Desarrollo y Caracterización de Implantes Biodegradables Conteniendo Clorhidrato de Moxifloxacina y Dexametasona para Prevención y/o Tratamiento de Infecciones Bacterianas y Procesos Inflamatorios Intraoculares

Tutoría: Dra. Helena Pardo

Cotutoría: Dr. Luis Ignacio Tártara

Dirección Académica: Dr. Álvaro Mombrú

Q.F. Pablo Sebastián Miranda Fierro

Tesis de Doctorado en Química

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Doctor en Química

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Octubre de 2026

Agradecimientos

Arcos Biomedical: -Dr. Oscar Zenarruza

Laboratorio de Nanotecnología (IPTP): -Dra. Analía Castro
-I.Q. Juan Pablo Villanueva
-Msc. Luciana Pereira
-Dra. Patricia Zimet

Laboratorio BIOTEFA (IPTP): -Q.F. Antonio Malanga
-Q.F. Daniel Pérez
-Q.F. Federico Rosano
-Dra. María Luisa Rodríguez
-Dr. Omar Martín

Universidad Nacional de Córdoba: -Dr. Luis Manlla (F. Ciencias Médicas)
-Dra. Luz Juárez-Ruiz (F. Ciencias Médicas)
-Dr. Santiago Palma (F. Ciencias Químicas)

Cátedra de Física (FQ): -Dr. Benjamín Montenegro
-Dra. Dominique Mombrú
-Dr. Fernando Pignanelli
-Dra. Luciana Fernández
-Dr. Mariano Romero
-Dr. Martín Estevez
-Dr. Ricardo Faccio
-Quim. Tatiana Gregorio

Taller de Instrumentos (FQ): -Q.F. Daniel Lorenzo

Laboratorio de Instrumentos Analíticos (FQ): -Dr. Danilo Davyt
-Q.F. Luisina Rodríguez

Más allá de todas las personas mencionadas anteriormente, quisiera también agradecer por su ayuda constante durante la realización de esta tesis a mis tutores: **Dra. Helena Pardo** por recibirme en su laboratorio desde 2012, **Dr. Luis Ignacio Tártara** por su trabajo con los estudios *in vivo*, y en especial al **Dr. Álvaro Mombrú** por todas las oportunidades y apoyo brindado a lo largo de los años.

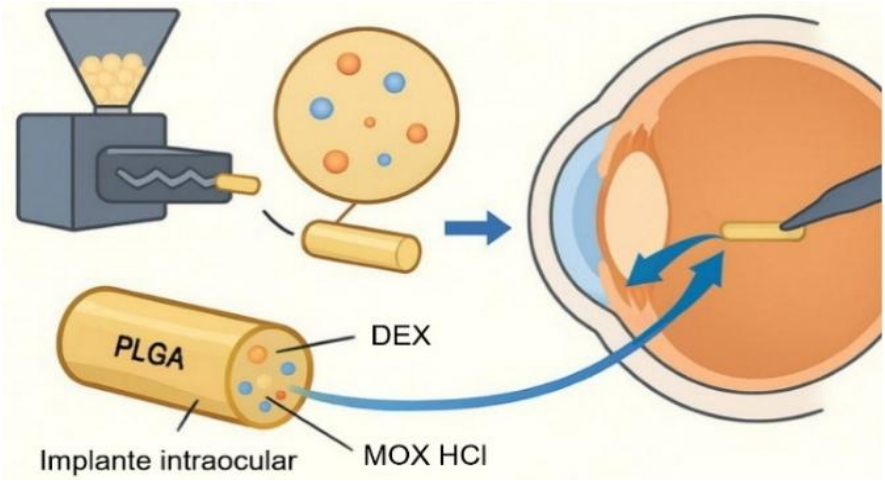
Resumen

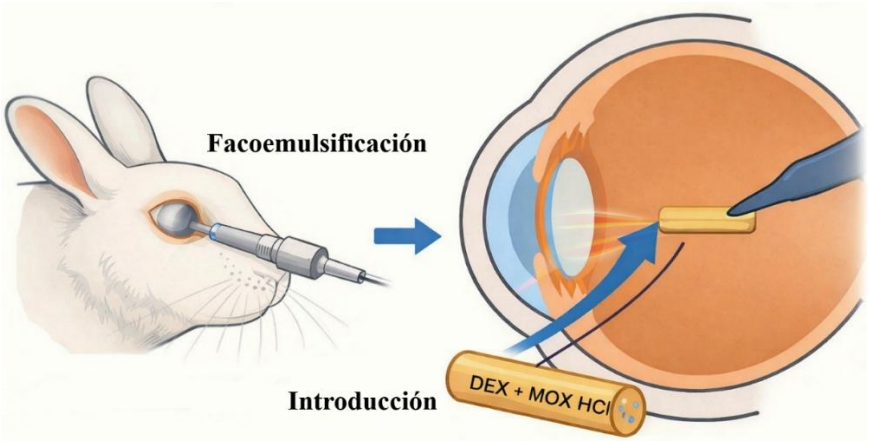
El objetivo principal de esta tesis consistió en el desarrollo, fabricación y evaluación de una formulación de implantes intracamerales biodegradables de liberación prolongada, basados en una matriz de ácido poli-(láctico-co-glicólico), conteniendo dexametasona (antiinflamatorio corticosteroide) y clorhidrato de moxifloxacina (antibiótico de amplio espectro). Los insertos se diseñaron tomando dos medicamentos de aplicación intraocular aprobados para uso humano como referencia tecnológica (Surodex® y Ozurdex®). Este tipo de implantes se asocia a una elevada biodisponibilidad en comparación con formulaciones tópicas. Asimismo, permite reducir riesgos derivados de inyecciones intraoculares repetidas. La producción de los insertos se realizó mediante una extrusora de calidad farmacéutica, y el desarrollo se llevó a cabo aplicando el enfoque sistemático Quality by Design. Esto permitió, bajo las condiciones de trabajo de la tesis, generar unidades con desempeño farmacéutico adecuado. Además, se realizó la puesta a punto de metodologías analíticas de control de calidad, evaluándose también el perfil de liberación *in vitro* de los insertos. Se efectuaron asimismo estudios de caracterización fisicoquímica empleando varias técnicas instrumentales. Por otro lado, se determinó el perfil farmacocinético poblacional en humor acuoso, en conejos albinos con y sin afaquia inducida. Por último, se desarrolló un modelo animal de endoftalmitis utilizando la especie bacteriana *Pseudomonas aeruginosa*. La formulación final presentó perfiles de liberación prolongada diferenciados entre ambos fármacos *in vitro* e *in vivo*. En los estudios con animales se observó una reducción significativa de la inflamación intraocular y una marcada protección frente a la infección del modelo, sin evidencias relevantes de alteraciones sobre estructuras anatómicas. En conjunto, el proceso de fabricación y las materias primas empleadas permitieron obtener insertos con características compatibles con un potencial uso en humanos. La formulación cumplió los requisitos de control de calidad establecidos, y los resultados justifican a futuro evaluar su posible escalado industrial, registro e introducción en la práctica clínica.

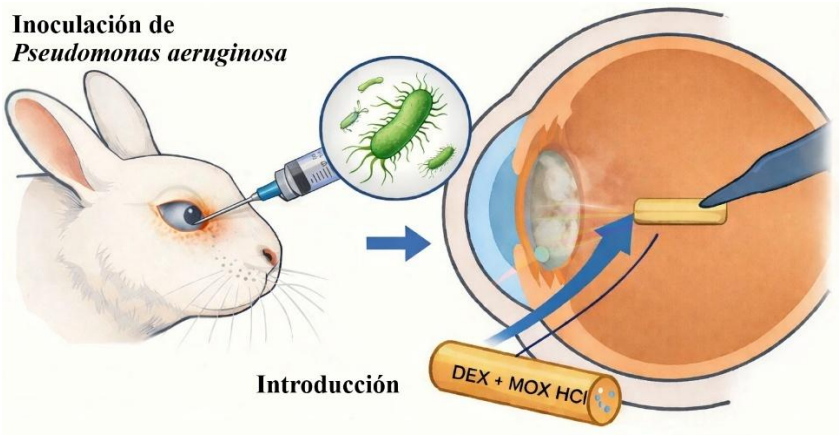
Abstract

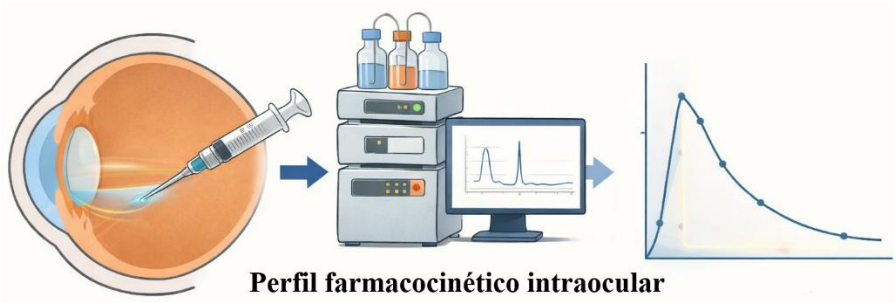
The main objective of this thesis was the development, manufacture and evaluation of a formulation of biodegradable, sustained-release intracameral implants based on a poly(lactic-co-glycolic acid) matrix containing both dexamethasone (a corticosteroid anti-inflammatory drug) and also moxifloxacin hydrochloride (a broad-spectrum antibiotic). The inserts were designed using two intraocular medicinal products approved for human use as technological references (Surodex® and Ozurdex®). This type of implant is associated with high bioavailability compared to topical formulations. Moreover, it reduces the risks derived from repeated intraocular injections. The production of the inserts was carried out by means of a pharmaceutical-grade extruder, and the development process was conducted by applying the systematic Quality by Design approach. Under the working conditions of the thesis, this allowed the generation of units with adequate pharmaceutical performance. Quality control analytical methodologies were established, and the *in vitro* release profile of the inserts was also evaluated. Additionally, physicochemical characterization studies were performed using various instrumental techniques. Furthermore, the population pharmacokinetic profile in aqueous humor was determined in albino rabbits with and without induced aphakia. Lastly, an animal model of endophthalmitis caused by the bacterial species *Pseudomonas aeruginosa* was developed. The final formulation exhibited long-acting and differentiated release profiles for both drugs *in vitro* and *in vivo*. In the animal studies, a significant reduction in intraocular inflammation and a marked protection against infection in the model were observed, with no relevant evidence of alterations in anatomical structures. Overall, the manufacturing process and raw materials employed enabled the production of inserts with potentially suitable characteristics for human use. The formulation met all established quality control requirements, and the results support future evaluation of possible industrial scale-up, regulatory registration, and introduction into clinical practice.

Resumen Gráfico









Índice

Abreviaturas.....**¡Error! Marcador no definido.**

Factores Empleados en Ecuaciones XIII

Unidades de Medida XVI

1. 1 – INTRODUCCIÓN 17

1.1 – Anatomía Ocular.....18

1.1.1 – Generalidades 18

1.1.2 – Humor Acuoso y Cristalino 18

1.2 – Farmacotecnia Intraocular 21

1.2.1 – Vías de Administración 21

1.2.2 – Insertos Oculares 22

1.2.3 – Extrusión en Caliente (HME) 24

2. 2 – OBJETIVOS 27

2.1 – Generales 28

2.2 – Específicos.....28

3. 3 – MATERIALES Y MÉTODOS 29

3.1 – Componentes de los Implantes 30

3.1.1 – PLGA.....30

3.1.2 – DEX.....31

3.1.3 – MOX HCl 32

3.2 – Diseño de la Formulación.....34

3.2.1 – Seguridad de los APIs.....34

3.2.2 – Información Previa acerca de Tratamientos con MOX HCl.....34

3.2.3 – Dispositivos de Referencia Conteniendo DEX.....36

3.2.4 – Breve Introducción al Quality by Design (QbD).....36

3.2.5 – Aplicación de la Metodología QbD 37

3.2.6 – Formulación Tentativa.....39

3.3 – Metodología Analítica 40

3.3.1 – Verificación de Pipetas Automáticas 40
3.3.2 – Limpieza del Material de Vidrio 40
3.3.3 – Influencia de las Membranas de Filtración 40
3.3.4 – Carry over 41
3.3.5 – Perfil de Impurezas 41
3.3.6 – Degradación Forzada 41
3.3.7 – Impurezas de DEX y MOX HCl 42
3.3.8 – Validación del Método HPLC 44
3.3.9 – Análisis Cromatográfico 45
3.4 – Equipamiento de Producción 48
3.4.1 – Molienda 48
3.4.2 – Mezcla de Sólidos 48
3.4.3 – Producción de Fibras e Insertos 49
3.5 – Proceso de Fabricación 50
3.5.1 – Homogeneidad de Mezclado 50
3.5.2 – Obtención de los Implantes 50
3.5.4 – Optimización de la Formulación 52
3.5.5 – Procesamiento de las Fibras 55
3.6 – Determinaciones Instrumentales 56
3.6.1 – Análisis Térmico por DSC 56
3.6.2 – Estudio Cristalográfico por XRD 56
3.6.3 – Exploración Morfológica por SEM 57
3.6.4 – Verificación Cualitativa de la Homogeneidad por CRM 57
3.7 – Control de Calidad sobre los Implantes 58
3.7.1 – Densidad 58
3.7.2 – Uniformidad de Masa 58
3.7.3 – UC 58
3.7.4 – Liberación *In Vitro* 59

3.7.5 – Estabilidad de la Formulación en el Tiempo 59
3.8 – Ensayos In Vivo 61
3.8.1 – Manejo de Animales de Experimentación 61
3.8.2 – Toma de Muestras *In Vivo* 61
3.8.3 – Estudios Preliminares en Animales 62
3.8.4 – Evaluación Clínica de la Actividad de DEX en los Insertos 62
3.8.5 – Cuantificación de la Inflamación mediante Tests ELISA 63
3.8.6 – Evaluación de la Protección Antibiótica *In Vivo* 64
3.8.7 – Análisis Farmacocinético 66
4. 4 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN 67
4.1 – Validación Analítica In Vitro 68
4.1.1 – Verificación de la Limpieza de los Recipientes 68
4.1.2 – Diferencias Generadas por el Proceso de Filtración 68
4.1.3 – Estimación del CO 69
4.1.4 – Evaluación de la Degradación 70
4.1.5 – Indicadores Fundamentales de Calidad del Método Cromatográfico 72
4.2 – Preparación Previa a la Extrusión 73
4.2.1 – DTP antes y después de la Molienda 73
4.2.2 – Tiempo Óptimo de Mezclado 75
4.3 – Diseño Experimental 76
4.3.1 – DOE con DEX 76
4.3.2 – DOE con MOX HCl 78
4.3.3 – Perfiles *In Vitro* luego de la Irradiación 80
4.4 – Análisis Instrumental 83
4.4.1 – DSC 83
4.4.2 – XRD 84
4.4.3 – SEM 85
4.4.4 – CRM 85

4.5 – Control de Calidad 87
4.5.1 – Análisis de Rutina 87
4.5.2 – Efecto del Almacenamiento en la Estabilidad 88
4.6 – Ensayos en Animales 90
4.6.1 – Evaluación de la Reacción General al Proceso de Inserción 90
4.6.2 – Estudios Preliminares del Sistema Implantable luego de una Cirugía 91
4.6.3 – Confirmación de la Actividad Antiinflamatoria del Inserto 92
4.6.4 – Desempeño del Dispositivo luego de una Facoemulsificación 94
4.6.5 – Cuantificación de la Actividad Antiinflamatoria 95
4.6.6 – Modelo de Endoftalmitis 98
4.6.7 – Monitorización de la PIO 100
4.6.8 – Método Cromatográfico en Ensayos *In Vivo* 101
4.6.9 – Modelos Farmacocinéticos para DEX ..... **¡Error! Marcador no definido.**
4.6.10 – Perfiles Poblacionales de DEX 111
4.6.11 – Modelos Farmacocinéticos para MOX HCl 113
4.6.12 – Perfiles Poblacionales de MOX HCl 120
5. 5 – CONCLUSIONES 123
5.1 – Puntos Clave 124
5.1 – Formulación objetivo 124
5.2 – Proceso de fabricación 124
5.3 – Controles de calidad 124
5.4 – Evaluación de la estabilidad 124
5.5 – Estudios *in vivo* 125
5.6 – Perfiles farmacocinéticos 125
5.7 – Resumen final 125
6. 6 – ANEXOS CXXVIII
6.1 – Tratamiento Estadístico de los Datos Experimentales CXXIX
6.1.1 – Generalidades CXXIX

6.1.2 – Detección de Outliers CXXIX
6.1.3 – Tests de Hipótesis CXXIX
6.1.4 – ANOVA CXXIX
6.1.5 – Incertidumbre de los Resultados CXXIX
6.2 – Cálculos para Validación Analítica In Vitro CXXX
6.2.1 – Pipetas Automáticas CXXX
6.2.2 – Solución de Prueba para Lavados CXXX
6.2.3 – Estándares y otras Soluciones para Dosificación *In Vitro* CXXX
6.2.4 – Membranas de Filtración de 0.45 μm CXXXI
6.2.5 – Carry over CXXXI
6.2.6 – Degradación Forzada CXXXII
6.2.7 – Límites Instrumentales CXXXIV
6.2.8 – Linealidad CXXXV
6.2.9 – Exactitud CXXXVI
6.2.10 – Precisión CXXXVII
6.2.11 – Robustez CXXXVII
6.3 – Cálculos para Control de Calidad CXXXVIII
6.3.1 – Evaluación de la Homogeneidad del Polvo CXXXVIII
6.3.2 – Cálculo de la Densidad CXXXIX
6.3.3 – Verificación de la Uniformidad de Masa CXL
6.3.4 – UC CXL
6.3.5 – Evaluación de la Liberación *In Vitro* CXLI
6.3.6 – Estudios *In Vivo* CXLV
6.4 – Otros Trabajos Generados durante la Tesis ..... **¡Error! Marcador no definido.**
6.4.1 – Artículos Científicos CXLVI
6.4.2 – Proyectos de Investigación Financiados CXLVI
6.4.3 – Presentaciones en Congresos CXLVI
6.5 – Bibliografía CXLVII

