



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN:**

**MICROEMULSIONES PARA VÍA OFTÁLMICA, UNA ALTERNATIVA PARA EL  
DESARROLLO DE MEDICAMENTOS APLICADOS EN EL APARATO OCULAR.**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**ANAHÍ NICOLÁS SOLÍS**



**CDMX**

**2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** LEMUS BARAJAS MA. GUADALUPE  
**VOCAL:** BERNAD BERNAD MARIA JOSEFA  
**SECRETARIO:** LLERA ROJAS VIRIDIANA GISELA  
**1º SUPLENTE:** JUAREZ OSORNIO CARLOS  
**2º SUPLENTE:** VILLANUEVA MARTINEZ NORMA ANGÉLICA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS**

**SUSTENTANTE:**

---

**ANAHÍ NICOLÁS SOLÍS**

## **AGRADECIMIENTOS OFICIALES**

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

A LA FACULTAD DE QUÍMICA

A LA DRA. MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD POR PERMITIRME INVESTIGAR DESDE LAS INSTALACIONES DEL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN F001 EN LA FACULTAD DE QUÍMICA.

## DEDICATORIA

A Dios, por darme vida, salud y voluntad.

A mis papás, Adriana Solís y Víctor Manuel Nicolás por su amor infinito, ejemplo y gran apoyo.

A Viridiana Llera (un ejemplo a seguir) por motivarme desde sus clases, apoyarme y siempre creer en mí.

A mis tíos (María de los Remedios, Georgina, Domingo, Arturo, Carmelita, Jorge, Julio, Juliana, Argelia, Héctor, Carlos, Hebert, Elisa, Guadalupe); y primos (Raúl, Héctor, Juliana, María Elisa, Cristina, Elisa, Manuel, Gabriela y Liliana) por su cariño, enseñanzas y apoyo. A mis sobrinos, Ahmed y Roberto por los recuerdos, las risas, los buenos momentos y por estar en los malos también.

A mis amigos:

Que me acompañan desde el inicio de la carrera: Anaid, Javier, Katherine, Armando, Daniela, Denisse, Izael, Gerardo, Nayeli, Lilia, Fernando. Saben que los quiero mucho y que son para toda la vida.

Que conocí a lo largo del camino: Daniel Mora, Mayra Ojeda, Nancy Venegas y Daniela Bolaños; que me han apoyado en todo momento.

Con los que trabajé: Gabriela Benitez, Braulio Torres, Melissa Ortiz, Rafael Belmonte, Eduardo Rosas, Cristal Rizada, Florencia Pacheco, Evelyn Santiago, Laura Chavero, Lizzett Sandoval, José Antonio Pérez Villanueva, Marisol Juárez, Lidia Alonso, Miguel Díaz, Hugo Hernández, Karen Ávila. Gracias por su cariño, enseñanzas, apoyo y compañerismo.

A los que están lejos: Migdalia Ramírez, por siempre estar para mí pese a la distancia.

A los que recuerdo con cariño: Gabriela Martínez, María Fernanda de la O, Adriana Méndez.

A Kimbra y Dixie, por su amor y compañía.

## Índice

Carátula y presentación.....	1
1. Introducción .....	8
2. Objetivos .....	8
3. Hipótesis.....	13
4. Antecedentes.....	14
4.1 Fisiología del Ojo .....	14
4.1.1 Estructuras del Segmento Anterior .....	17
4.1.2 Estructuras del Segmento Posterior.....	32
4.2 Barreras y rutas de absorción en la fisiología del ojo.....	39
5. Microemulsiones.....	45
5.1 Composición de las microemulsiones.....	49
5.1.1 Diagramas de fase y su uso para definir la proporción de los componentes. .	55
5.1.2 Diseño de experimentos como herramienta para el desarrollo farmacéutico.	60
5.2 Métodos de preparación. ....	66
5.3 Ventajas y Desventajas.....	70
5.3.1 Ventajas .....	70
5.3.2 Liberación Controlada.....	85
5.3.3 Tamaño de partícula o glóbulo .....	88
5.3.4 Ventajas sobre Formas Farmacéuticas convencionales .....	89
5.4 Desventajas .....	93
5.5 Fármacos incorporados a microemulsiones. ....	95
5.6 Pruebas.....	98
5.6.1 Pruebas <i>in vivo</i> .....	98
5.6.2 Pruebas <i>in vitro</i> .....	107
5.7 Conclusiones .....	134
5.8 Bibliografía .....	135

## Índice de Tablas

Tabla 1.	Ejemplo de valores de las variables para los ingredientes de una microemulsión (fase oleosa, fase acuosa y tensoactivo con cosurfactante en proporción 1:1).....	57
Tabla 2.	Fármacos formulados en microemulsiones.....	95
Tabla 3.	Criterios de evaluación de los signos observados en la córnea, iris y conjuntiva.....	102
Tabla 4.	Resumen sobre la selección de lotes, parámetros por evaluar y condiciones de cada tipo de estudio de acuerdo a la <i>NOM-073-SSA1-2005</i> .....	118
Tabla 5.	Interpretación de resultados de acuerdo al valor de MRD <sub>50</sub> y el Sistema Global Armonizado (GHS)	128

## Índice de Figuras

Figura 1.	Anatomía del ojo.....	16
Figura 2.	Capas de la película lagrimal de la interna a la externa.....	18
Figura 3.	Capas de la córnea.....	23
Figura 4.	Cuerpo Ciliar.....	28
Figura 5.	Esclerótica y músculos extraoculares.....	33
Figura 6.	Diagrama del curso y dirección del fármaco a través del ojo.....	41
Figura 7.	Representación de inyección subconjuntival.....	43
Figura 8.	Representación del cambio en la energía libre de Gibbs antes y después de la formación de la microemulsión.....	45
Figura 9.	Sistema compuesto de agua y aceite .....	46
Figura 10.	Diferencia de tensión interfacial ( $\sigma$ ) provocada por el gradiente de concentración de sustancias activas.....	47
Figura 11.	Movimiento autónomo de los glóbulos de la microemulsión.....	48
Figura 12.	Diferencia entre micelas y microemulsiones.....	52
Figura 13.	Diagrama ternario.....	56
Figura 14.	Adición de los componentes en el desarrollo experimental.....	58
Figura 15.	Representación de un diagrama de fases pseudoternario.....	59
Figura 16.	Clasificación del diseño de experimentos en categorías.....	61
Figura 17.	Diseño simple reticular.....	63
Figura 18.	Diseño simple con centroide.....	63
Figura 19.	Tipos de microemulsiones con base en la clasificación de P. A. Winsor.....	69
Figura 20.	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica.....	75
Figura 21.	Posible localización del fármaco en el sistema de microemulsión.....	78

Figura 22.	Posible disposición espacial del cloranfenicol en una microemulsión aceite en agua.....	80
Figura 23.	Método general de la prueba Draize para ojo.....	100
Figura 24.	Comportamiento de un fluido Newtoniano al graficar esfuerzo cortante contra velocidad de corte.....	110
Figura 25.	Tipos de fluidos no Newtonianos.	112
Figura 26.	Representación gráfica de una cámara cerrada.....	124
Figura 27.	Mapa sobre las pruebas in vitro revisadas por la Comisión Europea....	129
Figura 28.	Representación de la anatomía del huevo de gallina.....	131
Figura 29.	Enfoques Ascendente y Descendente para la evaluación de la irritabilidad ocular.....	132

## Abreviaturas

ME(s)	Microemulsión(es)
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
MGA	Método General de Análisis
CMC	Concentración Micelar Crítica
CPP	Parámetro Crítico de Empaquetamiento
PEG	Polietilenglicol
ANOVA	Análisis de Varianza
PPD	Parafenilendiamina
FDA	Food and Drug Administration.
ECVAM	European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing.
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
DLS	Dynamic Light Scattering
SANS	Small-angle Neutron Scattering
SAXS	Small-angle X-ray Scattering
O/W	Oil in Water.
W/O	Water in Oil.
ICE	The Isolated Chicken Eye Test Method
BCOP	Bovine Corneal Opacity and Permeability
FL	Fluorescein Leakage
CM	Cytosensor Microphysiometer Test Method
HET-CAM	Hen's egg test – Chorioallantoic membrane
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

GHS	Global Harmonized System
AAINES	Anestésicos y Analgésicos Antiinflamatorios No Esteroideos
ATP	Adenosin trifosfato

## 1. Introducción

Las sustancias que presentan actividad farmacológica y que puedan identificarse por sus características físicas, químicas o acciones biológicas; y provengan de una fuente natural, sintética o biotecnológica, se conocen como fármacos, los cuales se identifican como principios o ingredientes activos en los preparados farmacéuticos (Secretaría de Salud, 1997).

Los fármacos *per sé* carecen de características adecuadas para ser aplicados directamente en los diversos sitios del cuerpo humano. Para ello, se requiere que se mezclen y procesen con otras sustancias que les confieran propiedades que permitan, tanto que se liberen, absorban y distribuyan; así como que sean tolerados por el organismo, incluso de “protegerlos” de las diferentes condiciones físicas, químicas y biológicas del mismo. Las cuales podrían obstaculizar que desempeñen la actividad farmacológica que los caracteriza. Dichas sustancias se denominan excipientes.

Las formas farmacéuticas son un conjunto de excipientes que, al estar dispuestos junto con el fármaco permiten su dosificación, así como que el preparado presente las características para una mejor funcionalidad terapéutica, de fabricación, o estabilidad (Robles, 2011). Pueden presentarse como sólidos, por ejemplo: cápsulas, tabletas, implantes; líquidos como las soluciones, suspensiones y emulsiones; o semi-sólidos, como los geles. Los dos primeros (sólidos y líquidos) en combinación con sustancias en estado gaseoso dan lugar a los aerosoles.

Finalmente, de acuerdo con el artículo 221, capítulo IV de la Ley General de Salud, los medicamentos son aquellos que contienen uno o más principios activos, con características físicas, químicas y biológicas identificables; dispuestos en formas farmacéuticas que pueden tener un efecto preventivo, terapéutico o rehabilitatorio.

Una de las clasificaciones de las formas o preparados farmacéuticos es acorde a la vía de administración a la que están destinados. Para la absorción del ingrediente en el tracto gastro - intestinal se utiliza la oral, siendo la más común. Existen algunas otras tales como la ótica (dirigida al oído), dérmica (dirigida a la piel) y oftálmica (dirigida al ojo), por mencionar algunas.

Diseñar y desarrollar medicamentos para vía oftálmica representa un reto dada la fisiología ocular. Las formas farmacéuticas más comúnmente utilizadas han sido los colirios y ungüentos.

Por un lado, los colirios son preparados en forma de disolución, suspensión o emulsión, (Baranowski, Bożena Karolewicz, *et al.*, 2014) que contienen ingredientes que permiten que sean isotónicos, presenten determinado pH, cierta viscosidad y en algunos casos que protejan al fármaco de la oxidación (antioxidantes). Pueden acondicionarse en envases multidosis o dosis única. Para el primero caso, además de fabricarlos en condiciones estériles, se le agregan agentes antimicrobianos que impiden el crecimiento de microorganismos que pudieran contaminar el preparado tras repetidas administraciones (conservadores); mientras que para el segundo es indispensable que sea estéril desde su fabricación hasta el momento en que se administre el medicamento.

Si bien los colirios son relativamente fáciles de aplicar (Kumari, Anita, Sharma, Pramod K., Garg, Vipin K., Garima, 2010), presentan algunas desventajas como la pérdida del volumen aplicado por mecanismos como el parpadeo, producción de lágrimas y regeneración de la película lagrimal (de 2 a 3 minutos). El tiempo que el fármaco permanece en contacto con la superficie ocular no es el suficiente, pues el conjunto de mecanismos mencionados, hacen que se remueva en tan sólo 15 o 30 segundos, obstaculizando la absorción. (Gaudana et al., 2010). Subsecuentemente, se ve afectada la biodisponibilidad; del total de la dosis aplicada se conserva sólo del 1 al 10%. (Kumari, Anita, Sharma, Pramod K., Garg, Vipin K., Garima, 2010). Además, para que el fármaco pueda penetrar el ojo se requiere mantener cierta concentración del fármaco en el sitio de aplicación lo que puede llevar a incrementar la concentración del principio activo en el preparado o administrar el medicamento de manera repetida en periodos cortos de tiempo. Esto puede aumentar el riesgo de presentar reacciones adversas al sobre pasar la dosis recomendada. Otra de las desventajas es la baja permeabilidad a través de la córnea, la cual es la primera línea de defensa ante sustancias ajenas al organismo, como la penetración de fármacos (Kumari, Anita, Sharma, Pramod K., Garg, Vipin K., Garima, 2010).

Otra desventaja inherente a los colirios es la alta frecuencia en la administración, lo que puede tener un efecto negativo en el apego al tratamiento por parte del paciente (adherencia terapéutica). De manera general, son aplicados cada 4 hasta 6 horas, sin embargo, esto varía de acuerdo a la posología definida para cada padecimiento. Por ejemplo, en una prescripción habitual de dexametasona (fosfato sódico), se aplican dos gotas de solución oftálmica al 0.1% cada cuatro horas sobre el saco conjuntival (Goodman and Gilman, 1996). De manera específica, para tratar condiciones agudas de inflamación se recomienda aplicar 1 gota cada 30 minutos; para la escleritis, de una a dos gotas cada 2 o

3 horas durante una semana (UNAM, 2018). Por otro lado, se encuentran los ungüentos, formas farmacéuticas sólidas o semi-sólidas que regularmente contienen aceite mineral y una base de hidrocarburos (petrolato) que presentan un punto de fusión cercano a la temperatura corporal (Baranowski, Bożena Karolewicz, *et al.*, 2014). Son útiles para suministrar antibióticos, entre otros fármacos (Goodman and Gilman, 1996). Una vez aplicado el ungüento, se convierten en gotas pequeñas que permanecen en contacto con el saco conjuntival, aumentando la biodisponibilidad. Debido a que pueden producir visión borrosa e irritación, se recomienda aplicarlo durante la noche. (Baranowski *et al.*, 2014).

La importancia del presente trabajo, radica en mostrar como la tecnología de las microemulsiones es útil para mejorar la solubilidad, permeabilidad, biodisponibilidad y de los ingredientes activos aplicados por vía oftálmica, con el objetivo de minimizar no sólo el impacto en la seguridad del preparado, sino también en la falta de adherencia terapéutica propiciada por la alteración en la visión y la alta frecuencia en la administración del medicamento, debido a la eliminación del mismo por los mecanismos naturales del ojo.

## 2. Objetivos

- I. Describir las estructuras y rutas del ojo asociadas a la absorción de fármacos.
- II. Detallar los componentes, métodos y herramientas experimentales para la formulación de las microemulsiones.
- III. Describir a las microemulsiones como sistemas de liberación oftálmica.
- IV. Exponer las ventajas y desventajas de las microemulsiones como sistemas de liberación oftálmica.
- V. Especificar las pruebas de calidad y caracterización de las microemulsiones oftálmicas.

### 3. Hipótesis

Si las microemulsiones poseen características fisicoquímicas que tengan efectos sobre la liberación, tiempo de permanencia, absorción y biodisponibilidad de los fármacos en el ojo, entonces ¿podrían ser utilizadas como tecnología o forma farmacéutica alternativa a las convencionales, para principios activos dirigidos a la vía oftálmica?

## 4. Antecedentes

### 4.1 Fisiología del Ojo

El ojo es un sistema óptico compuesto por superficies refractantes (Furlan, Walter; García Monreal, Javier; Muñoz Escrivá, 2003). Además, cuenta con diversos mecanismos de defensa. Dependiendo de la amenaza, es la estructura que reacciona como mecanismo protector.

En caso de que se presente algún agente mecánico, la defensa más común es el parpadeo provocado al estimular pequeñas vellosidades que se encuentran encima del párpado (pestañas). Las sustancias químicas pueden ser removidas por medio de las lágrimas; además, el ojo cuenta con una barrera protectora del epitelio corneal, que está hecha de 5 a 7 capas de células. Para actuar contra agentes biológicos, la película lagrimal contiene mucinas. Por otro lado, la microbiota impide el crecimiento de otros agentes biológicos, además, se pueden encontrar células denominadas *Asesinas Naturales* que restringen la diseminación de infecciones virales. El epitelio corneal y la capa de Bowman funcionan como barreras físicas contra la penetración de microorganismos patógenos. La membrana de Descemet resiste la proteólisis provocada por infecciones corneales. (Skalicky, 2016). Cada estructura del ojo cumple con una función importante.

La anatomía del ojo comprende tres tunicas o capas:

A) Túnica fibrosa. Es la más externa, brinda soporte y protección al ojo. Sirve de andamio para los músculos externos y también para aquellos implicados en el proceso de enfoque. La componen las estructuras córnea y esclerótica.

B) Túnica vascular o úvea. Realiza diversas funciones además de contener las rutas para los respectivos componentes de la linfa y sangre; tiene la propiedad de secretar y absorber el humor acuoso. Controla la forma del cristalino y determina la cantidad de luz que pasa a través del ojo. Está integrada por el cuerpo ciliar, iris y coroides.

C) Túnica nerviosa o interna. La estructura que la compone es la retina, la cual está conformada por una capa delgada pigmentada y otra llamada nerviosa. La región pigmentada absorbe la luz incidente. Los receptores de esta desencadenan interacciones bioquímicas que involucran a la región nerviosa para el procesamiento que integra la información obtenida del estímulo visual (Martini, 2007).

Las estructuras que conforman al ojo se pueden dividir con base en el segmento en el que se encuentran: anterior y posterior se muestran en la Figura 1. El primero comprende estructuras como el iris, la córnea, pupila, conjuntiva, cuerpo ciliar, cavidad anterior y posterior, humor acuoso y cristalino; mientras que la segunda incluye al humor vítreo, esclerótica, coroides, retina, mácula y nervios (Addo, 2016).

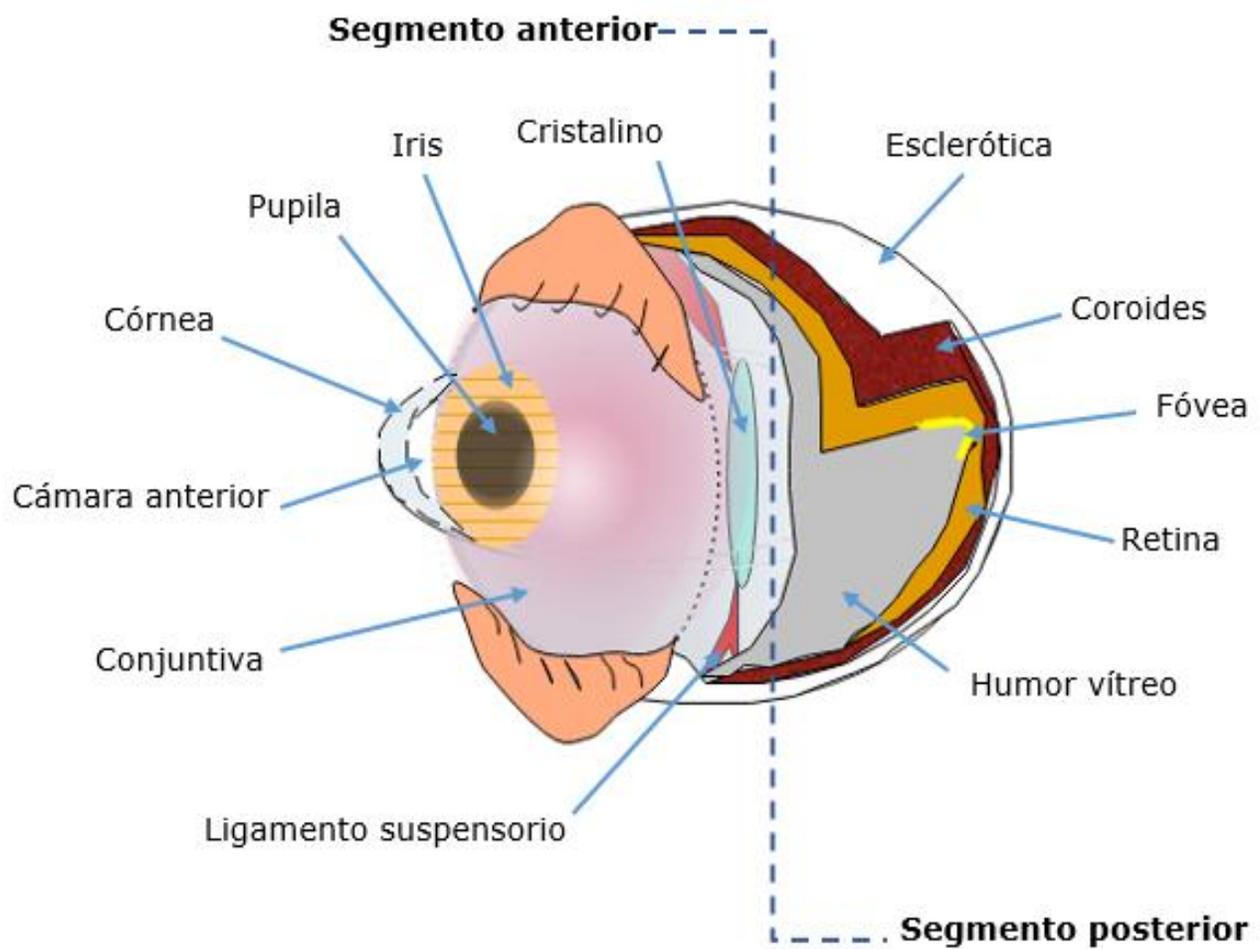


Figura 1. Anatomía del ojo

#### 4.1.1 Estructuras del Segmento Anterior

El 90% de las formulaciones oftálmicas están destinadas a la aplicación tópica, sin embargo, se presentan algunas limitaciones de absorción y biodisponibilidad del fármaco dada la anatomía y fisiología del ojo. A continuación, se describen las porciones del ojo que se ven implicadas.

Si se describe al ojo desde la porción más externa (segmento anterior) a la más interna (segmento posterior), se encuentra en primera instancia la superficie ocular. Esta se encuentra constituida por la película lagrimal, conjuntiva, córnea y la unión córneo-esclerótica. (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011)

##### Película Lagrimal

Se encuentra sobre la superficie ocular. Se describe como una capa lineal y fluida que abarca desde la capa bulbar conjuntival superior hasta la inferior, por encima de la córnea. El volumen total de esta es de 7 a 10 microlitros. (Skalicky, 2016)

Está constituida por varias capas las cuales se muestran en la Figura 2:

- A. Glucocalix. Se trata de la capa más interna, constituida por una red de glucocálix adherida a las microvellosidades de las células epiteliales de la conjuntiva y córnea. Le confiere naturaleza polar a la superficie ocular, además de hacerla hidrofílica.
- B. Moco. Está constituida por mucinas (glucoproteínas), agua y electrolitos. Las mucinas juegan papeles importantes:

- Mantienen el contenido de agua y confieren viscosidad al moco.
  - Potencian la lubricación de la conjuntiva, lo que permite el libre movimiento de una sobre otra durante el parpadeo o movimiento ocular.
  - Protege a las células epiteliales adyacentes de cuerpos extraños.
  - Funciona como reservorio para inmunoglobulinas.
  - Promueve la humectabilidad de la superficie al superar la hidrofobicidad del epitelio corneal.
- C. Capa acuosa. Casi la totalidad de esta capa es secretada por la glándula lagrimal. Tiene la capacidad de regular el pH y la osmolaridad de las lágrimas, lo cual es indispensable para la función y supervivencia de las células epiteliales. Además, cuenta con proteínas que participan en la eliminación de microorganismos patógenos: Inmunoglobulina A (se une y opsoniza antígenos), Lisozima (daña la pared celular de las bacterias), Lactoferrina (inhibe la proliferación bacteriana al unirse al hierro).
- D. Capa lipídica. Está constituida por triglicéridos, colesterol, ácidos grasos, lípidos anfipáticos (que permiten la mantener contacto con la capa acuosa), proteínas, hidrocarburos y ésteres. Cumple funciones como evitar la evaporación de la capa acuosa, así como su derramamiento sobre el párpado.

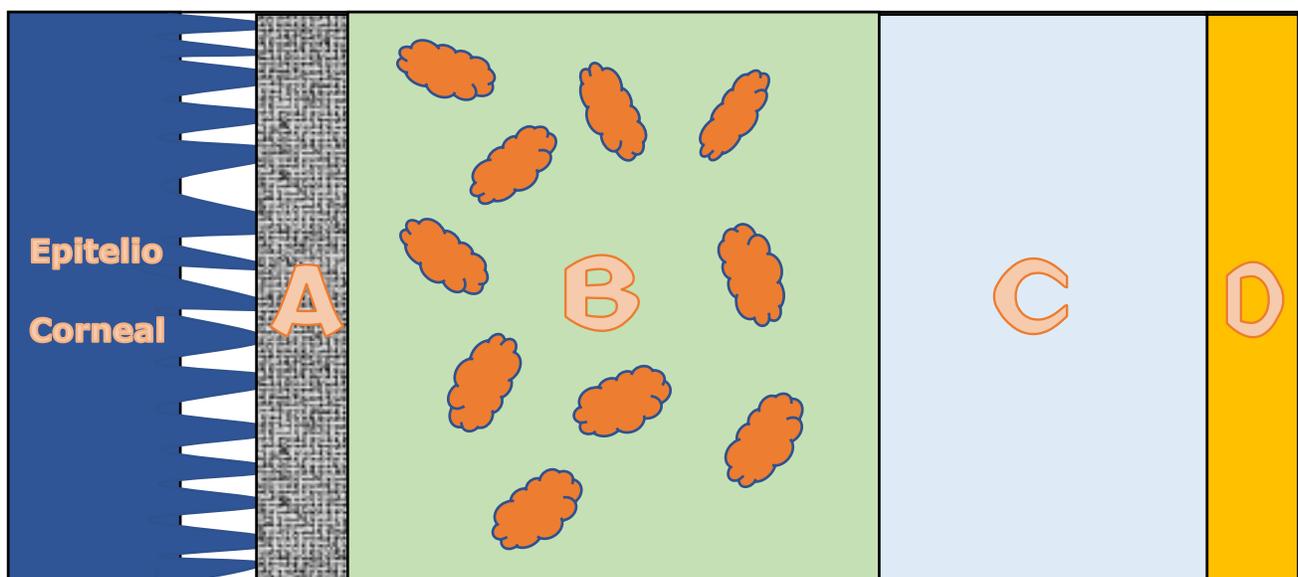


Figura 2. Capas de la película lagrimal de la interna a la externa (A)Glucocalix. (B)Capa de moco compuesta de mucinas. (C) Capa acuosa. (D) Capa lipídica.

La córnea y conjuntiva son las estructuras más comúnmente asociadas a las principales rutas de absorción de fármacos. Sin embargo, se reporta en la literatura que la esclerótica funciona como una ruta alterna. De estas tres, la ruta primaria es la transcorneal, la cual permite el paso a fármacos pequeños y lipofílicos; mientras que la ruta transconjuntival es secundaria, y permite el paso a moléculas más grandes e hidrofílicas. Ambas conducen el fármaco al segmento anterior. Por otro lado, aquellos fármacos dirigidos al segmento posterior, son conducidos a su sitio de acción a través de la ruta transesclerótica (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011).

### Córnea

Se trata de un tejido transparente y avascular, que cubre un sexto de la superficie total del ojo, mientras que la esclerótica ocupa el resto. Esta, además de proteger las estructuras que se encuentran en el interior del ojo, provee de integridad al globo. Posee propiedades ópticas de refracción y transmitancia de la luz (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011).

La córnea está compuesta de cinco capas. A continuación, se representan en la Figura 3 y se describen en orden de la más superficial a la más interna: epitelio, capa de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio. (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011).

A. Epitelio. Está conformado por células escamosas, células aladas, desmosomas y células epiteliales basales. Es de los tejidos más inervados del cuerpo con 16,000 terminales nerviosas por milímetro cuadrado; lo que representa alrededor de 2.2 millones de terminaciones nerviosas. La capacidad sensitiva de la córnea se puede ver disminuida por enfermedades, procedimientos quirúrgicos, después del uso lentes de contacto o tras la aplicación de medicamentos tópicos tales como anestésicos y analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AAINES).

En la literatura se describe al epitelio como una barrera hidrofóbica (Chen *et al.*, 2018) de baja permeabilidad dado que las células escamosas se encuentran rodeadas por bandas de uniones oclusivas, también llamadas en latín *Zonula occludens* y en inglés *tight junctions*; lo que implica que en la región intercelular se evita el paso a la región del estroma, de iones, agua y aquellos fluidos provenientes de las lágrimas. Además, protege a la córnea de microorganismos patógenos. Estas uniones están conformadas por proteínas transmembranales denominadas ZO-1, JAM-A, ocludina, ocludina-1 entre otras (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011). Respecto a los fármacos, las uniones oclusivas retardan su permeación paracelular, lo que limita la permeabilidad corneal a moléculas ionizadas e hidrofílicas (Achouri, Alhanout, Piccerelle, Andrieu, *et al.*, 2013).

B. Capa de Bowman. Se encuentra por debajo del epitelio y por encima del estroma. Está compuesta de fibras de colágeno tipo I. Sirve de barrera protectora contra el trauma e invasión microbiana (Pavelka, Margit; Roth, 2015).

C. Estroma. Es la capa más gruesa de la córnea, representando un 90% de la misma. Se encuentra constituida principalmente por arreglos laminares de fibrillas de colágeno por lo que es transparente; además, le confieren resistencia contra la tensión que pudiera

presentarse en el tejido corneal (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011). Presenta un alto contenido de agua, lo que hace que sea una capa impermeable a moléculas hidrófobas o lipofílicas. Referente al tamaño de las moléculas, sólo aquellas menores a 50,000 Da podrán ser difundidas a través del estroma (Achouri, Alhanout, Piccerelle & Andrieu, 2013).

Esta capa también contiene proteoglicanos, que proveen de volumen al tejido y mantienen el orden en ensamblaje de las fibras de colágeno; glicoproteínas, sales y sustancias provenientes de queratocitos que, junto con el colágeno, mantienen la transparencia del tejido.

D. Membrana de Descemet. Se encuentra entre el endotelio y el estroma. Es una membrana acelular conformada por colágeno y glucoproteínas. Cuando la córnea sufre lesiones, la membrana de Descemet se mantiene intacta. Se considera altamente resistente a proteínas proteolíticas (Saona Santos, 2006).

E. Endotelio. Es una barrera de alta permeabilidad. Esta capa se encuentra conformada por células hexagonales de tamaño uniforme. Gracias a su forma geométrica, el endotelio está dispuesto de tal manera que sólo existe un espacio de 20 nm de ancho entre célula y célula. Estos espacios cuentan con uniones estrechas denominadas en la literatura internacional como *apical macula occludens tight junctions*, las cuales le confieren cierta permeabilidad. La capa previene que el fluido proveniente del humor acuoso migre al estroma, sin embargo, presenta filtraciones que permiten el paso de nutrientes provenientes del mismo (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011).

La función principal del endotelio es mantener la transparencia regulando la hidratación de la córnea. En la membrana de las células que lo conforman, se encuentran varias

unidades de ATPasas (bomba de sodio – potasio) que transportan iones sodio y bicarbonato fuera del estroma, región que corresponde al humor acuoso. La diferencia de partículas (solutos) en un compartimento y otro, provoca un gradiente osmótico que permite el transporte de agua desde la córnea al humor (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011).

Los fármacos que atraviesan la córnea lo hacen por medio de la difusión (mecanismo de transporte pasivo). Como se describió, cada porción de la córnea tiene sus propias características, lo cual representa una barrera que limita el paso de los principios activos. En primer lugar, se encuentra el epitelio, que al igual que el endotelio, presenta un alto contenido de fosfolípidos, siendo apto para el transporte de moléculas hidrofóbicas o liposolubles. La siguiente es la capa de Bowman que se sabe es impermeable a electrolitos y permeable a sustancias solubles en grasas. Le sigue el estroma, que por su composición a base de agua y glucosaminoglucanos permite el paso de moléculas hidrofílicas. Finalmente, tras pasar la membrana de Descemet el endotelio hace posible la difusión de fármacos hidrofóbicos o liposolubles (Bye, Louise A.; Modi, Neil, C.; Stanford, 2013).

Dada la naturaleza anfifílica de la córnea, es recomendable que los ingredientes activos estén tanto en su forma ionizada como no ionizada. La segunda podrá ser transportada por el epitelio, mientras que, la primera pasará a través del estroma capa de Bowman y endotelio. Es aquí donde el pH juega un papel importante. Si bien los preparados oftálmicos contienen soluciones amortiguadoras, ya sea para mantener la estabilidad del fármaco o para causar la menor irritación posible; el pH lagrimal (entre 6.5 y 7.6) por sí mismo provee de un ambiente ácido-base capaz de generar ambas formas del principio

activo (ionizada y no ionizada) mejorando su permeabilidad a través de las cinco capas de la córnea (Bye, Louise A.; Modi, Neil, C.; Stanford, 2013).

### Capas de la córnea

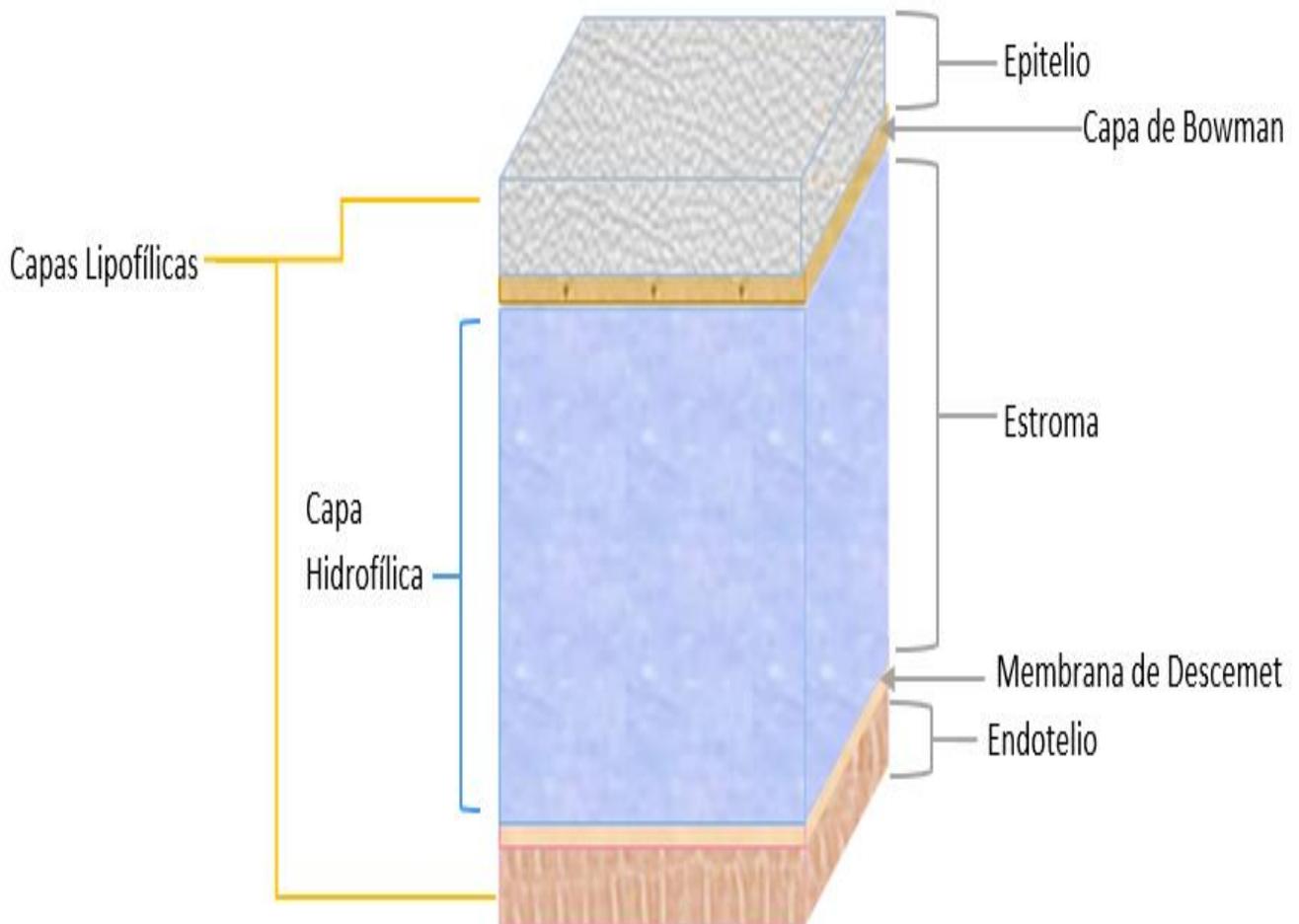


Figura 3. Capas de la córnea

## Conjuntiva

Se trata de una superficie mucosa que se extiende desde la unión de la esclera con la córnea hasta los límites del párpado y carúncula. Su estructura comprende la fórnix, región bulbar y palpebral (Holland, Edward J; Mannis, Mark J; Lee, 2013).

