 1993. Mitra AK, editor. Precorneal, corneal, and Postcorneal Factors In: *Ophthalmic Drug Delivery Systems*. Marcel Dekker, Inc; New York, pp. 59-69.
- Letheen Caldo (En línea). 1998. (Citado en Oct. 2007). Disponible en la web: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/letheencaldo.htm>
- Liesegang T, Bourne W. 1986. The use of HPMC in extracapsular cataract extraction with intraocular lens implantation. *Am J Ophthalmol* 12: 723-726.
- López B, Ubel J. 1991. Quantitative evaluation of the corneal epithelial barrier. Effect of artificial tears and preservatives. *Curr Eye Res* 10(7):645-656.
- Mamoru S, Reiko U, Nobuhiro I, Naoaki H, Eiichi O. 2003. Studies of antibacterial Activity of Benzalkonium Chloride as preservative for Ophthalmic solutions Against Gram positive cocci and negative rods. *Jap J Phar Health Care Sci* 29 (3): 341-345.
- Ohresser S, Griveau S, Schann C. 2004. Validation of microbial recovery from hydrogen peroxide-sterilized air. *PDA J Pharma Sc Tech* 58(2): 75-80.
- Pflug I, Evans K. 2000. Carrying Out Biological Qualification, the Control Operation of Moist-Heat (Steam Sterilization) Processes for Producing Sterile Pharmaceuticals and Medical Devices. *PDA J Pharma Sc Tech* 54(2):117-135.
- Sharpe R. 1985. The Draize test- motivation for change *Food Chem Tox* 23:139-143.
- Sterilizers. 2000. The authorized persons group UK. Moist-Heat Sterilization in the UK Pharmaceutical Industry. *PDA J Pharm Sc Tech* 54 (5): 413-420.
- The Merck Index. 2001. Thirteenth ed. An Encyclopedia of chemicals, drugs and biological. Whitehouse Station (NJ): Merck & Co., Inc.: pp. 283, 1544-1545, 8725, MISC-32-42.
- Toda I, Shinosaki N, Tsubota K. 1996. HPMC for the treatment of severe dry eye associated with sjogren's syndrome. *Cornea* 15 (2): 120-128.
- Turco S. 1994. 4th ed. *Ophthalmic Preparation*. In: *Sterile Dosage Forms. Their preparation and clinical application*. Brown M, Klass F, editors. US: Williams & Wilkins Press; Philadelphia pp. 344-371.
- USP 30-NF 22. 2007. United States Pharmacopeia convention, Inc., Rokville, MD. pp. 85-87, 105-110. Hypromellose (Sup.1;
- Versura P, Maltráelo MC, Stecher F, Camarazza R, Lashci R. 1989. Dry eye before and after therapy with HPMC Ultrastructural and Cytochemical study in 20 patients. *Ophthalmologica* 198:152-162.