Abreviaturas

θ = Ángulo de difracción

α = Nivel de significación estadística (0.05 → 95 % de confianza)

λ = Longitud de onda

ω = Desviación estándar de efectos aleatorios

ADF = Acetónido de fluocinolona

AIC = Criterio de información de Akaike

ANOVA = Análisis de varianza

API = Principio activo

BEC = Beclometasona

BLQ = Por debajo de LOQ

BRVO = Oclusión de la vena retiniana ramificada

CL = Clearance

CMA = Atributos críticos de los materiales

$c_{máx}$ = Concentración máxima alcanzada

CO_2 = Dióxido de carbono

CPP = Parámetros críticos del proceso

CQA = Atributos críticos de calidad

CRM = Microscopía Raman confocal

CRVO = Oclusión de la vena retiniana central

DEX = Dexametasona

DMSO = Dimetilsulfóxido

DOE = Diseño experimental

DSC = Calorimetría diferencial de barrido

DTP = Distribución de tamaños de partícula

ECC = Extracción capsular de cataratas

EMD = Edema macular diabético

EVA = Etinilvinilacetato

FDA = Administración de Alimentos y Drogas (Estados Unidos)

FM = Fase móvil

GI = Grupo uno

GII = Grupo dos

H_0 = Hipótesis nula

H_2O_2 = Peróxido de hidrógeno

H_3PO_4 = Ácido fosfórico

H_A = Hipótesis alternativa

HCl = Ácido clorhídrico

HME = Extrusión en caliente

HPC = Hidroxipropilcelulosa

HPLC = Cromatografía líquida de alta eficacia

HPMC = Hidroxipropilmetilcelulosa

HRA = Humedad relativa ambiente

ICH = Comité Internacional para la Armonización

IL-1 = Interleucina 1

IPO = Inflamación postoperatoria

k_a = Constante de absorción del fármaco

KH_2PO_4 = Fosfato monobásico de potasio

LIO = Lente intraocular

LPS = Lipopolisacárido

MEZ = Elemento mezclador del tornillo de la extrusora

MIC_{90} = Concentración mínima inhibitoria para el 90 % de las bacterias susceptibles

MOX HCl = Clorhidrato de moxifloxacina

NaCl = Cloruro de sodio

NaOH = Hidróxido de sodio

NLME = Efectos mixtos no lineales

PD = Producto de degradación

PEG = Polietilenglicol

PIO = Presión intraocular

PLGA = Ácido poli-(láctico-co-glicólico)

PR = Producto relacionado

PRE = Elemento presurizador del tornillo de la extrusora

PVA = Alcohol polivinílico

PVDF = Fluoruro de polivinilideno

Q = Flujo intercompartimental

QbD = Quality by design (calidad por diseño)

QTPP = Calidad del perfil del producto objetivo

R = Resolución de los picos en el método cromatográfico

r^2 = Coeficiente de determinación

RG502 = Resomer® RG502 (PLGA con terminación éster)

RG502H = Resomer® RG502H (PLGA con terminación ácida)

RSE = Error estándar relativo

SAR HCl = Clorhidrato de sarafloxacina

SEM = Microscopía electrónica de barrido

SM = Solución matricial

S_{NaCl} = Solución salina

TF = Factor de asimetría

$t_{máx}$ = Tiempo al cual se alcanza la concentración máxima

t_{ret} = Tiempo de retención

TP = Tamaño de partícula

TPD = Elemento transportador del tornillo de la extrusora

TPP = Perfil del producto objetivo

TRJ = Test de Ryan-Joiner

UC = Uniformidad de contenido

UCNI = Uveítis crónica no infecciosa

UPNI = Uveítis posterior no infecciosa

USP 42 NF 37 = Farmacopea de los Estados Unidos 42, Formulario Nacional 37

V_D = Volumen de distribución

V_{enrase} = Volumen de enrase para un punto de la curva de calibración

V_{P100} = Volumen de pipeta automática de 100 µL

V_{P1000} = Volumen de pipeta automática de 1000 µL

VPC = Chequeo de predicción visual

V_{SM} = Volumen de solución matricial

WHO = Organización Mundial de la Salud

XRD = Difracción de rayos X

Factores Empleados en Ecuaciones

$\Delta\%$ = Cambio porcentual (%)

$\partial h/\partial x$ = Derivada parcial de la magnitud h respecto a la variable x

$\nu_{\lambda máx}$ = Sensibilidad máxima del ojo humano a 555 nm (683.002 lux)

$\nu_{relativo}$ = Sensibilidad del ojo humano a 600 nm expresada como fracción de $\nu_{\lambda máx}$ (0.631)

σ_x = Error aleatorio

a = Pendiente del gráfico

A_F = Área de la solución luego de filtrar

A_{final} = Área final del estudio de robustez

A_{FM} = Área de API en blanco de FM para el estudio de carry over

$A_{impureza}$ = Área de la impureza

$A_{inicial}$ = Área inicial del estudio de robustez

A_M = Área de la muestra (pico de analito)

A_{SF} = Área de la solución sin filtrar

A_{STD} = Área del pico del estándar

ATR = Área total relativa

AV = Valor aceptado para el ensayo de UC

b = Ordenada en el origen

c = Concentración genérica (cantidad/volumen)

c_f = Concentración final (cantidad/volumen)

c_i = Concentración inicial (cantidad/volumen)

$c_{límite}$ = Concentración límite para las condiciones sink (cantidad/volumen)

c_M = Concentración de la muestra (cantidad/volumen)

c_{medio} = Concentración de API en el medio de liberación (cantidad/volumen)

c_{punto} = Concentración de API para puntos de la curva de calibración (cantidad/volumen)

c_{STD} = Concentración del estándar (cantidad/volumen)

D = Porcentaje de degradación real (%)

d_{agua} = Densidad del agua (g/mL)

d_{fibra} = Densidad de la fibra (g/mL)

d_{HCl} = Densidad de la solución stock de HCl (g/mL)

$d_{solución}$ = Densidad de una solución genérica (g/mL)

E_E = Irradiancia (W/m^2)

E_v = Iluminancia (lux, lm/m^2)

F_A = Fracción afectada por el proceso de filtración

FD = Factor de desviación (%)

H = Homogeneidad (%)

H_v = Exposición luminosa (lux·h)

IQR = Rango intercuartil

K = Factor estadístico para 95 % de confianza en UC (K = 2.40)

k_H = Constante de Higuchi ($\mu g/m^2 \cdot d^{1/2}$)

L = Porcentaje de liberación acumulado (%)

LC = Valor declarado (µg)

LOD = Límite de detección (cantidad/volumen)

LOQ = Límite de cuantificación (cantidad/volumen)

M = Valor estadístico dependiente del contenido porcentual promedio de API

m_A = Masa liberada por unidad de área ($\mu g/m^2$)

m_{agua} = Masa de agua (g)

$m_{análisis}$ = Masa de sustancia a analizar (mg)

m_{API} = Masa de API (DEX o MOX HCl) en el total de polvo para mezclar (g)

$m_{colocada}$ = Masa de API colocada para recuperación (mg)

$m_{cuantificada}$ = Masa cuantificada (µg)

m_{fibra} = Masa de la fibra (g)

m_{HCl} = Masa de HCl en la solución concentrada (g)

m_I = Masa de implante (mg)

m_n = Masa total en cada tiempo de la liberación *in vitro* (µg)

m_{NaOH} = Masa de NaOH (g)

m_P = Masa cuantificada en el estudio de UC (µg)

m_{RG502H} = Masa de PLGA ácido Resomer® RG502H (g)

$m_{solución}$ = Masa de una solución genérica (g)

m_{STD} = Masa del estándar (mg)

$m_{teórica}$ = Masa teórica de API en la muestra (µg)

m_{toma} = Masa de líquido tomada para verificar pipetas automáticas (g)

M_x = Mediana de los datos

n = Número de puntos, repeticiones o réplicas

n_{HCl} = Cantidad de HCl en la solución concentrada (mol)

n_{NaOH} = Cantidad de NaOH en la solución concentrada (mol)

$\overline{P}$ = Potencia promedio (contenido de fármaco) respecto al valor declarado (%)

P_{fuente} = Potencia de la fuente luminosa (W)

P_i = Potencia del API en el implante iésimo respecto al LC (%)

P_{STD} = Pureza del estándar (%)

r = Radio de la esfera de luz para degradación lumínica (m)

$R_{\%}$ = Porcentaje de recuperación (%)

RSD = Desviación estándar relativa (%)

s = Desviación estándar

S^2 = Varianza de la curva ajustada por regresión lineal

S/N = Relación señal/ruido

S_{xx} = Suma de cuadrados corregida para la variable x

S_{xy} = Covarianza de las variables x e y con frecuencia relativa de 1

S_{yy} = Suma de cuadrados corregida para la variable y

t_{exp} = Tiempo de exposición a la luz (h)

$t_{\alpha/2,n-1}$ = Valor de la distribución t de Student para $\alpha = 0.05$ y n – 1 grados de libertad

U = Incertidumbre expandida

UM = Uniformidad de masa (%)

$V_{acetona}$ = Volumen de acetona para disolución (µL o mL)

$V_{acetona2}$ = Volumen de acetona para dilución (µL o mL)

V_{agua} = Volumen de agua (mL)

V_{EM} = Volumen de enrase de la muestra para disolución (mL)

V_{EM2} = Volumen de enrase de la muestra para dilución (mL)

V_f = Volumen final (mL)

V_{fibra} = Volumen de fibra (mL)

V_{HA} = Volumen de humor acuoso (mL)

V_{HCl} = Volumen imaginario del stock de HCl (mL)

V_i = Volumen inicial (mL)

V_M = Volumen de disolución de muestra (10 o 25 mL)

V_{matraz} = Volumen del matraz aforado para el estudio de densidad (50 mL)

V_{MdilM} = Volumen del matraz o tubo de dilución de muestra (2 o 10 mL)

V_{MdilS} = Volumen del matraz de dilución de estándar (10 mL)

V_{medio} = Volumen del medio de disolución *in vitro* (10 mL)

$V_{peróxido}$ = Volumen a tomar de H_2O_2 concentrado (mL)

V_{STD} = Volumen del matraz de disolución del estándar (25 mL)

V_{TM} = Volumen de toma de muestra para diluir (µL o mL)

V_{toma} = Volumen de toma genérico o para liberación *in vitro* (1 mL en tal caso)

V_{TP} = Volumen de toma para la verificación de la pipeta automática (mL)

V_{TSTD} = Volumen de toma del stock de estándar (mL)

$V_{vertido}$ = Volumen vertido para verificación de la pipeta automática (mL)

$\bar{x}$ = Promedio de la variable x

x_i = Valor iésimo de la variable x

Z = Porcentaje de API en la masa total de polvo para el estudio de homogeneidad (%)

Unidades de Medida

Cantidad química = mol

Conteo bacteriano = UFC (unidades formadoras de colonias)

Diferencia de potencial eléctrico = kV (kilovoltios)

Distancia = nm (nanómetros), µm (micrómetros), mm (milímetros), cm (centímetros)

Frecuencia (como número de onda) = cm^{-1}

Iluminancia = lux = lm/m^2 (lumen sobre metro cuadrado)

Intensidad de corriente eléctrica = mA (miliamperios)

Intensidad de señal espectrometría = maU (mili unidades arbitrarias), aU (unidades arbitrarias)

Masa = pg (picogramos), µg (microgramos), mg (miligramos), g (gramos), kg (kilos)

Peso molecular = Da (Dalton)

Porcentaje = m/V (masa/volumen), V/V (volumen/volumen)

Potencia = mW (miliwatts), W (Watts)

Presión = mmHg (milímetros de mercurio)

Radiación = kGy (kiloGray)

Separación angular = º (grados decimales)

Temperatura = ºC (grados Celsius)

Tiempo = s (segundos), min (minutos), h (horas), d (días)

Velocidad angular = rpm (revoluciones/minuto)

Volumen = µL (microlitros), mL (mililitros), dL (decilitro), L (litros)

1 – INTRODUCCIÓN

1.1 – Anatomía Ocular

1.1.1 – Generalidades

Desde la perspectiva de la óptica, el ojo puede considerarse como un sistema integrado cuyo objetivo es enfocar la luz sobre la retina, para facilitar su captación y posterior transducción inicial. En ese sentido, consta de diversos componentes agrupados en una estructura esferoide, de aproximadamente 2.50 cm de diámetro: el globo ocular. Este se divide anatómica y funcionalmente en dos segmentos bien definidos: anterior y posterior respectivamente. Ambas secciones contienen diferentes estructuras. La primera porción del ojo agrupa a las siguientes: córnea, iris, pupila, cristalino y cuerpos ciliares. Dicho segmento incluye a su vez dos cámaras (anterior y posterior) por donde circula el humor acuoso. Asimismo, la segunda porción del globo ocular es más interna. Allí se localizan humor vítreo, coroides, retina y la primera parte del nervio óptico.

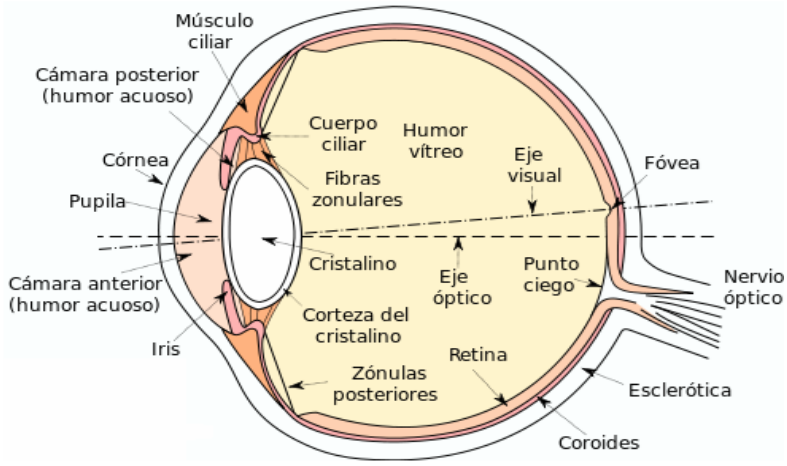


Figura 1. Esquema simplificado del ojo humano

1.1.2 – Humor Acuoso y Cristalino

Si bien el ojo es un órgano muy complejo, en el contexto de esta tesis resulta pertinente centrar la descripción en las estructuras directamente relacionadas con la administración de los implantes objetivo. En particular, existe una cavidad ubicada anatómicamente entre la córnea y el iris, que se denomina cámara anterior. Es en dicho espacio donde se colocarán los insertos desarrollados en esta tesis. Por otro lado, es importante mencionar que existe una segunda cavidad asociada, denominada cámara posterior, y que está limitada por el cristalino y los cuerpos ciliares. Ambos espacios se encuentran separados de la circulación sistémica mediante uniones que conforman la barrera hematoacuosa.

Entre esas cavidades circula libremente el humor acuoso, un líquido compuesto mayoritariamente por agua, que contiene a su vez iones inorgánicos, metabolitos y baja concentración proteica (Shahidullah et al, 2011). Se calcula que el volumen normal total de dicho fluido en un ser humano adulto es de aproximadamente 250 µL, con un recambio cercano a 2.75 µL/min (To et al, 2002). Este líquido se genera de forma circadiana por secreción activa desde los cuerpos ciliares. Tales estructuras pertenecientes a la úvea están situadas anteriores a la retina, y también participan del proceso de acomodación del cristalino. Una vez generado, el líquido es descargado en la cámara posterior, desde donde fluye hacia la anterior, impulsado por gradientes de presión y fenómenos convectivos.

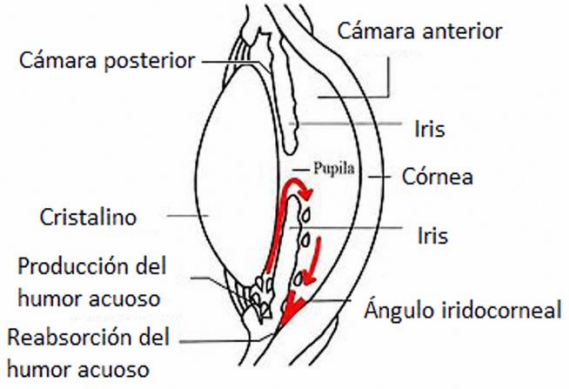


Figura 2. Circulación del humor acuoso

El líquido presente en las cámaras anterior y posterior se encuentra constantemente en un equilibrio tal que se mantiene una presión intraocular (PIO) normal de aproximadamente 15 mmHg (Goel et al, 2010). El drenaje se realiza desde el ángulo iridocorneal (aquel formado entre el iris y la raíz de la córnea) a través de dos vías principales. Uno de los caminos de salida disponibles ocurre mediante una estructura porosa de tejido conectivo conocida como red trabecular, la cual desemboca en el canal de Schlemm. Desde allí, el humor acuoso fluye hasta las venas epiesclerales y se reabsorbe a la sangre. La otra vía es la filtración uveoescleral, mediante la cual el líquido pasa hacia tejidos adyacentes.

Problemas con el drenaje del humor acuoso tienden a generar un aumento de la PIO y a favorecer la aparición de glaucoma. Su consecuencia principal es la degeneración progresiva y usualmente asintomática al inicio, que sufren el nervio óptico y las células retinianas por la elevada PIO. Dicha patología es sumamente grave, ya que se desarrolla rápidamente si no se trata de forma adecuada, y puede derivar en ceguera.

Ahora bien, aparte del mantenimiento de una correcta PIO, el humor acuoso tiene otras funciones. Por ejemplo, aporta nutrientes a los tejidos avasculares de la córnea y el cristalino. En particular, este último es una estructura transparente y flexible contenida dentro de un saco capsular que separa la cámara posterior del humor vítreo. El cristalino consta de una densa malla de proteínas con alto índice de refracción ordenadamente empaquetadas, lo cual le otorga la capacidad de actuar como lente biconvexo natural.