La conjuntiva bulbar consta de una capa de epitelio secretor no queratinizado que cubre el globo ocular. Contiene células que le confieren permeabilidad selectiva, así como células epiteliales que forman complejos con glucocálix que forma parte de la película lagrimal. Por otro lado, el fórnix, se encuentra entre el segmento bulbar y palpebral. En ella se encuentran las células caliciformes que se encargan de sintetizar mucinas que permiten la eliminación de alérgenos y poseen actividad antimicrobiana. Asimismo, son capaces de secretar electrolitos y agua a través de la síntesis de proteínas que participan en el transporte de estas (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011). También presenta glándulas de Krause que proveen los componentes que forman a la capa acuosa de la película lagrimal. Por último, la sección palpebral recubre la superficie interna de los párpados. Se subdivide en marginal, tarsal y orbital.

Estas estructuras en conjunto son de importancia, dado que protegen a los tejidos blandos del globo ocular y de los párpados; y proveen de componentes que mantienen la capa acuosa y mucosa de la película lagrimal (Holland, Edward J; Mannis, Mark J; Lee, 2013).

Como se mencionaba, la ruta transconjuntival permite la difusión pasiva de moléculas hidrofílicas y de mayores dimensiones, en comparación con la ruta transcorneal. Esto se debe a que el espacio que existe entre las células (uniones oclusivas) es menos estrecho que en el tejido corneal (Skalicky, 2016). Los inconvenientes de emplear medicamentos tópicos para su aplicación en la conjuntiva consisten en el poco tiempo de contacto con la superficie de la misma, debido a mecanismos como parpadeo y producción de lágrimas; y el riesgo de que el fármaco penetre a circulación sistémica por medio del plexo venoso ubicado en el estroma conjuntival o por medio del ducto nasolagrimal (Bye, Louise A.; Modi, Neil, C.; Stanford, 2013).

#### Unión córnea-esclerótica

*Limbus*, en inglés, es una región que se encuentra entre la esclera y la córnea. En un extremo colinda con las fibras de colágeno de la esclerótica; y en el otro con la membrana de Descemet y la capa de Bowman (córnea). Funciona como una barrera que previene el crecimiento de la conjuntiva encima de la córnea (Holland, Edward J; Mannis, Mark J; Lee, 2013).

#### Cristalino

Es un tejido transparente y biconvexo que se encuentra detrás del iris. Está unido a ligamentos suspensorios que lo mantienen en su sitio (Chen *et al.*, 2018). Carece de vascularización, por lo que adquiere nutrientes del humor vítreo y acuoso.

Tiene la capacidad de absorber luz ultravioleta, lo que protege a la retina. Asimismo, por su alto contenido proteico mantiene su índice de refracción, lo que permite que contribuya a la refracción de la luz que se dirige hacia la retina (García-Feijoó, Julián; Pablo-Júlvez, 2012).

## Iris

Es una estructura pigmentada que posee una región anterior, conformada por la capa del estroma; y la posterior compuesta por dos capas de epitelio. Cabe mencionar que, la superficie anterior no representa una barrera para solutos o fluidos.

El estroma está compuesto de fibroblastos, melanocitos, capilares sanguíneos, y presenta colágeno en abundancia. Las capas de epitelio, a diferencia de la porción anterior, no presentan pigmentación. Por otro lado, se encuentran el músculo constrictor (esfínter) y el músculo dilatador que actúan en conjunto para modificar la apertura de la pupila (región central del iris) regulando así la cantidad de luz incidente (Skalicky, 2016).

## Pupila

Es una abertura de diámetro variable que restringe el paso de la luz hacia estructuras más internas (Skalicky, 2016). La pupila tiene diferentes funciones en la fisiología del ojo:

- Regula la intensidad de la luz incidente, permitiendo maximizar la percepción visual por optimización de la iluminación en la retina. En presencia de luz tenue, el músculo dilatador del iris (el cual está inervado con terminaciones simpáticas) se contrae involuntariamente, dilatando la pupila (Rogers, 2010); por otro lado en presencia de luz brillante la pupila se contrae (miosis) por acción del músculo esfínter, porción inervada por terminaciones parasimpáticas (Rogers, 2010). Esta presenta un tamaño

estándar alrededor de 4 mm de diámetro (Furlan, Walter; García Monreal, Javier; Muñoz Escrivá, 2003), sin embargo, si en estado basal este fuera menor, se podría tener una mejora en la calidad de la imagen. Esta cualidad disminuye las aberraciones cromáticas y esféricas (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011).

- Si la pupila presenta una menor apertura, se limita la entrada del rayo luminoso al centro de la córnea y cristalino; las regiones periféricas de estas estructuras producen mayores aberraciones cuando las atraviesa la luz incidente (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011).
- La profundidad de enfoque es producida por el pequeño diámetro de la pupila, el cual reduce el error de refracción, obteniendo un mejor enfoque al observar objetos cercanos (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011).

## Cuerpo Ciliar

El cuerpo ciliar es una estructura que tiene una forma similar a la de un toro. Es continua con el iris y la coroides, que en conjunto conforman una de las tres túnicas del ojo, la úvea (Skalicky, 2016). Como se muestra en la Figura 4, el cuerpo ciliar se encuentra sub-dividido en tres regiones: estroma, músculo y epitelio. También se divide en dos áreas, *pars plana* (región posterior) y *pars plicata* (región anterior). La segunda se encuentra altamente vascularizada, mientras que la primera es completamente avascular y pigmentada (Bye, Louise A.; Modi, Neil, C.; Stanford, 2013).

La llamada *pars plicata* presenta un centro fibroso y vascularizado, rodeado de epitelio ciliar doble; cada epitelio presenta distintas características, el no pigmentado se encuentra en contacto con el humor acuoso y se encarga de producirlo. La textura corrugada del tejido incrementa el área superficial de secreción del humor. Por el contrario, la otra parte del

epitelio se encuentra pigmentada y es contigua al estroma (Bye, Louise A.; Modi, Neil, C.; Stanford, 2013). Por otro lado, la parte muscular del cuerpo ciliar está conformado por tres tipos de fibras: las radiales, circulares y longitudinales (Skalicky, 2016); se encuentra unido al ligamento suspensorio del cristalino, también llamado *zónula de Zinn*. Cuando se contrae el músculo, la zónula libera tensión, lo que permite al cristalino incrementar su curvatura para refractar la luz hacia la retina. A este cambio o acomodo de forma se le conoce como "enfoque" o *accommodation* en inglés (Lens, Al; Nemeth, Sheila Coyne; Ledford, 2008). Por último, el estroma es tejido conectivo relajado y altamente vascularizado. En este se concentra el fluido remanente de donde se secretó el humor acuoso (Skalicky, 2016).

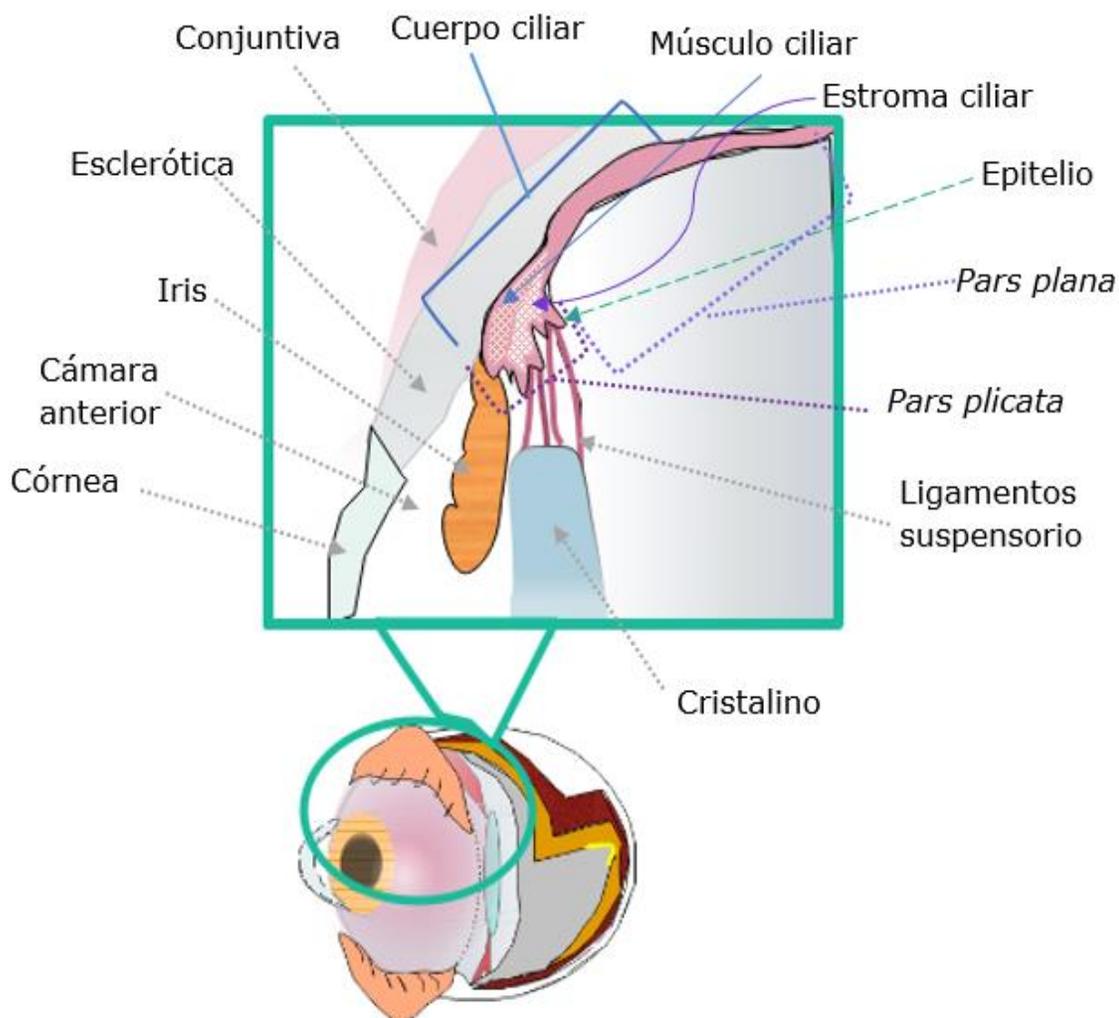


Figura 4. Cuerpo Ciliar

## Humor acuoso

Se le denomina humor acuoso al líquido que ocupa los espacios de la cavidad posterior y anterior del ojo (Goel *et al.*, 2010). La circulación de este genera presión en el interior del ojo (presión intraocular; valor de referencia de 15 mmHg), la cual permite que el globo mantenga su forma. Adicionalmente, nutre estructuras aledañas como la córnea, esclerótica y red trabecular. En su contenido se encuentra una baja concentración de proteínas (valor de referencia de 20 mg/100 mL) y alta de ascorbato. Un aumento en la concentración de las proteínas puede ser indicio de daño en la barrera hematoacuosa, lo que permite su filtración al humor acuoso, específicamente de aquellas provenientes del plasma. Si se hace incidir un rayo luminoso en la cavidad anterior, es posible observar turbidez o presencia de partículas. Este fenómeno se conoce como efecto Tyndall; consiste en que las partículas (proteínas) que, por su tamaño no es posible verlas a simple vista y se encuentran dispersas en un medio (humor acuoso) reflejan la luz, lo que permite que sean detectadas por el ojo humano. Por otro lado, la literatura indica que el ascorbato se encuentra 20 veces más concentrado en el humor acuoso que en el plasma (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011). En una persona sana, el ascorbato se encuentra una concentración de alrededor de 40 a 80 mM (Witmer *et al.*, 2016). Si se realiza el cálculo para conocer la

cantidad aproximada de este en el humor acuoso con base en la aseveración antes mencionada, se obtiene un valor de 0.8 M a 1.6 M. El ascorbato tiene un papel importante en la composición de este fluido puesto que funciona como antioxidante, absorbe la luz ultravioleta y mantiene el equilibrio del estado sol – gel de los mucopolisacáridos presentes en la red trabecular. El humor acuoso también contiene iones como el cloro; aminoácidos, glucosa, urea, nitrógeno y oxígeno (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011).

Este fluido se forma por medio de los mecanismos de difusión, ultrafiltración y secreción activa. El primero consiste en el transporte de solutos, principalmente liposolubles, a través de las membranas de los tejidos de la cavidad posterior. En el segundo, se transportan principalmente agua y moléculas solubles en agua desde el endotelio del cuerpo ciliar hasta el estroma del mismo debido al aumento de la presión hidrostática y al gradiente osmótico (Goel *et al.*, 2010). El último mecanismo, secreción activa, es responsable de la formación del 80 al 90% del total de humor acuoso (Pietrowska *et al.*, 2018). Consiste en generar un gradiente de solutos en la porción posterior de la cavidad ocular de tal manera que se lleve a cabo un equilibrio osmótico por el transporte de agua. Para lograrlo, las células epiteliales no pigmentadas del cuerpo ciliar transportan, a través de ATPasas, iones sodio e introducen iones potasio. Posteriormente las mismas células liberan de manera pasiva bicarbonato y cloruro. Finalmente, por la presión osmótica generada por los iones mencionados, el agua migra desde el estroma vascularizado del cuerpo ciliar hasta la cavidad posterior. No sólo se transporta agua, también ácido ascórbico, glucosa y aminoácidos (Fautsch, Michael P.; Johnson, 2006).

El humor acuoso fluye por dos vías:

1. A través de la red trabecular y el canal de Schlemms (ruta convencional) para circular fuera de la cavidad anterior.

La red trabecular se describe como una estructura porosa con forma triangular compuesta por la red uveal, corneoescleral y juxtacanalicular (Abu-Hassan, Diala W; Acott, Ted S; Kelley, 2014). Las capas más externas poseen características fagocíticas, lo que permite remover restos celulares dispersos en el humor acuoso. El canal de Schelemms posee un endotelio con uniones ocluyentes que funcionan como una barrera para el paso de fluidos. Las células que forman las uniones forman enormes vacuolas de drenaje donde migra el humor acuoso.

2. Y por medio del músculo ciliar y otros tejidos (no convencional). El humor acuoso se forma desde la cavidad posterior del globo ocular una vez que se haya llenado, este fluido pasa a través del cristalino y pupila, y rodea al iris hasta ocupar la cavidad anterior. Tan sólo el 10% del humor acuoso sale por esta vía. Cabe resaltar que el transporte del humor acuoso a través y alrededor de otras estructuras del ojo permiten nutrir la córnea y cristalino, además de remover residuos metabólicos (Pietrowska *et al.*, 2018).

Estos mecanismos de circulación del humor acuoso son de importancia, dado que permiten regular la presión intraocular. Los pacientes que presentan hipertensión ocular no han mostrado alteraciones en la cantidad de humor acuoso producido, sin embargo, aquel que circula para desocupar la cavidad anterior se ve reducido en una tercera parte (Civan, 2008); es decir, el aumento en la presión intraocular está mayormente influida por una disminución en el volumen de humor acuoso liberado de la cavidad anterior para desembocar en el sistema sanguíneo (Pietrowska *et al.*, 2018), que el que se produce en la cavidad posterior.

Algunos parámetros farmacocinéticos medidos en fármacos de uso oftálmico son la concentración máxima, porcentaje de absorción, distribución, aclaramiento y vida media; en los cuales se usa de matriz biológica el humor acuoso. Disponer de esta información puede ser de utilidad en el proceso del diseño de la formulación del medicamento a desarrollar (Pietrowska *et al.*, 2018).

#### 4.1.2 Estructuras del Segmento Posterior

##### Esclerótica

Consiste en una capa blanca, opaca, esférica y vascularizada (en la epiesclera), que cubre la región posterior del globo ocular. La opacidad se le atribuye a la capacidad que posee de dispersar la luz en todas las longitudes de onda posibles. Está compuesta en su mayoría por fibras de colágeno, y en menor proporción de elastina. Se divide en tres secciones: anterior, ecuatorial y posterior. La primera se encuentra en contacto con estructuras como la conjuntiva y córnea (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011).

Como se mencionaba anteriormente, la esclerótica es una de las rutas para la absorción de fármacos. Gracias a que esta puede arribar a tejidos como la retina y el humor vítreo. Para conseguirlo se requiere el uso de métodos invasivos (inyecciones intraoculares), lo cual es poco tolerado por los pacientes.

Esta estructura se encarga de proteger otros tejidos que pudieran ser más susceptibles al daño. Además, mantiene la forma del globo ocular gracias a su rigidez. Esto es importante ya que, de sufrir algún trauma, la retina podría resultar dañada, afectando la visión.

Funciona también como andamio para los músculos extraoculares como se muestra en la Figura 5 (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011).

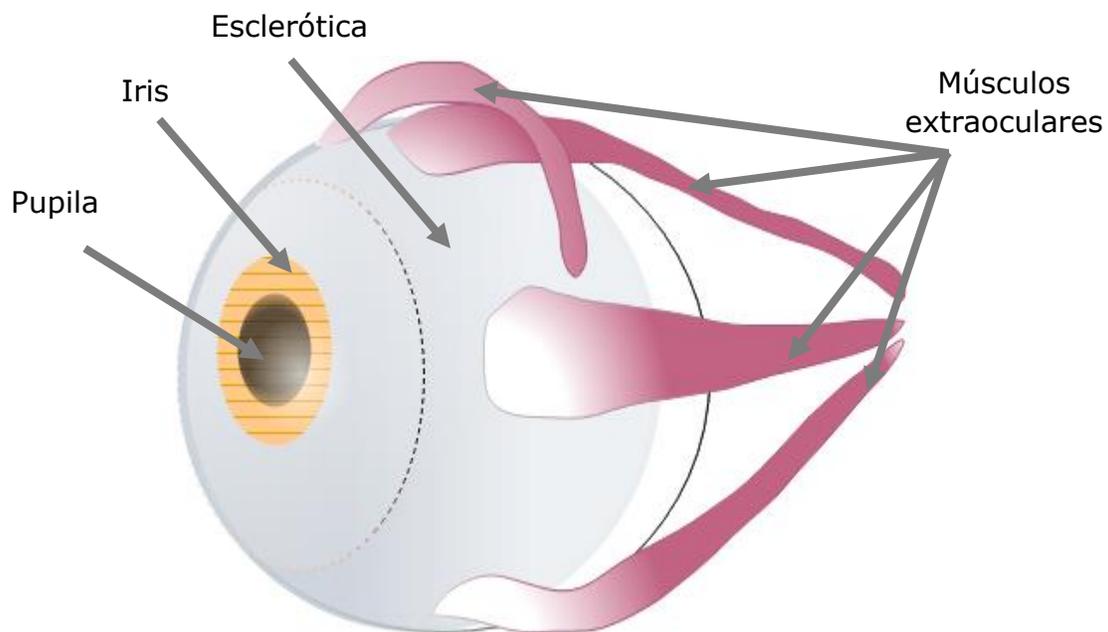


Figura 5. Esclerótica y músculos extraoculares.

### Coroides

Una de las tunicas que conforman al globo ocular es la Úvea (Rogers, 2010). En la región posterior de esta se encuentra la coroides, una estructura situada entre la retina y la esclerótica. Cuenta con una sección llamada *Membrana de Bruch*, la cual presenta una parte interna situada junto al epitelio pigmentado de la retina, seguida de fibras elásticas y la

región más externa está próxima a los capilares. También contiene otra denominada *capa vascular*, que como su nombre lo indica, se encuentra altamente vascularizada. A su vez, comprende tres regiones: la capa capilar o coriocapilar, la capa de vasos medianos y la capa de vasos de mayor tamaño. Por encima de la coroides y por debajo de la esclerótica, se encuentra el espacio supracoroidal, el cual provee a la primera estructura de terminaciones nerviosas y volumen sanguíneo. Las arterias que desembocan en el espacio supracoroidal son las arterias ciliares posteriores larga y corta; y las arterias ciliares anteriores. La circulación sanguínea posteriormente desemboca en la capa coriocapilar (Bye, Louise A.; Modi, Neil, C.; Stanford, 2013).

La alta vascularización de esta estructura cumple un papel importante pues nutre la parte posterior de la retina y provee de sangre al globo desde la parte interna hasta la externa o anterior.

Otra de las funciones de la coroides es actuar como disipador de calor y una "trampa" de luz, ya que absorbe la energía luminosa excesiva que incide en la retina (Skalicky, 2016).

### Humor vítreo

El humor vítreo consiste en un gel transparente conformado en un 80% por agua (Skalicky, 2016). En menor proporción contiene sustancias como colágeno y ácido hialurónico; la producción del último, está relacionada las células especializadas llamadas *hialocitos de Balazs* (Rogers, 2010). El humor vítreo comprende subestructuras como la base vítrea, la corteza, el espacio de Bergers y el canal de Cloquet. Lleva a cabo funciones importantes como dar soporte a la retina, mantener la claridad de la imagen pues contiene fibras de colágeno dentro de una matriz de ácido hialurónico, lo cual disminuye la dispersión de la

luz; además de ser una barrera para la difusión de solutos desde la región anterior del ojo hasta la posterior, evitando que se concentren en la retina; por otro lado, es reservorio de glucosa para el metabolismo del cuerpo ciliar y retina, así como de ascorbato (Skalicky, 2016).

## Retina

Se encuentra localizada entre el humor vítreo y la coroides. Comprende 10 capas, el orden de la más interna a la más externa, es el siguiente: I) la membrana interna limítrofe, II) la capa de fibras nerviosas, III) Capa de células ganglionares, IV) Capa plexiforme interna, V) Capa nuclear interna, VI) Capa plexiforme externa, VII) Capa nuclear externa, VIII) Membrana externa limítrofe, IX) Capa fotorreceptora y X) Capa de epitelio retinal pigmentado (Bye, Louise A.; Modi, Neil, C.; Stanford, 2013). A continuación, se describen algunas de ellas.

- I) Membrana interna limítrofe. Se encuentra conformada por las protuberancias internas de células gliales llamadas células de Müller (Bye, Louise A.; Modi, Neil, C.; Stanford, 2013). Dentro de sus funciones está amortiguar el pH extracelular, ser una barrera ante el transporte de sustancias provenientes de la barrera sanguíneo-retinal; provee de lactato a las neuronas de la retina mediante glucólisis anaerobia. Además, participa en la respuesta al daño de la retina liberando antioxidantes y factor neurotrópico (Skalicky, 2016).

- III) Capa de células ganglionares. En esta capa se encuentran los cuerpos de las células ganglionares que integran la información recibida para que posteriormente se dirija a la capa de fibras nerviosas.
- IV) Capa plexiforme interna. Tanto la capa plexiforme interna como externa carecen de cuerpos celulares, únicamente se encuentran en ellas los axones o las protuberancias de las células nerviosas. En el caso de la parte interna comprende células como las ganglionares, células amacrinas y bipolares.
- VI) Capa nuclear interna. Comprende los cuerpos celulares de las células de Müller, bipolares, amacrinas y horizontales. Estas se encuentran conectadas entre sí en diferentes configuraciones. Las células bipolares en forma de barra conectan con otras del mismo tipo, así como a cuatro células ganglionares; en el caso de aquellas que son planas (también llamadas células bipolares difusas) conectan a conos con varias células ganglionares. Las bipolares enanas conectan a un cono con una célula ganglionar enana. En el caso de las amacrinas, que modulan las señales de los fotorreceptores a través de neurotransmisores, se enlazan a otras del mismo tipo, así como a las ganglionares. Aquellas células localizadas cerca de las terminales de los bastones y conos son multipolares que contienen pequeñas protuberancias e integran la información de las células bipolares y los fotorreceptores, estas se denominan *horizontales*. Una vez que reciben el estímulo de los fotorreceptores, liberan ácido gamma-aminobutírico (GABA), lo cual inhibe la actividad de las células bipolares. Por otro lado, las células de Müller pertenecientes a las membranas interna y externas limítrofes, hacen contacto con los vasos sanguíneos de la retina, como se mencionaba antes, forman parte de barrera sanguíneo ocular-retinal (Bye, Louise A.; Modi, Neil, C.; Stanford, 2013).

VII) Capa nuclear externa. En ella están concentrados los núcleos de los fotorreceptores, los cuerpos de éstos se encuentran en la membrana limítrofe externa.

El papel de la retina en la función ocular ocupa un lugar importante pues contribuye a la formación de imágenes regulando los estímulos que traducen en señales cerebrales, por ejemplo, el cambio en la intensidad de la luz.

Dentro de la estructura de la retina la capa fotorreceptora cuenta con células llamadas conos y bastones, las cuales captan los estímulos de la luz y los conducen a células intermediarias (bipolares, horizontales y amacrina); para finalmente emitir una señal en las células ganglionares que forman parte de la capa del nervio óptico. Se sabe que los bastones cuentan con una sustancia llamada rodopsina la cual absorbe la luz incidente. Esta se encuentra conformada por la proteína opsina y el cromóforo 11 cis-retinal, derivado de la vitamina A. En animales se ha visto que se forma durante la adaptación a la oscuridad o ausencia de luz. Una vez que se encuentran en ambientes iluminados, la rodopsina se transforma en Metaropsina II con lo que se inicia la cascada de señalización para la adaptación del ojo a la presencia de luz (Skalicky, 2016).

Por otro lado, los conos son los responsables de distinguir entre las diferentes longitudes de onda de la luz, lo que permite al ojo humano distinguir colores. Existen tres tipos de conos, uno contiene pigmentos que absorben la luz roja, otro la luz azul-violeta y el tercero la luz verde. Al visualizar colores, se estimulan en mayor o menor medida cada tipo de conos lo que determina el cómo se percibe el color (Rogers, 2010).

Otro de los factores que regula la retina en la formación de imágenes, es el nivel de detalle con el que se generan. Para ello, se requiere que el ojo sea capaz de distinguir entre dos o más estímulos en un mismo espacio, lo cual está relacionado a la agudeza visual. Una

unidad de agudeza visual es el poder de resolución de detalle en un minuto de arco (medida angular) (Rogers, 2010). Para entender este concepto, se puede imaginar un círculo dividido en 360 partes, una de esas (un grado) se divide en otras 60 partes. La capacidad del ojo de captar el detalle en ese 1/60 (un minuto arco) está dado por la agudeza visual.

## Fóvea

La fóvea es una depresión que se encuentra en la mácula lútea, que a su vez está localizada en la región central de la retina; está formada por el desplazamiento de neuronas retinales (Remington & Goodwin, 2011), por lo que se concentra una mayor cantidad de fotorreceptores, específicamente conos, que permiten la percepción del color y el detalle. Los conos de esta región son más elongados que los que se encuentran distribuidos en la retina, esta forma les confiere un aspecto similar a los bastones.

Por otro lado, la fóvea carece de las células fotorreceptoras responsables de la percepción de las formas y tamaño en ambientes con poca luz, bastones; que a diferencia de los conos, no se asocian a la percepción del color ni detalle (Skalicky, 2016).

La región central de la fóvea (de 0.4 a 05 mm) (Remington & Goodwin, 2011), es avascular, lo cual minimiza la dispersión de la luz y permite que esta sea captada por los fotorreceptores (Skalicky, 2016).

La mácula lútea es un área de color amarillo que no sólo comprende a la fóvea, en la región más interna se encuentra la foveola, que es la curvatura central de la depresión del tejido. Al exterior de la fóvea, se encuentra el área parafoveal y adyacente a esta el área perifoveal;

en la primera se concentran principalmente las células bipolares y ganglionares que permiten la transducción de señales hacia el nervio óptico (Skalicky, 2016).

#### 4.2 Barreras y rutas de absorción en la fisiología del ojo.

El ojo, como se describe en puntos anteriores, comprende varias estructuras que contribuyen en las funciones y protección de este. A continuación, se mencionan aquellas que pueden considerarse barreras que comprometen el paso de sustancias y/o las rutas que podrían tomar los fármacos cuando migran a las diferentes porciones del ojo.

La primera línea de defensa con la cual entra en contacto una forma farmacéutica oftálmica tópica es la película lagrimal. Esta superficie que se encuentra cubriendo a la córnea y conjuntiva contiene múltiples componentes (como las inmunoglobulinas, lisozimas, mucinas) que protegen a las estructuras aledañas de agentes externos y patógenos, así como cambios osmóticos o de pH (Barar *et al.*, 2008). Esta barrera se restaura de 2 a 3 minutos. Los colirios en forma de soluciones se remueven en los primeros 15 o 30 segundos después de su aplicación (Bye, Louise A.; Modi, Neil, C.; Stanford, 2013).

Posteriormente, se encuentra la córnea y en las periferias, la conjuntiva. Estas dos estructuras se describen en la literatura como las rutas principales para la absorción de fármacos; sin embargo, también existe la ruta transesclerótica que conduce a las sustancias a la parte posterior del ojo (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011). La ruta primaria es la transcorneal, la cual está representada en la Figura 6.

Como se mencionaba anteriormente, la córnea está conformada por un epitelio cuya naturaleza permite el paso de moléculas liposolubles dado que está integrado por células (desmosomas) con espacios intercelulares, confiriéndole cierta permeabilidad (Addo, 2016); después se encuentra el estroma que, por estar constituido por un gran contenido

de agua, colágeno hidratado y proteoglicanos, permite el paso de moléculas hidrosolubles. Adyacente a esta se encuentra el endotelio que por la disposición de las células que lo integran, cuenta con espacios intercelulares que contienen uniones estrechas que únicamente permiten la difusión de moléculas pequeñas, sobre todo si su naturaleza les permite disolverse principalmente en lípidos (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011). La disposición de las capas de la córnea asemeja a un sándwich con un interior que permite el transporte de moléculas hidrofílicas y un exterior apto para las lipofílicas; por ello, es importante que la forma farmacéutica que se utilice para administrar el fármaco permita que este pueda disolverse en las regiones lipofílicas e hidrofílicas de la córnea. Una estrategia que ofrece la literatura, es conservar la forma ionizada y no ionizada del ingrediente activo (Bye, Louise A.; Modi, Neil, C.; Stanford, 2013).

La solubilidad o disolución del fármaco en lípidos o agua no es la única limitante para atravesar la córnea, el peso molecular y grado de ionización de la molécula también son importantes. Las moléculas menores a 5 KDa (en sus formas no ionizadas) pueden ser capaces de pasar a través de las uniones oclusivas del epitelio y endotelio de manera paracelular (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011). Por otro lado, el epitelio de la córnea está cargado negativamente por la presencia del grupo carboxilo de las proteínas que conforman las uniones oclusivas (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011). Las moléculas cargadas negativamente serían repelidas al presentar cargas iguales, mientras que las positivas podrían formar enlaces iónicos, lo que podría comprometer la permeabilidad del fármaco (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011).

En general, la córnea tiene una estructura tal que funciona como una barrera para toda aquella sustancia que entre en contacto con esta. Como se muestra en la Figura 6 (Hornof, Toropainen & Urtti, 2005), en los casos en el que el fármaco logre librar su estructura, este podría llegar al humor acuoso y úvea (cuerpo ciliar e iris) (Barar et al., 2008).

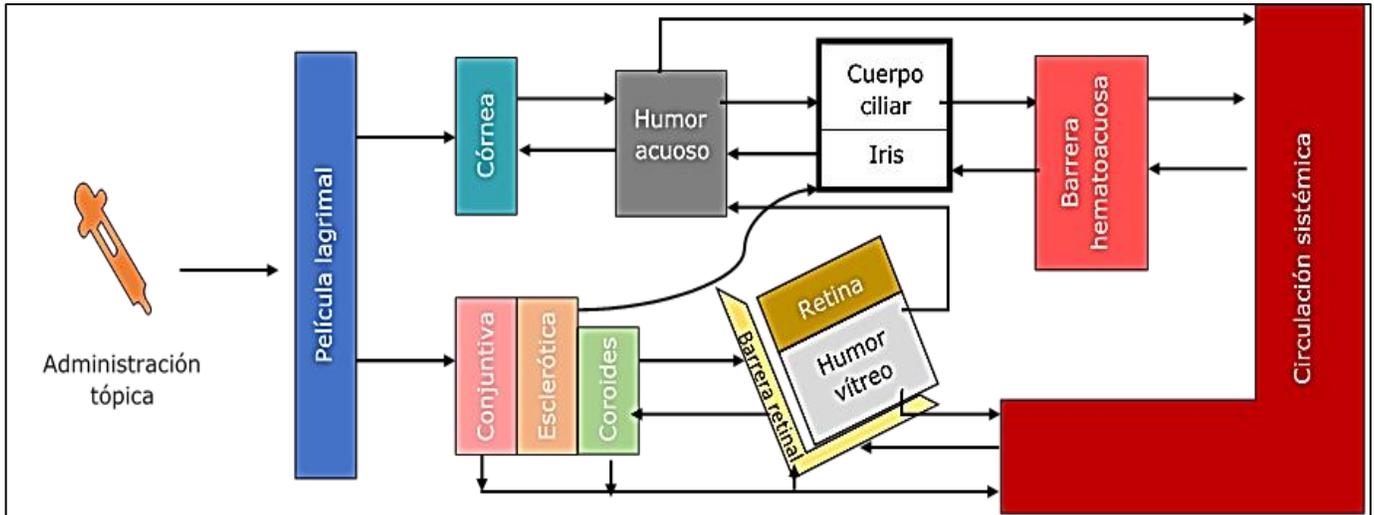


Figura 6. Diagrama del curso y dirección del fármaco a través del ojo. Modificado de Hornof et.al (Hornof, Torapainen & Urtti, 2005).

En la región de la úvea se encuentra la barrera hematoacuosa (Blood-aqueous barrier, en inglés), la cual corresponde a la porción anterior del ojo. Está integrada por el epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar y el endotelio de los vasos sanguíneos del iris. Las células de estos tejidos cuentan con uniones estrechas oclusivas que evitan el movimiento de solutos al interior de la porción anterior, manteniendo el equilibrio químico (Addo, 2016). Es importante mencionar que, el mantenimiento del balance de sustancias en la región anterior es esencial para conservar la transparencia del ojo (Addo, 2016).

Esta barrera, además, regula el paso de sustancias entre la sangre y el humor acuoso como es el caso de las proteínas; las cuales se encuentran en menor cantidad en el segundo. Por otro lado, este presenta ascorbato en una mayor concentración en comparación con la

sangre. Otra de las sustancias a las que limita el acceso desde la sangre al humor, son los fármacos hidrofílicos (Urtti, 2006).

Por otra parte, se encuentran las rutas no corneales. En el segmento anterior corresponde a la ruta transconjuntival, que se considera secundaria a la transcorneal. Después de la película lagrimal se encuentra la conjuntiva bulbar, es decir, aquella que se encuentra en las periferias de la córnea (Andrés-Guerrero & Herrero-Vanrell, 2008) Esta vía tiene la particularidad de permitir la difusión pasiva de moléculas hidrofílicas de tamaños desde 20 hasta 40 KDa; los beta bloqueadores y los inhibidores de la anhidrasa carbónica son algunos ejemplos. Las uniones oclusivas presentes en la conjuntiva son mucho más holgadas en comparación con los de la córnea (aproximadamente 18 veces más) (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011).

Si bien las rutas de fármacos para el segmento anterior son la corneal y la conjuntival, para el segmento posterior es a través de la esclerótica. La permeabilidad de este tejido a los fármacos disminuye conforme aumenta la lipofilidad y el radio molecular. Por otro lado, la esclerótica cuenta con poros que se encuentran cargados negativamente, lo que compromete el paso de las moléculas cargadas tanto positiva como negativamente (Cholkar & Dasari, 2013).

La administración tópica de medicamentos oftálmicos no resulta eficiente si es que se requiere llegar al segmento posterior del ojo. Existen algunas otras como la administración sistémica a través de vía enteral o parenteral. Sin embargo, el fármaco sólo permanece alrededor de 30 minutos al llegar a la coroides, el cual es un tejido altamente vascularizado, provocando que esta sea breve y no permita alcanzar concentraciones terapéuticas (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011).

Otra estrategia es aplicar el fármaco en el tejido posterior a través de vías como la intravítrea o la vía periorcular que comprende inyecciones subconjuntival como se muestra en la Figura 7, retrobulbar y peribulbar (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011).

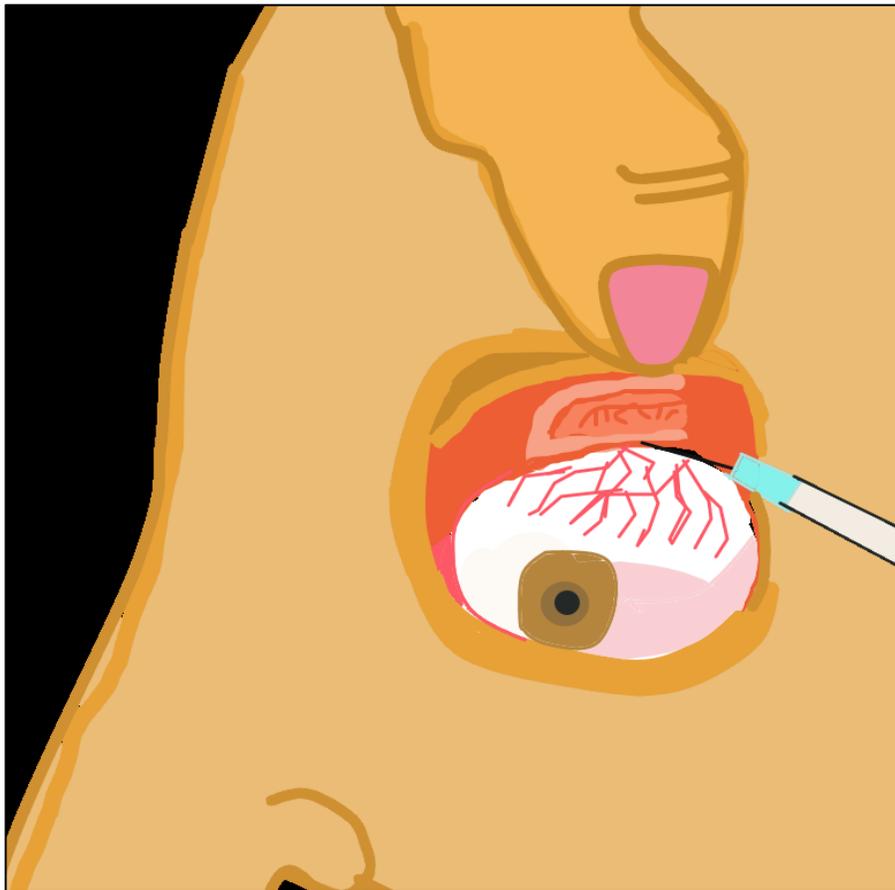


Figura 7. Representación de inyección subconjuntival.

La barrera hematorretiniana (blood retinal – barrier, en inglés), está integrada por el endotelio capilar de la retina en la parte interna; y por las células pigmentadas de la retina, en la parte externa. Limita el acceso de fármacos desde la sangre a la retina. También previene el paso de proteínas y sustancias hidrofílicas. Cuenta con mecanismos de transporte activo para la eliminación de fármacos provenientes de la porción anterior del ojo, así como del humor vítreo; también puede darse el transporte por difusión pasiva para los fines mencionados (Addo, 2016).

A lo largo de los años se han creado formas farmacéuticas alternativas a las convencionales (colirios y ungüentos) (Kumari, Anita, Sharma, Pramod K., Garg, Vipin K., Garima, 2010). para satisfacer las necesidades terapéuticas y superar los obstáculos que representa fabricar un medicamento compatible e inocuo para el ojo humano.

## 5. Microemulsiones

Las microemulsiones (MEs) son sistemas coloidales compuestos por una fase acuosa, una oleosa, surfactantes (o tensoactivos) y cotensoactivos (Hegde, Verma & Ghosh, 2013). En estos sistemas se forman glóbulos de la fase que se encuentra en menor proporción (fase dispersa) delimitados por una capa de tensoactivos y cotensoactivos. Los tamaños de los glóbulos se encuentran entre los 10 y 100 nanómetros de diámetro (Callender *et al.*, 2017) siendo en comparación con las emulsiones, microscópicamente más pequeño.

Son termodinámicamente estables. Lo cual significa que la energía libre de Gibbs en el sistema es menor cuando se forma la microemulsión (ME) en comparación con el estado previo a la formación de la ME en donde los componentes recientemente son dispuestos unos con otros como se ilustra en la Figura 8 (Callender *et al.*, 2017).

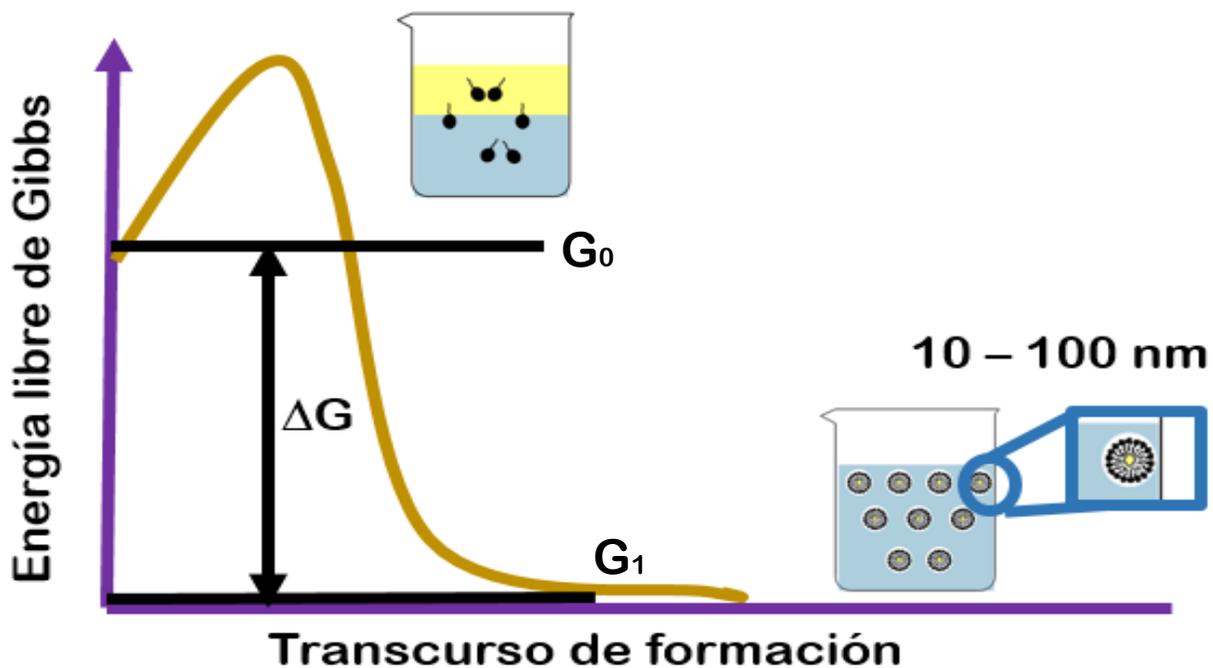


Figura 8. Representación del cambio en la energía libre de Gibbs antes y después de la formación de la microemulsión.

Una vez que los elementos (o ingredientes) del sistema se encuentran recién integrados, las moléculas de cada fase que se encuentran en la región limítrofe que las divide (interfase), tenderán a atraerse entre sí, generando una fuerza en dirección al seno de su fase respectiva y opuesta a la interfase. En la Figura 9 se encuentra representado este fenómeno.

Esto último, propicia que la interfase se contraiga y se genere tensión. A la fuerza opositora para balancear la fuerza generada por las moléculas de una y otra fase en la región limítrofe, se le denomina tensión superficial (Sinko, 2010) o interfacial, si se habla de dos fases líquidas. La tensión interfacial se ve disminuida por la presencia de los tensoactivos y cotensoactivos, permitiéndole al sistema llegar a un estado de menor energía libre y formar una microemulsión.

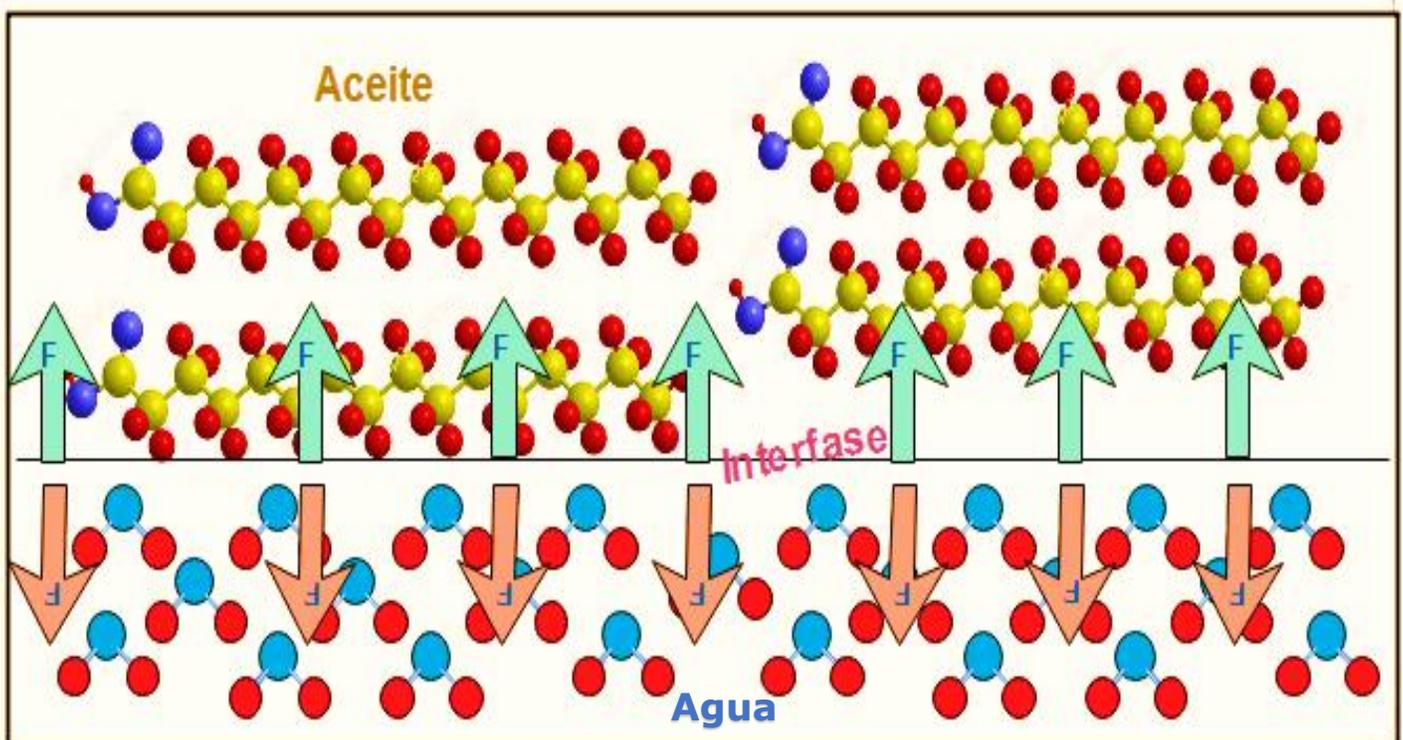


Figura 9. Sistema compuesto de agua (átomos de oxígeno en azul e hidrógeno en rojo) y aceite (moléculas de ácido palmítico en amarillo los átomos de carbono, hidrógenos en rojo y oxígenos en azul). Se representa la dirección de la fuerza de las moléculas en la interfase con flechas rosas para el agua y verde para el aceite, las cuales apuntan hacia el seno de sus respectivas fases.

Como se mencionaba anteriormente, algunos monómeros de las sustancias activas migran hacia la interfase, otros permanecen en el seno de la fase oleosa o acusa, provocando una diferencia o gradiente de concentración. Esta diferencia puede dar lugar a lo que se conoce como *Efecto Marangoni*, el cual consiste en la auto organización (en este caso de las sustancias tensoactivas) debido a la diferencia de tensión interfacial provocada por la adsorción no uniforme de los tensoactivos en la interfase entre la fase dispersa y la fase continua del sistema. Esto implica que en los sitios donde se encuentra situado el tensoactivo, se ve disminuida la tensión interfacial ( $\sigma$ ), lo que no sucede en las regiones libres de este (Innocenzi, Malfatti & Falcaro, 2013), como se ejemplifica en la Figura 10.

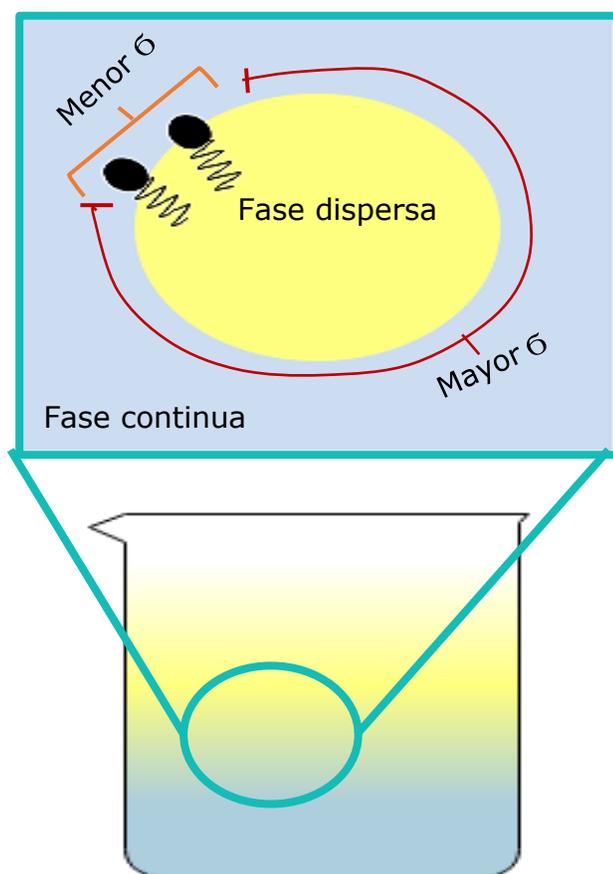


Figura 10. Diferencia de tensión interfacial ( $\sigma$ ) provocada por el gradiente de concentración de sustancias activas.

En la literatura se considera que este fenómeno es responsable del movimiento autónomo e individual de los glóbulos o gotas de las microemulsiones. Además, se piensa que a medida que incremente la adsorción de las sustancias tensoactivas en la interfase, aumenta el movimiento que experimenta el glóbulo. La explicación de este fenómeno se representa en la Figura 11, en donde se puede observar que, en la medida en que adsorben los monómeros de sustancias tensoactivas en la interfase, se produce una diferencia de tensión interfacial denotada como  $\downarrow \sigma$  donde la tensión interfacial es menor y como  $\uparrow \sigma$  donde es mayor. A su vez, se produce un movimiento de las sustancias activas dentro de la fase oleosa (en color amarillo) y a su vez el movimiento del glóbulo de microemulsión en formación. (Banno, Toyota & Asakura, 2017). Este movimiento también es conocido como *Movimiento de Marangoni*. Como se muestra en la parte B de la Figura 11, se origina desde una región de menor tensión a una de mayor tensión interfacial. Los glóbulos al estar en movimiento evitan el acercamiento de unos con otros, adicionalmente se evita que el contenido del glóbulo se derrame y se dé el fenómeno de coalescencia, es por ello que se piensa que el *Movimiento de Marangoni* contribuye a mantener la estabilidad del sistema (Ruckenstein, 1996).

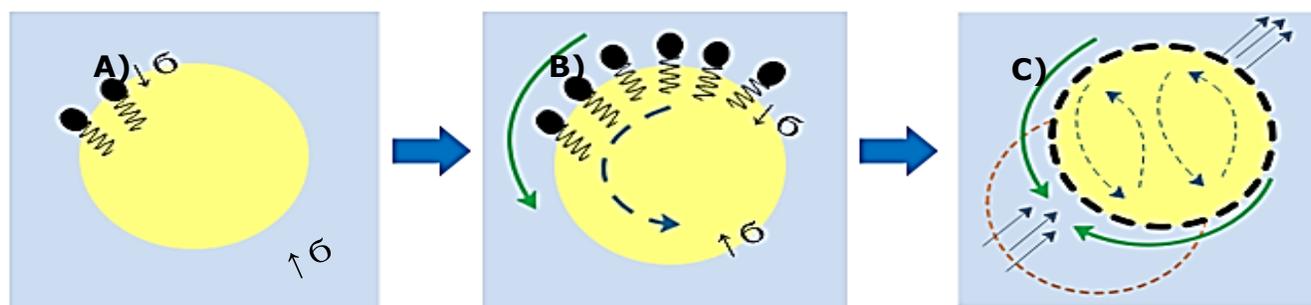


Figura 11. Movimiento autónomo de los glóbulos de la microemulsión. En azul se representa a la fase continua, en amarillo a la fase dispersa y en negro a las sustancias tensoactivas. A) Diferencia de tensión interfacial al adsorberse las sustancias tensoactivas. B) Movimiento de las sustancias activas dentro del glóbulo en formación representado por la flecha azul de línea discontinua; movimiento del glóbulo en formación representado por la flecha verde. C) Movimiento autónomo del glóbulo formado. Flechas grises denotan la dirección del movimiento. Modificado de Banno, Toyota y Asakura, 2017.

## 5.1 Composición de las microemulsiones.

Los tensoactivos son moléculas anfifílicas que contienen una región o cabeza hidrofílica y una cadena hidrofóbica, lo que les permite interactuar con sustancias inmiscibles entre sí, como las fases acuosa y oleosa de las microemulsiones (Shaw & Ph, 2016). Dada su naturaleza permiten el abatimiento de la tensión interfacial y la integración de los componentes del sistema.

Por otro lado, los cosurfactantes o cotensoactivos son generalmente cadenas cortas, de bajo peso molecular y con cabezas de grupos pequeños como aminas, alcoholes o ácidos carboxílicos (Vaidya & Ganguli, 2019). Los más comúnmente usados en formulaciones oftálmicas son los alcoholes y glicoles de dos a diez carbonos. Se sabe que estos compuestos contribuyen a la disminución de la tensión interfacial.

En comparación con los tensoactivos, los cotensoactivos presentan un menor tamaño por lo cual tienen la capacidad de adsorberse en la monocapa de tensoactivos y así aumentar su flexibilidad (Ibrahim, 2019). Lo anterior es de suma importancia para la formación de las microemulsiones puesto que permite que se curve la monocapa y se formen varias estructuras, las cuales se mencionan más adelante (Bergström, 2017). Estas estructuras presentan tamaños nanométricos lo que confiere al sistema una apariencia translúcida o incluso transparente (Ibrahim, 2019). Adicionalmente, permiten la partición homogénea de los componentes que conforman las partículas o gotas (Herrero-Vanrell *et al.*, 2013); por otra parte se reporta en la literatura que cumplen la función de evitar la formación de estructuras indeseables como los cristales líquidos (Rajpoot & Tekade, 2019), esto se le atribuye a la contribución de los cotensoactivos en la disminución de la viscosidad del sistema (Rousseau, Rafanan & Yada, 2011).

Es importante mencionar que los cotensoactivos por sí solos no forman agregados; lo cual los diferencia de los tensoactivos que, en cuanto rebasan la concentración a la que saturan la interfase, Concentración Micelar Crítica (CMC), comienzan a agregarse y a organizarse en diferentes estructuras como las micelas. La particularidad del tamaño pequeño de la cabeza de la molécula de cotensoactivo es lo que no permite que sus monómeros se agreguen o acomoden en otras estructuras (Sakamoto, Lochhead & Yamashita, 2017). A pesar de presentar esta característica, se sabe que los cotensoactivos ayudan de manera importante a la formación de agregados o estructuras como las microemulsiones, pues se incluyen entre las colas hidrocarbonadas de los monómeros de tensoactivo en la capa de tensoactivo que delimita a las microemulsiones, incrementando la flexibilidad y fluidez de la interfase (Rousseau, Rafanan & Yada, 2011).

Mezclar cotensoactivos y tensoactivos permite una disminución importante de la tensión superficial. Además, la diferencia de tamaños de la cabeza polar de los tensoactivos y cosurfactantes promueve que el parámetro crítico de empaquetamiento (CPP) aumente formando diferentes estructuras. Cuando el valor de CPP es menor a la unidad ( $CPP < 1.0$ ) la curvatura de la interface del sistema se orienta hacia la fase acuosa produciendo microemulsiones tipo aceite en agua (Rajpoot & Tekade, 2019); adicionalmente, las sustancias tensoactivas forman micelas esféricas en valores cercanos a 0.33 y micelas agrupadas en cilindros en valores cercanos a 0.5 (Escobar Jimenez, 2017). Cuando se encuentra alrededor de la unidad se ( $CPP \approx 1.0$ ) se forman estructuras bicontinuas o lamelares como los cristales líquidos. En caso de que el CPP sea mayor a 1.0 ( $CPP > 1$ ) la curvatura se orienta hacia la fase oleosa, formando MEs agua en aceite (Rajpoot & Tekade, 2019); además se forman micelas esférica invertidas donde las cadenas hidrocarbonadas se encuentran orientadas hacia afuera del núcleo dejando un centro hidrofílico (Escobar

Jimenez, 2017). El tipo de estructura que se forma depende también de las proporciones de la fase acuosa, oleosa, los tensoactivos y cotensoactivos (Callender *et al.*, 2017). Se piensa que incrementando la proporción tensoactivo-cotensoactivo se potencia la formación de micelas y la capacidad de solubilización de la microemulsión (Ibrahim, 2019).

La ecuación que describe el parámetro crítico de empaquetamiento es la siguiente:

$$CPP = \frac{v}{al}$$

Donde:

$V$  es el volumen [ $\text{nm}^3$ ] de la porción hidrofóbica del tensoactivo;  $a$  es el área [ $\text{nm}^2$ ] que ocupa la cabeza polar en la interfase,  $l$  es la longitud [ $\text{nm}$ ](Israelachvili, 2011) de la cadena de la cola hidrofóbica (Lawrence & Rees, 2012).

Es importante señalar que las microemulsiones y las micelas no son lo mismo. Si bien son parecidas dado que están conformadas por monómeros organizados formando estructuras circulares o esféricas, son diferentes puesto que las microemulsiones contienen en su interior la fase dispersa, sea oleosa o acuosa, mientras que las micelas tienen un centro hidrófobo compuesto por las cadenas hidrocarbonadas de las sustancias tensoactivas; es posible que también posean un centro hidrofílico conformado por las cabezas de los monómeros de tensoactivo (micelas invertidas). En la literatura se puede encontrar que se hace referencia a las microemulsiones por el término de "micelas hinchadas" o *swollen micelles* en inglés pero como ya se mencionó, la estructura de los glóbulos de las MEs no deben confundirse con la estructura de la micela (Lopez *et al.*, 2004). En la figura 12 se ilustra la diferencia entre las micelas y las microemulsiones. En el inciso *A* se muestra una micela delimitada por monómeros de tensoactivo (en color negro) la cual presenta un centro hidrofóbico y exterior hidrofílico en un medio acuoso; mientras que en el inciso *B* la micela

invertida presenta un centro hidrofílico conformado por las cabezas polares del tensoactivo y un exterior hidrofóbico rodeado por medio oleoso. A diferencia de las micelas, en el inciso C se muestra el glóbulo o gota de una microemulsión aceite en agua con una mono capa conformada por tensoactivo y cotensoactivo, mientras que en la letra D se muestra el glóbulo de una ME agua en aceite.

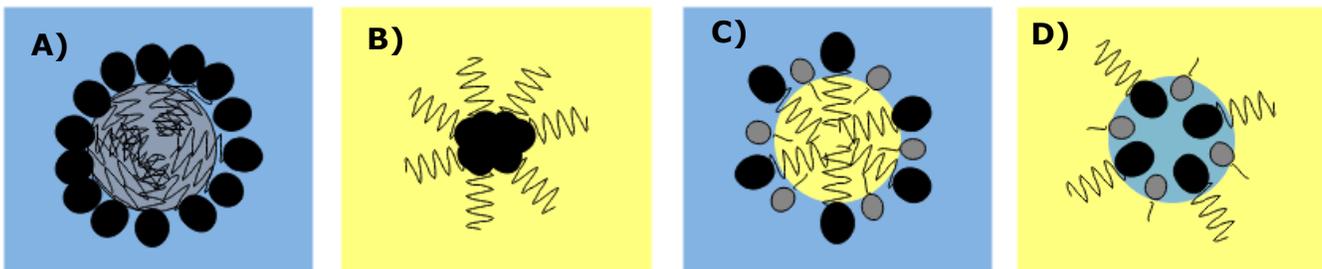


Figura 12. Diferencia entre micelas y microemulsiones. A) Micela B) Micela invertida C) Microemulsión aceite en agua D) Microemulsión agua en aceite. Modificado de Rajpoot & Tekad, 2019).

Al elegir los tensoactivos y cotensoactivos se debe tener presente que no toda la amplia gama de sustancias existentes es apta para entrar en contacto con el ojo ya que algunas no se emplean para esos fines y otras resultan bastante tóxicas. Los más utilizados para el microemulsiones oftálmicas son los tensoactivos no iónicos, es decir, aquellos que no poseen un grupo cargado negativa o positivamente en su cabeza polar; estos presentan menores riesgos asociados en comparación a los iónicos, que se consideran altamente tóxicos. Incluso los tensoactivos no iónicos son más estables y biocompatibles. Además, estos son más voluminosos y menos polares, por consiguiente, presentan una CMC menor permitiendo la formación de estructuras micelares y otros agregados a menor concentración de tensoactivo (Ibrahim, 2019). Aquellos que se han empleado en formulaciones oftálmicas son los siguientes:

- \* Poloxámeros. Bloques de copolímeros conformados por polioxipropileno y polioxietileno
- \* Éster de poliglicerol de ácidos grasos. Principalmente utilizado como emulsificante de alimentos. Conocido comercialmente como Polirricinoleato de poliglicerol (Gautam & Kesavan, 2017)
- \* Éteres de polietileglicol (o macrogol) conocidos como Cremophor (ricinoleato de macrogolglicerol), Brij (por ejemplo, Brij 30, Brij 35; Brij 52 o Polietilenglicol hexadecil éter).
- \* Polisorbatos (Tween 20, 80).
- \* Ésteres de sorbitan (Span 20, 80)
- \* Polietilenglicol. Por ejemplo, PEG 200, PEG 400
- \* Lecitina (Mandal *et al.*, 2010)

Por otro lado, los cotensoactivos que se emplean generalmente son:

- \* Alcoholes de cadena corta: Etanol, propanol y butanol.
- \* Aldehídos: 1,2-propanediol, 1,2-butanediol
- \* Glicerol
- \* Glucitol (Gautam & Kesavan, 2017).

Es importante mencionar que las microemulsiones contienen entre un 15 y 30% de tensoactivos mientras que las emulsiones y las nanoemulsiones entre 1 y 3% (Callender *et al.*, 2017). El alto porcentaje de estos ingredientes implica elegir cuidadosamente los tensoactivos a emplear en la formulación puesto que se asocian a modificaciones celulares en la córnea y conjuntiva. La literatura sugiere que preferentemente se utilicen hasta en un 5% de la formulación. Por otro lado, los tensoactivos de cabeza catiónica y aniónica son conocidos por su alta toxicidad, siendo los no iónicos los menos tóxicos de los tres (Jiao,

2008). En el caso del tejido ocular, la córnea presenta una superficie cargada negativamente por las proteínas que contienen grupos carboxilos (Jiao, 2008), por lo cual un tensoactivo catiónico podría tener interacción con los componentes negativos de la membrana celular, desacoplándola y provocando el vaciado de la célula y así dañar la córnea (Ibrahim, 2019). Adicional a la selección del tipo de tensoactivo a emplear en la formulación, se debe tener presente que, la exposición a altas concentraciones de estos anfifílicos a través del tiempo, puede generar respuestas como regeneración epitelial, neovascularización, conjuntivalización (invasión corneal por el epitelio conjuntival), además de causar edema, inflamación, enrojecimiento de la conjuntiva, quemosis y secreción (Jiao, 2008).

Como se mencionó anteriormente, algunos cotensoactivos empleados son alcoholes. Se ha encontrado que aquellos con longitudes de 3 a 8 carbonos han sido fuertes irritantes en comparación al etanol. Si bien, la presencia de estos ingredientes permite la formación de agregados como microemulsiones, micelas y estructuras laminares; se ha reportado en la literatura que aún sin estos, es posible obtener microemulsiones en su ausencia sin afectar la estabilidad del sistema ME (Gautam & Kesavan, 2017). También se hace mención sobre la cadena hidrofóbica del tensoactivo como referencia para decidir emplear un cotensoactivo. Se indica que al utilizar tensoactivos de una sola cadena la tensión superficial no se ve lo suficientemente disminuida, es por ello que se adiciona un cotensoactivo (Katiyar *et al.*, 2013).

### 5.1.1 Diagramas de fase y su uso para definir la proporción de los componentes.

Además de elegir el tipo de tensoactivo a emplear, definir la cantidad de tensoactivo y cotensoactivo en la formulación es uno de los pasos más importantes en el proceso de desarrollo de un fármaco en una microemulsión. Para ello se emplean diagramas ternarios o pseudoternarios. Estos diagramas son una representación gráfica del comportamiento de una propiedad característica con relación a la composición de un sistema de tres o más componentes, generalmente a temperatura y presión constantes. Como se muestra en la Figura 13, es representado por un triángulo equilátero donde cada vértice (A,B,C) es un componente puro o una relación constante entre dos componentes (Novelo-Torres & Gracia-Fadrique, 2010). La diferencia entre un diagrama ternario y uno pseudoternario radica en que el segundo, uno o más "componentes" son en realidad un conjunto de sustancias que pueden estudiarse como si fueran uno mismo, es decir, un psuedocomponente (Universidad de los Andes, 1991). De esta manera, se podría elaborar el diagrama de fases de una ME con un componente "A" que incluya la fase acuosa adicionada con amortiguador de pH, antioxidantes etc; catalogar como "B" a la fase oleosa y "C" a las sustancias modificadoras de la tensión superficial.

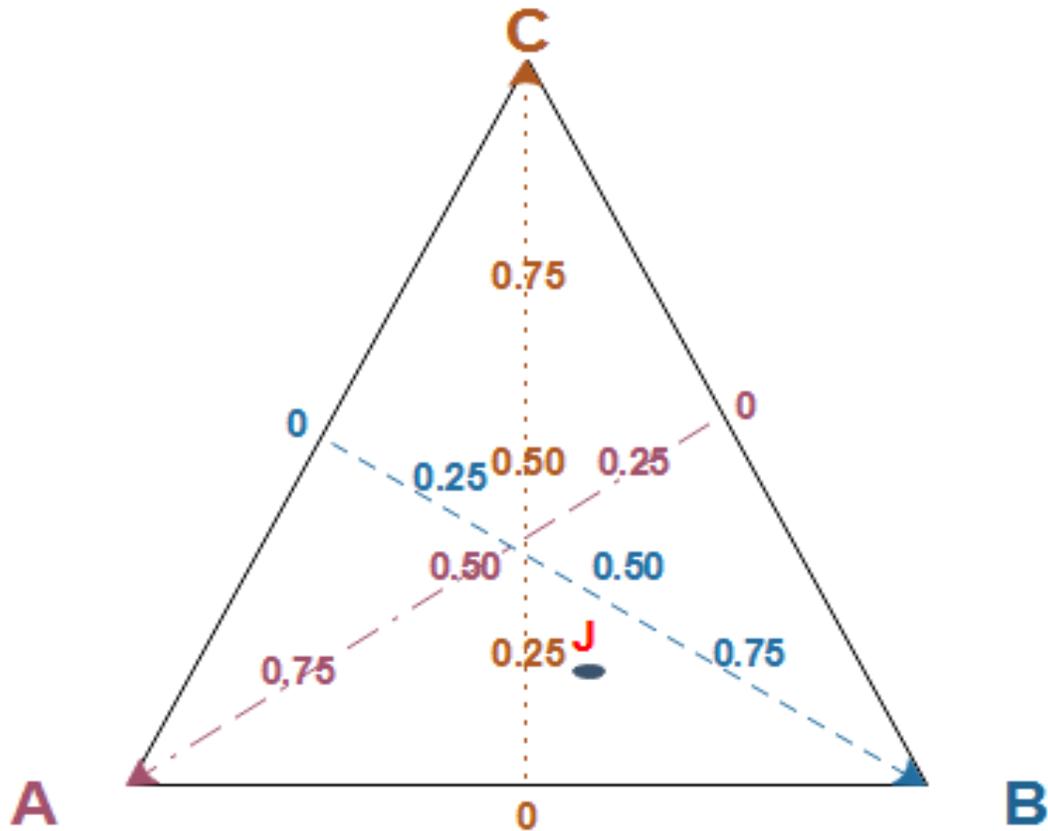


Figura 13. Diagrama ternario. Punto J donde  $A = 0.4$ ,  $B = 0.4$  y  $C = 0.2$ . La suma de A, B y C da como resultado la unidad.