Con la edad, esta red se desnaturaliza y opaca el normal pasaje de la luz. Es entonces cuando comienza la enfermedad de cataratas, una de las patologías intraoculares más prevalentes. El tratamiento habitual consiste en remover el cristalino, y reemplazarlo por un lente intraocular (LIO), dejando el ojo en estado pseudofáquico. En dicho contexto, la cirugía considerda como "Gold Standard" es la facoemulsificación. Esta consiste en realizar una pequeña incisión autosellante en la córnea, a través de la cual se introduce un instrumento capaz de fragmentar y aspirar el cristalino, y luego colocar el LIO en su lugar.

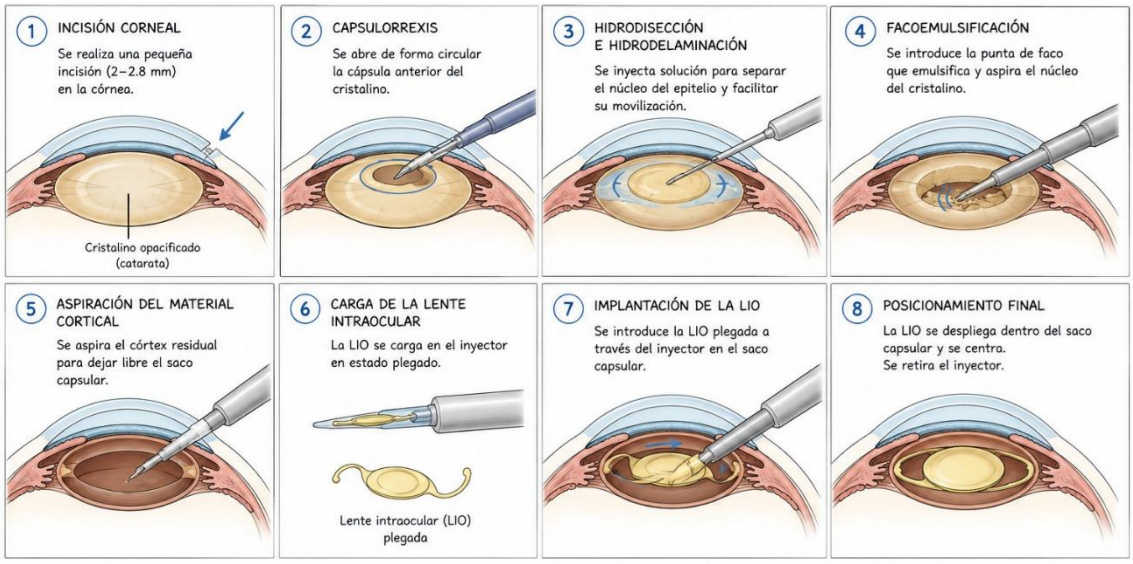


Figura 3. Procedimiento general de una facoemulsificación

Si bien se trata de una intervención altamente segura, normalmente induce cierto grado de inflamación intraocular. Asimismo, en un pequeño porcentaje de los casos pueden producirse infecciones bacterianas capaces de desencadenar endoftalmitis. Aunque infrecuente, la enorme cantidad de cirugías de cataratas realizadas anualmente a nivel mundial hace que el número absoluto de eventos reportados continúe siendo considerable, representando aún un problema relevante que requiere estrategias preventivas.

1.2 – Farmacotecnia Intraocular

1.2.1 – Vías de Administración Usuales

El ojo se encuentra eficientemente aislado de la circulación sistémica gracias a dos barreras bien definidas: la hematorretiniana que separa a la cavidad vítrea, y la hematoacuosa que hace lo propio con la cámara anterior. Además de la administración tópica, la introducción de fármacos en ambos espacios puede realizarse mediante inyecciones. Se distinguen entonces las vías intravítrea e intracameral respectivamente.

La desventaja principal de las inyecciones intraoculares repetidas es el daño asociado al procedimiento. No obstante, en general se administran de esta manera fármacos formulados como soluciones o suspensiones para tratar diversas patologías. Un ejemplo clásico es el corticosteroide acetónido de triamcinolona. Este antiinflamatorio se formula como suspensión, y se inyecta por vía intravítrea (Cheng & Wu, 2006). Otras terapias antiinflamatorias que siguen el mismo método de administración se basan en la inoculación de anticuerpos monoclonales (ranibizumab, bevacizumab, etc.) que actúan a modo de inhibidores del factor de crecimiento del endotelio vascular.

Por otro lado, se ha reportado por vía intravítrea la introducción de antibióticos tales como vancomicina y ceftazidima para el tratamiento de casos de endoftalmitis bacteriana (Radhika et al., 2014). A su vez, si bien no es lo más común en la práctica clínica, una alternativa terapéutica es la administración intracameral (Braga-Mele et al, 2014). En dicho caso, los antibióticos más utilizados son clorhidrato de moxifloxacina (MOX HCl), cefuroxima y vancomicina respectivamente (Nguyen & Shorstein, 2013).

Ambas vías de administración (intravítrea e intracameral) presentan la importante ventaja de que reducen la incidencia de efectos secundarios sistémicos. En consecuencia, estos métodos directos de inoculación se caracterizan por aumentar significativamente la biodisponibilidad, dado que el fármaco es forzado hacia el interior del globo ocular y una fracción sustancial de la dosis contacta inmediatamente con los tejidos diana. En comparación, las formulaciones aplicables sobre el exterior del ojo exhiben una tasa de absorción considerablemente baja, debido al drenaje lacrimal y a las barreras anatómicas de la conjuntiva, la esclera y el epitelio corneal. Por ejemplo, las gotas de uso oftálmico presentan valores de biodisponibilidad usualmente inferiores a 7 % (Shirasaki, 2008).

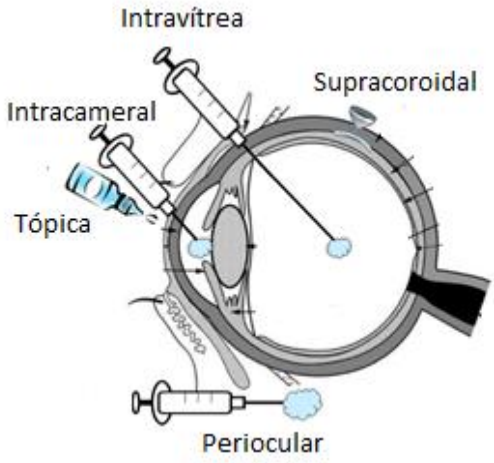


Figura 4. Administración oftálmica

1.2.2 – Insertos Oftálmicos

Desde la década de 1970, un buen número de formulaciones implantables oftálmicas han entrado a etapas de desarrollo o incluso alcanzado el mercado, en base a la premisa de evitar los daños asociados a repetidas inoculaciones intraoculares de un principio activo (API). A continuación, y sin ánimo de hacer una lista exhaustiva, se indicará la evolución de los insertos oculares de uso humano más representativos alguna vez aprobados.

El primero de ellos fue Ocusert®. Aprobado por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) en 1974, se trataba de un dispositivo indicado para glaucoma y diseñado con el fin de liberar pilocarpina desde el saco conjuntival (Macoul & Pavan-Langston, 1975). La formulación consistía en una matriz no biodegradable de etinilvinilacetato (EVA) y alcohol polivinílico (PVA). Si bien fue innovador en su momento, Ocusert® presentaba desventajas asociadas con la comodidad del paciente. Por ejemplo, causaba sensación de cuerpo extraño y frecuentemente era expulsado del ojo de forma accidental. Debido a esto, nunca logró superar a las gotas oftálmicas (Pollack et al, 1976).

En 1981 se aprobó Lacrisert®, un dispositivo diseñado para el tratamiento no farmacológico del ojo seco (Werblin et al, 1981). Tras colocarse en el saco conjuntival, se producía la hidratación de su excipiente hidroxipropilcelulosa (HPC), formándose un film viscoso que reducía la evaporación lacrimal, mejorando la lubricación ocular. Los desarrollos posteriores en la temática se centraron en insertos diseñados para colocación en cámara vítrea, fabricados en materiales no biodegradables, usualmente PVA/EVA.

Vitrasert® fue en 1996, el primero en ser aprobado. Esta formulación no biodegradable contenía ganciclovir (Smith et al, 1992), y se indicaba en el tratamiento de retinitis por citomegalovirus. Luego, en 2005 se aprobó Retisert® para uveítis crónica no infecciosa (UCNI). En este caso, su matriz consistía en EVA/PVA (Jaffe et al, 2000), y contenía acetónido de fluocinolona (ADF) como API. Al igual que Vitrasert®, presentaba la desventaja de requerir remoción quirúrgica tras el tratamiento. No obstante, una alternativa fue implementada en una siguiente generación de formulaciones, empleando un diseño en base a matrices biodegradables de ácido poli-(láctico-co-glicólico) (PLGA).

En ese sentido, el primero de tales dispositivos se aprobó en 2009: Ozurdex®. Esta formulación intravítrea contiene dexametasona (DEX) en una matriz de PLGA 50:50 (Whitcup & Robinson, 2015), y se indica para el tratamiento de edema macular diabético (EMD), oclusión de la vena retiniana central (CRVO) y de la ramificada (BRVO), UCNI y uveítis posterior no infecciosa (UPNI). Uno de sus principales efectos adversos es el aumento de PIO asociado a DEX. El dispositivo es cilíndrico y contiene 700 µg de DEX que se liberan en aproximadamente unos seis meses (Chan et al, 2011).

En 2014 se aprobó otra formulación no biodegradable intravítrea: Iluvien®. Como Retisert®, el dispositivo contiene ADF (Campochiaro et al, 2011) y se indica en el tratamiento de UCNI. En 2018 se aprobó Yutiq®, también con ADF en matriz no biodegradable (Testi & Pavesio, 2019). En 2019 siguió Dextenza®, indicado para dolor postoperatorio (Lee & Blair, 2020). Este dispositivo contiene 400 µg de DEX en una matriz biodegradable de polietilenglicol (PEG), y se coloca en el canalículo lacrimal.

En cuanto a cámara anterior, hacia el año 2000 se aprobó en China y Singapur Surodex®, una formulación indicada para prevenir la inflamación postoperatoria (IPO). El dispositivo consistía en un pequeño pellet conteniendo 60 µg de DEX en una matriz de PLGA/hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), y se insertaba durante la cirugía de cataratas (Tan et al., 1999). Pese a sus buenos resultados clínicos, diferencias relacionadas con los seguros médicos derivaron en su discontinuación. No obstante, los desarrollos enfocados en cámara anterior continuaron, y la FDA aprobó dos dispositivos de liberación prolongada basados en análogos de prostaglandinas, indicados en el tratamiento del glaucoma: Durysta® (Mann et al, 2025) y iDose® (Sarkisian et al, 2024) respectivamente.

Tabla 1. Formulaciones implantables intraoculares aprobadas para uso humano

Nombre	API	Matriz	Indicaciones	Duración
Ocusert®	Pilocarpina	EVA/PVA	Glaucoma	7 días
Lacrisert®	-	HPC	Ojo seco	1 día
Vitrasert®	Ganciclovir	EVA/PVA	Retinitis por citomegalovirus	5 – 8 meses
Surodex®	DEX	PLGA/HPMC	IPO	7 – 10 días
Retisert®	ADF	EVA/PVA	UCNI	3 años
Ozurdex®	DEX	PLGA	BRVO/CRVO/EMD/UCNI/UPNI	6 meses
Iluvien®	ADF	EVA/PVA	EMD	3 años
Yutiq®	ADF	EVA/PVA	UPNI	3 años
Dextenza®	DEX	PEG	Dolor postoperatorio	1 mes
Durysta®	Bimatoprost	PLGA	Glaucoma de ángulo abierto	3 – 4 meses
iDose®	Travoprost	EVA	Glaucoma de ángulo abierto	3 años

1.2.3 – Extrusión en Caliente (HME)

Se trata de una técnica de producción que permite dispersar APIs termoestables, independientemente de su punto de fusión, en una matriz amorfa a alta temperatura para luego forzar el pasaje de la mezcla a través de un pequeño orificio (tobera). La HME es la metodología por la cual se producen la mayoría de los insertos intraoculares comerciales actuales. Por otro lado, se trata además de una tecnología de fácil escalado industrial y aplicable a una gran variedad de formulaciones (Patil et al, 2016).

Mediante HME es posible producir una masa de material con densidad y composición uniformes a partir de APIs de diferente granulometría, ya que el calor generado y las fuerzas de corte proporcionadas por el mezclado son capaces de desagregar los aglomerados del sólido y formar una dispersión homogénea en el polímero amorfo. El proceso es facilitado si las materias primas presentan distribución de tamaño de partícula (DTP) uniforme. Esto permite a su vez mejorar el perfil de disolución de fármacos poco hidrosolubles, aumentando así su biodisponibilidad (Li et al, 2015).

El procedimiento de preparación de las formulaciones por HME se lleva a cabo utilizando una extrusora con capacidad de calentar el producto a lo largo de su recorrido. En ese contexto, los equipos empleados se clasifican principalmente como de tornillo único o doble. En este último caso, también se agrupan según el sentido de giro de sus elementos mezcladores (corrotatorio o contrarrotatorio). En particular, los equipos de tornillo doble presentan una eficiente transferencia de calor y de reducción de zonas inhomogéneas.

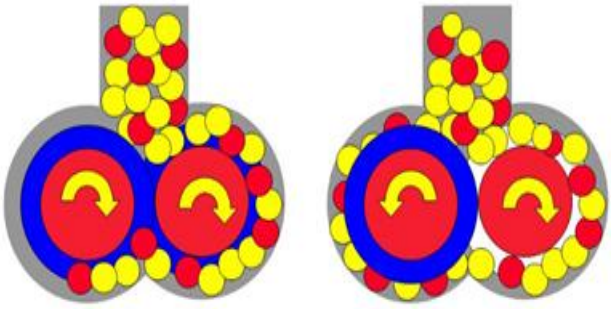


Figura 5. Giro de tornillo corrotatorio (izquierda) y antirrotatorio (derecha)

En una extrusión los factores más importantes son el tiempo de residencia de la mezcla en el interior del sistema y la temperatura de procesamiento (que puede ser constante o variable para cada una de las estaciones individuales instaladas en el equipo). Velocidad de giro de los tornillos y alimentación del material son también parámetros a controlar en el proceso. A su vez, hay que considerar las características generales del hardware.

Por ejemplo, en los equipos de tornillo único predomina la función de extrusión, pero su eficiencia de mezclado es menor. Esto se debe a que el transporte del material ocurre principalmente por arrastre y fricción. En ese sentido, presentan una limitada capacidad para generar mezclado distributivo y dispersivo homogéneo. En consecuencia, suelen utilizarse cuando el objetivo principal es solo impulsar el material fundido.

En contraposición, la corrotación (movimiento solidario de elementos mezcladores) en dispositivos de tornillo doble genera fuerzas que permiten integrar los componentes de la masa caliente. Por otro lado, su geometría favorece la descarga mutua del material acumulado en las caras de las piezas, promoviendo su autolimpieza. Si bien los costos y el consumo energético de un equipo de tornillo doble son mayores, la inversión es a largo plazo más económica ya que reúnen tres funciones a la vez (calentar, mezclar y extrudar).

1.2.4 – Farmacocinética Intraocular

El tratamiento posterior a una cirugía de cataratas requiere controlar simultáneamente la inflamatoria y el riesgo de infección por contaminación microbiana. La combinación de un glucocorticoide (DEX), y un antibiótico de amplio espectro (MOX HCl), posee un fundamento farmacológico claro. Esta asociación ha sido utilizada principalmente mediante formulaciones tópicas, mientras que las estrategias más recientes procuran sustituir la administración repetida de colirios por sistemas de dosificación única.

Los antecedentes sobre dispositivos intraoculares de liberación prolongada conteniendo a la vez DEX/MOX son escasos. No obstante, recientemente se ha descrito un sistema de PLGA con DEX y MOX destinado al tratamiento posterior a la cirugía de cataratas (Subhash et al, 2025). Este dispositivo presentó velocidades de liberación diferentes para ambos fármacos, con una tasa de entrega más rápida de MOX y más prolongada de DEX, lo que confirma que es posible incorporar la combinación en una única plataforma, pero que cada API conserva un comportamiento biofarmacéutico propio.

También se ha reportado que DEX es capaz de distribuirse desde la cámara anterior hacia tejidos oculares internos. Así, una disminución de su concentración en humor acuoso puede incluir transferencia y redistribución a otras estructuras. En un modelo de implante capsular en conejos (Chennamaneni et al, 2014), la administración sostenida de DEX produjo una exposición superior a la obtenida con colirios en diferentes tejidos oculares y permitió un flujo bidireccional entre los segmentos anterior y posterior respectivamente.

MOX HCl posee una solubilidad acuosa mucho mayor que DEX, y se distribuye más fácilmente en humor acuoso. La importancia de sostener su liberación puede observarse en estudios de administración intracameral en conejos. En ese sentido, se ha estimado una semivida en humor acuoso de unas 2.20 horas (Asena et al, 2013). Por otro lado, dado que las fluoroquinolonas presentan una actividad fuertemente dependiente de la concentración inhibitoria mínima para el 90 % de las bacterias susceptibles (MIC_{90}), los índices farmacodinámicos clásicos toman AUC/MIC_{90} y en particular $c_{máx}/MIC_{90} \geq 10$ respecto a microorganismos resistentes (Preston et al, 1998). No obstante, en un compartimento anatómicamente restringido como en el caso de la cámara anterior, también resulta informativo evaluar el tiempo de exposición local por encima de la MIC_{90}.

2 – Problema a Tratar

2.1 – Hipótesis de Trabajo

Se plantea la posibilidad de desarrollar una formulación biodegradable, implantable e intracameral por HME basada en PLGA, conteniendo DEX y MOX HCl. El dispositivo debería presentar atributos reproducibles, permitir la liberación prolongada de ambos APIs y producir concentraciones intraoculares compatibles con actividad antiinflamatoria y antibacteriana, manteniendo una adecuada tolerabilidad local en modelos animales.