Para construir un diagrama ternario, se requiere de tres variables medibles, las cuales se calculan en proporciones que, al sumarlas entre sí, dan la unidad o el 100% del sistema (Verma, 2012). En ese sentido, si se quisiera representar las proporciones de tensoactivo se podría hacer como se muestra en la Tabla 1. Nótese que la suma de  $A+B+C$  da 1 o 100%.

Tabla 1. Ejemplo de valores de las variables para los ingredientes de una microemulsión (fase oleosa, fase acuosa y tensoactivo con cotensoactivo en proporción 1:1).

Variables en porcentaje			Variables fracción en peso		
A	B	C	A	B	C
Fase Acuosa Porcentaje en peso (%)	Fase Oleosa Porcentaje en peso (%)	Tensoactivo + Cotensoactivo (1:1) Porcentaje en peso (%)	Fase Acuosa Fracción en peso	Fase Oleosa Fracción en peso	Tensoactivo + Cotensoactivo (1:1) Fracción en peso
47.5	47.5	5.0	0.475	0.475	0.050
45.0	45.0	10.0	0.450	0.450	0.100
40.0	40.0	20.0	0.400	0.400	0.200
33.3	33.3	33.3	0.333	0.333	0.333
27.5	27.5	45	0.275	0.275	0.450

Se podrían obtener los datos experimentales añadiendo a mezclas binarias el tercer componente, como se representa en la Figura 14. Posterior a esto, se evaluarían características como aspecto translúcido y uniforme; tamaño de gota y estabilidad (visualmente se identifica como capacidad de mantener el sistema en una sola fase en el transcurso del tiempo).

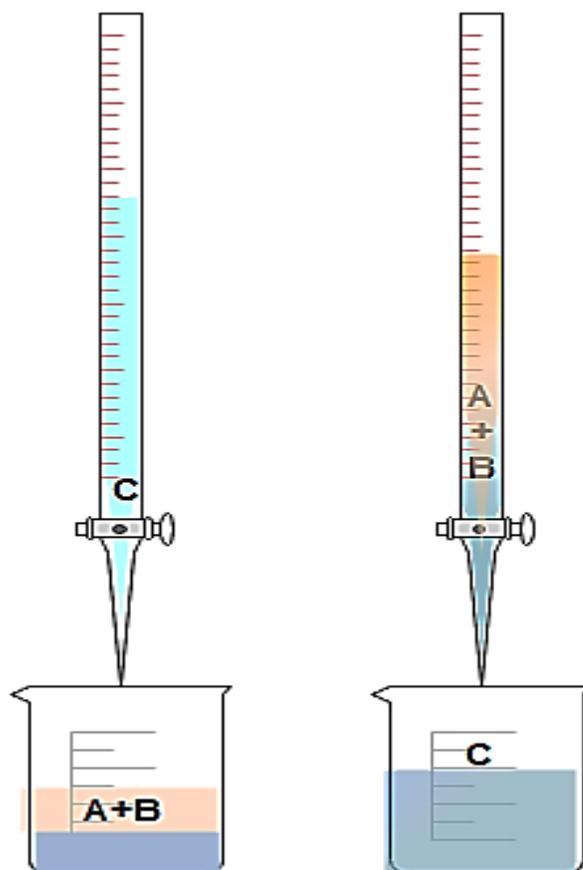


Figura 14. Adición de los componentes en el desarrollo experimental.

Una vez identificadas las proporciones de los componentes que conllevan a la formación de la microemulsión, se ubican en el diagrama ternario sombreando las zonas donde se obtuvo el resultado deseado, (Dantas *et al.*, 2010) en la Figura 15 se muestra un ejemplo.

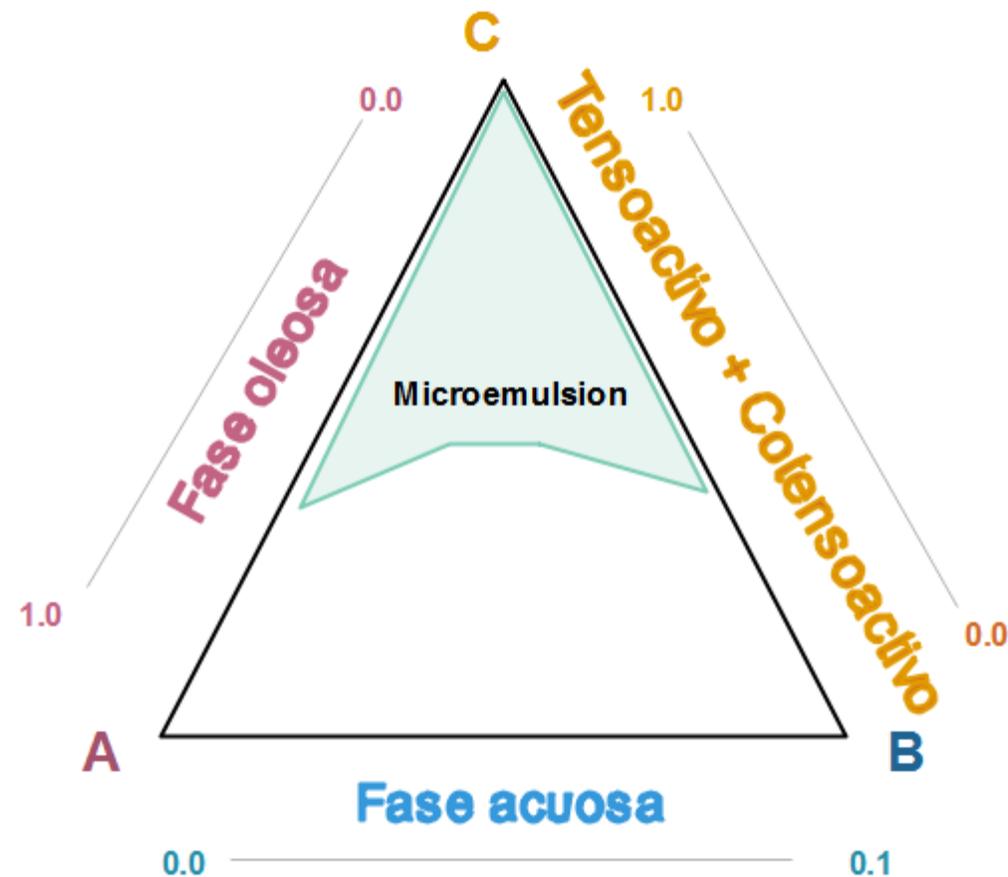


Figura 15. Representación de un diagrama de fases pseudoternario donde se muestra la zona en las proporciones en las que se forman microemulsiones. Se ilustra la escala en la que aumentan o disminuyen las variables A (Fase oleosa), B (Fase acuosa), C (Tensoactivo y Cotensoactivo).

Si bien se pueden hacer mezclas hasta encontrar el resultado deseado en términos de apariencia (opacidad, translucidez), de estabilidad o características de tamaño de partícula entre 10 a 100 nm; el método de "ensayo y error" puede no ser el más eficiente para encontrar las proporciones de tensoactivo y cotensoactivo que permiten definir los ingredientes de la fórmula para la fabricación de un medicamento. Aunado a esto, en un inicio no es posible definir la materia prima y las proporciones para establecer la formulación

final. Es posible que se requiera invertir tiempo en realizar pruebas tanto para elegir los ingredientes como para construir el diagrama ternario o pseudoternario.

En un escenario en donde se deben economizar los recursos materiales, así como la competencia comercial frente a otros productos donde el tiempo juega un papel importante, se requiere contar con una estrategia que permita obtener resultados en el menor tiempo y costo posible (Ortega-Pérez *et al.*, 2015). Para ello, existen metodologías estadísticas que son aplicables en la planeación de experimentos o ensayos, tal como el diseño de experimentos.

#### 5.1.2 Diseño de experimentos como herramienta para el desarrollo farmacéutico.

El diseño de experimentos es una de las ramas de la Quimiometría, disciplina que tiene por objeto la aplicación de métodos estadísticos, matemáticos y químicos. De manera análoga, existe también la Farmametría, que son los métodos estadísticos aplicados a la Farmacia. (Fernández, *et. al.* 2008). El diseño de experimentos se refiere al proceso de planear el experimento que permita obtener datos adecuados para analizarlos con métodos estadísticos que llevarán a conclusiones válidas, objetivas y significativas (Montgomery, 2004). Como se muestra en la Figura 16, se han clasificado los diseños de experimentos en tres categorías.



Figura 16. Clasificación del diseño de experimentos en categorías. Esquema modificado de Fernández et. al. (Fernández, et.al., 2008)

Cada categoría se centra en un objetivo de estudio. Por ejemplo, se pueden comparar dos o más tratamientos a través del uso del Análisis de Varianza (ANOVA), el cual se centra en separar la variación total en las partes con las que contribuye cada fuente de variación en el experimento (Gutiérrez-Pulido & De la Vara-Salazar, 2008). Por otro lado, el diseño multivariado permite investigar problemas complejos que son afectados por dos o más variables distintas (Balluerka & Vergara, 2002). Por último, existen diseños de experimentos que permiten determinar qué tanto se ve afectada la respuesta de salida de un proceso

dependiendo de los factores que se quieran estudiar, por ejemplo, el diseño factorial y el diseño de mezclas.

En el caso del desarrollo de microemulsiones, se emplea el diseño de mezclas, el cual se refiere al conjunto de experimentos en los que los factores (o variables en estudio) son las cantidades o proporciones de los componentes o ingredientes de la mezcla (Gutiérrez-Pulido and De la Vara-Salazar, 2008). Estos factores son dependientes entre sí, es decir, que cada uno en sus diferentes proporciones conforman el total del sistema. En lenguaje matemático esta aseveración está representada de la siguiente manera:

$$\sum_{i=1}^q X_i = X_1 + X_2 + \dots + X_q = 1$$

Además, cumple con las siguientes restricciones:

$$0 \leq X_i \leq 1$$

Entiéndase que X es la proporción y el subíndice *i* se refiere al componente en cuestión.

Dependiendo de los puntos que se requieran ubicar en superficie de respuesta es el tipo de diseño que puede utilizarse (Gutiérrez-Pulido & De la Vara-Salazar, 2008):

Tipo de diseño	Diseño simple reticular también llamado simplex-lattice	Simple con centroide
Descripción	Incluye puntos en la frontera. Considera <i>q</i> componentes. Se puede ajustar a un modelo de orden <i>m</i> .	Este se aplica con pocos componentes y consiste en $2^{q-1}$ puntos definidos o tratamientos. De tal manera que si se tiene <i>q</i> =3 se tendrían los siguientes experimentos o coordenadas:

Los tratamientos se pueden obtener con todas las mezclas que pueden formarse con los valores:

$$X_i = 0, \frac{1}{m}, \frac{2}{m}, \dots, \frac{m}{m}$$

Al aumentarse  $m$  es posible explorar más puntos dentro de la superficie respuesta, de tal manera que se puede obtener más información sobre la influencia de los componentes en la misma (Gutiérrez-Pulido & De la Vara-Salazar, 2008), ver Figura 17.

$(1,0,0);(0,1,0);(0,0,1)$

$(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 0); (\frac{1}{2}, 0, \frac{1}{2}); (0, \frac{1}{2}, \frac{1}{2}); (\frac{1}{3}, \frac{1}{3}, \frac{1}{3})$

Los puntos mencionados estarían ubicados en el diagrama (Gutiérrez-Pulido and De la Vara-Salazar, 2008) como se muestra en la Figura 18.

También se emplea cuando todos los componentes tienen el mismo intervalo entre 0 y 1 (Buruk Sahin, Demirtas Aktar & Burnak, 2016).

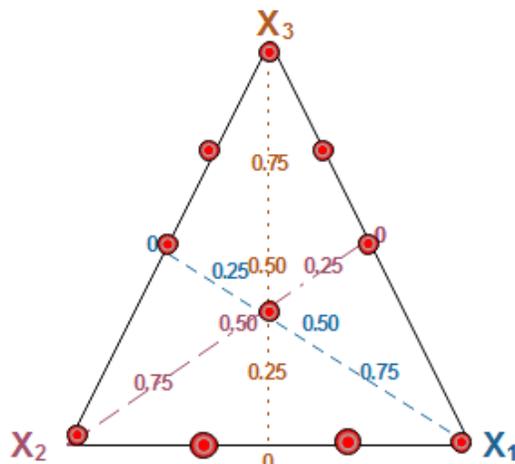


Figura 17. Diseño simple reticular (3,3) es decir,  $q=3$   $m=3$ .

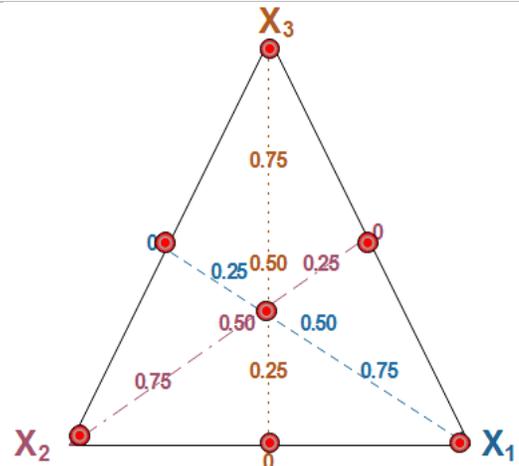


Figura 18. Diseño simple con centroide  $q=3$ .

Los dos tipos de diseños mencionados anteriormente son ejemplos representativos para su aplicación en la definición de los componentes durante diseño de mezclas (Buruk Sahin, Demirtas Aktar & Burnak, 2016). Sin embargo, no son los únicos que existen. También se encuentra otro llamado *Diseño de vértices extremos* conocidos también como "*Optimal*", el cual es útil cuando la proporción de los componentes se ve limitada, ya sea por costos, disponibilidad o incluso por intervalos en los cuales su uso representa menor toxicidad (Gutiérrez-Pulido & De la Vara-Salazar, 2008). La región de la superficie de estudio que se crea por las restricciones no es siempre simétrica, por lo que este tipo de diseño es útil para la exploración y optimización de las respuestas deseadas. Se conocen tres tipos de Diseños *Optimal*, el "I" el cual se enfoca en minimizar la varianza sobre la región de diseño; el "D" que estima los mejores coeficientes posibles del modelo matemático sobre todo en donde las regiones de la mezcla se encuentran restringidas. Por último, el "G" se centra en la varianza de la ecuación general que se usa para la predicción de la respuesta al ajustar los factores o variables (Buruk Sahin, Demirtas Aktar & Burnak, 2016).

Es importante recalcar que, si bien el diseño de experimentos (particularmente el de mezclas) es una herramienta estadística útil para conocer y optimizar el desarrollo farmacéutico, es probable que en caso de que se parta de cero, sea necesario complementar con el método de "ensayo y error" para obtener un panorama preliminar de la formulación y su comportamiento.

Se ha enfatizado en la importancia de la selección del sistema de tensoactivos y cotensoactivos como componentes de las microemulsiones, así como las herramientas estadísticas para definir su composición; no obstante, la fase acuosa y oleosa también las conforman y se han caracterizado para su uso en el ojo.

Para la fase acuosa se debe tener presente que no es suficiente contar con agua. El ojo tiene la característica de tolerar intervalos de pH entre 4 y 8 (Baranowski, Bożena Karolewicz, *et al.*, 2014), si bien el intervalo de tolerancia es amplio, resulta necesario agregar sustancias amortiguadoras. Ya que en caso de presentarse un cambio, esto podría provocar irritación, promoviendo la producción de lágrimas y con ello una disminución del tiempo de permanencia del preparado en la superficie ocular, disminuyendo la probabilidad de que el fármaco sea absorbido (Baranowski, Bożena Karolewicz, *et al.*, 2014). Se ha visto que en el uso de lentes de contacto, existe un grado de incomodidad si el pH de las soluciones para la limpieza de los lentes (Tang *et al.*, 1996) no es ajustado al lagrimal (7.2 a 7.4) (García Lopez, 2002). Por otro lado, se sabe que los colirios usualmente contienen conservadores para prevenir el crecimiento microbiano, por ejemplo, cloruro de benzalconio. En el caso de las microemulsiones no es muy recomendable su uso puesto que al interactuar con los tensoactivos se disminuye (e incluso se anula) su capacidad antimicrobiana al formar micelas con los tensoactivos de la formulación (Jiao, 2008).

Respecto a la fase oleosa, los aceites y/o lípidos que se han empleado para la vía oftálmica son los siguientes:

- \* Oleato de etilo
- \* Miristato de isopropilo
- \* Palmitato de isopropilo
- \* Ácido oléico
- \* Triglicérido caprico-caprílico (miglyol 80)
- \* Ácido octanóico (Gautam & Kesavan, 2017)
- \* Aceite de soya
- \* Aceite de ricino (Herrero-Vanrell *et al.*, 2013)

## 5.2 Métodos de preparación.

En los inicios de los estudios sobre las microemulsiones (alrededor de los años 1940), el equipo de J.H. Schulman preparaban una emulsión y la titulaban con un cotensoactivo hasta que se tornara de opaca a translúcida (Katiyar *et al.*, 2013).

En la actualidad se describe en la literatura que el método general para la elaboración de MEs consiste integrar los componentes que sean miscibles entre sí para posteriormente conjuntarlos y formar un solo sistema. Nina Lidich y colaboradores en Israel; concentraron el sistema de tensoactivo-cotensoactivo junto con el aceite (fase oleosa) para posteriormente diluir con agua adicionada con fosfato de riboflavina (ingrediente activo) (Lidich *et al.*, 2019).

El grupo de Irán, Bayat y colaboradores prepararon nanopartículas de CL-20 (nitroamina utilizada propulsores y formulaciones explosivas) utilizando microemulsiones. Para ello primero cargaron el aceite con CL-20 para posteriormente añadirlo a la fase acuosa junto con las sustancias tensoactivas (Bayat *et al.*, 2014).

Por otro lado, también se describen en la literatura otros procesos para la formación de microemulsiones:

- Auto microemulsificación. El cual consiste en la formación espontánea de los glóbulos cuando se incorporan todos los ingredientes y se aplica el mínimo de energía para homogeneizar los mismos.
- Titulación de fase. Consiste en mezclar los componentes en proporciones de 0% a 100% y se construye un diagrama de fase en las que se colocan el aceite, agua, tensoactivo y cotensoactivo. En esta se contempla que se distribuya de manera espontánea el tensoactivo en la fase continua para posteriormente abatir la tensión superficial (Gautam

& Kesavan, 2017). Laddha y colaboradores, utilizaron este método para desarrollar microemulsiones con el objetivo de mejorar la disolución de domperidona (antiémético de clasificación biofarmacéutica clase II). Tras realizar pruebas de solubilidad del fármaco en diferentes aceites, utilizaron ácido oleico para cargar el fármaco en cantidades constantes, posteriormente añadieron la mezcla de tensoactivo (Labrasol) y cotensoactivo (Transcutol HP), finalmente la mezcla se tituló con agua. Evaluaron el tiempo de emulsificación, porcentaje de transmitancia y tamaño de partícula; además evaluaron visualmente los preparados y construyeron diagramas de fases ternarios (Laddha, Suthar & Butani, 2014). En un artículo más antiguo al ya referenciado, también se utiliza este método para construir el diagrama de fases. Adicionaron el fármaco Ramipril (inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina) al aceite (Sefsol 218 o éster de propilenglicol monocaprílico), adicionaron la mezcla de tensoactivo y cotensoactivo (Cremophor EL y Carbitol respectivamente); y titularon con la fase acuosa (Shafiq-un-nabi *et al.*, 2007).

A diferencia de los autores mencionados, Ligório y da Silva realizaron la titulación con el cotensoactivo, método anteriormente utilizado por Schulman. Primero agregaron dexametasona al miristato de isopropilo, y le añadieron la mezcla de tensoactivo con fase acuosa. Mezclaron utilizando un Ultraturrax T25 y agregaron propilenglicol como cotensoactivo mientras agitaban con el equipo ya mencionado (Ligório Fialho & da Silva-Cunha, 2004).

- Inversión de fase. Este término se refiere a cambiar la fase dispersa por la dispersante y viceversa, lo cual puede llevarse a cabo 1) añadiendo un exceso de la fase dispersa al sistema, o 2) modificando la temperatura. Este último también se conoce como *Phase Inversion Temperature* o *PIT* por sus siglas en inglés. Consiste en mezclar la

solución del fármaco con las microemulsiones y aplicar calor para cargar al sistema con el ingrediente activo (Narang, Delmarre & Gao, 2007). Esto es posible dada la naturaleza de los tensoactivos no iónicos. Se sabe que la hidrofobicidad de los tensoactivos etoxilados (Tween 61, por ejemplo) se ve incrementada al aumentar su temperatura (Gadhavé & Waghmare, 2014), por lo cual, dependiendo del tipo de microemulsión que se tenga, ya sea aceite en agua (Oil/Water en inglés, denotado como O/W) o agua en aceite (Water/Oil en inglés, denotado como W/O); se aumentará o disminuirá la temperatura para producir el cambio deseado.

Dependiendo de las proporciones definidas para la fase acuosa, oleosa, tensoactivos y cotensoactivos; y habiendo concluido el proceso de manufactura, los tipos de microemulsiones que se podrían formar son los siguientes:

- ☼ Aceite en agua: Donde los glóbulos de fase oleosa se dispersan en la fase acuosa (continua).
- ☼ Agua en aceite: Donde los glóbulos de agua se dispersan en la fase oleosa (continua).
- ☼ Bicontinua: Donde la fase acuosa y oleosa se encuentran inter dispersas dentro del sistema debido a la presencia de los monómeros de tensoactivo que permiten que se encuentren en el equilibrio por su naturaleza anfifílica. (Gautam & Kesavan, 2017)

En 1954, P.A. Winsor predijo los tipos de equilibrio que podrían formarse al elaborar microemulsiones, lo cual se convirtió en una clasificación (Sanchez-Dominguez, Aubery & Solans, 2012):

- Tipo I. Se encuentra conformada por dos fases. En una fase se encuentra la microemulsión aceite en agua, la cual puede coexistir con la otra fase (exceso de fase oleosa) por medio de monómeros de tensoactivo.

- Tipo II. Al igual que el tipo I, el sistema es bifásico. La diferencia es que la microemulsión es agua en aceite. Este último coexiste con un exceso de fase acuosa a través de las sustancias tensoactivas.
- Tipo III. El sistema presenta tres fases en donde la parte central está conformada por una microemulsión bicontinua coexistiendo tanto con un exceso de fase oleosa como con una parte acuosa como se muestra en la Figura 19.
- Tipo IV. Monofásica, el sistema tiene una apariencia uniforme.

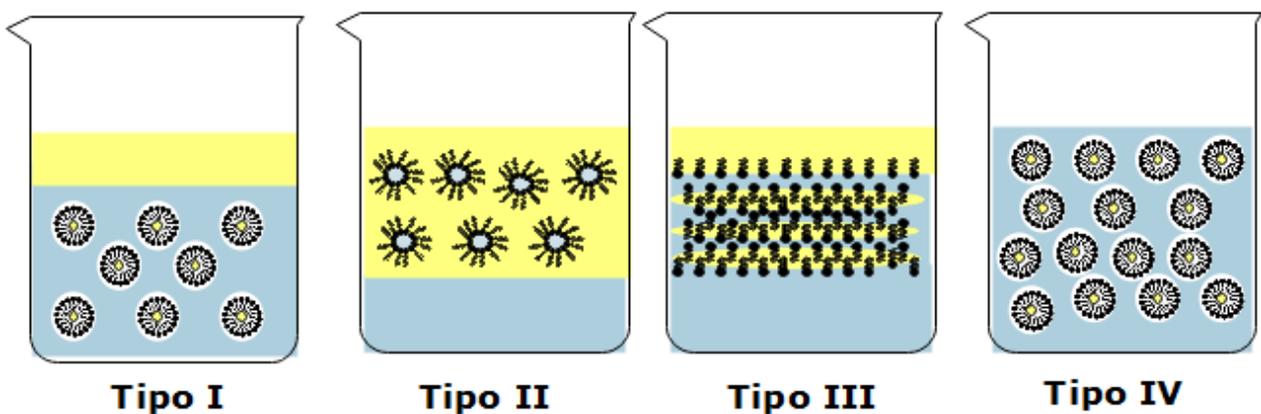


Figura 19. Tipos de microemulsiones con base en la clasificación de P. A. Winsor.

Además, Winsor relacionó el efecto de la temperatura para (tensoactivos no iónicos) y salinidad (para tensoactivos iónicos) con la formación de los tipos de microemulsión. A medida que se incrementa la temperatura y la salinidad, se pueden obtener los tipos I, III y II en ese orden (Sanchez-Dominguez, Aubery & Solans, 2012).

## 5.3 Ventajas y Desventajas

### 5.3.1 Ventajas

#### 5.3.1.1 Generales

De manera general, las microemulsiones se caracterizan por ser sistemas termodinámicamente estables, fáciles de preparar, y esterilizar (por filtración); además, los componentes que las conforman, permiten incorporar tanto fármacos liposolubles como hidrosolubles (Herrero-Vanrell *et al.*, 2013). También se considera que su fabricación no es costosa dado que no se requiere aplicar demasiada energía para su formación así como el empleo de instrumentos o equipo especializado (Ligório Fialho & da Silva-Cunha, 2004).

Por contener sustancias tensoactivas que disminuyen la tensión superficial hasta en un orden de  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$   $\left[\frac{mN}{m}\right]$  (Sanchez-Dominguez, Aubery & Solans, 2012). La importancia de esta característica radica en la buena distribución del preparado sobre la córnea, permitiendo que se mezcle con la película lagrimal y mejore el contacto entre el epitelio corneal y el fármaco (Ligório Fialho & da Silva-Cunha, 2004). El tiempo de permanencia del medicamento en la superficie ocular es clave para una adecuada absorción del fármaco.

Por otro lado, las microemulsiones también se caracterizan por presentar baja viscosidad. Se sabe que en los colirios convencionales suelen agregarse agentes que aumentan la viscosidad, dado que es importante para que se aumente el tiempo de contacto del fármaco con la superficie ocular. Una viscosidad adecuada permite disminuir la rapidez de drenado del preparado a través de la conjuntiva o el conducto nasolagrimal y así evitar su llegada a circulación sistémica. En el caso del timolol, indicado para el glaucoma, se sabe que su administración ocular tópica puede producir reacciones adversas sistémicas como

bradicardia (descenso de la frecuencia cardíaca a 60 latidos por minuto) y episodios de asma (Gasco *et al.*, 1989). Por el contrario, una elevada viscosidad (arriba de 50 cP) puede producir molestias como visión borrosa así como dolor al parpadear dada la resistencia al movimiento de los párpados (Kumar & Sinha, 2014); sin mencionar que no ayuda a la penetración del fármaco (García Lopez, 2002). Otro inconveniente relacionado a la alta viscosidad es la imposibilidad de esterilizar el preparado por filtración, como sucedió con una formulación que contenía quitosano y presentaba una viscosidad de 88.8 a 90.01 cP (Üstündag-Okur *et al.*, 2014).

En una formulación de una microemulsión con dexametasona al 0.1% realizada por científicos de Brasil, se obtuvo una viscosidad promedio de  $40.27 \pm 0.98$  mPas. Esta es considerablemente mayor a la que se observa en soluciones oftálmicas (alrededor de 20 mPas) (Ligório Fialho & da Silva-Cunha, 2004). Lo anterior revela que es posible obtener cierta viscosidad utilizando microemulsiones de tal manera que se contribuya a aumentar la permanencia del fármaco en la superficie ocular. Además, los científicos brasileños realizaron estudios en conejos Nueva Zelanda, obteniendo un resultado negativo, es decir, no hubo irritación observable tras la aplicación del preparado (Ligório Fialho & da Silva-Cunha, 2004).

Se ha visto también que estos sistemas pueden contribuir a mantener la estabilidad de los fármacos por ejemplo al protegerlos de la oxidación e hidrólisis enzimática (Kumar Jha, Dey & Karki, 2011).

Científicos de China lograron disminuir la producción de glicoles derivada de la hidrólisis del cloranfenicol (fármaco utilizado para tratar la queratitis en el ojo), al incorporar el fármaco en una microemulsión (Lv, Zheng & Tung, 2005).

La mejora en la estabilidad del fármaco también se ha visto en otras vías distintas a la ocular. En Suiza se realizó un estudio con un inmunosupresor utilizado para evitar el rechazo de trasplantes. El péptido ciclosporina ha representado un reto para su formulación dirigida a la vía oral por la cual se absorbe sólo el 30% de la dosis administrada (Drewe *et al.*, 1992). El reto que implica formular este tipo de fármacos radica en su composición por tratarse de aminoácidos pues sufren alteraciones en sus cargas dependiendo de su pKa y el pH del medio en el que se encuentren; sea ácido, como es el estómago, o básico como lo es el intestino. Estos cambios en el pH pueden tener un impacto en cómo se absorbe el ingrediente activo aumentándolo o disminuyéndolo, según sea el caso. Adicionalmente, en el tracto gastrointestinal se encuentran enzimas proteolíticas, lo cual evita que la mayor concentración de fármaco llegue a circulación sanguínea (biodisponibilidad), siendo un inconveniente para alcanzar la dosis terapéutica. Si bien se considera que la ciclosporina es resistente a la proteólisis (Sarciaux, Acar & Sado, 1995), se ve limitada su absorción en el tracto gastrointestinal. Drewe y colaboradores obtuvieron un incremento significativo en los parámetros farmacocinéticos (área bajo la curva, tiempo y concentración máxima), al incluir el fármaco en una microemulsión aceite en agua, que a su vez estaba dispuesta en una cápsula de gelatina dura. Esta formulación fue comparada contra una cápsula de gelatina blanda (producto comercial). Los resultados no sólo reflejan la ventaja del incremento o mejora observable de la biodisponibilidad tras el uso de microemulsiones, sino que adicional a ello, muestra de manera indirecta que se mantuvo la estabilidad del fármaco durante su ciclo de vida en el organismo. Cabe mencionar que el estudio fue realizado en 12 voluntarios sanos (Drewe *et al.*, 1992).

No sólo se ha observado que es posible preservar la estabilidad del fármaco con las microemulsiones, sino que también, el preparado presenta estabilidad a largo del tiempo

por la estabilidad termodinámica del sistema; la cual está asociada a la baja energía libre de Gibbs de formación comparada con la energía de los ingredientes estando en contacto entre sí, sin sustancias tensoactivas. (Talegaonkar *et al.*, 2008). Los surfactantes están relacionados con la estabilidad termodinámica de las MEs dado que, al rodear los glóbulos o gotas de la fase interna, disminuyen el contacto entre ellas evitando que se agreguen y se presente el fenómeno de coalescencia (Ibrahim, 2019).

Científicos de la India realizaron pruebas de estabilidad a las seis formulaciones de microemulsiones que elaboraron con diferentes proporciones de bromofenaco (fármaco antiinflamatorio), ácido oléico (fase oleosa), mezcla de poloxámero (tensoactivo) con propilenglicol (cotensoactivo) y solución amortiguadora de fosfatos (fase acuosa). Estas pruebas consistieron en congelar las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, después cambiaron la temperatura a  $25^{\circ}\text{C}$ , repitieron el procedimiento 6 veces. Posteriormente centrifugaron a 5000 rpm (revoluciones por minuto) durante una hora. De las seis formulaciones dos fueron estables (Yadav & Khatri, 2012).

Por otra parte, Üstündag-Okur y colaboradores, realizaron dos estudios de estabilidad. El primer estudio consistía en almacenar los dos sistemas de microemulsiones cargados con ofloxacino a temperaturas de  $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante doce meses. En el segundo centrifugaron las muestras a 12,000 rpm a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Para ambas pruebas resultó que las formulaciones eran estables. Cabe mencionar que en la primera prueba midieron durante doce meses los parámetros con los cuales caracterizaron los preparados, tales como tamaño de partícula, conductividad eléctrica, pH, viscosidad, índice de refracción, contenido del fármaco y separación de fases. Realizaron la prueba estadística Tukey y no se obtuvieron diferencias significativas (Üstündag-Okur *et al.*, 2014).

### 5.3.1.2 Incremento en la disolución de fármacos de baja solubilidad

Para desarrollar un medicamento, los aspectos principales a tomar en cuenta son las propiedades fisicoquímicas del fármaco. Una de ellas es la solubilidad, la cual es una constante intrínseca que expresa la cantidad de un soluto que puede ser dispersado en otro compuesto (solvente) hasta tener una mezcla homogénea al equilibrio en condiciones de temperatura y presión dadas (Farfán Álvarez, 2019). Esta propiedad tiene un impacto importante en la biodisponibilidad (cantidad de fármaco disponible en su lugar de acción) (Prieto Calvo, 2012) debido a que se requiere la disolución del fármaco para ejecutar su efecto terapéutico. Los medios de disolución son los fluidos biológicos, como la sangre o el humor de la cavidad anterior, los cuales son acuosos.

En los años de 1980 e inicios de los noventa la mayoría de los compuestos eran considerados como poco solubles, ya que presentaban valores entre 10 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A partir de los años 2000 la solubilidad de los compuestos se ha encontrado entre 1 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , incluso menos de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Krishna & Yu, 2008).

El interés por estudiar la disolución de los fármacos ha estado fuertemente enfocado en la vía oral. Incluso se crearon clasificaciones para las moléculas que presentaran ciertas características, tal como el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica o BCS por sus siglas en inglés. Este fue publicado por Amidon y colaboradores en 1995. Se basa en la solubilidad acuosa y la permeabilidad intestinal de los ingredientes activos (Dokoumetzidis & Macheras, 2006). Consta de cuatro clases las cuales se encuentran representadas en la Figura 20. La primera clase se refiere a los ingredientes altamente solubles y permeables; la segunda de baja solubilidad y alta permeabilidad; la tercera de alta solubilidad y baja permeabilidad; y la cuarta de baja solubilidad y permeabilidad.

## Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

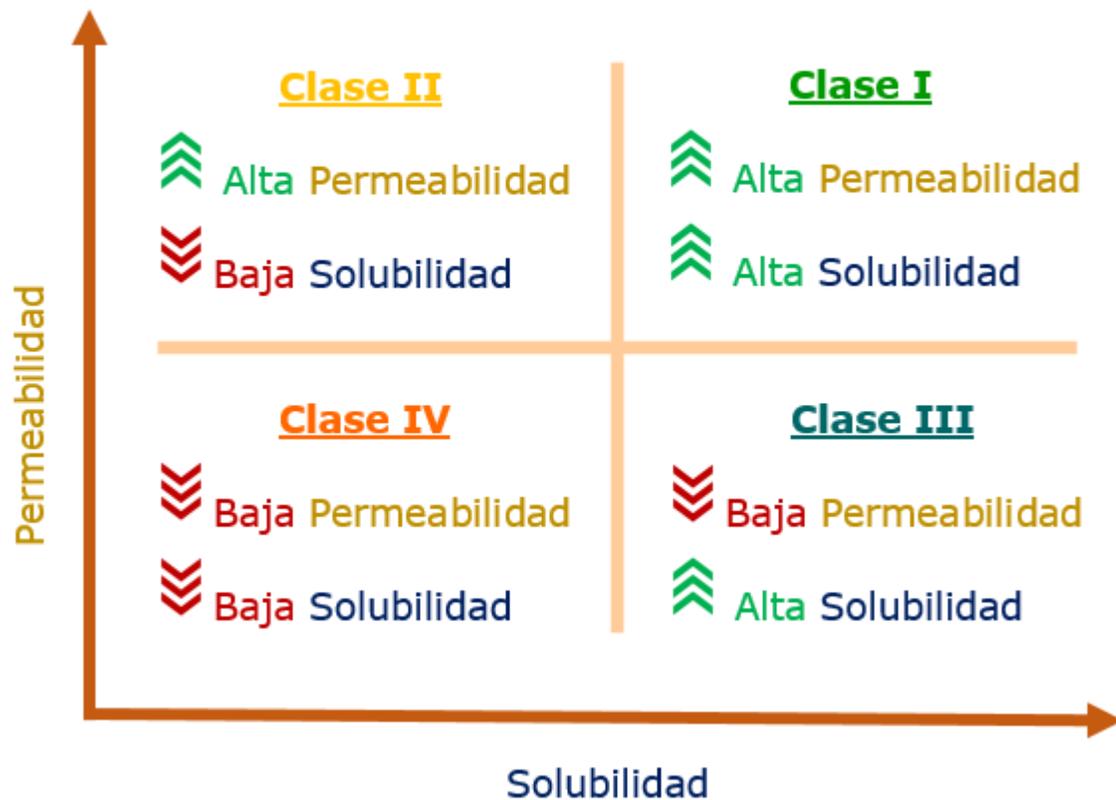


Figura 20. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

En el caso del ojo, se tienen una serie de barreras fisiológicas que limitan la absorción del fármaco. La permanencia sobre la superficie ocular se ve disminuida por la presencia de la película lagrimal que se restaura en un tiempo de 2 a 3 minutos, así como la lacrimación refleja que se produce en respuesta a un estímulo físico que promueven la dilución y eliminación del ingrediente activo en el sitio de aplicación (García Lopez, 2002). Adicionalmente, el parpadeo y la exposición al conducto nasolagrimal limita y reduce la absorción del fármaco. Posteriormente, se encuentran estructuras como la córnea que cuenta con capas que asemejan un emparedado con "tapas" aptas para moléculas

liposolubles y un interior para aquellas hidrosolubles lo cual complica la difusión de las moléculas a través de ella.

Dependiendo del tamaño de la partícula y su afinidad al agua, el fármaco se conducirá por una ruta diferente. En caso de ser pequeños y lipofílicos la primaria sería la transcorneal, mientras que la ruta transconjuntival es más adecuada para moléculas hidrofílicas de pesos o tamaños moleculares mayores (Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, 2011).

Si bien la solubilidad es un inconveniente en común tanto para la vía ocular como para otras, las microemulsiones han resultado una alternativa para formular fármacos que presenten un reto por su escasa capacidad de disolución.

En India, científicos de la Universidad de Nirma estudiaron la liberación de un antiemético (domperidona) de clasificación biofarmacéutica II (alta permeabilidad y baja solubilidad). Una vez que diseñaron las MEs y optimizaron la formulación, solidificaron el preparado y lo incluyeron en cápsulas, compararon los perfiles de disolución contra el producto Domcolic (tabletas) y el fármaco puro. De manera gráfica se observa que el perfil de disolución del preparado con ME libera mayor cantidad de fármaco en menor tiempo, sin embargo, no lo comparan de manera estadística (Laddha, Suthar & Butani, 2014), para ello debieron incluir el preparado de microemulsiones en una tableta y realizar el perfil de disolución.

Por otro lado, en Corea del Sur elaboraron microemulsiones con Flurbiprofeno, un fármaco analgésico antiinflamatorio, el cual es poco soluble en agua (0.012 mg/mL), y cuenta con una solubilidad en solución amortiguadora de fosfatos de 1.25 mg/mL. Las formulaciones fueron creadas para vía parenteral. En el año de 1999, existía una emulsión para esta vía, pero con la molécula acetilada. En esta publicación se usa la que no cuenta con esta modificación química. Los preparados conteniendo oleato de etilo y Tween 20 permitieron

que se solubilizara el fármaco hasta 10 mg/mL. Este valor es considerablemente mayor si se compara con la solubilidad intrínseca del Flurbiprofeno en agua y en solución amortiguadora de fosfatos (Park & Kim, 1999).

La capacidad de las microemulsiones de mejorar la disolución de los fármacos se le atribuye a su estructura conformada por monómeros de sustancias tensoactivas con un centro hidrófobo (si contiene a la fase oleosa), o hidrofílico (si contiene a la fase acuosa); el cual permite albergar moléculas de fármaco poco hidrosolubles o hidrosolubles, respectivamente (Ibrahim, 2019). Aunado a ello, se ha visto que la propiedad de las MEs tanto para mejorar la disolución de fármacos de baja solubilidad, como para proveer una capacidad de carga adecuada para contener incluso péptidos (ciclosporina A) y proteínas (insulina para vía oral), se debe a la región donde se incluyen los principios activos en el sistema coloidal (Narang, Delmarre & Gao, 2007).

Como se mencionaba antes, las micelas y las microemulsiones no son exactamente lo mismo, pero tienen algunas similitudes. Son diferentes en que la micela se puede formar al estar en contacto con una sola fase, en la cual, al rebasarse la concentración micelar crítica los monómeros de tensoactivo se agregan y orientan sus cabezas con grupos hidrofílicos hacia el exterior (si el solvente es polar) y las colas de compuestos hidrocarbonados hacia el interior de la estructura, dando como resultado un conglomerado de tensoactivos con un exterior hidrofílico y un centro hidrofóbico. Por el contrario, las microemulsiones se forman al estar en contacto con una fase oleosa y una acuosa, donde pequeñas porciones de la fase dispersa, quedan rodeadas de tensoactivos y cotensoactivos además de la fase continua. Como resultado, el interior en una microemulsión aceite en agua, no sólo contiene tensoactivos y cotensoactivos, sino que, además contiene una porción de fase oleosa.

De manera general, las micelas y las MEs se asemejan en que están conformadas por sustancias tensoactivas agrupadas y organizadas dando estructuras con regiones hidrofílicas e hidrofóbicas. Es por ello por lo que, los sitios de inclusión de fármacos en las micelas podrían ser semejantes en las microemulsiones. Suratkar y Mahapatra mencionan en su publicación *Solubilization Site of Organic Perfume Molecules in Sodium Dodecyl Sulfate Micelles: New Insights from Proton NMR Studies*, los sitios donde puede solubilizarse un compuesto dentro de las micelas de dodecilsulfato de sodio (SDS) en agua (Suratkar & Mahapatra, 2000), los cuales posiblemente se pueden extrapolar a las microemulsiones y así darse una idea sobre donde puede ubicarse el fármaco dentro de las microemulsiones. Entonces, los posibles sitios de inclusión de fármacos dentro del sistema de la microemulsión se representan en la Figura 21 y se mencionan a continuación.

- A) Entre los grupos funcionales de las cabezas hidrofílicas de las sustancias tensoactivas.
- B) En la interfase, entre las cabezas y colas de los tensoactivos y cotensoactivos
- C) Entre las cadenas hidrocarbonadas de las sustancias tensoactivas.
- D) En la fase dispersa (en este caso oleosa) de la microemulsión.

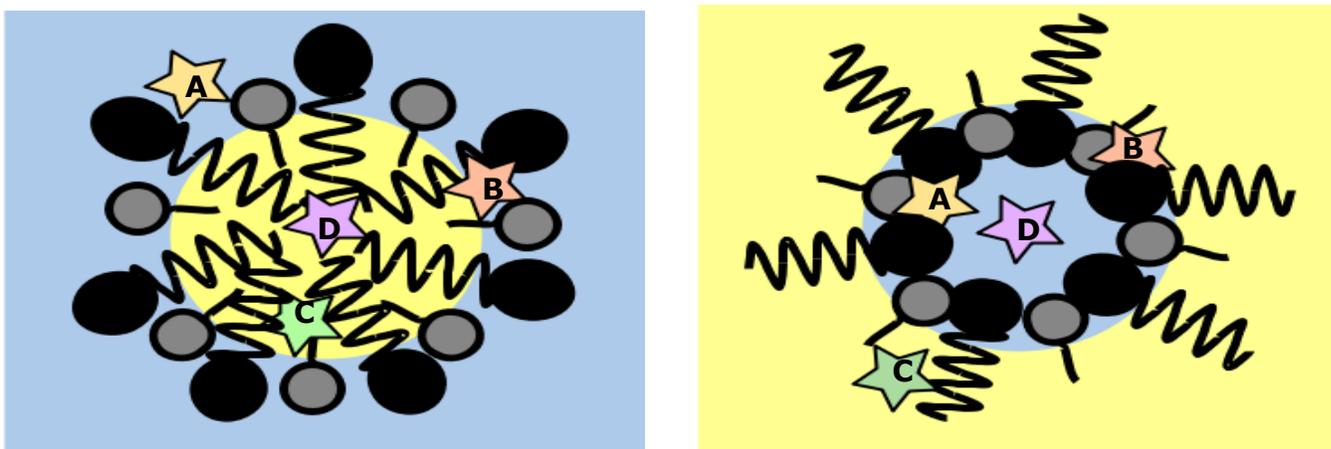


Figura 21. Posible localización del fármaco en el sistema de microemulsión

Si bien aún no se encuentran publicados en la literatura todos los posibles sitios donde se localiza el fármaco en las MEs al solubilizarse, existen un estudio publicado por Feng-Feng Lv y colaboradores en el cual, además de investigar el uso de las microemulsiones para mejorar la estabilidad del cloranfenicol (fármaco usado para tratar infecciones oculares), buscaban conocer donde se incluía el fármaco en el sistema de microemulsión. Para ello, utilizaron la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno ( $\text{RMN}^1\text{H}$ ). Con ella obtuvieron la diferencia en el desplazamiento químico de los hidrógenos de los metilenos de los tensoactivos Span 80 y Tween 80 antes y después de agregar cloranfenicol a la formulación. Únicamente aquellos localizados en grupo oxietileno  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$  y en el metileno cercano al éter, mostraron una diferencia importante en el desplazamiento químico, el cual se movió campo arriba para el oxietileno mientras que campo abajo para el metileno mencionado. Se sabe que el anillo de benceno (como el que posee el cloranfenicol) provoca un efecto de apantallamiento a los hidrógenos vecinos o cercanos. Esto se observa en el espectro como una señal menos intensa con desplazamiento campo arriba (de menor energía), como ocurre con el oxietileno. Por otro lado, el grupo nitro atrae la densidad electrónica hacia sí, provocando que el desplazamiento químico de los hidrógenos cercanos se mueva campo abajo (de mayor energía). Con estos resultados, los autores concluyeron que el fármaco se encontraba ubicado en la sección hidrofílica de la microemulsión conformada por los grupos de la cabeza polar de los tensoactivos Span 80 y Tween 80. El grupo nitro del cloranfenicol (principio activo) se localizaría cerca del metileno aledaño al éter de los tensoactivos; mientras que el anillo de benceno (también del cloranfenicol) se encontraba cerca al grupo oxietileno (F. F. Lv, Zheng & Tung, 2005). En la Figura 22 se ilustra la posible disposición espacial de los tensoactivos en presencia del cloranfenicol.

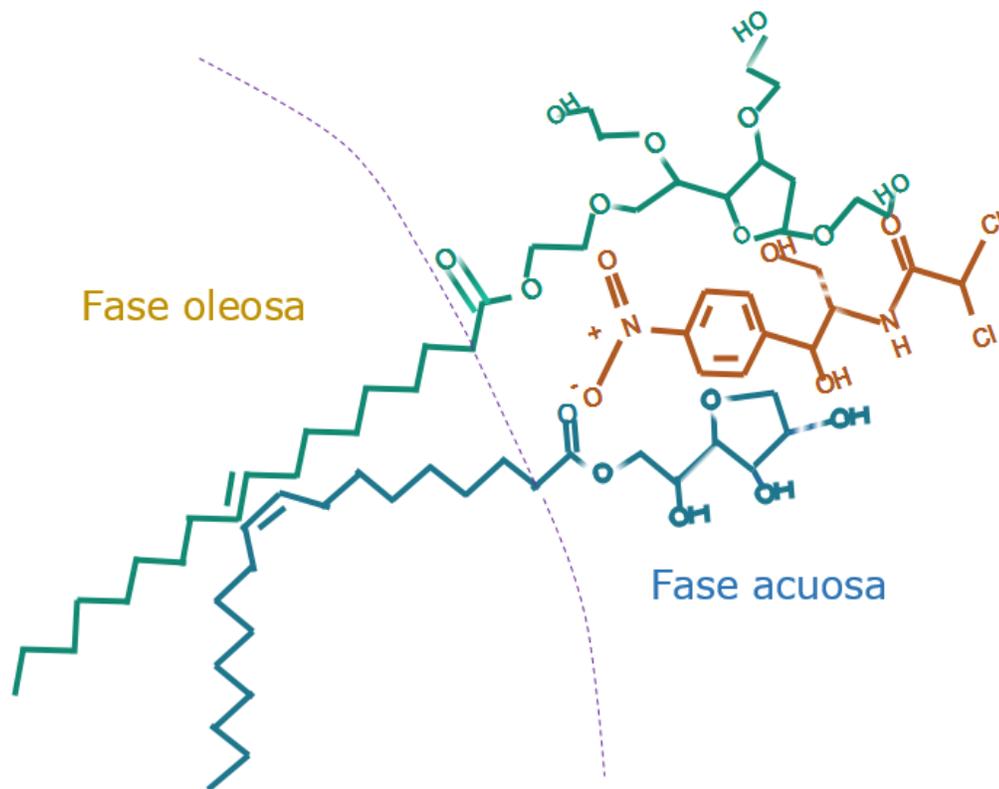


Figura 22. Posible disposición espacial del cloranfenicol en una microemulsión aceite en agua. Las moléculas que se representan son Tween 80 en verde, Span 80 en azul y cloranfenicol en naranja.

La Resonancia Magnética Nuclear no ha sido la única técnica para estudiar la posición del fármaco en las microemulsiones. En la publicación *Lyophilized Lecithin Based Oil-Water Microemulsion as a New and Low Toxic Delivery System for Amphotericin B*, Moreno y colaboradores utilizaron espectrofotometría de luz Ultravioleta-Visible (UV) para estudiar la inclusión de Anfotericina B, un fármaco poco soluble en agua con acción fungicida, en una microemulsión aceite en agua. En ese estudio además de estudiar los efectos toxicológicos de la formulación y compararlos contra una formulación parenteral comercial; también buscaron conocer la ubicación del fármaco dentro del sistema. Para ello utilizaron de apoyo estudios de coeficiente de partición entre la fase acuosa y la oleosa puesto que, les daba una idea de la preferencia del fármaco hacia cada fase. El resultado que obtuvieron (1.45

$\pm 0.08$ ) indicaba una preferencia similar de la Anfotericina B tanto por la fase acuosa como la oleosa. Con ello se puede inferir que el fármaco podría situarse entre estas fases, como ocurre con los tensoactivos. Con la espectrometría de UV verificaron esta hipótesis.

Se sabe que a altas concentraciones las moléculas de anfotericina B se auto asocian, por lo que las bandas que se observan normalmente alrededor de los 400 nm son reemplazadas por bandas a los 420, 320, 340 y 385 nm de longitud de onda. Estas bandas son características de los cambios en el estado molecular de la anfotericina B debido a agregación. En los resultados del estudio de UV visible de la ME en vez de obtener la banda a los 420 nm, obtuvieron una a los 413 la cual es característica de los complejos de anfotericina con la lecitina (tensoactivo) de la microemulsión. Es así como los autores indican que es altamente probable que el fármaco se encuentre en la interfase, formando un complejo con la lecitina (Moreno, Frutos and Ballesteros, 2001).

Gracias a estas publicaciones, se tiene cierta información sobre las regiones de solubilización del fármaco en la microemulsión así como cierta evidencia de su efecto en la solubilidad de estos ingredientes. Sin embargo, es un terreno que aún podría explorarse más.

En la literatura se ha encontrado que el sitio donde se incluya el fármaco dentro del sistema de microemulsión depende de los grupos hidrofóbicos, de la forma tanto de los tensoactivos como de las moléculas de fármaco (Narang, Delmarre & Gao, 2007), así como de su solubilidad y afinidad por cada componente en la formulación (Moreno, Frutos and Ballesteros, 2001).

Por otro lado otro, se ha visto que otro factor relacionado a la solubilidad y que influye en la disolución del fármaco, es el tamaño nanométrico de las MEs, el cual contribuye a mejorar

la velocidad de disolución dado el incremento del área de contacto entre los glóbulos (estabilizados por agentes tensoactivos) y el medio (Ibrahim, 2019).

#### 5.3.1.3 Incremento de la permeabilidad.

La permeabilidad es la velocidad del paso de una molécula a través de una membrana o barrera biológica. Esta depende de la composición de la membrana, la expresión de transportadores o la estrechez de las uniones intercelulares (Kerns & Di, 2008). Este concepto está fuertemente ligado a la biodisponibilidad (Ibrahim, 2019) ya que es el paso intermedio entre la aplicación del preparado y la distribución del fármaco hacia el sitio blanco para ejercer el efecto terapéutico.

Como ya se ha comentado anteriormente, el ojo presenta una fisiología y anatomía particular que regula y limita la permeabilidad de los fármacos a través de este. Para tales fines, los colirios los cuales son utilizados en un 90% de las formulaciones oftálmicas, se ven en desventaja puesto que tras su aplicación, sólo aproximadamente el 5% del fármaco penetra el epitelio corneal y el resto llega a circulación sistémica; lo cual aumenta la probabilidad de que el paciente presente reacciones adversas (Li *et al.*, 2007). Conociendo estos datos, los investigadores han buscado soluciones a través de las microemulsiones como sistema de liberación.

En el caso del antibiótico ofloxacino, indicado para el tratamiento de queratitis bacteriana, Üstündag-Okur y colaboradores elaboraron dos formulaciones con este ingrediente activo, M1OFX y M2OFX. Los sistemas estaban compuestos por ácido oleico (fase oleosa), Tween 80 (tensoactivo), Etanol (cotensoactivo), Agua destilada (fase acuosa) y solución de NaOH 0.5 N (para ajustar el pH). Adicionalmente, una de ellas (M2OFX) contenía lactato de oligosacárido de quitosano.

En una celda de difusión de Franz probaron las formulaciones utilizando córnea de conejo en vez de una membrana. Los resultados derivados de este estudio fueron porcentajes de permeación donde la formulación M1OFX obtuvo el mayor porcentaje ( $4.421 \pm 0.530\%$ ), por otro lado, la formulación comercial obtuvo el valor de  $2.988 \pm 0.061\%$ . Adicional a ello, obtuvieron el porcentaje de penetración haciendo un proceso de digestión a la córnea. El valor más alto de penetración lo obtuvo también la formulación M1OFX ( $35.767 \pm 2.531\%$ ); este fue incluso el doble en comparación al porcentaje obtenido para la formulación comercial ( $18.843 \pm 1.885\%$ ). Cabe aclarar que la permeación está relacionada al paso del fármaco a través de la córnea desde el sitio de aplicación hasta el medio receptor; mientras que la penetración no necesariamente conlleva a la salida del fármaco fuera de la córnea. Adicionalmente, es importante mencionar que la formulación M1OFX presentó un tamaño de gota promedio de  $4.563 \pm 0.192$  nm (Üstündag-Okur *et al.*, 2014). Por otro lado, los autores relacionan el incremento de la permeabilidad (permeación y penetración) con el tiempo de permanencia en la superficie ocular del fármaco, el cual fue de 40 min para las microemulsiones y de 5 minutos para la solución comercial.

Por otro lado, Shaul Muchtar y colaboradores estudiaron la permeabilidad de la indometacina usando microemulsiones. Este fármaco dispuesto en colirios ha sido empleado para reducir la inflamación post operatoria tras el tratamiento quirúrgico de cataratas. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes como irritación, dolor local y baja biodisponibilidad. Esta última se relaciona con la absorción y permeabilidad. En su publicación también reportan haber realizado un estudio de permeabilidad en córnea de conejos del cual obtuvieron un coeficiente de permeabilidad aparente 3.8 veces más grande en comparación con una solución comercial. Este resultado se lo atribuyen a que el preparado cubría una mayor superficie de contacto con el ojo derivado del tamaño de

partícula en el orden de los nanómetros que este presenta. Para obtener el coeficiente de permeabilidad graficaron la cantidad de fármaco permeado contra el tiempo, obtuvieron la pendiente de la parte lineal del gráfico y utilizaron la siguiente ecuación (Muchtar *et al.*, 1996):

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \times \frac{1}{[60 \times A \times C_0]}$$

Donde  $\frac{\Delta Q}{\Delta t}$  es la porción lineal de la pendiente [ $\mu\text{g}/\text{min}$ ], 60 es el equivalente en segundos de un minuto,  $A$  es el área de la superficie corneal para ese estudio ( $0.196 \text{ cm}^2$ ) y  $C_0$  es la concentración inicial de fármaco [ $\text{mg}/\text{cm}^3$ ] (Muchtar *et al.*, 1996).

Una de las razones por las cuales se ha visto un incremento en la permeabilidad del fármaco al utilizar MEs está relacionado a los tensoactivos que las conforman. Se indica en la literatura que estas sustancias tensoactivas poseen la capacidad de potenciar la permeación. Se sugieren varias teorías posibles de cómo sucede esto. La primera indica que algunas moléculas tienen efectos al inhibir la expresión de la Glicoproteína P, la cual es un canal de eflujo sobre la bicapa lipídica de la membrana celular de la córnea y el epitelio pigmentado de la retina (Ibrahim, 2019); funciona como una bomba que expulsa los fármacos del interior de las células tras la hidrólisis del Adenosin trifosfato (ATP) (Ruíz Gómez, Souviron Rodríguez & Martínez Morillo, 2002). Se sabe que tensoactivos como los poloxámeros, polisorbatos, ésteres de sorbitan (Spans), éteres de polietilenglicol (Cremophor) y la vitamina E TPGS (succinato D-alfa-tocoferil polietilenglicol) tienen la capacidad de inhibir dicha glicoproteína. La segunda, sugiere la interrupción de los complejos de uniones estrechas para facilitar el transporte paracelular de los fármacos, es decir, entre célula y célula. Por otra parte, una tercera sugiere que los tensoactivos modifican las propiedades físicas de la membrana celular al incorporarse en la bicapa lipídica permitiendo

la penetración de fármaco desde el preparado. Una cuarta teoría hace referencia a la posibilidad de que la bicapa lipídica se sature con micelas. Esto provocaría que se solubilicen los componentes que conforman la bicapa, por lo que se removerían los fosfolípidos por medio de las micelas. Finalmente, esto desacoplaría la bicapa lipídica de la membrana celular (Ibrahim, 2019).

Se ha visto que al incorporar al fármaco en microemulsiones se facilita la penetración hacia las estructuras del ojo, tales como la córnea. El sistema coloidal *per se* cuenta con un tamaño (10 a 100 nm) y una organización estructural única en sus fases que contribuyen a una mayor permeación a través de la córnea; adicional a ello este arreglo en sus fases podría contribuir a contar con regiones adicionales donde solubilizar el fármaco incrementando la capacidad de carga de las MEs. Estas características les confieren ventajas importantes frente a los colirios (Üstündag-Okur *et al.*, 2014).

#### 5.3.1.4 Liberación Controlada

La alta frecuencia en la administración de los fármacos para vía ocular representa un factor que disminuye la adherencia de los pacientes al tratamiento (Habib, El-Mahdy & Maher, 2011). Dependiendo el padecimiento, la aplicación tópica de los productos oftálmicos se encuentra entre 1 y 6 horas. Esto implica que el paciente deba estar pendiente de aplicarse el medicamento e interrumpir sus actividades cotidianas para cumplir con el tratamiento.

Las formas farmacéuticas de liberación inmediata o convencionales, como los ungüentos, suspensiones y colirios; están diseñadas para liberar cierta concentración de fármaco durante cierto tiempo. La administración repetida del preparado implica una fluctuación de la concentración entre una aplicación y otra (Wilson *et al.*, 2012). Por el lado contrario, la liberación controlada se refiere a la salida de una cantidad de fármaco constante a partir la

forma farmacéutica (Llera-Rojas, 2018) a una velocidad deseada, por un periodo de tiempo específico. La velocidad de la liberación influye en el proceso de absorción lo cual puede alargar el periodo en el que se obtiene el efecto terapéutico (Shargel & Yu, 2016). Una sub categoría es la acción sostenida, en la cual el fármaco se libera con el propósito de que la absorción sea constante; de tal manera que las concentraciones en la matriz biológica tengan menos variaciones a través del tiempo (Servicio Navarro de Salud, 2005) y se mantengan dentro de la ventana terapéutica, es decir, entre la dosis mínima para obtener el efecto terapéutico y la máxima antes de producir efectos no deseados (Wilson *et al.*, 2012).

En la literatura se considera que las microemulsiones son nanoacarreadores capaces de prolongar la liberación de los fármacos y con ello disminuir la tasa de aplicación de los mismos (Ligório Fialho & da Silva-Cunha, 2004) A continuación se citan algunos ejemplos.

Como se mencionaba en apartados anteriores, científicos de Turquía elaboraron dos formulaciones de microemulsiones de ofloxacino. Realizaron estudios de liberación en bolsa de diálisis. La formulación M2OFX que contenía un compuesto de quitosano mostró una liberación más lenta en comparación con la que no lo contenía (M1OFX). Los autores se lo atribuyen a la viscosidad del preparado ( $90.01 \pm 0.011$  cP) que fue casi tres veces más grande que la formulación sin quitosano (Üstündag-Okur *et al.*, 2014).

En la India Bharti y Kesavan desarrollaron microemulsiones compuestas de Tween 80 y Span 20 como agentes tensoactivos; miristato de isopropilo como fase oleosa; y solución amortiguadora de acetatos como fase acuosa. El sistema también contenía moxifloxacino como principio activo, fármaco indicado para la queratitis bacteriana. Al finalizar los diferentes estudios que realizaron concluyeron que las MEs son una alternativa a los colirios

convencionales dada su habilidad de potenciar la biodisponibilidad así como mostrar una liberación sostenida y un tiempo de residencia pre corneal más largo (Bharti and Kesavan, 2017).

Científicas Italianas obtuvieron sistemas MEs a partir de una mezcla de lecitina (tensoactivo), 1-butanol (cotensoactivo), solución amortiguadora isotónica de fosfatos, miristato de isopropilo (fase oleosa) y timolol como principio activo; indicado para el tratamiento del glaucoma. Realizaron un estudio en conejos en el cual administraban a un grupo 3 gotas del preparado coloidal cada 4 minutos y a otro grupo la misma dosis y frecuencia, pero de una solución con timolol. Tomaron alícuotas del humor acuoso a los 5, 15, 25, 30, 40, 60, 90 y 120 minutos. Las muestras se cuantificaron por cromatografía en capa fina. En los gráficos y resultados, se muestra la presencia del fármaco liberado a partir de la ME aún transcurridos 120 minutos; mientras que con la solución acuosa se dejó de detectar el timolol a partir del minuto 90. Cabe señalar que la concentración absorbida con las microemulsiones fue considerablemente mayor respecto a la solución acuosa (Gasco *et al.*, 1989).

En Alemania, investigadores realizaron estudios de liberación *in vitro* con un equipo de diálisis. En sus resultados muestran una gráfica donde se observa el perfil de liberación semejante al de una acción prolongada. Cabe mencionar que sus sistemas MEs estaban compuestos por lecitina y macrogol 1500 (tensoactivos), polietilenglicol 200 y propilenglicol (cotensoactivos); miristato de isopropilo como fase oleosa y agua bidestilada como fase acuosa (Habe & Keipert, 1997).

De acuerdo con las publicaciones referenciadas, se sabe que las microemulsiones tienen la propiedad de liberar el fármaco de tal manera que permita su absorción constante, por lo

cual podría adecuarse el preparado y aprovechar la liberación controlada del principio activo. Adicionalmente podrían realizarse investigaciones para optimizar estos sistemas con la finalidad de no sólo obtener perfiles de liberación controlada que soporten su uso como una forma farmacéutica propia de dicho tipo de liberación, sino que además se apliquen para disminuir la frecuencia de administración.

#### 5.3.1.5 Tamaño de partícula o glóbulo

Cabe señalar que las microemulsiones se caracterizan por ser sistemas visiblemente translúcidos, inclusive algunos autores también los catalogan como transparentes. Esta particularidad es consecuencia de su tamaño de partícula (10 a 100 nm) puesto que es mucho menor en comparación con la longitud de onda de la luz visible (400 a 700 nm) (Benita, 2005). Esta característica óptica reduce la discapacidad visual tras la aplicación del preparado, lo cual permite una mejor adherencia al tratamiento (Ibrahim, 2019). Esta es una ventaja importante frente a los ungüentos, los cuales son generalmente aplicados en la noche dado que pueden causar visión borrosa (Baranowski, Bozena Karolewicz, *et al.*, 2014).

Aunado a ello, en la literatura también se relaciona al tamaño de glóbulo o partícula con una mejor adherencia a las membranas (Talegaonkar *et al.*, 2008). Se considera que un tamaño de partícula en el orden de los nanómetros posibilita la penetración en la córnea (Üstündag-Okur *et al.*, 2014), lo cual es uno de los mayores retos para mejorar la absorción y consecuentemente la biodisponibilidad del fármaco.

Por otra parte, se ha establecido que para evitar la irritación ocular los sistemas nano particulados pueden poseer un tamaño de partícula incluso mayor a 10 µm. En este sentido,

el tamaño característico de las microemulsiones (entre 10 y 100 nm), contribuye a la tolerabilidad y seguridad del preparado (Ibrahim, 2019).

#### 5.3.1.6 Ventajas sobre Formas Farmacéuticas convencionales

Los investigadores usualmente comparan la permeabilidad y biodisponibilidad entre las microemulsiones y colirios oftálmicos. La mayoría realizan estudios *in vitro* por el método de diálisis. La biodisponibilidad es la ventaja más reportada en la literatura, sin embargo, no es la única. A continuación, se mencionan algunos ejemplos.

Ligório y da Silva compararon los parámetros farmacocinéticos de tiempo y concentración máxima, y área bajo la curva de la microemulsión contra una suspensión oftálmica comercial por medio de la administración de los preparados en los ojos de conejos blancos Nueva Zelanda. Tras realizar la prueba estadística *t* encontraron diferencias significativas. Los valores de área bajo la curva y concentración la microemulsión son dos veces mayores a los obtenidos con la forma farmacéutica convencional. Por otro lado, el tiempo máximo ( $T_{max}$ ) se vio reducido a la mitad (30 min.) (Ligório Fialho & da Silva-Cunha, 2004). Estos resultados se traducen no sólo en un paso más rápido del fármaco a través de las estructuras oculares sino también en mayor cantidad; por lo cual se obtuvo una  $T_{max}$  menor, así como una concentración mayor de fármaco administrado disponible, respectivamente. El área bajo la curva indica una mayor biodisponibilidad. La literatura indica que se logra obtener el efecto antiinflamatorio con dexametasona sin toxicidad hasta los 200  $\mu g/mL$ . En este artículo se demuestra la ventaja de emplear microemulsiones como forma farmacéutica sobre una suspensión oftálmica convencional.

Como se mencionaba en el apartado sobre liberación controlada, Habe y Keipert incorporaron hidrocloreto de pilocarpina, fármaco que comúnmente es indicado para el tratamiento del glaucoma (Goodman and Gilman, 1996) en microemulsiones. Es importante aclarar que los autores no tenían como objetivo estudiar sus efectos para tratamiento del glaucoma. Ellos realizaron un estudio para observar uno de los efectos farmacológico de la pilocarpina, la miosis (contracción de la pupila) resultante posterior a la administración de pilocarpina en conejos. Sus resultados revelan que la biodisponibilidad utilizando microemulsiones fue significativamente mayor en comparación con una solución acuosa de este fármaco (Habe and Keipert, 1997).

Por otro lado, Lv, Zheng y Tung de China, estudiaron el comportamiento en la estabilidad del cloranfenicol en microemulsiones aceite en agua elaboradas con Span y Tween 20 y 80, n-butanol, miristato y palmitato de isopropilo y agua bidestilada. Este principio activo se caracteriza por su baja solubilidad en agua y por ser fácilmente hidrolizable, lo que promueve la formación de glicoles. En los colirios convencionales se encuentran una gran cantidad de estas sustancias y consecuentemente menor concentración de fármaco. Utilizaron el método de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC por sus siglas en inglés) para cuantificar el porcentaje de glicoles en dos formulaciones de microemulsiones y en un colirio comercial. Los resultados señalan una considerable disminución de la presencia de glicoles en los preparados de microemulsiones en comparación con el colirio. Los autores se lo atribuyen a la inserción del fármaco en la estructura de los glóbulos ya que este cuenta con grupos hidrófilos (hidroxilo y grupo nitro) e hidrófobos (fenilo) como los tensoactivos, lo que favorece su interacción molecular con las sustancias tensoactivas (Lv, Zheng & Tung, 2005).

En este caso, un sistema coloidal como las microemulsiones permitieron dar solución a un problema de estabilidad del fármaco al prevenir su hidrólisis. De alguna manera se vio "protegido" por la estructura y composición de la fase oleosa que caracteriza a estos sistemas. Es posible que si se utilizara esta tecnología en un colirio de cloranfenicol se tendría mayor seguridad de que las concentraciones en el preparado serán suficientes cuando se le administre el medicamento al paciente en un momento dado o meses después de la fabricación del medicamento, sin que haya una disminución importante en la cantidad de fármaco disponible.

En Turquía, Üstündag-Okur y colaboradores, fabricaron microemulsiones cargadas con Ofloxacino. Este fármaco podía encontrarse en el mercado en la presentación de colirio (solución) conteniendo 0.3% de fármaco.

Dentro de los inconvenientes que afectaban al paciente y su adherencia terapéutica, se encontraba la alta frecuencia de administración. Siendo que para la queratitis bacteriana se administra el medicamento cada 2 a 4 horas; y cada 30 minutos para úlceras corneales. Esto está asociado al rápido "lavado" del preparado cuando se encuentra en la superficie ocular. Sumado a los cortos periodos de administración, la alta frecuencia de la aplicación se encuentra asociada a reacciones adversas como dolores de cabeza, disminución de la visión en espacios poco iluminados y pseudomiopía (Üstündag-Okur *et al.*, 2014).

Estos científicos concluyeron que las microemulsiones podrían ser ofrecidas como una estrategia prometedora para los fármacos dirigidos a las patologías oculares ya que obtuvieron mejores resultados en las pruebas donde compararon sus formulaciones MEs contra una solución comercial:

- A) En tiempo de retención del preparado, siendo de 40 minutos para las microemulsiones y de 5 minutos para la solución comercial.
- B) En un estudio compararon los tratamientos con el sistema ME y la solución comercial. Para ello, indujeron queratitis a los conejos inoculando la bacteria *Staphylococcus aureus*; posteriormente les aplicaron a los conejos 50  $\mu$ L (2 gotas) del preparado cada 12 horas por 24 horas, durante 7 días. Al finalizar el tratamiento se revisa el ojo tratado. En las fotografías se observa primero el ojo sin tratar el cual presenta la córnea totalmente opaca; enseguida se muestra el ojo que fue tratado con el preparado de microemulsiones donde prácticamente no se observan opacidades. También mencionan que obtuvo el menor puntaje de síntomas clínicos. Finalmente, el ojo tratado con el producto comercial después de 7 días de tratamiento aún muestra signos clínicos y una porción opaca en la córnea. La mejora se le atribuye al mayor tiempo de retención del preparado sobre la superficie ocular (Üstündag-Okur *et al.*, 2014).
- C) La viscosidad de sus formulaciones fue mayor en comparación con la solución comercial, lo cual permite una mayor permanencia del preparado sobre la superficie ocular.

En Italia, Gasco y Gallarte realizaron experimentos *in vivo* en conejos. En los resultados se observa que el tiempo de absorción del fármaco incluido en MEs es mayor en comparación con la solución; este se encuentra representado por una pendiente menos pronunciada en el gráfico de la concentración del ingrediente activo en función del tiempo. Adicionalmente, el área bajo la curva de las microemulsiones fue 3.5 veces mayor que el de la solución (Gasco *et al.*, 1989), lo cual refleja el potencial de las microemulsiones para mejorar la absorción y por ende en la biodisponibilidad del fármaco.

Con base en las publicaciones referenciadas, es posible notar que las microemulsiones permiten mitigar el corto tiempo de residencia en la superficie ocular; mejorar la absorción

y, consecuentemente, incrementar el área bajo la curva de los fármacos respecto a los colirios convencionales, sean soluciones o suspensiones.

#### 5.4 Desventajas

Se han recapitulado las características de las microemulsiones que las hacen una alternativa factible como tecnología o forma farmacéutica para los fármacos dirigidos a la terapia de padecimientos oculares. Sin embargo, en la literatura se han encontrado desventajas.

Las MEs son sensibles a la temperatura y fuerza iónica dada su composición con agentes tensoactivos (Callender *et al.*, 2017). La mayoría de estos agentes usados para vía oftálmica son no iónicos, por lo que el efecto en la salinidad del preparado no tendría tanta influencia en comparación con aquellos que sí lo son. Respecto a la temperatura, se sabe que la hidrofobicidad de los tensoactivos aumenta, al aumentar la temperatura, lo cual podría modificar la organización interna del sistema (Ibrahim, 2019).

Como se ha mencionado antes, las microemulsiones contienen una cantidad alta de tensoactivos (15-30%) lo cual aumenta el riesgo de presentar cierta toxicidad. Dentro de los tipos de tensoactivos, los catiónicos son los que presentan mayor toxicidad, seguidos de los aniónicos y por último los no iónicos, que se conocen por ser los que presentan menor toxicidad, los cuales son los más usados para los preparados oftálmicos (Rajpoot & Tekade, 2019). Por ello, es que se debe tener especial cuidado en seleccionarlos además de hacer las pruebas necesarias para verificar que la formulación sea lo menos irritante posible.

Otra desventaja es la posible inestabilidad del preparado al diluirlo. Para determinar el tamaño de partícula, morfología y superficie de los sistemas coloidales se utilizan métodos

de dispersión, los cuales requieren que se diluya la muestra, sin embargo, las microemulsiones tienen una composición definida y se asocia la dilución a modificar las proporciones de los ingredientes (Tadros, 2014). Por otro lado, en algunas publicaciones se ha reportado que mantienen su estabilidad a pesar de la adición de más fase extensa. Es importante tomar en cuenta que, en condiciones reales, si se aplicara el medicamento por vía tópica, este inevitablemente se vería diluido en la película lagrimal. Si este no mostró estabilidad al ser diluido en condiciones *in vitro*, no se tendría un antecedente que pronostique su estabilidad una vez administrado. El riesgo de no realizar esta prueba está relacionado a la saturación de la fase acuosa en una ME O/W con fármaco poco soluble, provocando que precipite (Benita, 2005) lo que consecuentemente evitaría su absorción y biodisponibilidad.

## 5.5 Fármacos incorporados a microemulsiones.

Se reportó en 2014 la existencia en el mercado una formulación de microemulsión oftálmica conteniendo Ciclosporina A (Üstündag-Okur *et al.*, 2014)

Por otro lado, han realizado numerosas investigaciones sobre las microemulsiones como sistemas de liberación como una alternativa a las formas farmacéuticas convencionales para la vía ocular, es de interés mencionar para qué fármacos se han realizado dichos estudios.

En la Tabla 2 se muestran los fármacos que se han incorporado en microemulsiones.

Tabla 2. Fármacos formulados en microemulsiones.

Fármaco	Indicación
Difluprednato (Baranowski, Bożena Karolewicz, <i>et al.</i> , 2014)	Inflamación y dolor asociado a procedimientos quirúrgicos
Ciclosporina A (Baranowski, Bożena Karolewicz, <i>et al.</i> , 2014)	Queratitis, Ojo Seco, Trasplante Corneal
Acetil Flurbirprobeno (Baranowski, Bożena Karolewicz, <i>et al.</i> , 2014)	Inflamación posoperatoria de cataratas
Profármaco de flurbirprofeno (Baranowski, Bożena Karolewicz, <i>et al.</i> , 2014)	Inflamación posoperatoria de cataratas

Ofloxacino (Üstündag-Okur <i>et al.</i> , 2014)	Queratitis Bacteriana
Timolol (Li <i>et al.</i> , 2007)	Glaucoma
Tacrolimus (Kumar and Sinha, 2014)	Profilaxis de rechazo en pacientes con trasplante de córnea. Profilaxis de rechazo en pacientes con trasplante de córnea
Everolimus	Inmunosupresor
Prednisolona (Kumar and Sinha, 2014)	Condiciones alérgicas e inflamatorias
Levobunolol (Gasco <i>et al.</i> , 1989)	Glaucoma
Prednisona (Benita, 2005)	Condiciones alérgicas e inflamatorias
Nitrofurazona (Benita, 2005)	Agente bactericida, desinfección de heridas.
Fenilbutazona (Benita, 2005)	Infección e Inflamación
Betametasona (Benita, 2005)	Inflamación
Menadiona (Benita, 2005)	Hemorragias Quirúrgicas y traumáticas
Atropina (Benita, 2005)	Infección e Inflamación
Cloranfenicol (Benita, 2005)	Antibiótico bacteriostático indicado para procesos

	infecciosos como conjuntivitis y queratitis
Indometacina (Benita, 2005)	Inflamación
Diclofenaco (Benita, 2005)	Inflamación por cirugía para tratar cataratas, queratomía radial, trabeculoplastía por laser
Pilocarpina (Benita, 2005)	Glaucoma
Moxifloxacino (Bharti and Kesavan, 2017)	Queratitis bacteriana
Vancomicina (Nair, Chakrapani and Kaza, 2012)	Conjuntivitis y blefaroconjuntivitis

## 5.6 Pruebas

### 5.6.1 Pruebas *in vivo*

Las pruebas que se realizan, además de caracterizar las propiedades de la formulación y comprobar su calidad, sirven en gran medida para determinar la seguridad del producto final. Lo cual es y debe ser de los aspectos más importantes tanto para las entidades regulatorias como para la industria farmacéutica y cosmética.

La importancia de verificar la seguridad de los medicamentos surge, desafortunadamente, de eventos en los que se ha dañado o puesto en riesgo la salud o vida de las personas. Tal es el caso de una mujer de Ohio (Estados Unidos de América) que en el año de 1933 le tiñeron las cejas y pestañas con un producto cosmético que se comercializaba. Este contenía derivados del alquitrán de hulla y parafenilendiamina (PPD), el cual puede causar blefaritis alérgica, queratoconjuntivitis tóxica y queratitis bacteriana secundaria. La mujer presentó queratitis y durante el mes posterior a la tinción que se realizó, así como úlceras corneales causadas por estafilococos (Wilhelmus, 2001).

La importancia de este suceso impulsó a la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) a evaluar la seguridad oftálmica de los productos para proteger a los ciudadanos de cualquier exposición que representara un riesgo. No sólo se hizo en los Estados Unidos, sino también en Canadá, la Unión Europea y Japón. Si bien, algunos métodos como cultivos celulares ayudan a predecir la seguridad de los productos, no siempre predicen el impacto en el ojo vivo (Wilhelmus, 2001).

#### 5.6.1.1 Pruebas de calidad

#### 5.6.1.2 Prueba de irritabilidad ocular.

Se entiende por irritación ocular, cualquier conjunto de cambios estructurales e inflamatorios reversibles dentro de un periodo de 21 días (European Commission, 2017). Por el contrario, si el daño fuera irreversible se considera que el preparado o la sustancia en cuestión es corrosivo (Wilhelmus, 2001). Para predecir la existencia de irritación en humanos, se han realizado pruebas en animales. El método que precede a las pruebas actualmente existentes es la prueba Draize.

##### 5.6.1.2.1 Prueba Draize

Tiempo después del incidente en Ohio, la FDA contrata al Químico Farmacéutico John H. Draize en la División de Farmacología donde estaría encargado de desarrollar métodos de prueba para identificar los efectos adversos de productos cosméticos. Además, en 1940 lo nombraron líder de la rama de toxicidad dermatológica y ocular.

Draize junto con su colaborador Geoffrey Woodard, publicaron un reporte sobre cómo evaluar la exposición en diferentes intervalos de tiempo, al aplicar los compuestos en piel y ojos de conejo. Su método después sufrió modificaciones en el número de conejos a utilizar, el tiempo de evaluación después de la exposición y las estructuras a evaluar así como los criterios para dictaminar el efecto de los preparados en estos órganos (Wilhelmus, 2001).

En la Figura 23 se describe el método original, el cual comprende el uso de 9 conejos blancos de raza Nueva Zelanda.

El método consiste en evaluar primero que los ojos de los animales se encuentren en estado normal antes del experimento. Se aplica la sustancia prueba en uno de los ojos mientras

que el otro sirve de control. No se recomienda el uso de anestesia tópica antes de la aplicación del preparado. Acto seguido, se observa si existe opacidad en la córnea y qué tan extensa es. En el iris se evalúa si existen pliegues, hinchazón, congestión, hemorragia, destrucción y si este reacciona a la luz de manera lenta (lo cual es positivo). En la conjuntiva se observa la presencia de enrojecimiento de la conjuntiva palpebral, vasos inyectados o más pronunciados de lo normal; quemosis o cualquier inflamación fuera de lo normal con o sin eversión de los párpados y presencia de secreción (Wilhelmus, 2001). En la Tabla 3 se muestra el puntaje que se le da a cada rubro.

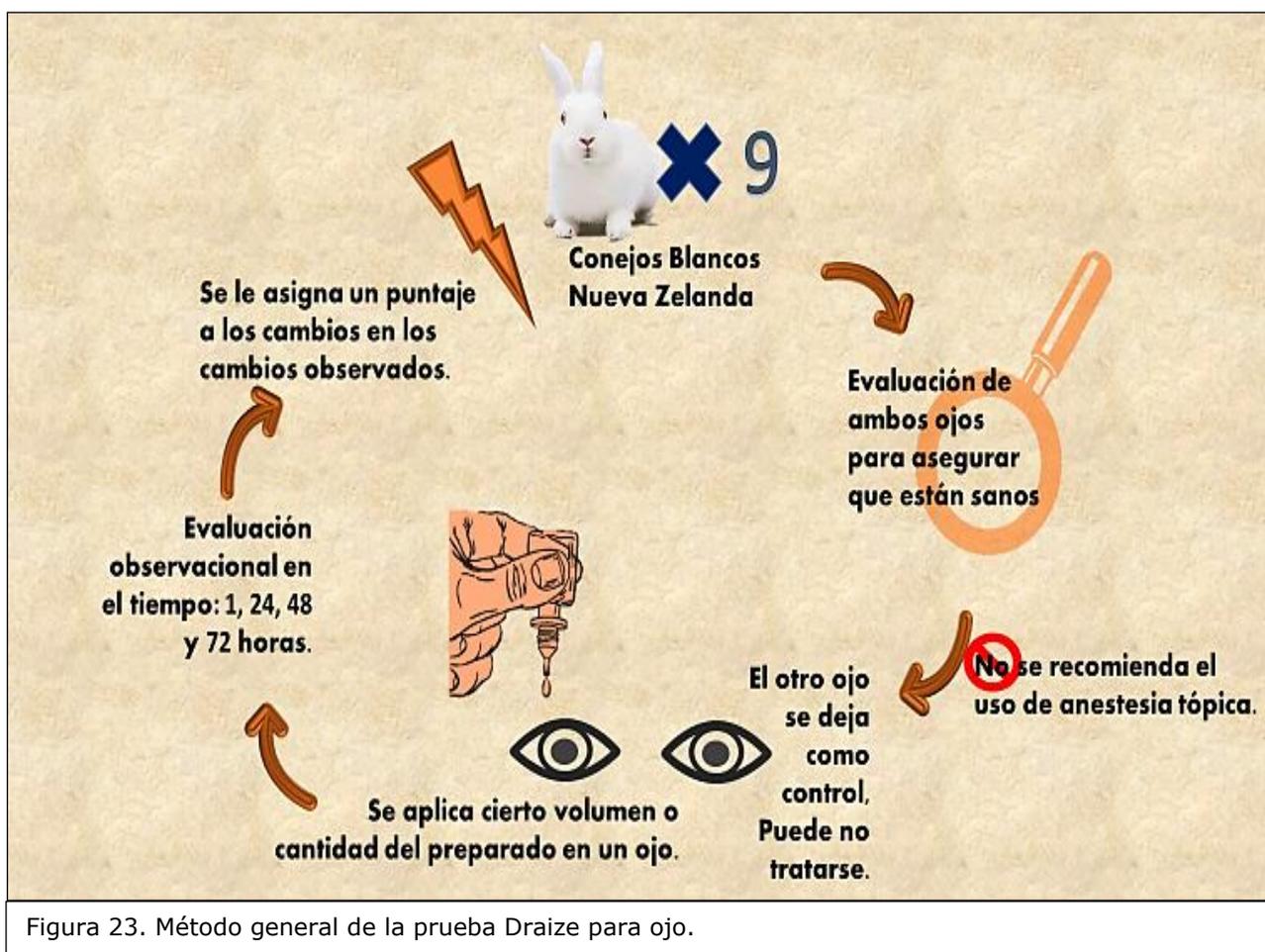


Figura 23. Método general de la prueba Draize para ojo.

A pesar de que se cuenta con un conjunto de características o modificaciones observables como se enlistan en la Tabla 3, en la literatura no se indica un intervalo con el cual se pueda dar un veredicto sobre si la sustancia es irritante o no, sólo se considera que la formulación podría causar irritación al ojo humano si este es cercano o igual a 110. Aunado a esto, se recomienda que debe tomarse en cuenta el número de animales que están presentando algún signo. Si al menos 4 de 6 animales presentan signos entonces la prueba puede considerarse como positiva; en caso de que uno o ninguno tenga alguna respuesta al preparado, se considera negativa. Y si 2 o 3 animales presentan signos y los otros no, entonces habría que repetir el experimento. Cabe mencionar que el estudio original involucra 9 unidades experimentales, sin embargo, puede reducirse a 6, esto depende también del tipo de diseño experimental que se requiera (Wilhelmus, 2001).

Tabla 3. Criterios de evaluación de los signos observados en la córnea, iris y conjuntiva.

Modificado de Wilhelmus, 2001.

Estructura del ojo	Resultado o respuesta observable	Puntaje	Puntaje Total por estructura
Córnea	A. Opacidad o grado de densidad		Puntaje de las observaciones en córnea (PCorn) = A*B*5 Intervalo de 0 a 80.
	<p>Área dispersa o difusa y se alcanzan a observar los detalles del iris</p>	1	
	<p>Áreas translúcidas fáciles de discernir. Los detalles del iris se observan ligeramente oscurecidos.</p>	2	
	<p>Áreas opalescentes. No se observan detalles del iris y la pupila es apenas discernible</p>	3	
	<p>Opaco. Iris no visible.</p>	4	
	B. Extensión del área afectada.		
	<p>Al menos un cuarto o menos.</p>	1	
	<p>Entre 1/4 y menos de la mitad de la córnea</p>	2	
<p>Más de la mitad pero menos que 3/4 de la córnea.</p>	3		
<p>Más 3/4 o toda el área de la córnea.</p>	4		

Iris	<p>A. Observaciones anormales Pliegues arriba de lo normal, congestión, hinchazón acompañada (o no) de inyección alrededor de la córnea. El iris sigue reaccionando a la luz. Si se da de manera lenta se considera una reacción positiva. 1</p> <p>Hemorragia, destrucción del tejido. No se presenta reacción a la luz. 2</p>	<p>Puntaje de las observaciones en iris (PI) = A*5 Intervalo de 0 a 10</p>
Conjuntiva	<p>A. Enrojecimiento de la conjuntiva palpebral</p> <p>Los vasos se observan inyectados más de lo normal 1</p> <p>Se observa rojo carmesí más oscuro. No es posible discernir los vasos de manera individual 2</p> <p>Se observa un tono rojo similar al de la carne cruda. 3</p> <p>B. Quemosis</p> <p>Cualquier inflamación arriba de lo normal 1</p> <p>Inflamación obvia con eversión parcial del párpado 2</p> <p>Inflamación con el párpado parcialmente cerrado 3</p> <p>Inflamación con el párpado cerrado por completo o casi completamente 4</p> <p>C. Descarga o Secreción</p> <p>En cualquier cantidad diferente a la normal 1</p> <p>Descarga con humedad en los párpados y vellosidades adyacentes a los párpados 2</p> <p>Descarga con humedad en los párpados y un área considerable alrededor del ojo. 3</p>	<p>Puntaje de observaciones en conjuntiva (PConj) = (A+B+C)*2 Intervalo de 0 a 20</p>
Puntaje total	<p>Suma del puntaje de la afectación observable en la córnea, iris y conjuntiva.</p>	<p>Total = Pcorn + PI + Pconj</p>

Adicionalmente, es importante considerar si el cambio en el ojo es reversible o irreversible ya que esto indicará si la sustancia es irritante o corrosiva. Por ello, es de utilidad dar seguimiento a aquellos animales en los que los signos persistan incluso más allá de las 72 horas o incluso después de haber transcurrido los 7 días posteriores al experimento. También se sugiere re examinar a aquellos sujetos que hayan presentado algún cambio y este haya desaparecido (Wilhelmus, 2001).

Esta prueba fue bastante criticada no sólo por el trato y el uso de animales tanto para el uso farmacéutico como cosmético (el cual se veía más justificado para el primero que para el segundo); sino también, por la falta de reproducibilidad dadas las variables (diferencia entre la fisiología ocular humana y animal; susceptibilidad ocular mayor en comparación con la humana, por mencionar ejemplos) que podrían influir en el experimento. Además, era incierta la aceptabilidad de la prueba a través de métodos estadísticos. A pesar de lo antes mencionado, fue posible predecir de manera correcta la irritación ocular en humanos en el 85% de los preparados o sustancias tóxicas utilizadas entre 1945 y 2000 (Wilhelmus, 2001).

En la actualidad, en México se utiliza la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) para establecer los requisitos mínimos de calidad para los productos nacionales e internacionales que sean comercializados en este país. En esta se encuentra descrito el método general de análisis (MGA) 0516 referente a la Irritabilidad Ocular.

El MGA indica que deben seleccionarse 6 conejos albinos sanos que no hayan sido utilizados en otra prueba de irritabilidad y no presenten defectos o irritación ocular visible. Se les aplica 0.1 mL de la muestra líquida o 100 mg de la muestra en polvo o semisólida. También es posible aplicar sustancias en forma de gránulos o escamas siempre que se compacten

sin alterar o romper su forma original. Se inmoviliza al animal para instilarle la muestra en el párpado inferior; posteriormente se cierra el párpado por un segundo y el otro ojo se deja sin tratar. Se examinan los ojos a las 24, 48 y 72 h con lámpara y lupa; y se registra el grado de irritación. En caso de tener dudas es posible aplicar fluoresceína sódica estéril al 2.0%, las áreas dañadas se observan de color amarillo (Secretaría de Salud, 2018).

Para la medición de la reacción de irritación, se considera una reacción positiva cuando se observa alguna de las siguientes alteraciones:

- \* Ulceración en la córnea, que se manifiesta como punteado fino.
- \* Opacidad en la córnea.
- \* Inflamación del iris, que se identifica como una ligera depresión o arruga, o enrojecimiento de los vasos sanguíneo circuncorneales.
- \* Inflamación de la conjuntiva. Se puede observar eversión parcial de los párpados o un enrojecimiento carmesí difuso sin distinción individual en los vasos sanguíneos circuncorneales (Secretaría de Salud, 2018).

La interpretación de la prueba se basa en el número de conejos que presenta reacción positiva. En caso de que sea sólo uno, entonces la prueba se considera satisfactoria. Por el contrario, si cuatro o más de los animales presentan reacción positiva, la muestra es irritante. Al igual que en la prueba Draize, la FEUM señala que en caso de que sólo dos o tres animales presenten reacción positiva se debe repetir la prueba con otros 6 animales. Esta segunda prueba se puede considerar positiva si tres o más animales presentan reacción positiva. De ser así, entonces se realiza una tercera prueba con el mismo número de animales (6) y si un animal presenta una reacción positiva, entonces la muestra se considera irritante.

Realmente lo que está estipulado en México por la farmacopea no es muy distinto a los criterios de evaluación que se indican para la prueba Draize. Las diferencias radican en la falta de seguimiento a lo largo del tiempo para evaluar si el daño es permanente; además de que no se asigna un valor numérico a los efectos observados.

Otro punto para destacar es que en la FEUM aún no se cuenta con métodos *in vitro* para evaluar la irritabilidad ocular mientras que la Comisión Europea cuenta con el Centro para la Validación Alternativa (ECVAM) el cual busca evitar el uso innecesario de animales, y sugiere métodos alternativos para este fin. Existen varias pruebas las cuales se mencionan en la Figura 27. En la sección 5.6.2.2.7 se encuentran descritas.

Por otra parte, también señala las características que debe de tener una prueba in vivo la cual es similar a la Draize. En la versión de la Comisión Europea (*Test Guideline 405*) se examina la opacidad corneal, inflamación del iris, el enrojecimiento de la conjuntiva y la quemosis, los cuales reciben un valor numérico después de la observación a las 24, 48 y 72 horas tras la instilación de la muestra en el saco conjuntival de tres diferentes animales. Con base en los resultados, se le da una categoría a la sustancia (Comisión Europea, 2017):

- Categoría 1            Cuando al menos en un animal el efecto causado no se revierte por completo o no se espera que sea revertido en un lapso de 21 días
- Categoría 2            Cuando los efectos se revierten por completo en un lapso de 21 días.
  - Categoría 2A. Se considera irritante para los ojos cuando el efecto no se revierte por completo durante 7 días de observación.
  - Categoría 2B. Ligeramente irritante para los ojos cuando el efecto es completamente reversible en un lapso de 7 días de observación.

Aquellas sustancias que no entren en alguna de estas categorías se consideran como no irritantes.

## 5.6.2 Pruebas *in vitro*

### 5.6.2.1 Caracterización de las Microemulsiones

#### 5.6.2.1.1 Estudios de Comportamiento de fase.

Conocer el tipo de fase que se obtiene al realizar las diferentes combinaciones entre proporciones de los ingredientes es de los primeros pasos del diseño de una microemulsión. Es de utilidad registrar los resultados en los diagramas de fase (ternarios o pseudoternarios) para conocer las regiones en donde se forman los sistemas deseados, los cuales generalmente poseen características como ser estables, isotrópicos, de un tamaño de partícula o morfología en específico (Karunaratne, Pamunuwa & Ranatunga, 2017). Esto se puede lograr por medio de observaciones macroscópicas de aspectos como la formación de sistemas monofásicos y translúcidos (Katiyar *et al.*, 2013). Por otro lado, microscópicamente, permiten distinguir y diferenciar las zonas donde se forman estructuras diferentes a las microemulsiones, por ejemplo, los cristales líquidos y emulsiones. Esto puede realizarse a través de observaciones por microscopía de contraste de fase o microscopía de transmisión de electrones por fractura en congelación (Katiyar *et al.*, 2013).

#### 5.6.2.1.2 Tamaño de partícula e índice de polidispersión

Las técnicas de dispersión son métodos que proveen información sobre el tamaño, forma y estructura de las microemulsiones. El método más común para medir el tamaño de partícula e índice de polidispersión, es el de Dispersión de Luz Dinámica (DLS por sus siglas en inglés), se refiere al fenómeno por el cual la luz blanca se descompone al penetrar un medio

transparente. Este fenómeno está relacionado con el índice de refracción del medio, el cual se refiere al cambio en la dirección y velocidad de onda al cambiar de un medio a otro (Millán, Escofet & Pérez, 2003). En la técnica de Dispersión Dinámica de la Luz se mide el cambio de la intensidad de la luz dispersada por el movimiento de las partículas que muestran un movimiento Browniano (aleatorio) esparcidas en un fluido a través del tiempo. Con la información obtenida de esta técnica es posible obtener el radio hidrodinámico, el cual está relacionado con el tamaño de las partículas, puesto que se trata de la capa o corona de agua que la rodea (Guíalab, 2018). Sin embargo, este no es el único que existe, también se han encontrado publicaciones en las que utilizar otras técnicas como Dispersión de Neutrones de Ángulo Pequeño (SANS); Dispersión de Rayos - X de ángulo pequeño (SAXS); microscopía electrónica de criotransmisión; (Kumar Jha, Dey & Karki, 2011). Las técnicas mencionadas no sólo permiten obtener información sobre el tamaño de los glóbulos o partículas, si no también acerca de la morfología de los materiales (Hammouda, Krueger & Ginka, 1993).

Además de la estabilidad termodinámica, carácter isotrópico y baja tensión interfacial; medir el tamaño de partícula o glóbulo es otro de los parámetros, que permite saber si el sistema en cuestión se trata de una microemulsión. Se han encontrado publicaciones en las que se han reportado MEs con tamaños de partículas de 200 nm o más. Por otro lado, publicaciones más recientes definen que el tamaño de glóbulo de los sistemas MEs se encuentra entre un límite inferior de 5 o 10 nm y un límite superior de 100 nm (Karunaratne, Pamunuwa & Ranatunga, 2017).

Por otra parte, el Índice de polidispersión se define como la desviación estándar de la distribución del diámetro del tamaño de partícula dividido entre el promedio del tamaño de partícula. Este es usado para estimar la uniformidad promedio de las partículas dispersadas.

Una muestra se considera monodispersa cuando el valor es menor a uno (Clayton, Salameh & Kinzer-Ursem. T.L., 2016).

#### 5.6.2.1.3 Viscosidad

La medición de la viscosidad es una de las propiedades que se evalúan en productos farmacéuticos líquidos y semisólidos; se define como la resistencia al flujo (Aulton y Taylor, 2013) o como la medida de la resistencia de un fluido al corte cuando está en movimiento. El término de fluido se puede definir como una sustancia incapaz de resistir fuerzas o esfuerzos de corte sin deformarse (Duarte Agudelo & Niño Vicentes, 2004). Por otro lado, la viscosidad también es conocida como una proporción del esfuerzo cortante dividido entre la velocidad cortante. Si se grafica el esfuerzo cortante (eje Y) como función de la velocidad de corte (eje x), se puede obtener el valor de la pendiente, es decir, el valor de la viscosidad (Ramsey, 2019). Por otro lado, si el coeficiente de correlación del gráfico es mayor a 0.990 ( $r^2 > 0.990$ ) se puede considerar que la sustancia en estudio tiene un comportamiento Newtoniano, de lo contrario, sería No Newtoniano (Moreno, Ballesteros & Frutos, 2003).

Los fluidos Newtonianos son aquellos que se comportan de acuerdo con la ley de viscosidad de Newton, en la cual, el esfuerzo cortante ( $\tau$ ) presenta una relación lineal con al gradiente de velocidad o deformación ( $du/dy$ ) por la viscosidad ( $\mu$ ), la cual es una constante (Duarte Agudelo & Niño Vicentes, 2004).

$$\tau = \mu \frac{du}{dy}$$

Por otro lado, se sabe que la viscosidad de los fluidos Newtonianos no se ve afectada por la variación en la velocidad cortante o velocidad de flujo. Usualmente los líquidos no contienen partículas suspendidas son aquellos que muestran este tipo de comportamiento (Ramsey, 2019). El agua y la miel son ejemplos de este tipo de fluidos (Alexander, 2017). Además, cuando se encuentran en reposo (a cero velocidades cortantes) no generará esfuerzo cortante. Es por ello que, como se muestra en la Figura 24, en los gráficos de los fluidos Newtonianos es común encontrar que tienen un inicio en el origen (0,0) (Ramsey, 2019).

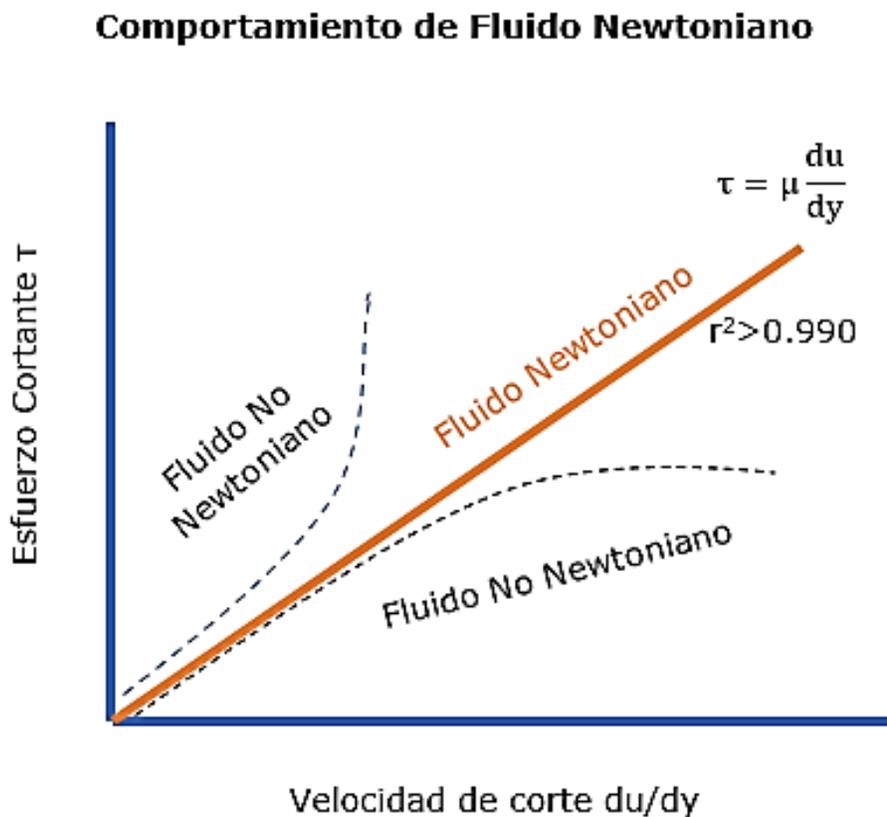


Figura 24. Comportamiento de un fluido Newtoniano al graficar esfuerzo cortante contra velocidad de corte. Modificado de Alexander, 2017.

Por el contrario, los fluidos No Newtonianos, son aquellos que no se comportan de acuerdo a la Ley de Newton, esto significa que un fluido de este tipo podría tener una viscosidad o pendiente que varía con la velocidad de corte o una intersección que no sea de cero o incluso ambas características (Ramsey, 2019), es decir, su viscosidad depende de la velocidad de corte o deformación por lo que muestran una relación no lineal entre el esfuerzo cortante y la velocidad de corte (Alexander, 2017). Los fluidos que contienen sólidos o polímeros generalmente son no Newtonianos. Un ejemplo de esto pueden ser los shampoos o la maicena en agua (Ramsey, 2019).

Los fluidos No Newtonianos pueden describirse de acuerdo con cómo se deforman, pueden ser elásticos, viscosos y viscoelásticos. Los materiales elásticos se deforman con la aplicación de un esfuerzo, pero esta deformación y energía de deformación es totalmente recuperable (reversible) cuando los esfuerzos se liberan. Esto no ocurre con un material viscoso, en el que cualquier aplicación de esfuerzo o energía se disipa en forma de calor y no puede ser recuperada al retirar el esfuerzo aplicado. Por último, los materiales viscoelásticos tienen un comportamiento que varía entre una deformación elástica y viscosa (Shenroy, 2018).

Además de clasificar a los fluidos no Newtonianos por su deformación, existen diferentes tipos dentro de la clasificación de los viscosos y viscoelásticos, los cuales se muestran en la Figura 25 (Shenroy, 2018).

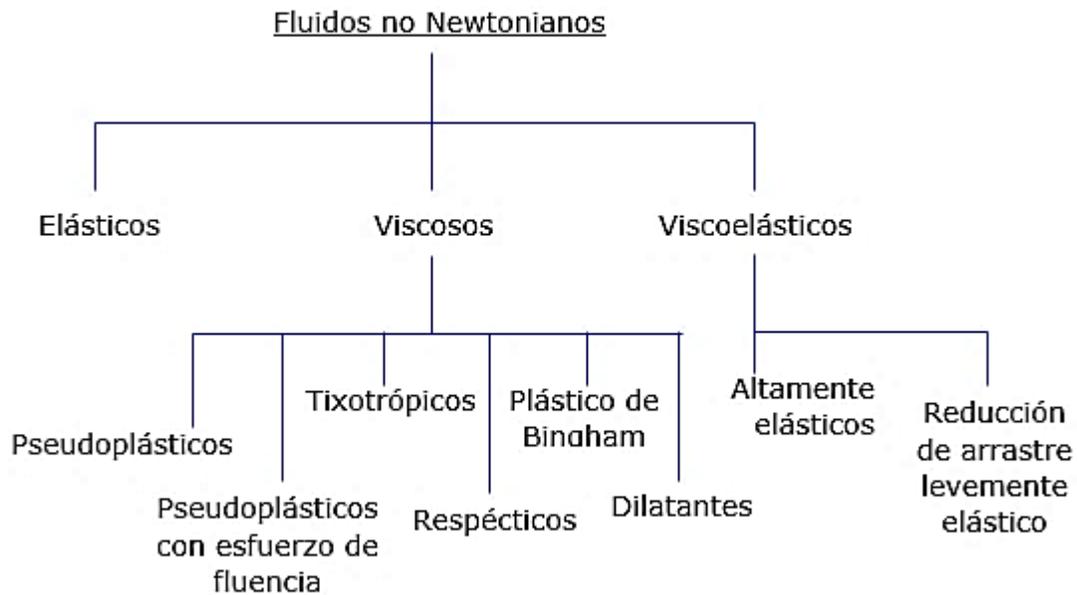


Figura 25. Tipos de fluidos no Newtonianos.