En ese sentido, el objetivo general de este trabajo de tesis será desarrollar y evaluar dicha formulación *in vitro* e *in vivo*. Se pretende que tales implantes intracamerales biodegradables cuya función sería la prevención o el control de procesos inflamatorios e infecciosos intraoculares, presenten una liberación prolongada tanto de DEX como de MOX HCl, una vez colocados quirúrgicamente en cámara anterior.

2.2 – Objetivos Específicos

Obtención de la formulación: Diseñar la composición, geometría y características generales de insertos destinados a su colocación intracameral, y establecer condiciones de fabricación por HME que permitan lograr unidades reproducibles.

Caracterización y Control Farmacéutico: Poner a punto metodologías analíticas para la cuantificación de ambos APIs, estudio de las propiedades fisicoquímicas del dispositivo (uniformidad, estabilidad, comportamiento ante el proceso de esterilización) y determinar los perfiles de liberación *in vitro* de DEX y MOX HCl.

Evaluación Preclínica de la Formulación: Desarrollar y aplicar modelos animales de afaquia, inflamación intraocular y endoftalmitis bacteriana inducida por la especie *Pseudomonas aeruginosa*. Mediante estos experimentos, evaluar la tolerabilidad ocular del implante y la actividad antiinflamatoria y antibacteriana del dispositivo.

Caracterización farmacocinética intraocular: Determinar perfiles poblacionales exploratorios para DEX y MOX HCl en humor acuoso y comparar su comportamiento en animales con y sin afaquia inducida. Esto permitirá evaluar la influencia de la extracción del cristalino sobre la disposición de ambos fármacos en el sistema biológico considerado.

3 – MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 – Componentes de los Implantes

3.1.1 – PLGA

Se trata de un copolímero ampliamente usado como material para matrices de liberación controlada, constituido químicamente por distintas proporciones (50:50, 75:25, etc.) de los poliésteres poliláctico y poliglicólico. En ese sentido, el contenido de ambos componentes influye directamente sobre la velocidad de degradación. Existen además distintos tipos de PLGA según el grupo terminal del copolímero: formas ácidas (uncapped) y esterificadas (end-capped). Ambas variantes presentan perfiles de degradación diferentes. Esto se debe a que el PLGA end-capped es más hidrofóbico, mientras que el uncapped es más hidrofílico y sus matrices se hidrolizan más rápidamente.

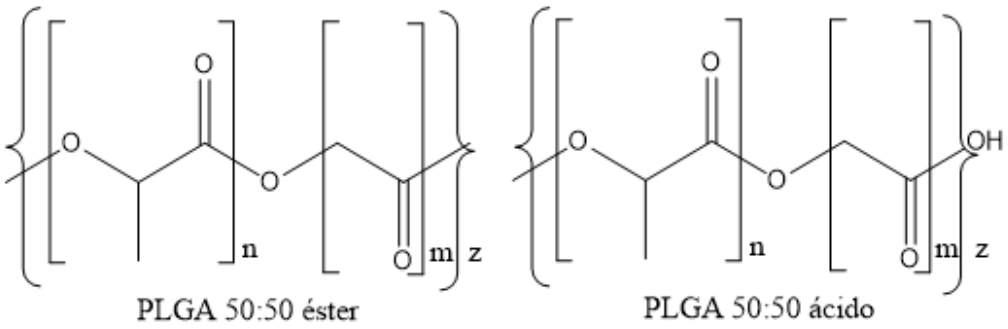


Figura 6. Estructuras químicas genéricas mínimas de ambos PLGAs

Sus cadenas poliméricas son biodegradadas principalmente por hidrólisis de sus enlaces éster generando los ácidos láctico y glicólico, los cuales son posteriormente metabolizados a CO_2 y agua. En condiciones *in vivo*, dicho proceso también puede estar influido por el microambiente biológico y por mecanismos enzimáticos. Esta es la razón por la cual usualmente se verifican diferencias al comparar el comportamiento de sistemas con matrices de PLGA respecto a lo observado en estudios *in vitro*.

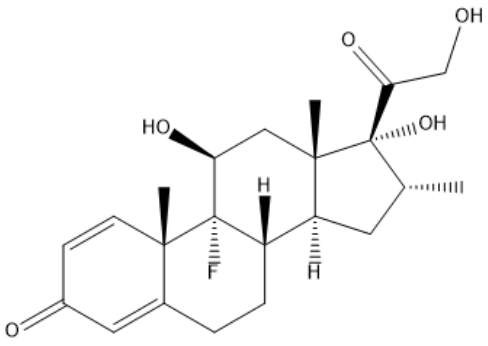
En algunas formulaciones de implantes intraoculares basadas en este copolímero, el API inicialmente se libera muy velozmente debido a que existe una mayor exposición del fármaco al medio de disolución. La descarga inicial está fuertemente influenciada por el área superficial del inserto, la hidrofilia del API y la dosis contenida en la formulación (Fredenberg et al, 2011). Posteriormente sigue una etapa de liberación prolongada y finalmente un pico importante de concentración asociado a la desintegración del sistema.

Siempre que los APIs mantengan estabilidad química, la tecnología más empleada para fabricar implantes basados en PLGA es la HME. Durante este proceso, las cadenas del copolímero adquieren movilidad y comportamiento plástico cuando se forma la matriz del inserto. Por ende, es necesario trabajar por encima de la temperatura de transición vítrea del PLGA. Esto permite una adecuada plastificación y mezcla del material. La transición vítrea es la temperatura a partir de la cual un polímero amorfo pasa de un estado rígido a otro más flexible durante el calentamiento. Para PLGA, esto ocurre en el rango 42 – 45 ºC. Si se desea una buena fusión termoplástica de los componentes, es necesario superar los 85 ºC, tal y como se llevó a cabo durante el presente trabajo de tesis.

Por otro lado, las matrices en las cuales se basaron los implantes fabricados consistieron en mezclas de PLGA 50:50 con terminación éster y ácida (cuyos nombres comerciales son Resomer® RG502 y RG502H respectivamente), con viscosidad intrínseca en el rango 0.16 – 0.24 dL/g, proporción de copolímero 48 – 52 % y un peso molecular promedio de 7000 – 17000 Da. Ambos productos fueron adquiridos de Evonik Industries (Alemania).

3.1.2 – DEX

Se trata de un glucocorticoide sintético utilizado en el tratamiento de patologías inflamatorias agudas y/o autoinmunes. Dado que es aproximadamente 25 veces más potente que el cortisol (Gupta & Bhatia, 2008), generalmente su efecto farmacológico solo requiere dosis en el orden de los microgramos. Por otro lado, fisicoquímicamente, se disuelve en diversos solventes orgánicos (acetona, metanol, etc.). Dado que en agua su solubilidad es ≈ 0.10 mg/mL a 20 ºC, este API se considera moderadamente lipofílico.



Dexametasona
Peso molecular = 392.46 Da

Figura 7. Estructura química de DEX

Farmacológicamente, inhibe la producción de citocinas proinflamatorias leucocitarias. La supresión de este mecanismo compromete la acción normal de los linfocitos, deprimiendo así el sistema inmunológico. Por otro lado, los glucocorticoides pueden afectar directamente el equilibrio del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal. La interferencia con ambos mecanismos genera diversos efectos adversos sistémicos a largo plazo.

En cuanto a las formulaciones oftálmicas de DEX, su sal sódica fosfatada se emplea en combinación con MOX HCl en presentaciones de gotas, mientras que el fármaco base se administra usualmente como ungüentos. A su vez, aparte de la vehiculización a través de implantes (Surodex®, Ozurdex®), DEX se ha utilizado ampliamente por vía intraocular mediante inoculación de suspensiones de hasta 4 mg/mL. No obstante, la administración oftálmica convencional presenta diversas limitaciones biofarmacéuticas.

En el caso de las gotas, el rápido drenaje lacrimal sumado a la baja penetrancia de los APIs a través de las estructuras externas del ojo (conjuntiva, esclera, córnea), limitan la biodisponibilidad. Por otro lado, las inyecciones intraoculares repetidas presentan como principal desventaja el daño asociado al procedimiento. Por tal motivo, la elección de una formulación de administración única con una tasa de liberación más lenta tiene sentido en el caso de DEX. En consecuencia, la baja solubilidad del fármaco base puede resultar ventajosa en sistemas reservorio, ya que favorece perfiles más sostenidos en el tiempo.

Para este trabajo, DEX fue adquirida de Zhejiang Xianyu Pharmaceutical (China), con una pureza de 99.20 % y una DTP correspondiente a 90 % de las partículas por debajo de 30 μm en volumen según su respectivo certificado de análisis. Como se verá más adelante, la DTP reportada para el API fue un punto importante a tener en cuenta durante el desarrollo de los insertos, dado que afecta significativamente a su performance.

3.1.3 – MOX HCl

Se trata de una sal del antibiótico moxifloxacina, una fluoroquinolona de amplio espectro de cuarta generación. La solubilidad del fármaco base en agua es de 0.17 mg/mL. No obstante, formulado como MOX HCl alcanza los 24 mg/mL a 20 ºC. Es por tal motivo que se le administra usualmente como gotas oftálmicas o inyectables. Por otro lado, debido a su estructura química, las especies presentes en solución varían con el pH.

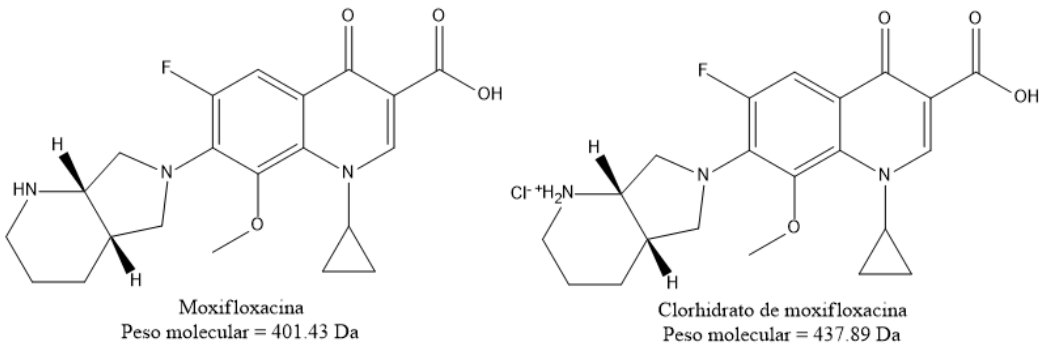


Figura 8. Estructuras químicas de moxifloxacina y su sal MOX HCl

Tradicionalmente su aplicación en la práctica clínica ha sido enfocada al tratamiento de infecciones sistémicas, respiratorias, oftálmicas y urinarias (Hooper, 2000). Esto se debe principalmente a que las fluoroquinolonas más modernas presentan una marcada actividad bactericida ante una muy amplia gama de microorganismos Gram positivos y negativos, y también contra varias especies anaerobias y patógenos menos frecuentes.

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición selectiva de ciertas enzimas procariotas esenciales para la replicación y organización del ADN. El fármaco actúa sobre ADN girasa y topoisomerasa IV. La primera introduce superenrollamiento negativo para reducir la tensión torsional de las hebras del material genético durante la replicación, mientras que la segunda separa los cromosomas hijos. La inactivación de alguna de estas enzimas desencadena la desorganización del genoma, generando un efecto bactericida.

Dado que la afinidad de estos antibióticos respecto a las topoisomerasas de células procariotas es elevada, se trata de fármacos que presentan una alta selectividad por dianas bacterianas. Asimismo, varios representantes de las fluoroquinolonas poseen perfiles de seguridad y eficacia bien establecidos, encontrándose incluidos en la lista de medicamentos esenciales que recopila la Organización Mundial de la Salud (WHO).

Para esta tesis, MOX HCl fue adquirida en Shreeji Pharma International (India), con una pureza de 99.90 % y DTP 90 % < 63.20 µm en volumen según se indica en el certificado de análisis correspondiente. De la misma manera que en el caso de DEX, como se verá más adelante, DTP tuvo que ser tenida en cuenta al momento del diseño del inserto con el fin de evitar posibles inconvenientes relacionados con el perfil de liberación.

3.2 – Diseño de la Formulación

3.2.1 – Seguridad del Dispositivo

El PLGA es un excipiente muy usado en terapia intraocular. Su biocompatibilidad (definida en base a su capacidad de no provocar una respuesta adversa en el organismo) se basa en que es biodegradable y en que sus productos de degradación entran en rutas metabólicas normales. No obstante, otros factores como la geometría, el tiempo de contacto y la zona de implantación pueden modificar este comportamiento.

Sobre DEX se ha reportado que inyectando 400 µg del API intracameral, el principal efecto adverso es un aumento de la PIO en 12.50 % de los casos (Abu et al, 2018). Una estimación simplificada sugiere así concentraciones intraoculares tolerables de al menos 1.60 mg/mL. Por otro lado, la única formulación inyectable intracameral aprobada por la FDA actualmente para uso humano (Dexycu®) ha sido reportada como segura en términos generales y no se asocia a efectos adversos graves (Donnenfeld & Holland, 2018).

Sobre MOX, existen estudios (Matsuura et al, 2013) que descartan síndrome tóxico del segmento anterior a concentraciones de al menos hasta 500 µg/mL. En ese sentido, un implante conteniendo DEX y MOX HCl parecería ser una opción viable en términos de seguridad y biocompatibilidad desde el punto de vista tanto de los APIs como del polímero. No obstante, la combinación de ambos fármacos en una matriz implantable requiere ser evaluada experimentalmente, ya que la liberación sostenida, la localización intraocular y el material polimérico pueden modificar la exposición tisular total esperada.

3.2.2 – Información Previa acerca de Tratamientos con MOX HCl

Dado que para el antibiótico no existen implantes intraoculares de referencia, es necesario estudiar propiedades de otras formulaciones. En ese sentido, MOX HCl se administra usualmente como gotas o soluciones inyectables. Si bien estas son formulaciones simples, es importante evaluar su posología y contenido de API, con el fin de extrapolar la dosis de antibiótico total en los insertos. Por ejemplo, un tratamiento con colirios de MOX HCl para infecciones comunes se extiende normalmente entre 5 y 10 días. A su vez, la prevención usual contra endoftalmitis post cirugía de cataratas consta de inyecciones intracamerales de 100 µL conteniendo 500 µg de antibiótico (Haripriya & Chang, 2018).

Esto implica, bajo una estimación teórica simplificada, alcanzar niveles en humor acuoso de aproximadamente 1.40 mg/mL. En la mayoría de los casos de endoftalmitis reportados usualmente en la práctica clínica (≈ 95 %), la MIC_{90} en general no supera los 16 µg/mL (Miller, 2008). El valor más alto registrado en la literatura es de 32 µg/mL, en una cepa de *Staphylococcus aureus* muy resistente y poco común (Arshinoff & Modabber, 2016), que representa solamente un 0.66 % de prevalencia entre el total informado.

Tabla 2. Datos de casos de endoftalmitis reportados en la bibliografía consultada

Bacteria	**MIC_{90} (µg/mL)**	**Identificaciones**	**Prevalencia (%)**
Haemophilus influenzae	≤ 2	3890	24.42
Moraxella catarrhalis	< 1	1993	12.51
Proteus mirabilis	≤ 2	63	0.40
	16	319	2
Pseudomonas aeruginosa	≤ 2	108	0.68
	16	1472	9.24
	> 16	681	4.27
Serratia marcescens	4	211	1.32
Staphylococcus aureus	≤ 8	1863	11.69
	≥ 32	105	0.66
Staphylococcus epidermidis	≤ 8	820	5.15
Streptococcus pneumoniae	≤ 4	4308	27.04
Streptococcus viridans	< 1	97	0.61

En base a la información presentada anteriormente, y bajo las suposiciones teóricas consideradas, la velocidad mínima estimada de liberación del API *in vitro* para controlar patógenos con $MIC_{90} \leq 16$ µg/mL durante 24 horas sería ≈ 67 µg/d, considerando un recambio de humor acuoso de 2.75 µL/min. No obstante, en condiciones *in vivo* este valor puede verse influenciado por otros factores fisiológicos y biofarmacéuticos.

3.2.3 – Dispositivos de Referencia Conteniendo DEX

En primer lugar, se puede tomar como punto de partida el implante intraocular más exitoso de la historia: Ozurdex®. Sus insertos cuentan con dimensiones de 6 mm de largo y 0.50 mm de diámetro, y contienen 60 % de API (700 µg) y 40 % de una mezcla de PLGAs en proporción éster/ácido de 1/3 (Shiah et al, 2013). Su diseño permite una liberación sostenida desde el humor vítreo durante aproximadamente 30 – 60 días, permaneciendo el fármaco detectable hasta incluso seis meses luego de la colocación.

El segundo ejemplo a tener en cuenta es Surodex®, una formulación implantable intracameral aprobada en humanos hacia el año 2000. El inserto medía 1 mm de largo y 0.50 mm de diámetro, y contenía 60 µg de DEX en una matriz de PLGA/HPMC. Su diseño permitía una liberación sostenida durante aproximadamente 7 – 10 días, tras su colocación en cámara anterior (Tan et al, 2001). El desempeño de Surodex® era superior en comparación a gotas oftálmicas del mismo API (Kodama et al, 2003).

3.2.4 – Breve Introducción al Quality by Design (QbD)

El fundamento de esta tesis se orientó hacia la obtención de una formulación con potencial de traslación tecnológica y eventual desarrollo farmacéutico posterior. En ese sentido, se aplicó la metodología QbD. Según el Comité Internacional para la Armonización (ICH), se define como un enfoque sistemático que asegura la calidad de un desarrollo farmacéutico, basado en la comprensión de producto y proceso (ICH Q8R2, 2009). A su vez, debe incluir evaluación y mitigación de riesgos asociados (ICH Q9, 2015). El QbD establece que la calidad no ha de verificarse solo con controles finales, sino diseñarse, construirse e incorporarse desde las etapas iniciales del desarrollo.