Dentro de la literatura sobre microemulsiones para vía oftálmica no es común encontrar que se estudie el tipo de fluido del preparado. Aquellas otras (no necesariamente oftálmicos) que sí reportan el tipo de fluido que se obtiene, varían entre preparados de comportamiento Newtoniano y otros de comportamiento no Newtoniano. Karl Bennet y colaboradores de la Universidad de Minnesota, obtuvieron microemulsiones no Newtonianas de comportamiento pseudoplástico (Bennett *et al.*, 1981). Por otro lado Blom y Mellema de Países Bajos, encontraron que su preparado mostraba un comportamiento no Newtoniano viscoelástico (Blom & Mellema, 1988). Rosa y colaboradores de la Universidad de Tecnología de Cracovia reportan haber obtenido microemulsiones No Newtonianas, sin embargo, no las clasificaron en ningún subtipo (Rosa, Kwiecień & Tal-figiel, 2013).

Por aparte, Moreno y colaboradores de la Universidad Complutense de Madrid, obtuvieron microemulsiones de comportamiento Newtoniano (Moreno, Ballesteros & Frutos, 2003). Por otro lado, Begoña y colaboradores de la misma universidad, obtuvieron en su estudio tanto microemulsiones Newtonianas como no Newtonianas. Las primeras tenían la misma proporción de tensoactivo (25%) mientras que las segundas estaban por debajo del 25% (20%) o por encima (30%) (Brime *et al.*, 2002). Lo anteriormente mencionado podría ser la clave de por qué el sistema muestra un comportamiento u otro. La proporción de los componentes no sólo permiten que la microemulsión sea estable, podría estar relacionada al tipo de comportamiento reológico que muestran.

Referente a los efectos que un comportamiento Newtoniano o no Newtoniano podría tener a la hora su uso del preparado, Alany y colaboradores indican que una formulación oftálmica viscosa con comportamiento No Newtoniano pseudoplástico sería más deseable en comparación con las viscosas Newtonianas ya que muestran menor resistencia al parpadeo, lo cual sería más aceptado por los pacientes (Alany *et al.*, 2006).

Por su parte, la viscosidad juega un papel importante en el tiempo de residencia del fármaco, así como la liberación de este. Este parámetro se puede determinar usando un reómetro desde 101 hasta 1800 rpm c (García Lopez, 2002).

Como observación adicional, se ha mencionado la influencia de la viscosidad en el tipo de liberación de las microemulsiones. Resulta que la viscosidad es inversamente proporcional al coeficiente de difusión de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$D = \frac{kT}{6\pi nr}$$

Donde  $k$  es la constante de Boltzmann;  $T$  es la temperatura;  $n$  es la viscosidad y  $r$  es el radio de las gotas.

Finalmente, la viscosidad también se asocia a la estabilidad del sistema dado que a mayor viscosidad, es menos factible que las gotas puedan colisionar dada la resistencia al movimiento a través de la fase externa (Callender *et al.*, 2017).

#### 5.6.2.1.4 Índice de Refracción

Se refiere al número adimensional que representa la medición de la curva de un rayo de luz mientras pasa a través de un material. Se calcula a partir de la relación entre la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad en un segundo medio (Particle Technology Labs, 2019). Es posible prever la discapacidad visual o visión borrosa a través del índice de refracción (Gautam & Kesavan, 2017), como sucede con los ungüentos. La diferencia entre el índice de refracción del preparado y el de las lágrimas se asocia a este efecto indeseado (Ali & Lehmussaari, 2006). Cabe señalar que el índice de refracción de las lágrimas se encuentra entre 1.34 y 1.36 (Craig *et al.*, 1995). En las publicaciones de Habe, Nair y Ligorio se reporta la medición de este parámetro, así como su valor, el cual fue un valor cercano al lagrimal (alrededor de 1.37).

#### 5.6.2.1.5 Potencial Zeta

El potencial zeta también denominado potencial electrocinético, se refiere al potencial de una partícula coloidal que se mueve bajo un campo eléctrico. También está relacionado al trabajo necesario para llevar una unidad de carga positiva desde un punto en el espacio hasta una superficie sin ninguna aceleración. Además, refleja la diferencia de potencial entre la capa eléctrica doble que se forma al exterior de una partícula o glóbulo, conformada por la capa difusa y la capa de Stern (Bhattacharjee, 2016).

En palabras más sencillas, se relaciona con la atracción o repulsión electrostática entre las partículas o glóbulos. Las repulsiones entre partículas se relacionan con la lejanía entre estas, lo cual podría evitar que coalezcan, es decir, que se agreguen formando una partícula más grande. Si bien esto podría ser indicio de la estabilidad del sistema, se requieren determinaciones respecto al tiempo para utilizar este parámetro como indicador de estabilidad (Callender *et al.*, 2017).

Jagdale y colaboradores reportaron un sistema de microemulsión que mostraba buena estabilidad en el valor de -9.50 mV (Rajpoot & Tekade, 2019). En la literatura el intervalo de potencial zeta en el que se considera que la fuerza de repulsión es suficiente para mantener una buena estabilidad física en los sistemas coloidales, como son las microemulsiones, es de - 30 mV a + 30 mV (miliVolts). Por otro lado, un valor pequeño podría resultar en la agregación y floculación de las partículas (Joseph and Singhvi, 2019).

#### 5.6.2.2 Pruebas de Calidad

##### 5.6.2.2.1 Esterilidad

Se considera que un producto es estéril cuando no existen organismos vivos y virus o sus formas de resistencia (Mendigan *et al.*, 2009). De acuerdo con el Método General de Análisis de la FEUM (MGA 0381), la prueba se debe realizar en condiciones asépticas. Consiste en agregar una muestra del preparado en los medios de cultivo tales como el de tioglicolato y el de digerido de soya-tripcaseína y se inoculan con no más de 100 unidades formadoras de colonias de cada uno de los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium sporogenes*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* (*niger*). Se incuba por 14 días y durante este periodo se observa si se presenta o no crecimiento microbiano. Si durante o 4 días posteriores al periodo de incubación, no

se presenta crecimiento microbiano se considera que el producto cumple con la prueba de esterilidad (Secretaría de Salud, 2018).

#### 5.6.2.2.2 Isotonicidad

Se considera que un sistema es isotónico cuando la concentración de solutos, osmolalidad y presión osmótica son los mismos que el sistema con el cual se compara y que presente igualdad en parámetros con el plasma (Fox, 2011). Este parámetro es importante dado que si no se mantiene puede causar irritación o daño al ojo. Puede ser evaluado mezclando gotas de sangre con el preparado y posteriormente observarlo al microscopio. Se comparan los resultados con una muestra sanguínea y solución de NaCl al 0.9%. Las células sanguíneas (glóbulos rojos) se contraerán si la muestra es hipertónica; se lisarán si el preparado es hipotónico; y mantendrán su morfología en condiciones normales si el sistema es isotónico (Soni *et al.*, 2019).

#### 5.6.2.2.3 Osmolalidad y Osmolaridad

La osmolalidad es un parámetro experimental y es una función de las partículas en solución asociada a la fuerza motriz (presión osmótica) que equilibra los niveles de disolvente entre dos soluciones de diferente concentración divididas por una membrana semipermeable a los solutos. Por otro lado, está la osmolaridad, el cuál es un cálculo teórico sobre el aporte de cada especie en solución, a la presión osmótica. De acuerdo con el Método General de Análisis 0621 puede determinarse la osmolalidad al emplear un osmómetro (Secretaría de Salud, 2018).

Al igual que la isotonicidad, es importante que la osmolalidad se encuentre alrededor de los  $310 \left[ \frac{mOsm}{kg} \right]$  y sea isotónica dado que las lágrimas presentan estas características. Igualar las

condiciones del ojo evita la incomodidad causada por una diferencia osmótica (Soni *et al.*, 2019).

#### 5.6.2.2.4 Estabilidad

De acuerdo con la *Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos*, se define la estabilidad como la capacidad de un fármaco o un medicamento de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas en el envase que lo contiene durante su periodo de vida útil. Mientras que los estudios de estabilidad son las pruebas que se efectúan por determinado tiempo, bajo la influencia de la temperatura, humedad o luz en el envase que contiene al preparado.

Existen dos tipos de estudios. Los acelerados son aquellos que se realizan bajo condiciones exageradas de almacenamiento para incrementar la velocidad de cambios físicos, degradación química o biológica de un fármaco o medicamento. Por otro lado, los que son a largo plazo están diseñados bajo condiciones de almacenamiento controladas para evaluar las mismas características mencionadas durante todo el periodo de reanálisis del fármaco o de caducidad del medicamento.

De acuerdo con la *NOM-073-SSA1-2005* dependiendo si el medicamento es nuevo o conocido se debe realizar una selección y evaluación de ciertos parámetros para aplicación oftálmica. En la Tabla 4 se concentra esta información (Secretaría de Salud, 2005).

Tabla 4. Resumen sobre la selección de lotes, parámetros por evaluar y condiciones de cada tipo de estudio de acuerdo con la *NOM-073-SSA1-2005*.

<b>Tipo de Medicamento</b>	<b>Nuevo</b>	<b>Conocido</b>
Selección de Lotes	<p>Al menos con tres lotes de medicamento fabricados con la misma fórmula cuali-cuantitativa aplicando el método de fabricación que simule el proceso usado en la fabricación de los lotes de producción para comercialización.</p> <p>Dos de los tres lotes deben ser lotes piloto; el tercero puede ser de menor tamaño.</p> <p>Se deben llevar a cabo en el mismo sistema contenedor-cierre para su almacenamiento</p>	<p>Al menos con tres lotes de medicamento fabricados con la misma fórmula cuali-cuantitativa aplicando el método de fabricación que simule el proceso usado en la fabricación de los lotes de producción para comercialización.</p> <p>Dos de los tres lotes deben ser lotes piloto; el tercero puede ser de menor tamaño.</p> <p>Se deben llevar a cabo en el mismo sistema contenedor-cierre para su almacenamiento</p>
Parámetros por evaluar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apariencia</li> <li>• Color</li> <li>• Olor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apariencia</li> <li>• Color</li> <li>• Olor</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ensayo</li> <li>• pH</li> <li>• Material Particulado</li> <li>• Viscosidad</li> <li>• Contenido de conservadores</li> <li>• Esterilidad inicial y final</li> <li>• Límite microbiano</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ensayo</li> <li>• pH</li> <li>• Material Particulado</li> <li>• Viscosidad</li> <li>• Contenido de conservadores</li> <li>• Esterilidad inicial y final</li> <li>• Límite microbiano</li> </ul>
Condiciones en estudio de estabilidad acelerada	<p>Temperatura: 40°C ± 2°C</p> <p>Humedad Relativa: no más de 25% ± 5%</p> <p>Periodo Mínimo: 6 meses</p> <p>Frecuencia de análisis: 0,3 y 6 meses</p>	<p>Temperatura: 40°C ± 2°C</p> <p>Humedad Relativa: 75% ± 5%</p> <p>Periodo Mínimo: 6 meses</p> <p>Frecuencia de análisis: 0,1 y 3 meses</p>
Condiciones en estudio de estabilidad a condición intermedia	<p>Temperatura: 30°C ± 2°C</p> <p>Humedad Relativa: 35% ± 5%</p> <p>Periodo Mínimo: 6 meses</p> <p>Frecuencia de análisis: 0,3 y 6 meses</p>	<p>Temperatura: 30°C ± 2°C</p> <p>Humedad Relativa: 65% ± 5%</p> <p>Periodo Mínimo: 6 meses</p> <p>Frecuencia de análisis: 0,3 y 6 meses</p>
Condiciones en estudio de estabilidad a largo plazo	<p>Temperatura: 25 o 30°C ± 2°C</p> <p>Humedad Relativa: 40 o 35% ± 5%</p> <p>Periodo Mínimo: 12 meses</p> <p>Frecuencia de análisis: 0,3,6,9 y 12 meses</p>	<p>Temperatura: 25 o 30°C ± 2°C</p> <p>Humedad Relativa: 60 o 65% ± 5%</p> <p>Periodo Mínimo: 12 meses</p>

		Frecuencia de análisis:0,3,6,9 y 12 meses
Cambios significativos	<p>5% de variación de la potencia inicial o no cumplimiento de la potencia.</p> <p>Cualquier producto de degradación que exceda su límite de especificación</p> <p>Cuando se excedan los límites de pH</p> <p>Cuando no se cumpla con las especificaciones de apariencia y propiedades físicas</p>	<p>5% de variación de la potencia inicial o no cumplimiento de la potencia.</p> <p>Cualquier producto de degradación que exceda su límite de especificación</p> <p>Cuando se excedan los límites de pH</p> <p>Cuando no se cumpla con las especificaciones de apariencia y propiedades físicas</p>

Es importante señalar que adicional a los parámetros que establece la norma mencionada anteriormente, es preciso medir los parámetros de caracterización previamente descritos.

#### 5.6.2.2.5 pH

El parámetro de referencia para el pH puede ser el de las lágrimas (7.4) puesto que es el recomendado para evitar causar irritación al consumidor del producto terminado (Soni *et al.*, 2019). Para determinarlo se puede consultar la metodología del MGA 0701 (Secretaría de Salud, 2018).

#### 5.6.2.2.6 Estudios de difusión (permeación y liberación)

Para ello puede emplearse una cornea de cabra o conejo como método *Ex vivo*; o una membrana para diálisis. Esta se coloca en una celda de difusión de Franz y se mantiene el preparado en contacto con la membrana o córnea en el compartimento donador. El compartimento receptor puede contener fluido lagrimal simulado a pH 7.4 a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . con agitación magnética. Se obtienen muestras en diferentes intervalos de tiempo y se analizan por espectrofotometría de luz visible y se determina la concentración del fármaco empleando una curva patrón previamente elaborada. Es importante reponer el medio receptor cada vez que se tome una muestra para mantener las condiciones sink (Soni *et al.*, 2019).

#### 5.6.2.2.7 Pruebas de irritabilidad ocular

Como se mencionaba en la sección 3.4.1.2, localmente la FEUM no cuenta con métodos in vitro que puedan ser usados para comprobar la irritabilidad potencial del producto terminado. Pero en el continente Europeo la Comisión Europea señala los métodos in vitro existentes y aquellos que esta entidad reconoce como científicamente válidos tanto en Europa como en Estados Unidos de Norte América, estos se muestran en la Figura 27 identificados con una viñeta. A continuación, se describen brevemente las pruebas científicamente validadas y una más. El Comité Europeo de Consultoría Estadística (ESAC) señala que se requiere más trabajo para que ser reconocidas como científicamente válidas.

#### 5.6.2.2.8 Prueba en Ojo de Pollo Aislado o The Isolated Chicken Eye Test Method (ICE)

Se considera que este método cuenta con la exactitud y reproducibilidad suficiente para identificar sustancias irritantes no severas. Es importante mencionar que no se recomienda

su uso para etiquetado de aquellas sustancias que no hayan sido examinadas anteriormente. En caso de que esta prueba resulte negativa, es necesario realizar la prueba *in vivo* para identificar falsos negativos e irritantes oculares leves o moderados. Consta en determinar la opacidad e grosor corneal (relacionado con la inflamación), así como la retención (permeabilidad) de fluoresceína en ojos de pollo de 7 semanas derivados de una planta procesadora de aves (ICCVAM, 2010). Para ello, primero se preparan los ojos. Se extirpan; se les coloca una gota de fluoresceína sódica al 2% y se deja en contacto con la córnea durante 10 a 20 segundos. Posteriormente se enjuaga con solución salina isotónica y se incuban a cierta temperatura y tiempo determinado. Se examinan con un microscopio de lámpara de hendidura para revisar que no hayan sufrido daño la córnea y se encuentren en condiciones óptimas para la prueba. Posteriormente, se coloca en un aparato de perfusión con una bomba de agua. Antes de aplicar el preparado se mide el grosor de la córnea y se toma como línea base, así como la retención de fluoresceína. Se extrae el ojo del aparato de perfusión y se coloca en un pañuelo, se coloca el ojo con la córnea hacia arriba y se aplica la muestra de prueba por diez segundos. Se enjuaga con solución salina y se regresa al aparato antes mencionado (ICCVAM, 2010).

Se examinan los ojos a los 30, 75, 120, 180 y 240 minutos. Sólo en el primer tiempo se determina la retención de fluoresceína; mientras que la opacidad y grosor corneal, así como cualquier cambio morfológico se examina en todos los tiempos de la prueba. Se le asigna un numérico a cada rubro a evaluar y se revisa la categoría que se le da en cada aspecto. La combinación de las categorías obtenidas en los resultados permite determinar si la muestra se clasifica como irritante severo (ICCVAM, 2010).

#### 5.6.2.2.9 Permeabilidad y Opacidad en Córnea de Bovino o Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method (BCOP)

Esta prueba consiste en estudiar los cambios en la opacidad de la córnea (transmisión de luz a través de la córnea) y la permeabilidad de una cantidad determinada de fluoresceína. Para ello se emplean un opaciómetro y un espectrofotómetro de luz visible, respectivamente. Los resultados que se obtengan de las mediciones permiten calcular una puntuación de irritabilidad *in vitro* (IVIS por sus siglas en inglés, *In vitro Irritancy Score*) el cual predice el potencial de una sustancia para causar irritación *In vivo*.

Como unidades de estudio se utilizan ojos de ganado bovino derivados del procesamiento de los animales para su consumo. Para cada grupo (control negativo, positivo y prueba) se requieren al menos 3 ojos. Antes de realizar el experimento, se aísla la córnea del resto de las estructuras del ojo (iris, cristalino) y se colocan en una caja de Petri con Solución Salina equilibrada de Hank (HBSS). Se examinan para revisar que se encuentren íntegras y sin ningún daño visible, ya que esto afectaría la prueba. Se dejan incubar los tejidos en "porta córneas" (*corneal holders*, en inglés) como el que se muestra en la Figura 26 con medio por una hora a 32° C. Se examinan una vez más descartan las córneas con algún defecto.

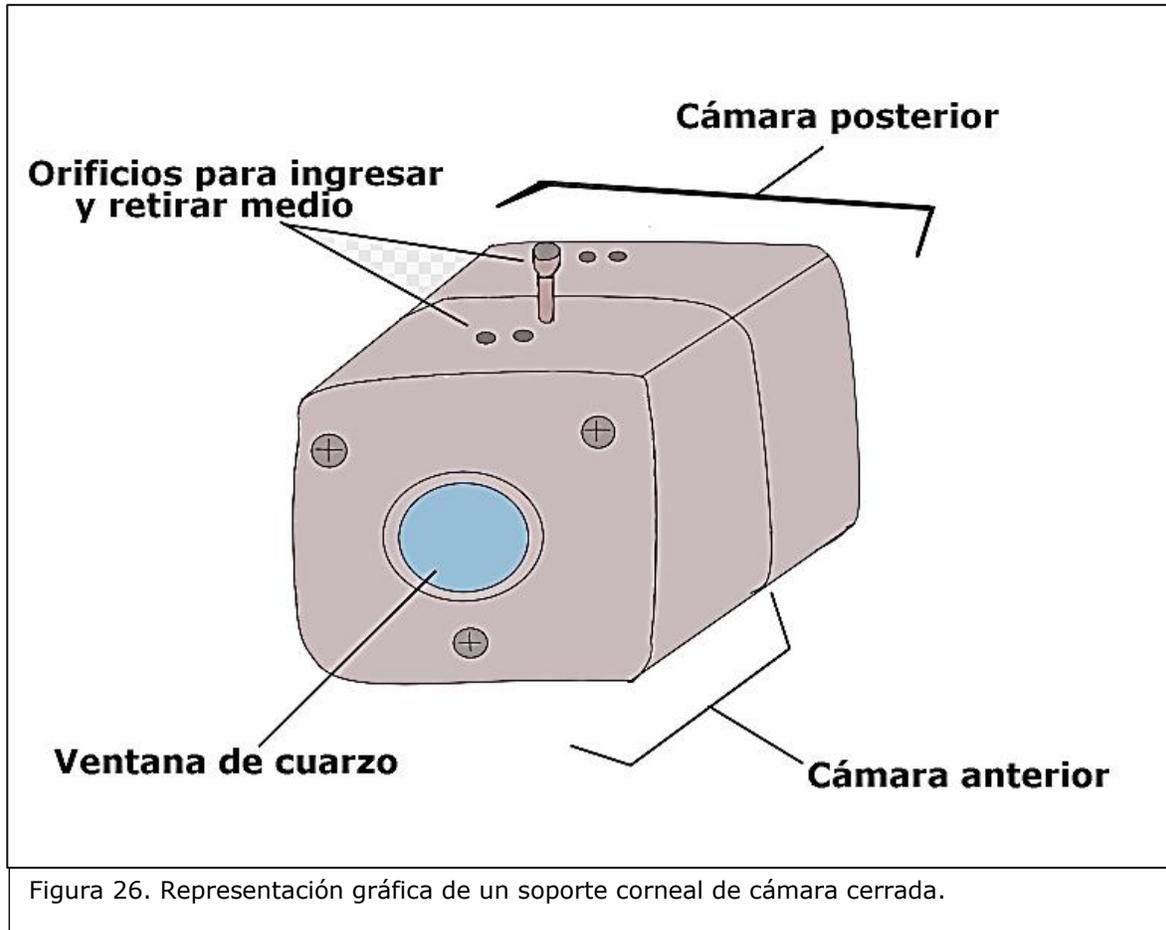


Figura 26. Representación gráfica de un soporte corneal de cámara cerrada.

Primero se determina la opacidad haciendo incidir una luz de lámpara halógena (por ejemplo, de xenón) en la córnea, la intensidad aparente es medida por un fotómetro o luxómetro. El equipo utilizado para ello es el opaciómetro, el cual arroja los datos en unidades lux que, de acuerdo al Sistema Internacional de Unidades, corresponden a la iluminancia (Goethem *et al.*, 2010). Esta se define como el flujo luminoso que incide en un área determinada (Iluminet, 2019). Las mediciones iniciales hechas con un soporte corneal vacío rondan los 1210 lux. Cuando se encuentra la córnea de por medio este valor disminuye. Si la opacidad es parcial, se arroja un valor menor en comparación a una opacidad completa, de acuerdo con la relación inversamente proporcional entre la iluminancia y el área (Goethem *et al.*, 2010).

Posteriormente, se determina la permeabilidad. Se coloca una solución de fluoresceína en el soporte corneal; se enjuaga y después de un tiempo de incubación, se cambia nuevamente el medio y se obtiene una muestra para medir absorbancia en el espectrofotómetro UV/VIS (Duratec, 2019) a 490 nm, que corresponde a la longitud de onda máxima en la que la fluoresceína absorbe la luz (Bandamwar, 2011).

La fluoresceína se ha usado en oftalmología desde 1882, entre sus aplicaciones está la detección de lesiones en la superficie corneal. El epitelio de la córnea es poco permeable a la fluoresceína y cuando pierde su continuidad, se observa la acumulación de dicha sustancia depositada en el estroma la cual emite luz al hacer incidir una fuente de luz azul. También es posible realizar la prueba de Seidel, la cual consiste en detectar fugas de humor acuoso por lesiones en alguna región del ojo. Se instila una concentración alta de fluoresceína en el sitio de la lesión la cual permite identificar dicha fuga. La aplicación más común es la evaluación de la adaptabilidad de los lentes de contacto en el ojo así como identificar alguna lesión por el uso de los mismos (Bandamwar, 2011).

Para determinar el puntaje de irritabilidad *In vitro* se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Puntaje In Vitro} = \text{Promedio de la opacidad} + [15(\text{Promedio de la absorbancia a } 490 \text{ nm})]$$

Los puntajes iguales o mayores a 55.1 se clasifican como *irritantes severos*.

BCOP permite identificar las sustancias corrosivas o irritantes severas. No se recomienda para identificar aquellas que sean moderada o levemente irritantes (ICCVAM, 2010).

#### 5.6.2.2.10 Prueba de Fuga de Fluoresceína o *Fluorescein Leakage (FL)*

Esta prueba está validada por el *Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para alternativas a la experimentación con animales* (EURL ECVAM), la cual indica que esta

permite clasificar a las sustancias o preparados (hidrosolubles) como corrosivos o irritantes severos. Por otro lado, no es posible determinar si se trata de un irritante leve o moderado. En caso de que exista la necesidad de determinar lo anterior mencionado, se requiere de métodos adicionales de prueba, incluso en conejos (OECD, 2017).

Es importante mencionar que este método no es suficiente para reemplazar los estudios *in vivo* en conejos. La Unión Europea se encuentra realizando evaluaciones de los métodos *in vitro* para que en el futuro, un conjunto de pruebas pueda sustituir la experimentación en animales vivos (OECD, 2017).

La prueba FL mide la capacidad de la sustancia de prueba para inducir daño en los epitelios, como el de la córnea y conjuntiva, los cuales se caracterizan por ser impermeables a sustancias ajenas al organismo por la presencia de uniones estrechas; es por ello que, un cambio en la permeabilidad es indicador de una alteración estructural asociada a la inflamación y daño en la superficie, las cuales se observan en el desarrollo de la irritación ocular (OECD, 2017).

En este método se utilizan cultivos de líneas celulares epiteliales monocapa de riñón canino Madin Darby (MDCK CB997) adheridas a una membrana. Se coloca la sustancia o preparado de prueba sobre el cultivo celular y se deja actuar durante un minuto a temperatura ambiente. Posteriormente se remueve por aspiración y se lava dos veces con agua estéril a 37 °C, así como con solución de calcio, y con Solución Salina equilibrada de Hank. Inmediatamente después, se agrega solución de fluoresceína de sodio al 0.01% y se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar este periodo se remueven los insertos y se mide la fluorescencia a longitudes de onda 485 y 530 nm de la solución remanente (OECD, 2017).

Finalmente, se determina el FL<sub>20</sub> (Fuga de fluoresceína del 20%). Si este presenta un valor menor o igual a 100 mg/mL se dice que sustancia de prueba en cuestión es corrosiva o irritante severa para el ojo (OECD, 2017).

#### 5.6.2.2.11 Prueba con Microfisiómetro Sensorial o Cytosensor Microphysiometer Test Method (CM)

Esta prueba se basa en evaluar la toxicidad celular al identificar la disminución en el procesamiento de la glucosa por parte de una línea celular L929 de fibroblastos de ratón. Durante el metabolismo de la glucosa se excretan subproductos ácidos como iones hidronio (H<sup>+</sup>), ácido láctico y CO<sub>2</sub> que disminuyen el pH extracelular. Su cambio respecto al tiempo es medido a través del microfisiómetro sensorial (Institute for In Vitro Sciences, 2020).

Dado que este instrumento mide la velocidad de acidificación del medio, las unidades en las que se trabaja son  $\left[\frac{mV}{s}\right]$  (milivoltios por segundo), siendo que una unidad de pH equivale aproximadamente a 61 mV (Mcconnell *et al.*, 1992).

El procedimiento consiste en preparar 7 concentraciones  $\left[\frac{mg}{mL}\right]$  distintas del preparado farmacéutico. Es importante recalcar que este debe ser soluble en agua de lo contrario no se recomienda utilizar este método para determinar la irritabilidad ocular (ECVAM, 2011). Posteriormente, el proceso para cada concentración de preparado es el mismo: se exponen las células a la sustancia de prueba, se lava y se realizan mediciones de velocidad de acidificación. Después se elabora un gráfico de la velocidad de acidificación contra las concentraciones preparadas y se interpola el 50% de la reducción de la velocidad de acidificación la cual es una medida indirecta de la actividad metabólica también llamada en inglés *the dose of the product that decrease the metabolic rate of the cells by 50%* (MRD<sub>50</sub>)

para conocer la concentración a la cual esto puede ocurrir. Los resultados se interpretan de acuerdo a la siguiente Tabla 5 (ECVAM, 2011).

Tabla 5. Interpretación de resultados de acuerdo al valor de MRD<sub>50</sub> y el Sistema Global Armonizado (GHS) (Modificado de ICCVAM, 2010).

MRD <sub>50</sub>	Sistema Global Armonizado
Menor a 2 $\frac{mg}{mL}$	Categoría 1
Mayor a 2 $\frac{mg}{mL}$ menor a 10 $\frac{mg}{mL}$	Categoría 2 (A o B)
Mayor a 10 $\frac{mg}{mL}$	No etiquetado

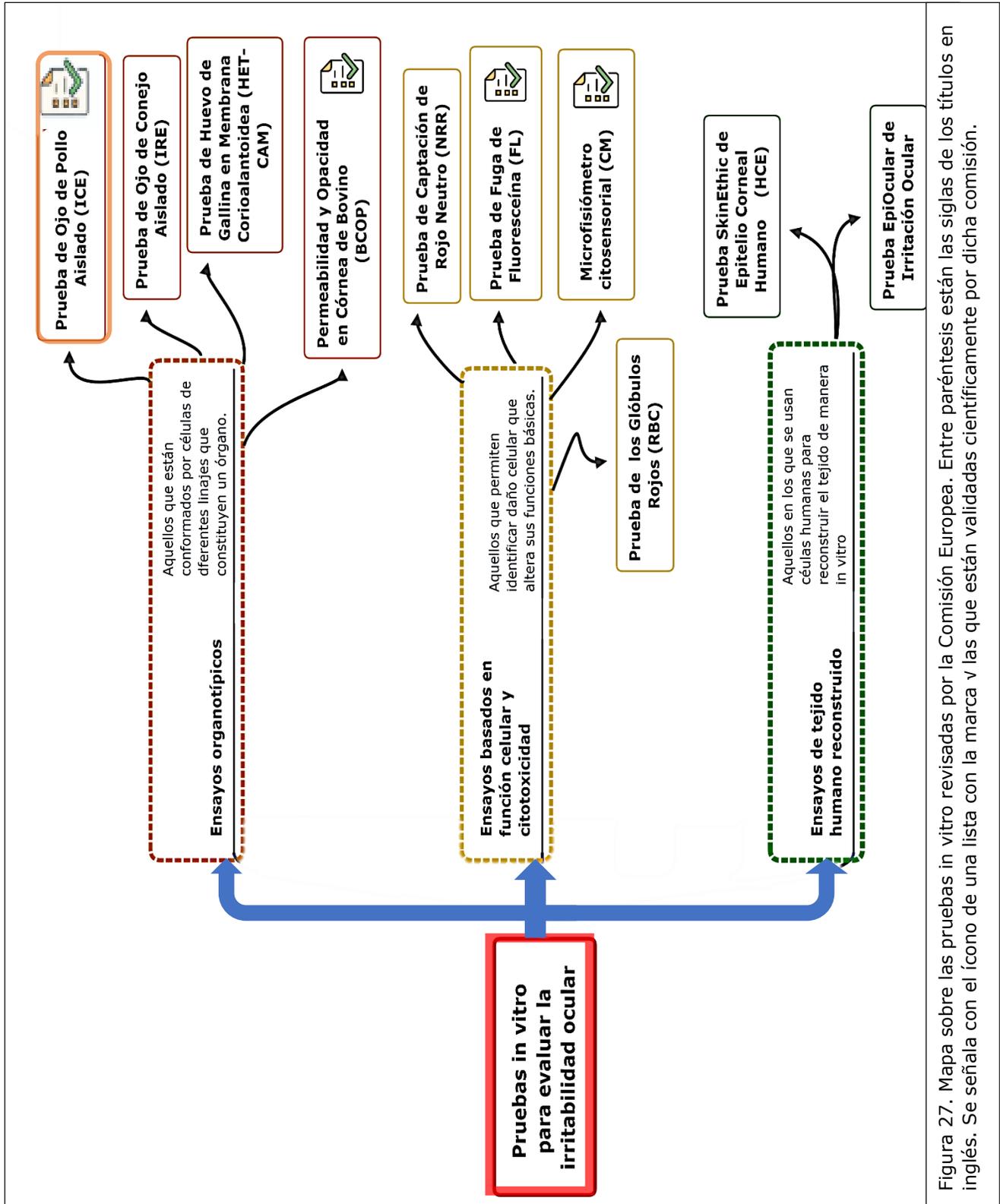


Figura 27. Mapa sobre las pruebas in vitro revisadas por la Comisión Europea. Entre paréntesis están las siglas de los títulos en inglés. Se señala con el ícono de una lista con la marca v las que están validadas científicamente por dicha comisión.

#### 5.6.2.2.12 Prueba en la membrana Corioalantoidea de huevo de gallina o Hen's egg test - Chorioallantoic membrane (HET-CAM)

A pesar de que actualmente organismos internacionales (como el ECVAM de la Unión Europea) aún no validan la prueba HET-CAM como con las anteriormente mencionadas, es importante incluirla en el presente trabajo dado que se ha utilizado para la evaluación de microemulsiones.

En el artículo de Habe y Keipert, antes referenciado, mencionan que utilizaron la prueba HET-CAM para verificar la biocompatibilidad fisiológica de la microemulsión antes de realizar estudios *in vivo* (Habe and Keipert, 1997).

Este es un método que evalúa la irritabilidad ocular potencial. Consiste en aplicar el preparado en la superficie de la membrana Corioalantoidea (CAM) de huevo de gallina; en la Figura 28 se muestra su ubicación anatómica. Tras la aplicación se observa si se presenta lisis vascular, hemorragia y/o coagulación a ciertos tiempos y a cada rubro se le asigna una puntuación. La suma de estos resulta en un total que de ser mayor a 9 se considera como irritación severa (ICCVAM, 2010).

En este caso, los investigadores obtuvieron que sus formulaciones fueron "no irritantes". por lo que procedieron a realizar la prueba Draize. Otro motivo por el cual decidieron realizarla fue que la prueba HET-CAM no está validada científicamente.