Como punto de partida puede definirse el perfil objetivo del producto (TPP). Allí se describen los objetivos terapéuticos generales a incluir en la formulación. En base a esta información, el QbD establece al perfil de calidad del producto objetivo (QTPP) como primer elemento formal. Aquí se definen especificaciones y características deseadas. En términos generales, se trata de los criterios que el producto debe cumplir consistentemente para garantizar su eficacia y seguridad. Los atributos críticos de calidad (CQA) conforman el siguiente punto. Se trata de características físicas, químicas o biológicas, cuya desviación comprometería la seguridad y/o el desempeño del producto.

A su vez, los atributos críticos de los materiales (CMA) se definen también sobre dicha base racional. Estos refieren a propiedades intrínsecas de APIs, excipientes y otros reactivos que pueden afectar la calidad del producto final. Por último, se deben definir los parámetros críticos del proceso (CPP). Estos corresponden a variables del método de fabricación que pueden impactar significativamente en la calidad del producto final.

3.2.5 – Aplicación de la Metodología QbD

Junto con los distintos puntos de calidad del producto, es necesario considerar potenciales problemas que podrían ocurrir durante el desarrollo de la formulación. De entre las estrategias citadas por ICH, se decidió emplear el análisis preliminar de riesgos. Esta metodología consiste en identificar de manera sistemática todos los eventos o desviaciones que podrían eventualmente afectar la calidad del producto o el desempeño del proceso. Además, tal enfoque permite priorizar recursos y esfuerzos experimentales acerca de aquellos atributos críticos con mayor impacto potencial sobre la seguridad, eficacia y reproducibilidad. De esta manera, el análisis de riesgos no solo actúa como una herramienta preventiva, sino que es también una guía para la toma de decisiones.

Una vez enumerados, todo potencial problema se analiza según su probabilidad de ocurrencia y la severidad de sus consecuencias. Posteriormente, se asigna un ranking cualitativo de riesgo a cada evento. Esto permite clasificarlos según su aceptabilidad, identificando cuáles requieren acciones de mitigación, controles adicionales o estudios experimentales específicos durante el desarrollo. La aplicación de dicha estrategia se integra directamente en la evaluación de los puntos de calidad detallados a continuación.

- TPP: Sistema combinado de administración única, implantable en cámara anterior, biodegradable con buena tolerabilidad intraocular. Debe, a su vez, liberar DEX y MOX HCl para en simultáneo controlar la inflamación y prevenir infecciones, manteniendo concentraciones terapéuticas de ambos APIs. Como riesgo general se identificó la imposibilidad de colocar correctamente el implante en la cámara anterior. La consulta de antecedentes correspondientes a Surodex® y la opinión experta de un oftalmólogo indicaron que la administración parecería técnicamente viable con diámetros inferiores a 0.75 mm y longitudes menores a 6 mm. Estas restricciones dimensionales del producto, permitieron concluir que la probabilidad de una inserción fallida sería baja.

- QTPP: Inserto cilíndrico conteniendo 200 µg de DEX y 1000 µg de MOX HCl, con dimensiones máximas de 0.75 mm de diámetro y 6 mm de largo, integridad mecánica adecuada, y perfiles de liberación prolongada que generen concentraciones terapéuticas de ambos APIs sin picos iniciales demasiado elevados. La exposición a MOX HCl debía mantenerse al menos cinco días post colocación. Asimismo, se requiere estabilidad a lo largo de al menos 12 meses, esterilidad y contenido aceptable de endotoxinas bacterianas.

El estudio del tiempo óptimo de mezclado y el análisis de homogeneidad actuaron a modo de medidas de mitigación ante el riesgo de desvíos de dosis. La posibilidad de no alcanzar concentraciones terapéuticas fue evaluada como alta. En ese sentido, la uniformización por micronización para DEX (Schoenwald & Stewart, 1980) y el control de la proporción de PLGA/MOX HCl fueron las medidas de mitigación propuestas. Se evaluó como baja la posibilidad de fallas de integridad mecánica, dado que los insertos mostraron adecuada manipulabilidad en pruebas previas. El riesgo de efectos adversos de APIs se consideró improbable por las dosis proyectadas para el dispositivo. La posibilidad de contaminación microbiana también se evaluó como baja por el proceso de fabricación aplicado.

- CMA: La pureza de los componentes y la DTP de DEX y PLGA fueron los atributos identificados más importantes. En ese sentido, se consideró que una molienda adecuada permitiría obtener una correcta DTP. No obstante, la reducción de tamaño para MOX HCl se evaluó negativamente por su alta solubilidad en agua, y por conformar el 50 % en masa del inserto. También se consideró la higroscopicidad del PLGA. Sin embargo, la única acción preventiva posible fue su correcto almacenamiento, ya que la humedad relativa ambiente (HRA) no pudo ser controlada activamente durante la HME.

- CPP: Los parámetros evaluados como los que más probablemente afectarían el resultado final fueron la homogeneidad del polvo de alimentación, la proporción de PLGA, la velocidad de giro de los tornillos y la temperatura de procesamiento del material durante la producción por HME. El primero influiría en las dosis efectivamente cargadas, mientras que el segundo debería impactar en la disolución del inserto. La velocidad de giro de los tornillos y la temperatura de extrusión afectan directamente a la presión de salida, que se relaciona de forma proporcional a la compactación del implante. Dichas condiciones generadas en la tobera podrían favorecer procesos de degradación.

- CQA: Los atributos críticos de calidad determinados respecto al QTPP fueron uniformidad de contenido (UC) y tasa de liberación *in vitro*. Por una parte, UC es afectado por la homogeneidad de la mezcla de polvos. Por otro lado, la tasa de liberación *in vitro* depende de las DTPs de DEX y PLGA, pero también de las condiciones de extrusión. Por tal motivo, es uno de los parámetros más importantes a monitorear durante el desarrollo.

3.2.6 – Formulación Tentativa

De acuerdo a bibliografía un implante intracameral de estas características no debería en general superar el 60 % de API en masa (Robinson et al, 2014). En ese sentido y considerando el análisis QbD planteado, se decidió en este trabajo que la mejor opción sería avanzar hacia insertos intraoculares conteniendo 200 µg de DEX (10 %), 1000 µg de MOX HCl (50 %) y 800 µg de PLGA (40 %). Se estableció entonces una masa teórica de 2 mg. Dicha elección fue respaldada por estudios exploratorios, los cuales demostraron que la tasa de liberación de ambos APIs se veía muy influenciada por la dosis.

En ese sentido, los primeros implantes probados en este trabajo contenían 100 µg de DEX y 500 µg de MOX HCl, pero no producían concentraciones razonablemente altas. Por tal motivo, se decidió fabricar insertos cargados con el doble de dosis, siempre contemplando las limitaciones asociadas al volumen intracameral disponible y la posible alteración de las propiedades fisicoquímicas de la formulación. Asimismo, el aumento en la cantidad de fármacos debía mantener la integridad estructural del sistema y no comprometer manipulación al momento de la administración. Como resultado, se observó un marcado incremento en la tasa de liberación, alcanzándose concentraciones bastante más elevadas.

Por otro lado, en base a la información recopilada, se decidió que la formulación desarrollada constara únicamente de los dos APIs seleccionados y el polímero matriz, sin el agregado de excipientes adicionales. Esta elección responde al objetivo de obtener un sistema simple, robusto y reproducible, minimizando posibles interferencias que afecten la biocompatibilidad, el perfil de liberación o la estabilidad del inserto. Asimismo, tanto PLGA como DEX y MOX HCl son compuestos ampliamente utilizados para uso humano, lo cual representa una ventaja desde un punto de vista de la seguridad de la formulación implantable. En ese sentido, todos los componentes del inserto deberían también ser evaluados positivamente en una eventual solicitud de registro ante autoridades sanitarias.

3.3 – Metodología Analítica

3.3.1 – Verificación de Pipetas Automáticas

El procedimiento se llevó a cabo con el fin de conocer el volumen real depositado en cada dispensación. Diferentes alícuotas de fase móvil (FM) se pesaron en una balanza analítica AP225WD (Shimadzu, Japón), evaluándose 10 tomas independientes para los valores mínimo, medio y máximo del rango de descarga establecido, según guías generales (Gilson, 2007). Luego se construyó una curva de calibración del volumen vertido en función del entregado en cada toma. Estos datos permiten corregir diferencias en la dispensación. Para ello, tras construir la curva de calibración se calculó el volumen real con la densidad de FM, y la desviación absoluta respecto al nominal depositado.

3.3.2 – Limpieza del Material de Vidrio

Se validó un método para remover secuencialmente PLGA, DEX y MOX HCl de una solución stock concentrada, considerando sus solubilidades. El procedimiento se aplicó a la limpieza de viales y matraces aforados de 10 y 25 mL junto con sus tapas. Se siguió el orden de lavado acetona → metanol → agua destilada (tres ciclos con cada solvente, agitando 15 segundos por vez). Tras el procedimiento los recipientes se enrasaron con FM, y se tomaron alícuotas de 1 mL. Posteriormente, las muestras se procesaron y analizaron por cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Esto permitió verificar la remoción efectiva de los APIs, evaluando la ausencia de picos tras el lavado.

3.3.3 – Influencia de las Membranas de Filtración

En este estudio se definieron dos rangos de concentración y tres niveles de trabajo (bajo, medio, alto), para determinar el porcentaje de recuperación de ambos APIs. A su vez, se emplearon filtros de jeringa de fluoruro de polivinilideno (PVDF) hidrofílicos, de 13 mm de diámetro y tamaño de poro de 0.45 μm. Primero, se clarificó una solución estándar diluida para remover partículas suspendidas. Luego se tomaron 10 alícuotas de 1 mL, de las cuales la mitad se filtró y el resto ofició como control. A partir de las áreas obtenidas inyectando 20 μL en HPLC, se evaluó con una prueba de comparación de medias si todas las diferencias observadas se mantuvieron por debajo de un umbral de aceptación definido en 5 %. Se evaluó también si el cambio de concentración afectó dichos resultados, a través de un estudio de análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por un test *post hoc*.

3.3.4 – Carry over

El estudio evaluó la transferencia de API adsorbido en el sistema de inyección del HPLC entre una muestra y otra, alternando con estándar y blancos. Para ello, se definieron una vez más dos rangos de concentración y tres niveles de trabajo (bajo, medio, alto). En ese sentido, el valor del *carry over* (arrastre de analito) se consideró aceptable por debajo de 5 % (Zeng et al, 2006). Se estudió también si el cambio de concentración afectó de forma significativa a los resultados, con un ANOVA de una vía seguido de un test *post hoc*.

3.3.5 – Perfil de Impurezas

Cualitativamente para un API, este concepto hace referencia al contenido de compuestos no deseados generados durante su proceso de síntesis o su vida útil. En general, no suele ser esperable hallar impurezas o productos de degradación (PDs) en materias primas, gracias a los estrictos controles de calidad en origen. No obstante, es necesario contar con métodos analíticos para su determinación. Dado que los estándares de dichos compuestos son extremadamente costosos, usualmente se obtienen en el laboratorio sometiendo el API a calor, humedad, fuentes luminosas, soluciones oxidantes, y a medios ácidos y básicos. Por convención, siempre se intenta promover una descomposición de 5 – 20 % sin provocar por completo la degradación del API (Blessy et al, 2014). Eventualmente, el perfil global se obtiene mediante HPLC tras combinar las muestras de cada tratamiento.

3.3.6 – Degradación Forzada

Se generaron PDs para DEX y MOX HCl, sometiendo de forma no exhaustiva muestras de los dos fármacos a las condiciones de estrés mencionadas, según guías estandarizadas (ICH Q1A(R2), 2003). Posteriormente se determinaron los perfiles cromatográficos de ambos APIs en conjunto y por separado con el fin de dilucidar el origen de los posibles PDs generados, calculándose además la resolución (R) entre picos adyacentes. Por último, se halló el porcentaje de degradación respecto a un estándar sin tratar.

Todos los análisis se realizaron por quintuplicado y los resultados se procesaron estadísticamente mediante un test de comparación de medias. De esta manera, se verificó que el grado de degradación se encontrara en el rango objetivo de 5 – 20 %. La solución estándar combinada se preparó disolviendo 12.50 mg de DEX y 62.50 mg de MOX HCl en 25 mL de FM (stock de concentraciones finales 0.50 y 2.50 mg/mL respectivamente).

Tabla 3. Programa de generación de PDs

Muestra	Agente	Tiempo	Tratamiento posterior
200 µL stock	Agua	10 días	Dilución a 10 mL con NaCl 0.90 % m/V
1 mL stock	HCl (1 mL – 1 mol/L)	1 día	NaOH (1 mL, 1 mol/L), dilución 1/10 FM
1 mL stock	NaOH (1 mL – 0.10 mol/L)	1 hora	HCl (1 mL – 0.10 mol/L), dilución 1/10 FM
1 mL stock	Luz monocromática 600 nm	1 hora	Dilución 1/10 con FM
1 mL stock	H_2O_2 (1 mL – 6 % V/V)	1 día	Dilución 1/10 con FM
APIs sólidos	Calor (170 ºC)	1 hora	25 mL de FM, dilución 1/10 con FM

La exposición al calor se llevó a cabo en estufa sobre muestras de 12.50 mg de DEX y 62.50 mg de MOX HCl. Por otro lado, los tratamientos en medio básico, ácido y oxidante se realizaron en una cámara de condiciones controladas (Binder, USA) a 75 % de HRA y 40 ºC. En el estudio de fotodescomposición (ICH Q1B, 1996), las muestras disueltas se sometieron a 1.20×10^6 lux·h de exposición luminosa. Para ello, recibieron 60 minutos de luz monocromática a 600 nm producida por una lámpara XPS-1000 (Solar Light, USA) con fuente de xenón y potencia nominal de 502.65 W, ubicada a 12 cm de distancia. Este enfoque se basa en exposición total, y no implica el uso de luz ultravioleta.

Por último, se determinó la estabilidad de ambos APIs ante hidrólisis acuosa. Para ello, en un ES-20 Orbital Shaker Incubator (Biosan, Letonia) a 37 ºC y 140 rpm de agitación, se colocaron cinco soluciones estándar combinadas. Tras 10 días, se analizó la cantidad remanente de ambos APIs. Considerando un límite de aceptación de 5 %, se determinó si existieron cambios estadísticamente significativos, con un test de comparación de medias.

3.3.7 – Impurezas de DEX y MOX HCl

Según las monografías oficiales de Farmacopea (USP 42 NF 37, 2019), la proporción relativa entre el área de cada pico y la del API en un cromatograma, permite determinar el contenido de cada producto relacionado (PR). Este término engloba tanto a PDs como a otras impurezas estructuralmente semejantes al API generadas durante el proceso de fabricación. Habitualmente, tales compuestos se encuentran presentes en niveles traza.

Los límites de aceptación establecidos para cada PR derivan de estudios toxicológicos previos y suelen calcularse por normalización, considerando la suma del área de todos los picos del cromatograma. Este enfoque permite minimizar el riesgo de subestimar el contenido real de impurezas o PDs. En términos prácticos, el método asume una respuesta cromatográfica equivalente entre el API y sus correspondientes PRs. Esto representa un escenario de "máxima exposición" potencial. Por otro lado, en ocasiones Farmacopea exige para determinados APIs, ciertos requisitos cromatográficos adicionales de calidad asociados a sus PRs (por ejemplo, resolución de picos respecto al del API, etc.).

En general, los estándares de impurezas son muy costosos. Por tal motivo, para validar la especificidad del método analítico en este trabajo, se emplearon los PDs obtenidos por degradación forzada, determinándose también el porcentaje de disminución experimental de cada API. Como referencia general, los fabricantes de Ozurdex® recomiendan en su patente un máximo de 2 % de PDs. En el caso de DEX, sus PRs se identifican con las letras A – F (Chen et al, 2008), y derivan de modificaciones de su anillo de ciclopentano.

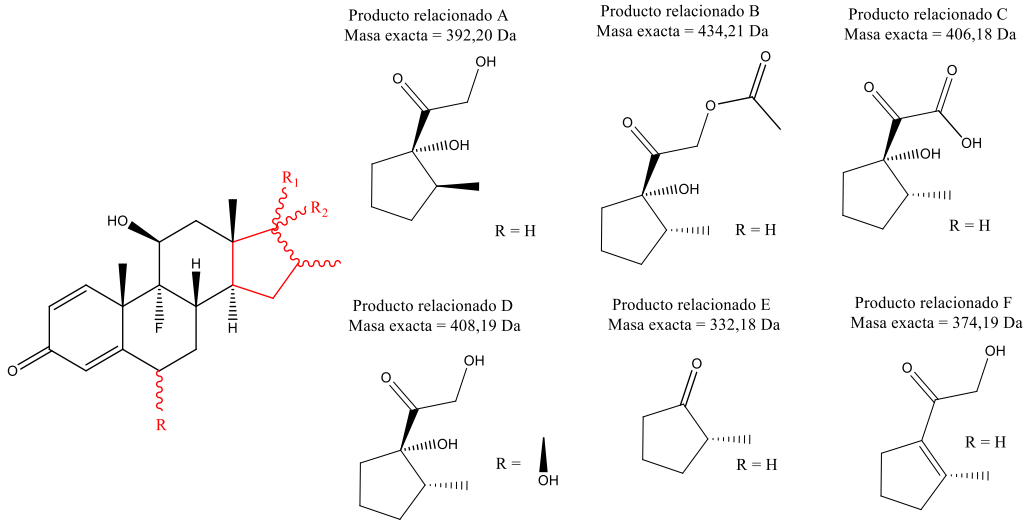


Figura 9. Estructuras químicas de las impurezas de DEX en Farmacopea

Para MOX HCl, sus PRs se identifican con las letras A – E, y derivan de sustituciones efectuadas sobre uno de sus anillos aromáticos (Djurdjevic et al, 2009). Químicamente, se trata fundamentalmente de compuestos fluorinados o esterificados. Por otro lado, los requisitos de aprobación para MOX HCl en el ensayo de dosificación son similares en exigencia respecto a DEX, según la monografía de Farmacopea. El límite individual permitido en cada PR es 0.10 %, y el máximo aceptable entre todas las áreas es 0.50 %.

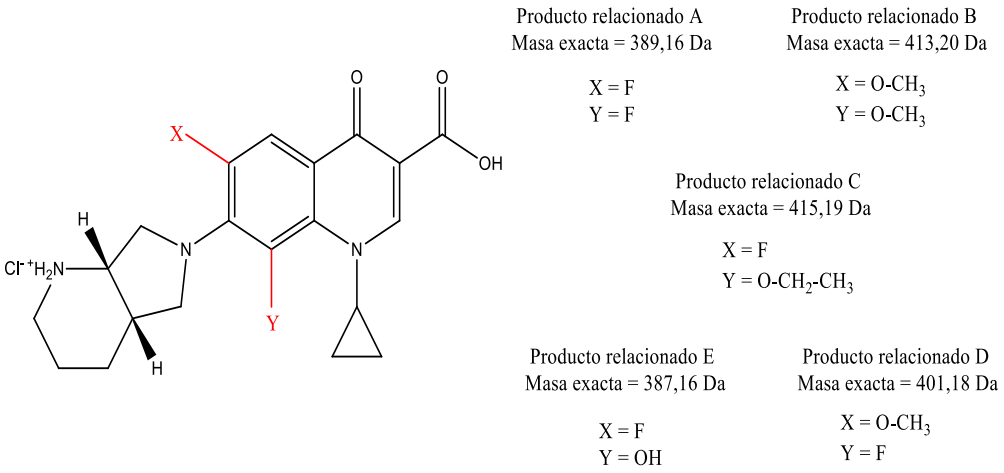


Figura 10. Estructuras químicas de las impurezas de MOX HCl en Farmacopea

3.3.8 – Validación del Método HPLC

El procesamiento de los datos y la generación de gráficas se realizó utilizando el software Excel® 2016 (Microsoft, USA). Dos grupos de concentraciones (GI y GII) fueron evaluados de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en guías estándar de validación analítica (ICH Q2R1, 2005). Como procedimiento general, previo a la inyección en el HPLC se realizó una filtración a través de membranas de 0.45 µm. A su vez, todas las soluciones analizadas se prepararon por quintuplicado (réplicas independientes) con el fin de garantizar la robustez estadística de los resultados.

Para asegurar una correcta separación de los componentes (especificidad), se estableció un tiempo de corrida de 10 minutos. En ese sentido, se fijó $R > 1.50$ entre todos los picos detectados como criterio de aceptación. Para evaluar la linealidad se construyeron curvas de calibración en rangos de concentración adecuados. Los límites instrumentales LOD y LOQ se hallaron con el valor de S/N calculado por el equipo sobre la línea de base.

La dosificación se realizó por comparación con estándares conteniendo ambos APIs a las concentraciones medias de las curvas de calibración. Dicho procedimiento se denomina cuantificación por punto único, y es posible siempre y cuando en el método propuesto se cumpla la linealidad y que el valor de la ordenada en el origen sea despreciable (muy cercano a cero). De esta manera, pueden obtenerse valores de concentración similares a los que se calcularían interpolando directamente las áreas en la curva de calibración, sin necesidad de construir un nuevo gráfico cada vez que se lleve a cabo el análisis.

Asimismo, se evaluó la exactitud por el método de placebo cargado, añadiendo cantidades conocidas de API a la matriz de PLGA. Se estudiaron tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) para una solución estándar combinada de ambos fármacos. Tras una extracción realizada sobre la matriz de PLGA, se evaluó por separado la recuperación de DEX y MOX HCl, considerando aceptables valores entre 95 – 105 %.

Luego se estudió la precisión, para determinar la dispersión de los resultados en réplicas preparadas con la misma solución stock. En ese sentido, se evaluó primero la repetibilidad (intradía). Para los tres niveles de concentración (bajo, medio y alto), se analizaron réplicas al inicio y al final de un mismo día. Luego se evaluó la variación intermedia. Para ello se reanalizó un set de réplicas a cada nivel tras 24 horas. Los resultados se expresaron como RSD (%) de las áreas, considerándose aceptable un RSD ≤ 5 %.

En el último punto de la validación analítica se estudió la robustez del método al nivel medio de concentraciones. Se compararon las áreas de cinco inyecciones consecutivas de solución estándar tras variar ± 3 % el flujo de FM, el pH del buffer y la temperatura. El método cromatográfico se consideró robusto si las diferencias observadas entre los valores de rango alto y bajo respecto al nivel medio, no superaron un umbral de 5 %.

3.3.9 – <u>Análisis Cromatográfico</u>

Se modificó y validó un método isocrático de determinación simultánea por HPLC para DEX, MOX HCl, y sus posibles PDs (Razzaq et al, 2014). Se aplicaron a su vez, criterios oficiales publicados en monografías de USP 42 NF 37. Todas las pesadas se realizaron empleando una balanza analítica AP225WD (Shimadzu, Japón). Para preparar la solución estándar stock combinada, 12.50 mg de DEX y 62.50 mg de MOX HCl se disolvieron en 25 mL de FM. Luego se aplicaron las diluciones necesarias, y alícuotas de 1 mL se filtraron a través de membranas de 0.45 µm. Finalmente, se inyectaron 20 µL en el HPLC.

Tabla 4. Soluciones de referencia para la dosificación

Estándar	[DEX] µg/mL	[MOX HCl] µg/mL	Dilución a 10 mL
GI	10	50	100 µL en Solución de NaCl (S_{NaCl}) 0.90 % m/V
GII	50	250	1 mL + 500 µL de solución matriz (SM) en FM

Los análisis se llevaron a cabo con un equipo HPLC modelo Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA) equipado con un detector de arreglo de diodos. La longitud de onda (λ) fue 242 nm, la temperatura del sistema cromatográfico 30 ºC y el flujo de FM 1.50 mL/min. En esta ocasión se utilizó una columna BDS Hypersil C8 (Thermo Fisher Scientific, USA) de 250 × 4.60 mm y tamaño de partícula (TP) de 5 µm.

Como FM se empleó una mezcla (en V/V) de 56 % de metanol y 44 % de buffer fosfato preparado disolviendo 2.72 g de KH_2PO_4 en 1 L de agua milliQ + 1 mL de trietilamina (bloqueador de silanoles) y ajustando el pH a 2.80 con H_3PO_4. El pH de FM se seleccionó con el fin de mantener a DEX sin ionizar, y a MOX HCl bajo su forma catiónica. Este equilibrio puede observarse en el gráfico obtenido de la herramienta online Chemicalize®.

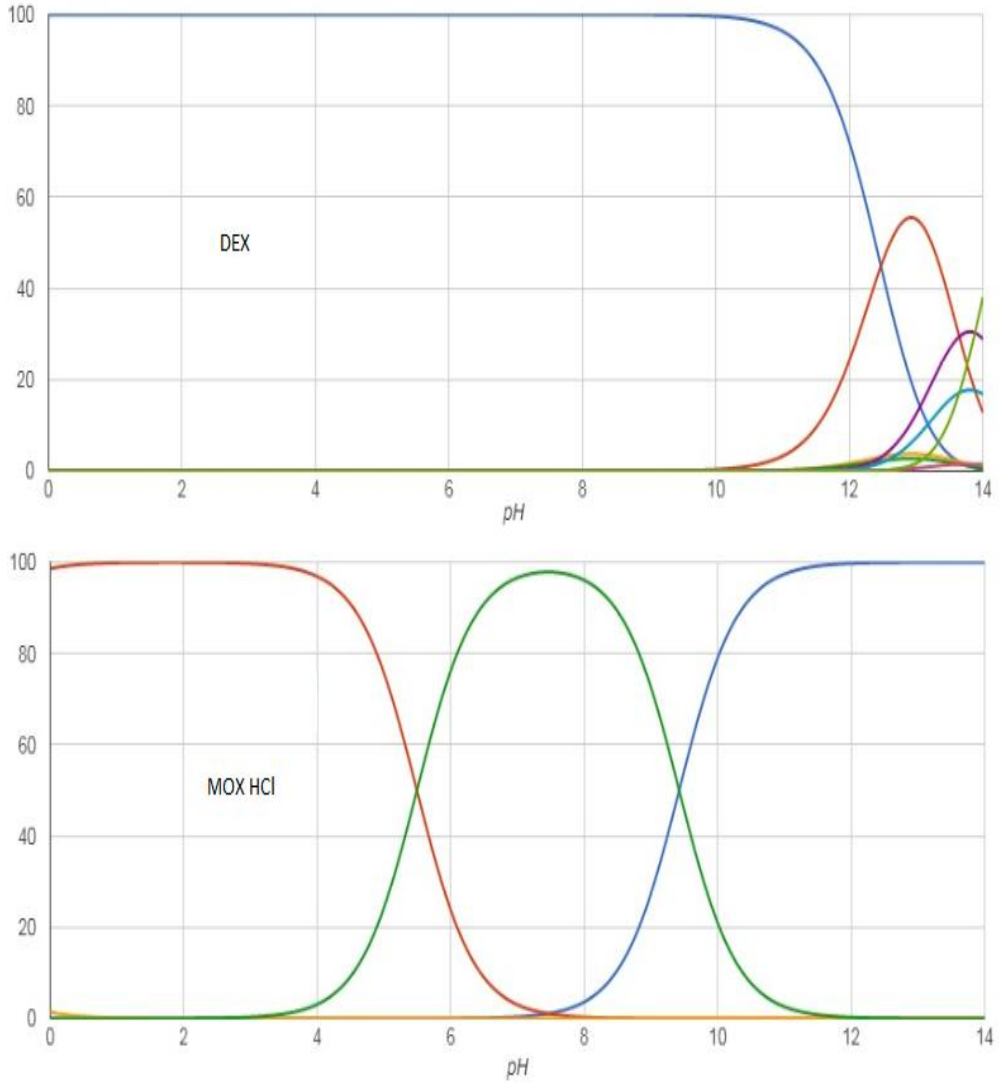


Figura 11. Equilibrios de ionización de ambos APIs

Para las muestras *in vivo*, el método cromatográfico se modificó para separar también a los compuestos clorhidrato de sarafloxacina (SAR HCl) y beclometasona (BEC) en humor acuoso. La incorporación de estos estándares internos es fundamental en la determinación de fármacos en matrices biológicas, ya que permiten compensar pérdidas, variaciones y posibles interferencias ocurridas durante las etapas de procesamiento.

Al añadirse una cantidad conocida de un compuesto que presenta un comportamiento fisicoquímico similar al del analito, es posible corregir diferencias en la recuperación y en la respuesta instrumental de las muestras. Para ello se compara la relación entre el área cromatográfica del API y la del estándar interno, lo cual permite compensar automáticamente muchas de la fluctuaciones que aportan variabilidad al resultado.

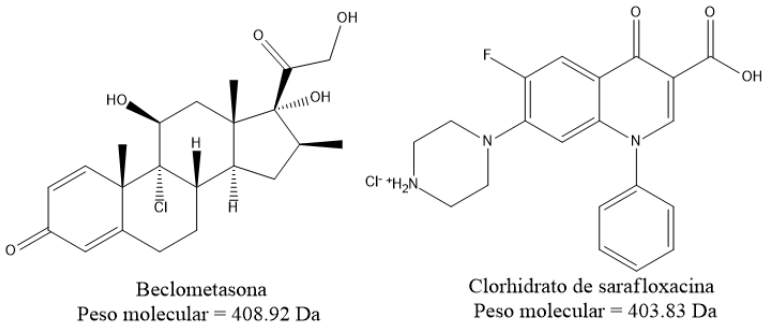


Figura 12. Estándares internos seleccionados

Se aplicó un gradiente inicial de cinco minutos comenzando con una proporción 50/50 en FM. Posteriormente, se pasó a una composición metanol/buffer 56/44. Luego se continuó manteniendo régimen isocrático durante otros cinco minutos. En esta variante del método HPLC, la aptitud del sistema cromatográfico se verificó evaluando el factor de asimetría (TF), y el RSD de las áreas obtenidas. El resultado se consideró aceptable cuando para cinco inyecciones consecutivas de solución estándar, TF < 2 y RSD ≤ 0.73 %.

El tiempo de retención (t_{ret}) en los pares SAR HCl/MOX HCl y DEX/BEC fue de entre 2.30 – 2.70 y 7 – 9 minutos respectivamente. Dada la importante similitud de la respuesta cromatográfica respecto del método original, se concluyó que las modificaciones introducidas no alteraron significativamente el comportamiento analítico del sistema. Por tal motivo, se consideró innecesaria una nueva validación completa, aunque sí se verificó la linealidad, los límites instrumentales y la aptitud para la separación de los analitos.

3.4 – Equipamiento de Producción

3.4.1 – Molienda

La DTP es un parámetro que afecta drásticamente la velocidad de disolución de un API (Sandri et al, 2014). Cuanto menor sea el TP de la distribución, mayor la superficie de contacto, y más factible la interacción con moléculas del solvente. Esto puede influir sobre la performance de ciertos productos. Por ejemplo, en el caso particular de DEX, la DTP repercute significativamente en la cinética de liberación intraocular. Por tal motivo, fue necesario incluir una etapa de disminución de DTP antes del mezclado.

En ese sentido, se redujo TP de DEX mediante molienda por impacto de bolas, empleando un equipo Turbula® T2F Shaker Mixer (Willy A. Bachofen, Suiza) con un paso posterior de tamización por malla 30 con el fin de romper aglomerados. Para ello, 45 g de DEX se trataron por tres horas en un recipiente de acero inoxidable fabricado a medida. Este procedimiento reduce significativamente la DTP, pero su rendimiento de recuperación es limitado. Por tal motivo y debido al alto costo de los polímeros, no se aplicó a los mismos.

Para MOX HCl, se decidió mantener su granulometría inicial correspondiente a ≈ 40 % de las partículas por debajo de 20 µm en volumen, dado que, por su alta solubilidad en agua, una molienda podría perjudicar la integridad de los insertos. En el caso de DEX, la patente de Ozurdex® recomienda una DTP específica, con el fin de lograr una liberación prolongada del API. En ese sentido, se planteó obtener, en términos de volumen, al menos 70 % de las partículas por debajo de 10 µm y 90 % menores a 20 µm. Esto permitiría asegurar una disolución adecuada y el desempeño farmacotécnico esperado. La DTP se monitoreó por difracción láser, con un analizador de partículas LS230 (Coulter, USA).

3.4.2 – Mezcla de Sólidos

Para llevar a cabo el procedimiento, se utilizó el equipo Turbula® T2F Shaker Mixer previamente mencionado. El aparato opera a velocidades fijas de 23, 34, 49, 72 y 101 rpm de acuerdo con el mecanismo de poleas seleccionado. El sistema de homogeneización empleado por el equipo se basa en la aplicación combinada de movimientos simultáneos de rotación, translación e inversión, lo que permite un mezclado eficiente del material del recipiente, basado en la teoría geométrica de Schatz (Bhoite et al, 2015).

3.4.3 – Producción de Fibras e Insertos

La mezcla de polvos se procesó con una extrusora de escala piloto modelo Pharma 11 (Thermo Fisher Scientific, Alemania) equipada con una tobera cuyo orificio de salida mide 0.50 mm de diámetro. El material fluye hacia ese punto impulsado por la acción de dos tornillos corrotatorios que giran a velocidades de entre 10 y 1000 rpm. Ambos miden 11 mm de diámetro y cuentan con tres tipos de elementos con distinta geometría: mezcladores (MEZ), transportadores (TPD) y presurizadores (PRE). En particular, los PREs se ubican al final del recorrido del material, y aplican la fuerza que expulsa a la fibra por la tobera. En ese punto, la presión generada es función de la temperatura, el caudal de alimentación del polvo y la velocidad de giro de los tornillos.

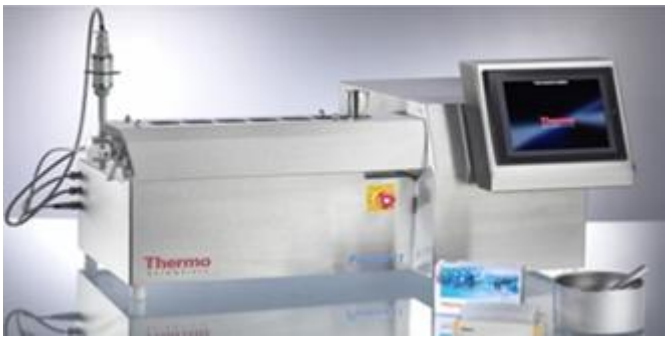


Figura 13. Extrusora Pharma 11

La capacidad de procesamiento del equipo es de 2500 g/h, y permite operar a temperaturas de hasta 280 ºC. A su vez, consta de cinco estaciones de calentamiento y una zona externa (troquel) donde se aloja la tobera. La configuración en bloques TPD/PRE puede también variarse para modificar las características de la fibra. Asimismo, la disposición de los elementos en el sistema (hacia la tobera) usado en este trabajo fue la típica de un proceso de extrusión estándar, y se indica a continuación: TPD → MEZ → TPD → MEZ → PRE.

Por otro lado, para la alimentación de la mezcla de polvos se utilizó una tolva volumétrica DDW-MT (Brabender, Alemania) cuya carga mínima operativa es de 30 g. A su vez, la refrigeración del sistema se realizó con agua destilada a 15 ºC. Para ello se empleó un recirculador Accel Laboratory Series (Thermo Fisher Scientific, Alemania). Finalmente, la fibra se depositó por efecto de la gravedad sobre una superficie antiadherente y se fraccionó manualmente. Estos pasos pueden automatizarse sincronizando la velocidad de salida con una cinta transportadora acoplada a un cortador de precisión láser o mecánico.

3.5 – Proceso de Fabricación

3.5.1 – Homogeneidad de Mezclado

El estudio se realizó con el fin de asegurar que el polvo de alimentación contuviera las proporciones correctas de los componentes de la formulación. Para ello es necesario conocer previamente el tiempo óptimo de mezclado. Este se define como el punto en el que se obtiene el menor RSD del contenido de ambos APIs en cinco muestras de polvo (Clark, 2009). El estudio de homogeneidad y el de tiempo óptimo de mezclado comparten el mismo procedimiento operativo de cuantificación, el cual se detalla a continuación.