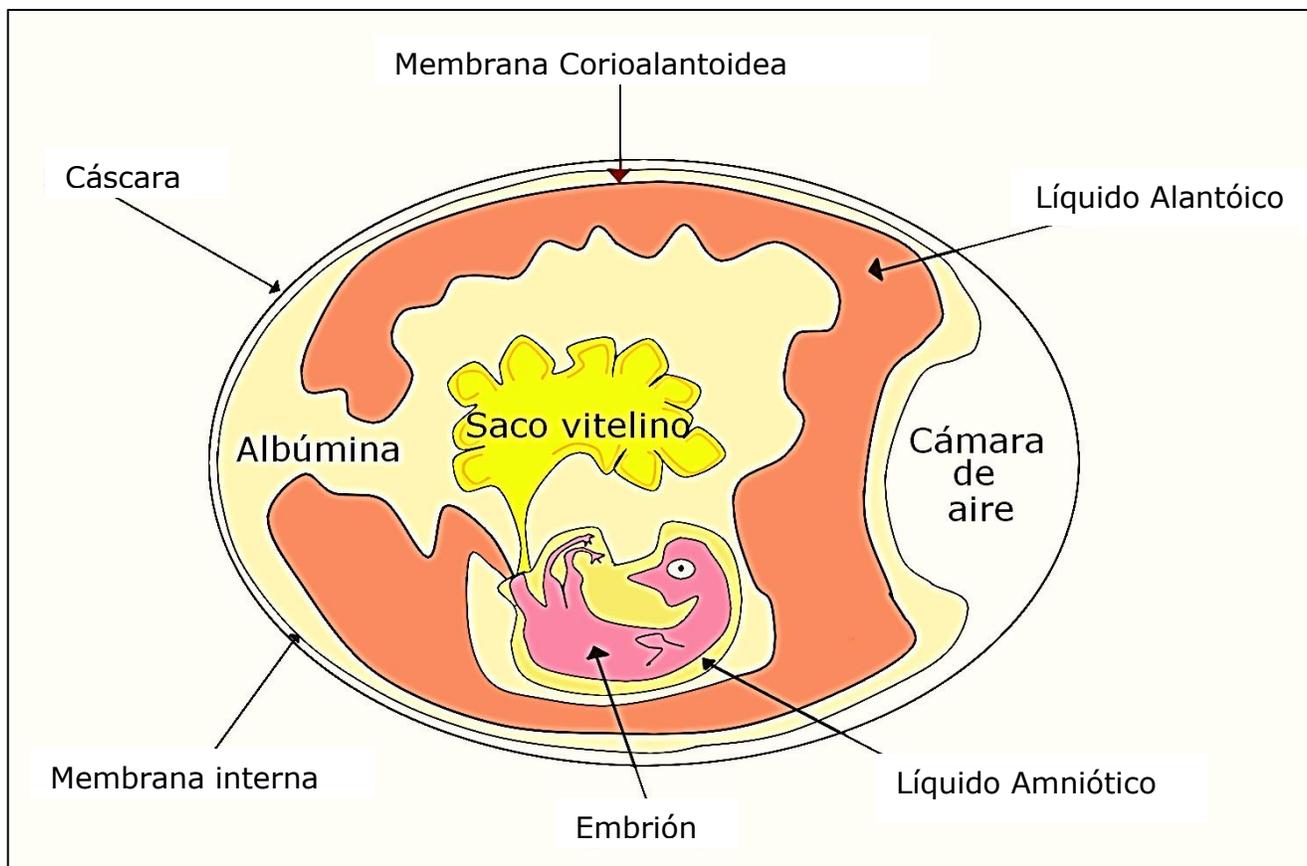


Figura 28. Representación de la anatomía del huevo de gallina donde se muestra la membrana Corioalantoidea que se usa para la prueba HET-CAM para identificar las sustancias potencialmente irritantes para el ojo. Modificado de Martínez Mora, 2013.

Dada la controversia sobre el uso de animales en pruebas de irritabilidad se han creado estrategias para evaluar la misma con pruebas *in vitro*. La llamada Estrategia de Prueba Escalonada (*Tiered Testing Strategy* en inglés) consiste en revisar toda la información y evidencia existente de algún riesgo con la sustancia o preparado en cuestión, en este punto si se cuenta con ello, así como con una clasificación establecida sobre la potencial irritación o carencia de esta, no es necesario realizar ninguna prueba. Por el contrario, si no es posible catalogar el riesgo con los registros existentes, entonces se realiza una prueba *in vivo* para realizar dicha clasificación (OECD, 2017).

Por otro lado, también existen las estrategias de enfoque ascendente (*Bottom Up Approach*) y enfoque descendente (*Top Down Approach*). La primera, parte de inferir que la sustancia es no irritante por lo cual se realizan pruebas in vitro para corroborar este supuesto, mientras que, en la segunda, se parte de la suposición de que la muestra es irritante. Dependiendo del resultado de las pruebas, como se muestra en la Figura 29, se le asigna una categoría al preparado.

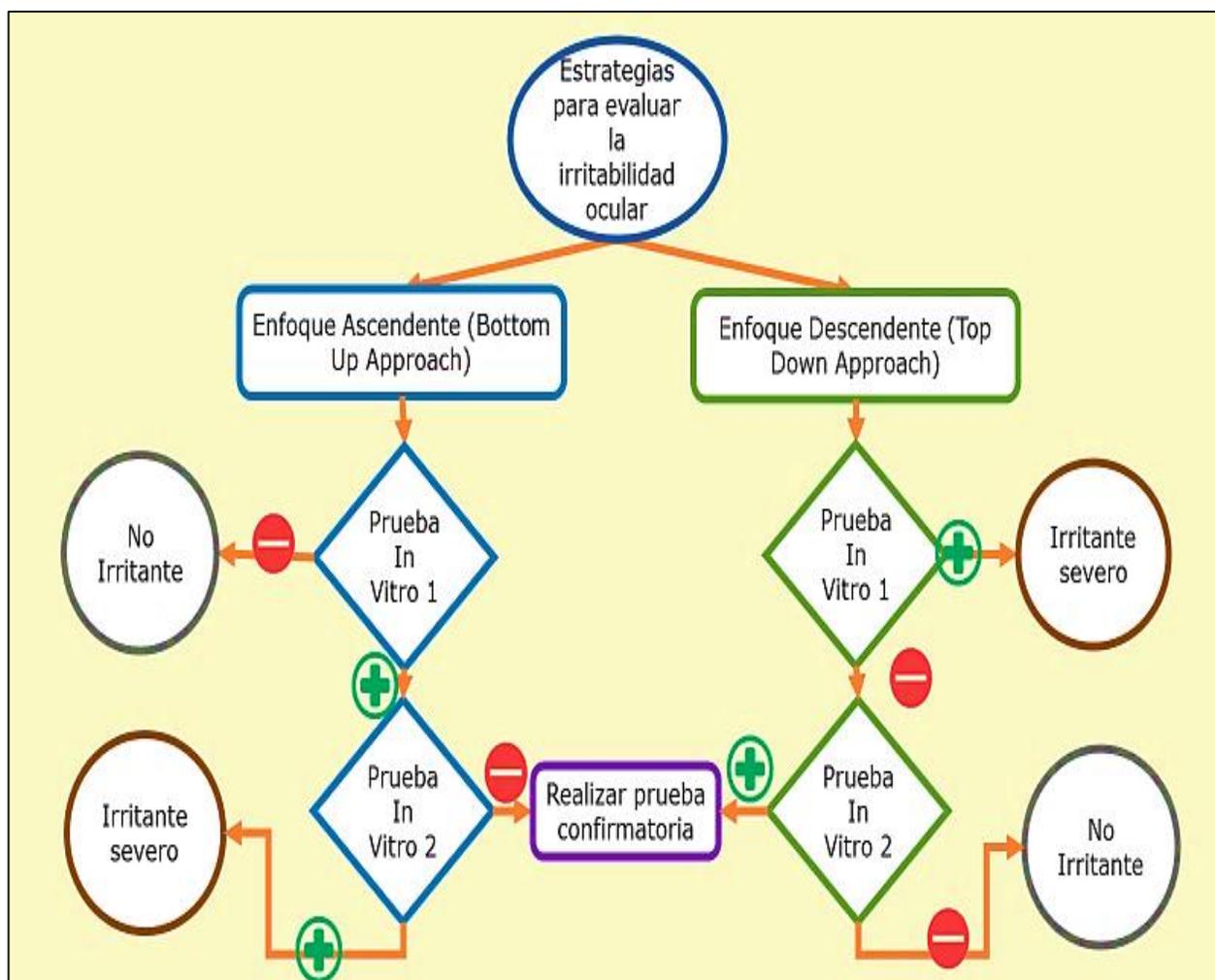


Figura 29. Enfoques Ascendente y Descendente para la evaluación de la irritabilidad ocular. Modificado de Institute for In Vitro Sciences, 2020.

En el momento que se requiera de los estudios descritos anteriormente para conocer la toxicidad de la formulación, se deben tener presentes factores como la naturaleza y concentración de los excipientes, el tiempo de residencia en la superficie ocular y la frecuencia de dosificación del preparado, así como la duración del tratamiento. Esto permite conocer las interacciones que ocurren entre los tejidos y los componentes de una formulación, además de estimar su irritación ocular potencial. (Ibrahim, 2019).

## 5.7 Conclusiones

- I. Se describieron las estructuras y rutas oculares que participan en la absorción de fármacos, así como aquellas que la limitan.
- II. Se abordó la definición, composición, métodos de fabricación, componentes y propiedades de las microemulsiones que permiten su aplicación como sistemas de liberación para fármacos oftálmicos.
- III. Se describieron las características de las microemulsiones que facilitan su aplicación para la vía ocular.
- IV. Se expusieron las propiedades de las microemulsiones para mejorar la solubilización, permeabilidad, biodisponibilidad; así como su capacidad para liberar de manera controlada el fármaco; además, de sus propiedades para incrementar el tiempo de residencia del preparado sobre la superficie ocular como ventajas frente a las formas farmacéuticas convencionales. Adicionalmente, se mencionaron las desventajas asociadas a estos sistemas.
- V. Se especificaron las pruebas de calidad y de caracterización aplicables a las microemulsiones oftálmicas.

## 5.8 Bibliografía

1. Abu-Hassan, Diala W; Acott, Ted S; Kelley, M. J. (2014) 'The Trabecular Meshwork: A Basic Review of Form and Function', *J Ocul Biol.*, 2(1), pp. 1385–1395.
2. Achouri, D., Alhanout, K., Piccerelle, P., Andrieu, V., *et al.* (2013) 'Recent advances in ocular drug delivery', 9045(11).
3. Achouri, D., Alhanout, K., Piccerelle, P. and Andrieu, V. (2013) 'Recent advances in ocular drug delivery', *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39(11), pp. 1599–1617.
4. Addo, R. T. (2016) *Ocular Drug Delivery: Advances, Challenges and Applications*.
5. Alany, R. G. *et al.* (2006) 'W/O microemulsions for ocular delivery: Evaluation of ocular irritation and precorneal retention', *Journal of Controlled Release*, 111, pp. 145–152.
6. Alexander, D. E. (2017) 'Biological Materials Blur Boundaries', in *Nature's Machines*. Academic Press, pp. 99–120.
7. Ali, Y. and Lehmuusaari, K. (2006) 'Industrial perspective in ocular drug delivery', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(11), pp. 1258–1268.
8. Andrés-Guerrero, V. and Herrero-Vanrell, R. (2008) 'Absorción de fármacos por vía tópica. Papel de la conjuntiva', *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 12, pp. 683–685.
9. Aulton, M. E. and Taylor, K. M. G. (2013) *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*. 4th edn. Edinburgh: Elsevier.
10. Balluerka, N. and Vergara, A. I. (2002) *Diseños de Investigación Experimental en Psicología*. Edited by Pearson. Madrid.
11. Bandamwar, K. L. (2011) *Mechanism and clinical significance of superficial micropunctate fluorescein staining of the cornea*. University of New South Wales.
12. Banno, T., Toyota, T. and Asakura, K. (2017) 'Self-Propelled Motion of Micrometer-Sized Oil Droplets in Aqueous Solution of Surfactant', in *Properties and Uses of Microemulsions*. IntechOpen, p. 38.
13. Baranowski, P., Karolewicz, Bożena, *et al.* (2014) 'Ophthalmic drug dosage forms: Characterisation and research methods', *The Scientific World Journal*, 2014.
14. Baranowski, Przemysław, Karolewicz, Bożena, *et al.* (2014) 'Ophthalmic drug dosage forms: characterisation and research methods.', *TheScientificWorldJournal*, 2014, p. 861904.

15. Barar, J. *et al.* (2008) 'Ocular novel drug delivery : impacts of membranes and barriers Ocular novel drug delivery : impacts', 5247(May), pp. 567–581.
16. Bayat, Y. *et al.* (2014) 'A novel approach for preparation of CL-20 nanoparticles by microemulsion method', *Journal of Molecular Liquids*, 193, pp. 83–86.
17. Benita, S. (2005) *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications, Second Edition*. 2nd edn. Edited by C. Press. Informa Healthcare.
18. Bennett, K. E. *et al.* (1981) 'Microemulsion Rheology: Newtonian and Non-Newtonian Regimes', *Society of Petroleum Engineers of AIME*, SPE 10061, pp. 1–13.
19. Bergström, L. M. (2017) 'Chapter 6: Thermodynamics and Bending Energetics of Microemulsions', in *Properties and Uses of Microemulsions*. IntechOpen, pp. 115–137.
20. Bharti, S. K. and Kesavan, K. (2017) 'Phase-transition W/O Microemulsions for Ocular Delivery: Evaluation of Antibacterial Activity in the Treatment of Bacterial Keratitis', *Ocular Immunology Inflammation*, 25(4), pp. 463–474.
21. Bhattacharjee, S. (2016) 'DLS and zeta potential - What they are and what they are not?', *J. Controlled Release*. Elsevier B.V., 235, pp. 337–351.
22. Blom, C. and Mellema, J. (1988) 'Rheological behaviour of microemulsions', *Progress in Colloid & Polymer Science*, 76, pp. 228–233.
23. Brime, B. *et al.* (2002) 'Amphotericin B in oil-water lecithin-based microemulsions: Formulation and toxicity evaluation', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(4), pp. 1178–1185.
24. Buruk Sahin, Y., Demirtas Aktar, E. and Burnak, N. (2016) 'Mixture Design : A Review of Recent Applications in the Food Industry', *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, 22(4), pp. 297–304.
25. Bye, Louise A.; Modi, Neil, C.; Stanford, M. (2013) *Basic Sciences for Ophthalmology*. first. United Kindom: Oxford University Press.
26. Callender, S. P. *et al.* (2017) 'Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery', *International Journal of Pharmaceutics*.
27. Chen, H. *et al.* (2018) 'Recent Developments in Ophthalmic Drug Delivery Systems for Therapy of Both Anterior and Posterior Segment Diseases', 24(March), pp. 54–61.
28. Cholkar, K. and Dasari, S. R. (2013) *Eye: anatomy, physiology and barriers to drug delivery*.
29. Civan, M. M. (2008) 'Chapter 1 Formation of the Aqueous Humor. Transport Components and Their Integration', in *Current Topics in Membranes*, pp. 1–45.

30. Clayton, K. N., Salameh, W. . and Kinzer-Ursem. T.L. (2016) 'Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry', *Biomicrofluidics*, 10(5), pp. 1–30.
31. Craig, J. P. *et al.* (1995) 'Refractive index and osmolality of human tears', *Optometry and Vision Science*, 72(10), pp. 718–724.
32. Dantas, T. N. C. *et al.* (2010) 'Development of a new propolis microemulsion system for topical applications', *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(3), pp. 368–375.
33. Dokoumetzidis, A. and Macheras, P. A. (2006) 'A Century of dissolution Research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System', *International Journal of Pharmaceutics*, 321, pp. 1–11.
34. Drewe, J. *et al.* (1992) 'Enhancement of the oral absorption of cyclosporin in man', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 34(1), pp. 60–64.
35. Duarte Agudelo, C. A. and Niño Vicentes, J. R. (2004) *Introducción a la mecánica de fluidos*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
36. Duratec (sin fecha) *Opacitometer*. <http://www.opacitometer.com/index.php/component/allvideoshare/video/bcop-training-english> (Se accedió el 11 diciembre 2019).
37. ECVAM (2011) 'Protocol for the Cytosensor Microphysiometer Toxicity Test', pp. 1–12.
38. Escobar Jimenez, M. P. (2017) *Elaboración y caracterización de cristales líquidos bioactivos*. Universidad Veracruzana.
39. European Commission (2017) *Eye Irritation / Serious Eye Damage, Validated Test Methods*. Available at: <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam/alternative-methods-toxicity-testing/validated-test-methods/eye-irritation> (Se accedió 1 diciembre 2019).
40. Farfán Álvarez, D. (2019) *Impacto de la Solubilidad en el Desarrollo Farmacéutico*. Universidad Nacional Autónoma de México.
41. Fautsch, Michael P.; Johnson, D. H. (2006) *Aqueous Humor Outflow What Do We Know? Where Will It Lead Us?* Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2092444/>.
42. Fernández, Eutimio Gustavo; Fernández, Mirna; Pérez, Irela Morón, Yohandro; García, V. and Perdomo, Israelio ; Pérez, N. (2008) 'Diseños de experimentos en tecnología y control de los medicamentos Experimental designs in pharmaceutical technology and control of medicaments', *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39(2), pp. 28–40.

43. Fox, S. I. (2011) *Fisiología Humana*. 3°. México: McGrawHill Educación.
44. Furlan, Walter; García Monreal, Javier; Muñoz Escrivá, L. (2000) *Fundamentos de Optometría. Refracción Ocular*. Valencia: Universitat de Valencia.
45. Furlan, Walter; García Monreal, Javier; Muñoz Escrivá, L. (2003) *Fundamentos de Optometría: Refracción Ocular*. Universitat de Valencia.
46. Gadhave, A. D. and Waghmare, J. T. (2014) 'A Short Review On Microemulsion and its Application in extraction of vegetable oil', *International Journal of Research in Engineering and Technology*, pp. 147–158.
47. García-Feijoó, Julián; Pablo-Júlvez, L. E. (2012) *Manual de Oftalmología*. Barcelona, España: Elsevier.
48. García Lopez, M. L. (2002) *Nuevas Estrategias en Administración Ocular de Fármacos*. Barcelona, España: Real Academia de Farmacia de Cataluña.
49. Gasco, M. R. et al. (1989) 'Microemulsions as topical delivery vehicles: Ocular administration of timolol', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 7(4), pp. 433–439.
50. Gaudana, R. et al. (2010) 'Ocular Drug Delivery', *The AAPS Journal*, 12(3), pp. 348–360.
51. Gautam, N. and Kesavan, K. (2017) 'Development of microemulsions for ocular delivery', *Therapeutic Delivery*, 8(5), pp. 313–330.
52. Goel, M. et al. (2010) 'Aqueous humor dynamics: a review.', *The open ophthalmology journal*, 4, pp. 52–9.
53. Goethem, F. Van et al. (2010) 'Development of a new opacitometer for the bovine corneal opacity and permeability ( BCOP ) assay', *Toxicology in Vitro*, 24, pp. 1854–1861.
54. Goodman, L. and Gilman, A. (1996) *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9th edn. Edited by Mc.Graw-Hill Interamericana de Mexico. México.
55. Guíalab (2018) *Comprendiendo y desafiando los límites de la técnica DLS, Comprendiendo y desafiando los límites de la técnica DLS*. <https://www.guialab.com.ar/notas-tecnicas/comprendiendo-y-desafiando-los-limites-de-la-tecnica-dls/>.
56. Gutiérrez-Pulido, H. and De la Vara-Salazar, R. (2008) *Análisis y diseño de experimentos*.
57. Habe, A. and Keipert, S. (1997) 'Development and characterization of microemulsions application', 43, pp. 179–183.

58. Habib, F., El-Mahdy, M. and Maher, S. (2011) 'Microemulsions for ocular delivery: Evaluation and characterization', *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 21(6), pp. 485–489.
59. Hammouda, B., Krueger, S. and Ginka, J. (1993) 'Small Angle Neutron Scattering at the National Institute of Standards and Technology', *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, 98(1), pp. 31–46.
60. Hegde, R. R., Verma, A. and Ghosh, A. (2013) 'Microemulsion: New Insights into the Ocular Drug Delivery', *ISRN Pharmaceutics*, 2013, p. 11.
61. Herrero-Vanrell, R. *et al.* (2013) 'Nano and microtechnologies for ophthalmic administration, an overview', *Journal of Drug Delivery Science and Technology*.
62. Holland, Edward J; Mannis, Mark J; Lee, W. B. (2013) *Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear Film*. USA: Elsevier.
63. Hornof, M., Toropainen, E. and Urtti, A. (2005) 'Cell culture models of the ocular barriers', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60, pp. 207–225.
64. Ibrahim, S. S. (2019) 'The Role of Surface Active Agents in Ophthalmic Drug Delivery: A Comprehensive Review', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108(6), pp. 1923–1933.
65. ICCVAM (2010) 'ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods National T', (10).
66. Iluminet (2019) *¿Qué es un lux?, ¿Qué es un lux?*. <https://www.iluminet.com/que-es-un-lux/> (Se accedió el 12 diciembre 2019).
67. Innocenzi, P., Malfatti, L. and Falcaro, P. (2013) *Water Droplets to Nanotechnology: A Journey Through Self-Assembly*. First Edit. Royal Society of Chemistry.
68. Institute for In Vitro Sciences (2020) *Cytosensor Microphysiometer, Cytosensor Microphysiometer*. <https://iivs.org/testing-services/assays/ocular/cytosensor-microphysiometer/>.
69. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods and National Institute of Environmental Health Sciences, U. S. (2010) 'ICCVAM-Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method', in *ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of In Vitro Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products*. National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), p. 10.
70. Israelachvili, J. N. (2011) *Intermolecular and Surface Forces*. Third Edit, *Journal of Chemical Information and Modeling*. Third Edit. Academic Press.

71. Jiao, J. (2008) 'Polyoxyethylated nonionic surfactants and their applications in topical ocular drug delivery', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 60(15), pp. 1663–1673.
72. Joseph, E. and Singhvi, G. (2019) *Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: A potential nanocarrier*, *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*. Elsevier Inc.
73. Karunaratne, N. ., Pamunuwa, G. . and Ranatunga, U. (2017) 'Chapter 1: Microemulsions', in *Properties and Uses of Microemulsions*. IntechOpen, pp. 3–13.
74. Katiyar, B. S. *et al.* (2013) 'Microemulsions : A Novel Drug Carrier System', *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 20(4), pp. 138–148.
75. Kerns, E. H. and Di, L. (2008) *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Method from ADME to Toxicity Optimization*. United States of America: Elsevier.
76. Krishna, R. and Yu, L. (2008) *Biopharmaceutics Application in Drug Development*. USA: Springer Science Business + Media, LLC.
77. Kumar Jha, S., Dey, S. and Karki, R. (2011) 'Microemulsions- Potential Carrier for Improved Drug Delivery', *International Pharmaceutica Scientia*, 1(2), pp. 25–31.
78. Kumar, R. and Sinha, V. R. (2014) 'Preparation and optimization of voriconazole microemulsion for ocular delivery', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117, pp. 82–88.
79. Kumari, Anita, Sharma, Pramod K., Garg, Vipin K., Garima, G. (2010) 'Ocular inserts — Advancement in therapy of eye diseases', *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 1(3), pp. 291–296.
80. Laddha, P., Suthar, V. and Butani, S. (2014) 'Development and optimization of self microemulsifying drug delivery of domperidone', *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50, pp. 92–100.
81. Lawrence, M. J. and Rees, G. D. (2012) 'Microemulsion-based media as novel drug delivery systems ☆', *Adv. Drug Deliv. Rev.* Elsevier B.V., 64, pp. 175–193.
82. Lens, Al; Nemeth, Sheila Coyne; Ledford, J. K. (2008) *Ocular Anatomy and Physiology*. Second Edi. United States of America: SLACK Incorporated.
83. Levin, Leonard A.; Nilsson, Siv F. E.; Ver Hoeve, J. W. S. M. . (ed.) (2011) *Adler's Physiology of the eye*. 11th edn. USA: Elsevier.
84. Li, C. C. *et al.* (2007) 'Timolol transport from microemulsions trapped in HEMA gels', *Journal of Colloid and Interface Science*, 315(1), pp. 297–306.
85. Lidich, N. *et al.* (2019) 'Potentiality of microemulsion systems in treatment of ophthalmic

- disorders: Keratoconus and dry eye syndrome – In vivo study', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 173, pp. 226–232.
86. Ligório Fialho, S. and da Silva-Cunha, A. (2004) 'New vehicle based on a microemulsion for topical ocular administration of dexamethasone', *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 32(6), pp. 626–632.
87. Llera-Rojas, V. G. (2018) *Obtención y Caracterización de Nanocápsulas de un Fármaco In Situ a través de un sistema automicroemulsionable SMEDDS para la administración oral*. Universidad Nacional Autónoma de México.
88. Lopez, F. *et al.* (2004) 'Role of the cosurfactant in water-in-oil microemulsion: Interfacial properties tune the enzymatic activity of lipase', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 237(1–3), pp. 49–59.
89. Lv, F. F., Zheng, L. Q. and Tung, C. H. (2005) 'Phase behavior of the microemulsions and the stability of the chloramphenicol in the microemulsion-based ocular drug delivery system', *International Journal of Pharmaceutics*, 301, pp. 237–246.
90. Lv, F., Zheng, L. and Tung, C. (2005) 'Phase behavior of the microemulsions and the stability of the chloramphenicol in the microemulsion-based ocular drug delivery system', *International Journal of Pharmaceutics*, 301, pp. 237–246.
91. Mandal, Surjyanarayan *et al.* (2010) 'Development of microemulsion formulation for the solubility enhancement of flunarizine', *Der Pharmacia Lettre*, 2(3), pp. 227–236.
92. Martini, F. H. (2007) *Anatomy and Physiology*. 1st edn. Jurong, Singapore: Pearson Education South Asia.
93. Mcconnell, A. H. M. *et al.* (1992) 'The Cytosensor Microphysiometer: Biological Applications of Silicon Technology', *Science*, 257(5078), pp. 1906–1912.
94. Mendigan, M. T. *et al.* (2009) *Brock, Biología de los microorganismos*. 12°. España: Pearson Education.
95. Millán, M. S., Escofet, J. and Pérez, E. (2003) *Óptica Geométrica*. Primera. Barcelona, España: Ariel Ciencia.
96. Montgomery, D. C. (2004) *Diseño y Analisis de Experimentos*.
97. Moreno, M. A., Ballesteros, M. P. and Frutos, P. (2003) 'Lecithin-based oil-in-water microemulsions for parenteral use: Pseudoternary phase diagrams, characterization and toxicity studies', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(7), pp. 1428–1437.
98. Moreno, M. A., Frutos, P. and Ballesteros, M. P. (2001) 'Lyophilized lecithin based oil-water microemulsions as a new and low toxic delivery system for amphotericin B', *Pharmaceutical Research*, 18(3), pp. 344–351.

99. Muchtar, S. *et al.* (1996) 'Ex-vivo permeation study of indomethacin from a submicron emulsion through albino rabbit cornea', *Journal of Controlled Release*, 44(1), pp. 55–64.
100. Nair, R., Chakrapani, M. and Kaza, R. (2012) 'Preparation and Evaluation of Vancomycin Microemulsion for Ocular Drug Delivery', *Drug Delivery Letters*, 2(1), pp. 26–34.
101. Narang, A. S., Delmarre, D. and Gao, D. (2007) 'Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions', *International Journal of Pharmaceutics*, 345(1–2), pp. 9–25.
102. Novelo-Torres, A. M. and Gracia-Fadrique, J. (2010) 'Trayectorias en diagramas ternarios', *Educacion Quimica*, 21(4), pp. 300–305.
103. OECD (2017) 'Test No. 460. Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. Guidelines for the Testing Chemicals Section 4.' Paris: OECD Publishing.
104. Ortega-Pérez, D. C. *et al.* (2015) 'Diseño de mezclas en formulaciones industriales', *Dyna-Colombia*, 82(189), pp. 149–156.
105. Park, K., Mi, G. and Kim, C. K. (1999) 'Preparation and evaluation of flurbiprofen-loaded microemulsion for parenteral delivery', *International Journal of Pharmaceutics*, 181(2), pp. 173–179.
106. Particle Technology Labs (2019) *Refractive Index, Refractive Index*.
107. Pavelka, Margit; Roth, J. (2015) *Functional Ultrastructure. Atlas of Tissue Biology and Pathology*. third edit. London Springer.
108. Pietrowska, K. *et al.* (2018) 'Analysis of pharmaceuticals and small molecules in aqueous humor', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier B.V., 159, pp. 23–36.
109. Prieto Calvo, E. (2012) *Farmacocinética, Biodisponibilidad y Tolerancia Ocular de Memantina en Conejos: Aportaciones al Análisis de una Nueva Formulación Oftálmica a Base de Nanopartículas*. Universidad Zaragoza.
110. Rajpoot, K. and Tekade, R. K. (2019) *Microemulsion as drug and gene delivery vehicle: An inside story, Drug Delivery Systems*. Elsevier Inc.
111. Ramsey, M. S. (2019) 'Rheology, Viscosity, and Fluid Types', in *Practical Wellbore Hydraulics and Hole Cleaning*. Gulf Professional Publishing, p. 340.
112. Remington, L. A. and Goodwin, D. (2011) *Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System*. Third. Oregon: Sciences, Elsevier Health.
113. Robles, L. V. (2011) 'Los excipientes y su funcionalidad en productos farmacéuticos

- sólidos';, *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 42(1), pp. 18–36.
114. Rogers, K. (ed.) (2010) *The Eye, The Physiology of Human Perception*. 1st edn. Britannica Educational Publishing.
  115. Rosa, M., Kwiecień, M. and Tal-figiel, B. (2013) 'Rheological Investigations of Pharmaceutical Emulsions Prepared With Modified Lecithin'.
  116. Rousseau, D., Rafanan, R. and Yada, R. (2011) '4.55 - Microemulsions as Nanoscale Delivery', in Moo-Young, M. (ed.) *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*. Second. Academic Press, pp. 675–682.
  117. Ruckenstein, E. (1996) 'Microemulsions, macroemulsions, and the Bancroft rule', *Langmuir*, 12(26), pp. 6351–6353.
  118. Ruíz Gómez, M. J., Souviron Rodríguez, A. and Martínez Morillo, M. (2002) 'La glicoproteína-P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer.', *An.Med.Interna*, 19(9), pp. 49–57.
  119. Sakamoto, K., Lochhead, R. Y. and Yamashita, Y. (2017) *Cosmetic Science and Technology, Theoretical Principles and Applications*. Elsevier.
  120. Sanchez-Dominguez, M., Aubery, C. and Solans, C. (2012) 'New Trends on the Synthesis of Inorganic Nanoparticles Using Microemulsions as Confined Reaction Media', *Smart Nanoparticles Technology*, (May 2014).
  121. Saona Santos, C. L. (2006) *Cotactología Clínica*. Segunda ed. Barcelona, España: Masson.
  122. Sarciaux, J. M., Acar, L. and Sado, P. A. (1995) 'Using microemulsion formulations for oral drug delivery of therapeutic peptides', 120, pp. 127–136.
  123. Secretaría de Salud (1997) 'Ley General de Salud', in *Diario Oficial de la Federación*. [http://www.salud.gob.mx/cnts/pdfs/LEY\\_GENERAL\\_DE\\_SALUD](http://www.salud.gob.mx/cnts/pdfs/LEY_GENERAL_DE_SALUD).
  124. Secretaría de Salud (2005) *NORMA Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos*. México.
  125. Secretaría de Salud (2018) *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)*. 12va edición. México.
  126. Servicio Navarro de Salud (2005) 'Formas farmacéuticas de liberación modificada y estereoisómeros ¿Nos aportan algo en la práctica clínica?', *Boletín de información Farmacoterapéutica de Navarra*, 13, pp. 1–10.
  127. Shafiq-un-nabi, S. *et al.* (2007) 'Formulation Development and Optimization Using Nanoemulsion Technique : A Technical Note', *AAPS PharmSciTech*, 8(2), pp. 1–6.

128. Shargel, L. and Yu, A. B. C. (2016) *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. 7th edn. Mexico City: McGrawHill Educación.
129. Shaw, C. and Ph, D. (2016) *Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages, Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages*.
130. Shenroy, A. (2018) *Heat transfer to Non-Newtonian Fluids, Fundamentals and Analytical Expresions*. Wiley-VCH.
131. Sinko, P. J. (ed.) (2010) *Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences*. 6th edn. Philadelphia.
132. Skalicky, S. E. and Application, C. (2016) *Ocular and Visual Physiology*. Sydney: Springer.
133. Soni, V. *et al.* (2019) 'Chapter 13 - Design and Evaluation of Ophthalmic Delivery Formulations', in Press, A. (ed.) *Basic Fundamentals of Drug Delivery*. 1°. Elsevier Inc., pp. 473–538.
134. Suratkar, V. and Mahapatra, S. (2000) 'Solubilization site of organic perfume molecules in sodium dodecyl sulfate micelles: New insights from proton NMR studies', *Journal of Colloid and Interface Science*, 225(1), pp. 32–38.
135. Tadros, T. (2014) *Formulation of Disperse Systems, Journal of Chemical Information and Modeling*. Wiley-VCH.
136. Talegaonkar, S. *et al.* (2008) 'Microemulsions : A Novel Approach to Enhanced Drug Delivery Microemulsions : A Novel Approach to Enhanced Drug Delivery', *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 2(3), pp. 238–257.
137. Tang, I. *et al.* (1996) 'The pH of Multi-Purpose Soft Contact Lens Solutions', *Optometry and Vision Science*, 73(12), pp. 746–749.
138. UNAM, F. de M. (2018) *Dexametasona*. Available at: [http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi\\_2k8/prods/PRODS/Dexametasona Ofta.htm](http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Dexametasona Ofta.htm) (Se accesó el 22 abril 2018).
139. Universidad de los Andes (ed.) (1991) *Comportamiento de Fase de los Sistemas DIAGRAMAS y BARRIDOS*. Formulacion. Merida, Venezuela: Universidad de los Andes, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química.
140. Urtti, A. (2006) 'Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery', 58, pp. 1131–1135.
141. Üstündag-Okur, N. *et al.* (2014) 'Novel Ofloxacin-Loaded Microemulsion', *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 30(4), pp. 319–332.

142. Vaidya, S. and Ganguli, A. K. (2019) 'Microemulsion Methos for Synthesis of Nanostructured Materials', *Nanotechnology*, 2, pp. 1–12.
143. Verma, S. P. (2012) 'Geochemometrics', *Revista Mexicana de Ciencias Geologicas*, 29(1), pp. 276–298.
144. Wilhelmus, K. R. (2001) 'The Draize Eye Test', *Survey of Ophthalmology*, 45(6), pp. 493–515.
145. Wilson, C. G. *et al.* (2012) *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*, *Journal of Chemical Information and Modeling*. Springer.
146. Witmer, J. R. *et al.* (2016) 'Direct spectrophotometric measurement of supra-physiological levels of ascorbate in plasma', *Redox Biology*. Elsevier, 8, pp. 298–304.
147. Yadav, S. and Khatri, J. (2012) 'Development and evaluation of an ocular anti-inflammatory microemulsion', *International Journal Of Pharmacy&Technology*, 4(2), pp. 4218–4230.