En primer lugar, se mezclaron DEX/MOX HCl/PLGA tras su agregado en ese orden, sin dilución geométrica, en proporción 10/50/40 % m/m (5 + 25 + 20 = 50 g totales). Luego, a cinco tiempos distintos (60, 90, 120, 150 y 180 minutos), se pesaron 50 mg de polvo de cada cuadrante y del centro del recipiente. Estas muestras se trataron con 5 mL de acetona en matraces aforados de 10 mL con el fin de disolver a DEX y al PLGA. A continuación, se agregaron 5 mL de FM y se agitó para solubilizar a MOX HCl. 200 µL del contenido de cada matraz se mezclaron con 100 µL de acetona, y se diluyeron a 2 mL con FM. Estas soluciones se filtraron a través de una membrana de 0.45 µm y se inyectaron 20 µL en el HPLC. La homogeneidad de ambos APIs se evaluó tras normalizar las áreas a una masa de 50 mg, definiendo como aceptable el rango de 100 ± 5 % del contenido teórico.

3.5.2 – Obtención de los Implantes

En primer lugar, APIs y PLGA se mezclaron por dos horas a 72 rpm. Luego se evaluó la homogeneidad del polvo final, y se procedió a la extrusión. Dado que esta formulación se esteriliza de forma terminal por radiación gamma, su producción puede realizarse en áreas de clase C (WHO, 2011). En ese sentido, la fabricación de los implantes se llevó a cabo en una instalación con dichas características, ubicada en el laboratorio de BIOTEFA.

La fibra se recolectó manualmente a una velocidad de salida que mantuviese su diámetro entre 0.60 – 0.70 mm. Luego se fraccionaron unidades de ≈ 4 mm de longitud. Tras la extrusión, los implantes se sellaron al vacío en bolsas plásticas impermeables al vapor de agua. Finalmente, el sistema se esterilizó por radiación gamma a una dosis de 30 kGy. El siguiente diagrama resume la producción y control de calidad de los insertos.

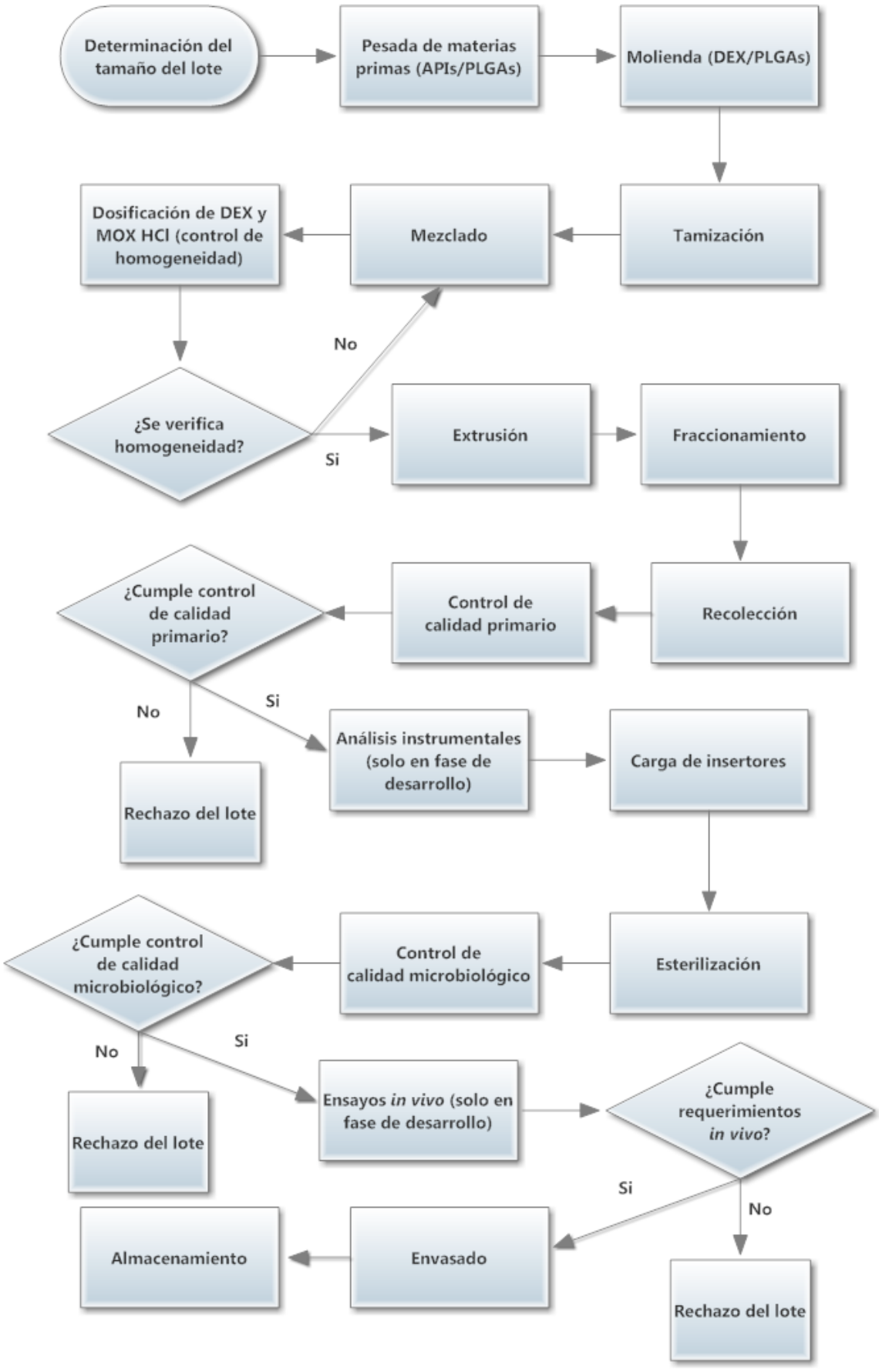


Figura 14. Diagrama de flujo para fabricación y control de calidad de los insertos

3.5.4 – Optimización de la Formulación

En todo sistema existen factores de proceso capaces de influir de forma directa (efectos principales) o por interacción con otras variables. Tales correlaciones pueden evaluarse estadísticamente según los valores de respuesta obtenidos con distintas combinaciones de dichos parámetros. Un análisis de estas características se denomina diseño experimental (DOE), el cual define para la evaluación de las variables un cierto espacio de trabajo.

En ciertas variantes de DOE, los resultados pueden representarse gráficamente mediante superficies de respuesta. Estas describen la evolución de las variables de salida frente a cambios en los factores evaluados. Las superficies de respuesta solo pueden representarse respecto a dos parámetros, y su visualización también es posible con gráficos de contorno, cuyas zonas delimitadas representan combinaciones de condiciones experimentales que generan un cierto grupo de resultados. Su objetivo es indicar el comportamiento de las variables de salida a partir de cambios en los valores de los factores evaluados. Esto permite maximizar, minimizar o acotar en un rango los resultados experimentales.

Para ello, se requiere conocer la expresión matemática del sistema obtenida por regresión lineal múltiple (Box & Wilson, 1951). Si bien el coeficiente de determinación (r^2) indica el grado de ajuste del modelo, su relevancia estadística se evalúa con una prueba ANOVA y un test de Lack of Fit. En ese sentido, el resultado se considera significativo si $p < 0.05$ en el primero, y $p \geq 0.05$ en el segundo. Usualmente, el modelo cuadrático es el más completo, ya que incluye términos lineales y de interacción entre factores. A su vez, su exponente de segundo orden representa la curvatura del gráfico. Para estimarla junto a la variabilidad aleatoria (error puro), deben incluirse réplicas del punto central del DOE.

El diseño de Box-Behnken es el más utilizado en cuanto a superficies de respuesta. Su popularidad radica en que permite seleccionar combinaciones eficientes para estimar los coeficientes de primer y segundo orden. Metodológicamente, puede aplicarse con al menos tres niveles y factores, e incluye puntos medios de los bordes del espacio de trabajo (Box & Behnken, 1960). Esto asegura que las condiciones experimentales no exhiban valores extremos. Por otro lado, una alternativa viable es el diseño central compuesto, el cual puede aplicarse a dos o más factores y con hasta cinco niveles. No obstante, debe considerarse que incluye puntos axiales que extienden el espacio de trabajo.

Debido al elevado costo del PLGA, en esta tesis se optó por un diseño central compuesto con el fin de reducir el número total de experimentos. El espacio de trabajo para el proceso a optimizar se seleccionó a partir del comportamiento del sistema y la evaluación de prototipos de implantes obtenidos en pruebas piloto. En ese sentido, se determinó que un diseño central compuesto no comprometería la logística operativa. Los factores seleccionados fueron la velocidad de giro de los tornillos y la temperatura de extrusión, la cual se configuró de la misma manera para el troquel y todas las estaciones del cañón.

Tabla 5. Factores seleccionados para el DOE

Código	**Parámetro regulable**	**Rango nominal**
A	Temperatura de extrusión	140 – 155 ºC
B	Velocidad de giro de los tornillos	250 – 350 rpm
C	Composición de los implantes	Constante

Las variables de salida seleccionadas fueron UC, y los porcentajes de liberación inicial y final de ambos APIs en el estudio *in vitro*. El análisis estadístico para optimizar la formulación y la generación de las superficies de respuesta correspondientes se llevó a cabo manteniendo los valores de UC en el rango 95 – 105 %. Esta decisión se basó en el hecho de que es necesario que los implantes conserven una buena homogeneidad en cuanto a la cantidad de API presente en la masa total de cada unidad producida. Por otro lado, se optó por maximizar las tasas de liberación inicial y final respectivamente. Esta decisión responde a la necesidad práctica de alcanzar rápidamente concentraciones intraoculares terapéuticas y evitar tratamientos excesivamente prolongados.

Tabla 6. Parámetros de respuesta seleccionados para el DOE

Medida	**DEX**	**MOX HCl**
UC	95 – 105 %	95 – 105 %
Liberación inicial (%)	Maximización	Maximización
Liberación total (%)	Maximización	Maximización

Inicialmente se planteó la incorporación de ambos polímeros en la formulación (siguiendo el ejemplo de Ozurdex®) y el fraccionamiento de los insertos en unidades de 2 mm (dada su comodidad para su posterior inserción intracameral). Sin embargo, estudios preliminares revelaron una tasa de liberación significativamente menor a la esperada tanto en el caso de DEX como en el de MOX HCl al incluir RG502. A su vez, se comprobó que este comportamiento era dosis dependiente para ambos APIs. Por tal motivo, se decidió emplear solo RG502H y alargar la longitud de los insertos hasta 4 mm para elevar el contenido a 200 y 1000 μg de DEX y MOX HCl respectivamente.

Debido al alto costo de los reactivos (particularmente los PLGAs) y dado que se conocían los límites operativos del proceso, se planteó aplicar un modelo de superficie de respuesta mediante un diseño central compuesto con dos puntos medios, reduciendo a 10 el número de experimentos. En base a todo lo anterior, se definió un cronograma de fabricación de 10 lotes de fibras más otro correspondiente a la formulación final optimizada. Por último, el tratamiento de datos, se realizó con el software Design-Expert® 13 (Stat-Ease, USA).

Tabla 7. Planificación de la producción asociada al DOE

Lote	**A (ºC)**	**B (rpm)**	**DEX (%)**	**MOX HCl (%)**	**RG502H (%)**
Pruebas previas	140 – 170	200 – 350	10	50	0 – 40
1	148	300	10	50	40
2	155	250	10	50	40
3	148	371	10	50	40
4	155	350	10	50	40
5	158	300	10	50	40
6	140	350	10	50	40
7	137	300	10	50	40
8	148	300	10	50	40
9	140	250	10	50	40
10	148	229	10	50	40

3.5.5 – Procesamiento de las Fibras

Cada lote se sometió a controles de calidad de rutina, y sobre el definitivo se incluyeron estudios de estabilidad y caracterizaciones instrumentales. En ese sentido, se evaluó por microscopía electrónica de barrido (SEM) la morfología de los insertos. Por otro lado, se verificó la ausencia de asociaciones químicas por difracción de rayos X (XRD). A su vez, se estudió el perfil térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC), y se evaluó por microscopía Raman confocal (CRM) la homogeneidad de distribución de los APIs.

Por otro lado, las fibras destinadas a los ensayos *in vivo* se esterilizaron por radiación gamma con un equipo Gammacell 220 Excel (Best Theratronics, Canadá). Dado que este proceso puede afectar a matrices de PLGA (Faisant et al., 2002), se llevó a cabo una evaluación posterior. El estudio se realizó por quintuplicado exponiendo los insertos a dosis de 15, 20, 25 y 30 kGy. Luego se compararon los perfiles de liberación *in vitro* y las UCs correspondientes. El análisis de datos se efectuó con un test ANOVA de una vía.

Tabla 8. Diferentes estudios a realizar sobre fibras y producto terminado

Lotes	**Análisis**	**Material a analizar**	**Cantidad utilizada**
Todos	Homogeneidad	Mezcla para extrusión	250 mg
Todos	UC/Uniformidad de masa	Implantes	10 – 30 unidades
Todos	Densidad del filamento	Fibra	1 g
Todos	Liberación *in vitro*	Implantes	5 unidades
Final	CRM + DSC + SEM + XRD	Materias primas/implantes	1 g
Final	Estabilidad (acelerada/natural)	Implantes	105 unidades
Final	Liberación *in vivo*	Implantes	53 conejos/67 ojos

Por último, considerando la presencia de antibiótico en la formulación, el calor seco empleado durante la fabricación de la fibra, la dosis de radiación aplicada y el manejo aséptico del proceso, se consideró innecesaria la realización de ensayos microbiológicos y/o de endotoxinas. No obstante, dichos estudios deberán incluirse en un eventual desarrollo que involucre como objetivo la presentación ante organismos regulatorios.

3.6 – Determinaciones Instrumentales

3.6.1 – Análisis Térmico por DSC

La técnica mide la diferencia de flujo de calor entre una celda de referencia y otra que contiene a la muestra, al variar la temperatura. Esto permite identificar eventos térmicos y cambios de capacidad calorífica. A su vez, puede detectar procesos entálpicos asociados a variaciones en la potencia entregada a la muestra respecto a la referencia. Para ello, el equipo ajusta el flujo de calor con el fin de mantener ambas celdas en equilibrio térmico.

En un gráfico de potencia (en mW) en función de temperatura, los eventos endotérmicos (fusiones o transiciones vítreas) y exotérmicos (descomposiciones) se observan como valles y picos, y su desplazamiento en la mezcla al comparar con los componentes por separado, permite inferir interacciones físicas atribuibles a un cambio en la capacidad calorífica del sistema. En este trabajo se empleó un equipo DSC-60A (Shimadzu, Japón), operando a celda abierta con crisoles de aluminio, con uno vacío de referencia. A su vez, se aplicó una rampa de calentamiento de 10 ºC/min en el rango 30 – 300 ºC.

3.6.2 – Estudio Cristalográfico por XRD

Esta técnica permite estudiar la organización cristalina de un material a partir del patrón de difracción generado cuando un haz de rayos X incide sobre la muestra. La dispersión del haz depende de la disposición de los átomos y de las distancias interplanares en la estructura. Tal fenómeno genera un patrón propio que aporta información variada. Es posible conocer así composición química y parámetros geométricos asociados a la distribución espacial de los átomos (por ejemplo, disposición, ángulos y distancias).

En un material cristalino, se observa un conjunto de picos definidos, característicos de cada compuesto y de su fase sólida. Así, es posible detectar la presencia de polimorfos en una muestra. En contraste, si el material es amorfo, el patrón de difracción carece de picos definidos y muestra una banda ancha o envolvente difusa. En este trabajo se empleó un difractómetro de polvos Miniflex 600-X (Rigaku, Japón) equipado con un tubo de cobre emisor de rayos X ($\lambda = 0.15419$ nm) y detector d/TEX Ultra 1D. El equipo operó con un voltaje de 40 kV y una corriente de 15 mA en geometría Bragg-Brentano ($\theta - 2\theta$), en el rango $2\theta = 5 – 55º$ con tamaño de paso $2\theta = 0.02º$ y velocidad de barrido de 10º/min.

3.6.3 – Exploración Morfológica por SEM

Esta técnica emplea un campo eléctrico que permite acelerar a muy altas velocidades un haz de electrones proveniente de un filamento de tungsteno. El haz es luego enfocado y desviado por bobinas deflectoras con el fin de incidir sobre una muestra. Al chocar el haz con la materia pueden producirse dos tipos de señales. Por un lado, si la interacción es inelástica, se desprenden electrones secundarios de la superficie del sólido. Estos escapan con diferentes energías y son captados posteriormente por el detector. Si la interacción es elástica, los propios electrones incidentes se retrodispersan (rebotan) contra el material.

Una vez que el detector capta la señal, el sistema informático genera imágenes de alta resolución. Para ello, la muestra debe estar a vacío, evitando interacciones con átomos de la atmósfera y los electrones. A su vez, materiales conductores eléctricos permiten mejores observaciones, sin necesidad de incrementar el voltaje aplicado. Sin embargo, si la superficie a explorar no es metálica, es necesario realizar un recubrimiento con oro o grafito. En este trabajo se estudió la morfología de implantes y materias primas con un microscopio electrónico de barrido JSM 5900LV (Jeol, USA). Las muestras se recubrieron con oro y las imágenes se obtuvieron a un voltaje de 10 kV.

3.6.4 – Verificación Cualitativa de la Homogeneidad por CRM

La espectroscopía Raman es una técnica de caracterización que se basa en la detección de los modos de vibración de los enlaces moleculares, luego de que sus átomos dispersan inelásticamente los fotones de un láser. Esto permite determinar la presencia de grupos funcionales en la estructura. Por otro lado, la microscopía confocal mejora la resolución espacial al restringir la detección a un único plano de enfoque mediante un sistema óptico, que rechaza señales de zonas fuera de foco. Tal combinación permite generar un espectro Raman independiente por cada píxel de imagen, revelando el patrón de distribución de los componentes de la muestra y permitiendo evaluar cualitativamente su homogeneidad.

En este trabajo se empleó un equipo Alpha 300-RA (WITec, Alemania), utilizando su láser de $\lambda = 785$ nm para evitar la fluorescencia de MOX HCl. Cada espectro del implante y sus materias primas se registró por separado como el promedio de 100 medidas, con un tiempo de integración de 0.50 segundos. Con la información obtenida, se generó una imagen de la distribución espacial de los tres componentes individuales de la muestra.

3.7 – Control de Calidad sobre los Implantes

3.7.1 – Densidad

En este estudio se pesó 1 g de fibra en un matraz aforado de 50 mL previamente seco y tarado. A continuación, se enrasó con agua hasta el aforo y se registró la masa total en balanza analítica. Luego se calculó el volumen de la fibra. Para ello se empleó la ecuación $d_{fibra} = m_{fibra}/(V_{matraz} - V_{agua})$. Este cálculo asume que el líquido desplazado por la fibra es la diferencia entre el volumen del matraz y del agua a la temperatura de medida.

3.7.2 – Uniformidad de Masa

Se trata de un estudio a pie de máquina que permite comprobar la reproducibilidad inicial de los implantes producidos. Según USP 42 NF 37, el ensayo se considera aceptable si la masa de al menos 18 unidades, de un total de 20 seleccionados al azar (90 % de la muestra), no se desvía en más del 10 % respecto al valor promedio. Dado que la extrusión incluyó una etapa manual de fraccionamiento de los insertos, fue necesario definir un rango operativo de aceptación más acotado, entre 1.90 y 2.10 mg. Este criterio permitió reducir la variabilidad asociada a diferencias de masa para las diferentes unidades.

3.7.3 – UC

Como referencia se aplicó el método descrito en USP 42 NF 37 para formulaciones sólidas con dosis inferiores a 25 mg. El procedimiento está diseñado con el fin de cuantificar directamente el contenido de API en cápsulas y comprimidos. Inicialmente, se determinó la cantidad de API presente en 10 implantes individuales seleccionados aleatoriamente. Asimismo, se registraron sus masas para un tratamiento posterior. A partir de los contenidos individuales, se calculó su promedio $\overline{P}$ y luego AV = $\left|M - \overline{P}\right|$ + Ks. El resultado del ensayo se considera aceptable si AV ≤ 15. En caso contrario, se analizan otras 20 unidades. En esta segunda etapa, el lote se aprueba solo si se cumple a la vez que AV ≤ 25 y que cada implante individual se encuentra en el rango 0.75M ≤ P ≤ 1.25M.

El valor de M utilizado en los cálculos depende de la determinación de $\overline{P}$:

- Si 98.50 % ≤ $\overline{P}$ ≤ 101.50 % → M = $\overline{P}$
- Si $\overline{P}$ < 98.50 % → M = 98.50 %
- Si $\overline{P}$ > 101.50 % → M = 101.50 %

Dada la baja masa de los implantes, fue necesario normalizar cada resultado a 2 mg con el factor $m_{teórica}/m_I$. Esto evita distorsiones por variaciones de pesada. Por otro lado, las monografías de USP 42 NF 37 reportan UCs de 97 – 102 % y 98 – 102 % para DEX y MOX HCl, pero Farmacopea no contempla aún sistemas implantables intraoculares. Por tal motivo, se decidió adoptar un intervalo de referencia más laxo, entre 95 – 105 %.

Para la determinación, las unidades se colocaron en tubos de 2 mL conteniendo 400 µL de acetona. Tras agitar por 30 segundos en vortex, se disolvieron DEX y la matriz de PLGA. Luego se añadieron 1.60 mL de FM para solubilizar a MOX HCl. El sistema se agitó otros 30 segundos, y 1 mL de la solución se diluyó a 2 mL con FM. Finalmente, las muestras se filtraron con membranas de 0.45 µm y se inyectaron 20 µL en el HPLC.

3.7.4 – Liberación *In Vitro*

Los experimentos se realizaron en 10 mL de solución acuosa de NaCl al 0.90 % m/V, cuya concentración de APIs nunca superó el 20 % de los límites de solubilidad respectivos (condiciones sink). Esta restricción evita variaciones en la tasa de liberación asociadas a fenómenos de saturación (Gibaldi & Feldman, 1967). Los estudios se realizaron sobre unidades de contenido nominal conocido, con masas acotadas en el rango 1.90 – 2.10 mg.

Cinco implantes se colocaron en matraces de 10 mL y se enrasaron con el medio de liberación. Luego, se ubicaron en un equipo ES-20 Orbital Shaker Incubator a 37 ºC, con agitación de 140 rpm. Se extrajo 1 mL de cada matraz a los días 1, 2, 3, 7 y 10 con reposición. Las tomas se filtraron con membranas de 0.45 µm y se inyectaron 20 µL en el HPLC. Las áreas obtenidas se normalizaron posteriormente al valor teórico de 2 mg por implante, y se calculó la masa liberada como $m_{cuantificada} = c_{medio}V_{medio} + \sum_{i=1}^{n-1} c_i V_{toma}$.

3.7.5 – Estabilidad de la Formulación en el Tiempo

Las guías regulatorias para registro de medicamentos establecen numerosos requisitos de seguridad, y eficacia de las especialidades farmacéuticas (FDA, 2009). En ese sentido, uno de los puntos a demostrar es la estabilidad en el tiempo (ICH Q1E, 2003). Esto se determina analíticamente comprobando que el contenido de API se mantiene constante dentro de los límites aceptables, y que no se produjo degradación significativa.

Para ello, es necesario llevar a cabo estudios de estabilidad que pueden ser a largo plazo o acelerados (FDA, 2008). El objetivo de cada uno es diferente, y tiene un impacto significativo sobre el registro del producto. Por ejemplo, los estudios a largo plazo, (en general 12 o 24 meses de duración) son obligatorios porque es necesario demostrar que el medicamento mantiene sus propiedades y seguridad en ese lapso de tiempo.

Por otro lado, las condiciones aceleradas pueden emplearse con dos objetivos. El primero de ellos es estimar la vida útil del producto (González-González et al, 2022), y si este es capaz de sobrevivir al estrés de un almacenamiento en situaciones que en realidad no serán las que ocurrirán en góndola. El segundo es permitir al laboratorio desarrollador comenzar con el proceso de registro a partir de esa información primaria ante la autoridad sanitaria correspondiente, mientras se completan los ensayos a largo plazo obligatorios.

A su vez, los estudios de estabilidad dependen del tipo de almacenamiento y de la región geográfica de registro (Grimm, 1993). En ese sentido es posible dividir al mundo en cuatro zonas climáticas bien definidas según la temperatura y HRA promedio a la que se ven sometidos los productos farmacéuticos en su empaque final durante su vida útil (WHO, 1996). Las pautas establecidas en las guías ICH contemplan fundamentalmente a las regiones más activas comercialmente, que son la I y la II respectivamente.

En particular, en esta última se encuentra Uruguay (clima subtropical y húmedo). En ese sentido, y de acuerdo a información previa recolectada sobre los implantes durante la etapa de evaluación inicial, se decidió que el producto de este trabajo fuese almacenado en refrigerador y a vacío en bolsas impermeables al vapor de agua. Esto determinó que, con el fin de cumplir con las guías ICH, para los estudios de estabilidad los insertos se mantuvieran a 25 ± 2 ºC por 180 días (acelerada) o a 5 ± 3 ºC por 1 año (largo plazo).

Por otro lado, se definió que la toma de muestras se realizaría a los meses 0, 3, 6, 9 y 12 respectivamente. En consecuencia, 105 unidades recogidas al azar del lote final fueron analizadas en total para los estudios de estabilidad. Por cada toma, 10 implantes se destinaron a la determinación de UC y los otros cinco a la liberación *in vitro*. De esta manera, fue posible comparar desde un punto de vista estadístico los resultados a lo largo del tiempo, respecto a lo obtenido en el momento de iniciados los estudios de estabilidad.

3.8 – Ensayos *In Vivo*

3.8.1 – Manejo de Animales de Experimentación

Para todos los estudios *in vivo* se utilizaron conejos hembra de raza New Zealand White (2.50 – 3 kg de peso) sin modificaciones genéticas. Los animales recibieron agua y comida *ad libitum* en un bioterio con temperatura controlada (21 ± 5 °C). Asimismo, se les expuso a ciclos diarios de luz/oscuridad de 12 horas durante dos semanas. El manejo y los procedimientos aplicados a los conejos fueron realizados según las pautas definidas por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Argentina). El protocolo (aprobado por resolución CE-2023-00288395) se redactó de acuerdo a las guías recomendadas por los National Institutes of Health (USA). El manejo de los animales estuvo a cargo del Dr. Luis Ignacio Tártara (cirujano oftalmólogo) y sus colaboradores.

3.8.2 – Toma de Muestras *In Vivo*

Uno de los objetivos de este trabajo de tesis fue el estudio del perfil farmacocinético de la formulación implantable. Para ello, fue necesario recolectar muestras biológicas tras la colocación de los insertos. En ese sentido, se extrajeron por punción 50 µL de humor acuoso por ojo, los días 1, 2, 3, 7, 10, 14, 17 y 24. Las fracciones obtenidas se almacenaron en congelador a – 25 ºC. Posteriormente siguió una etapa de procesamiento.

El tratamiento de muestras de humor acuoso implica precipitar sus proteínas con metanol y luego centrifugar (Khan et al, 2016). En este trabajo se utilizaron 50 µL de FM (56 % de dicho solvente). Asimismo, se agregaron 100 µL de una solución de estándar interno combinada, alcanzando un volumen final de 200 µL. Finalmente, 20 µL se inyectaron en el HPLC. Para DEX, el compuesto de referencia fue BEC, reportado en estudios en humor vítreo (Bhagat et al, 2014). En el caso de MOX HCl, se usó SAR HCl (Chan et al., 2006).

No obstante, en este trabajo no se observó precipitación al adicionar metanol a las tomas de humor acuoso, por lo que no fue necesaria una etapa de centrifugación previa al análisis. En consecuencia, el estándar interno se incorporó solo con el objetivo de controlar la consistencia del volumen final de dilución y minimizar posibles variaciones derivadas de la preparación manual de las muestras antes de la inyección en el HPLC.

Para preparar la solución stock combinada, 20 mg de SAR HCl se disolvieron en 75 mL de DMSO. Luego, se agregaron 125 mL de FM y 4 mg de BEC. Se agitó por dos horas a 70 ºC, y se repuso el volumen perdido de DMSO. Finalmente, 5 mL de stock se diluyeron a 25 mL con FM. Las concentraciones finales para BEC y SAR HCl luego de mezclar 100 µL de esta solución con humor acuoso + FM, (V_{final} = 200 µL) fueron 2 y 10 µg/mL.

3.8.3 – Estudios Preliminares en Animales

El objetivo de esta etapa fue adquirir experiencia en la colocación de los implantes y evaluar su comportamiento *in vivo*. Para la inserción, los animales recibieron anestesia general con ketamina (40 mg/kg) y xilacina (4 mg/kg) intramuscular, y local con gotas de proparacaína. Luego se dilataron las pupilas por vía tópica mediante tropicamida/fenilefrina, evitando el reflejo palpebral con un blefaróstato. Cinco conejos recibieron un único inserto (n = 5), y se les realizó un seguimiento clínico por 35 días.

Una biomicroscopía con lámpara de hendidura (Huvitz, Corea del Sur) adaptada para fotografía digital con una cámara EOS Rebel T6 (Canon, USA) permitió registrar el grado de inflamación. Asimismo, se evaluó el estado del humor vítreo y la retina con un oftalmoscopio binocular indirecto (Neitz, Japón) equipado con una lupa de 20 dioptrías (Volk, USA). Por último, se midió la PIO con un tonómetro digital (TonoVet, Finlandia).

En una segunda etapa, se evaluó la técnica quirúrgica de extracción capsular de cataratas (ECC). Para ello, tres animales recibieron un único implante (n = 3) con esta cirugía. En pruebas posteriores, se optó por una facoemulsificación (Pandey et al, 2002). En ese sentido, seis conejos recibieron un único inserto (n = 6). El seguimiento clínico se realizó por 24 días en ambos casos. Al finalizar los ensayos, los animales fueron anestesiados con ketamina/xilacina y eutanasiados en cámara de CO_2 según el protocolo aprobado.

3.8.4 – Evaluación Clínica de la Actividad de DEX en los Insertos

Para este estudio, tres conejos recibieron una facoemulsificación, y luego se esperó entre 7 – 14 días hasta la resolución clínica de la inflamación post quirúrgica. Posteriormente se les introdujo un implante en un ojo (n = 3), y se inyectaron por vía intravítrea 60 µL de una solución de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* (Sigma, USA) de concentración 1 mg/mL con el fin de inducir una uveítis controlada (Karaca et al, 2013).

Luego se evaluó clínicamente el grado de inflamación por lámpara de hendidura. Este instrumento es útil para diagnosticar una uveítis, al observar en la cámara anterior el efecto Tyndall (dispersión de la luz incidente en el humor acuoso) y/o el flare (aparición de turbidez). Ambas condiciones son causadas por la presencia de células inflamatorias y proteínas suspendidas (Jabs et al, 2005). En particular, el flare puede ser de tipo difuso en casos leves o asociarse también a la aparición de una membrana de fibrina en situaciones graves. Esta condición se evalúa según un criterio visual clínico estandarizado internacionalmente que clasifica el grado de inflamación intraocular.

Tabla 9. Escala SUN para el diagnóstico de la uveítis

Valor	Flare
1	Difuso, leve
2	Moderado (detalles del iris aún claros)
3	Marcado (detalles del iris nublados)
4	Intenso (aparición de fibrina u otras proteínas)

3.8.5 – Cuantificación de la Inflamación mediante Tests ELISA

La escala SUN es el estándar médico para la evaluación del flare intraocular. Sin embargo, se trata de un criterio visual, dependiente del entrenamiento del oftalmólogo que lo aplica. Dado que la escala es discreta y de rango acotado, dificulta detectar variaciones sutiles dentro de un mismo grado clínico. La evaluación utilizando este criterio se ve entonces limitada por su carácter categórico y observacional, lo que impide distinguir incrementos fraccionarios de inflamación intraocular con suficiente resolución.

Por tal motivo, se realizó un estudio cuantitativo con un ensayo ELISA sándwich. En este caso, se seleccionó la interleucina 1 (IL-1) como marcador de inflamación intraocular (Liu et al, 2020). Para ello se adquirió un kit de determinación específico para IL-1 de conejo común (*Oryctolagus cuniculus*). Según el fabricante (Cusabio, China), el kit (código CSB-E06896Rb) permite cuantificar esta interleucina con alta sensibilidad en el rango 15.6 – 1000 pg/mL. El estudio se realizó sobre muestras de humor acuoso de ojos implantados, tanto de los que recibieron facoemulsificación como de aquellos sin afaquia.

3.8.6 – Evaluación de la Protección Antibiótica *In Vivo*

Con el objetivo de demostrar la actividad antimicrobiana de la formulación implantable, fue necesario adaptar un modelo de endoftalmitis bacteriana en conejos, basado en reportes previos (Kowalski et al, 2012). De entre los posibles microorganismos candidatos, se eligió la cepa comercial 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC, USA) debido a su disponibilidad, su elevada virulencia, su prevalencia en la práctica clínica, y a que en términos generales la prognosis luego de la infección es muy desfavorable.

Se indujo endoftalmitis en un único ojo por animal mediante inyección intravítrea a 6 mm del limbo corneal. En ese sentido, se inocularon unos 60 µL de solución salina conteniendo 100 – 130 UFC/mL de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando una jeringa de 1 mL y una aguja 30 G. Se ha reportado que esta mínima carga (6 – 7 UFC totales) es suficiente para generar una infección intravítrea reproducible (Shockley et al, 1985).

Previo al procedimiento, los conejos recibieron anestesia general y tópica. Tras la inoculación, se documentó la evolución de la patología evaluando varios parámetros clínicos indicativos de infección, y asociados al daño de estructuras oculares. En total, se indujo endoftalmitis en 25 conejos divididos en tres grupos (A, B, C). Inmediatamente luego de introducido el inóculo, se procedió a aplicar los correspondientes tratamientos.

En ese sentido, los ojos del grupo A (n = 6) recibieron 80 µL de solución salina estéril intravítrea. Esto corresponde al control negativo del estudio. En el grupo B (n = 11), se inocularon de forma intravítrea 80 µL de ceftazidima (antibiótico utilizado en casos de endoftalmitis) con concentración de 2 mg/mL. Este corresponde al control positivo. Por último, para el grupo C (n = 8) se colocó un implante intraocular en cámara anterior.

La gravedad del cuadro de endoftalmitis se evaluó por criterios de puntuación de inflamación/infección clínica que extienden lo expuesto en trabajos previos con conejos albinos (Formica et al, 2020). Para ello se definió un score global que integra parámetros de afectación conjuntival, corneal, cámara anterior, cristalino y respuesta pupilar. Todos estos valores fueron registrados a lo largo de 24 días de estudio. A continuación, se detallan los criterios clínicos cuya sumatoria indica el estado patológico en el modelo de endoftalmitis (0 – 3 leve, 4 – 6 moderado, 7 – 8 grave, ≥ 9 severo).

Tabla 10. Parámetros de Evaluación para Determinar el Daño Ocular

A. Inflamación conjuntival	**Puntaje**
Nulo	0
Leve (escasa cantidad de vasos inyectados y sectorizados)	1
Moderado (visualización de congestión de los vasos de la mitad de la conjuntiva ocular)	2
Grave (enrojecimiento difuso de toda la conjuntiva)	3
Severo (enrojecimiento y edema de toda la conjuntiva)	4
B. Córnea	**Puntaje**
Sin opacidad ni queratitis	0
Opacidad o queratitis difusa, detalles del iris claramente visibles	1
Áreas translúcidas fácilmente discernibles, detalles del iris ligeramente oscurecidos	2
Áreas opalescentes, no hay detalles visibles del iris, tamaño de la pupila apenas discernible	3
Córnea opaca, iris no discernible	4
C. Cámara Anterior (Flare/Tyndall)	**Puntaje**
Nulo	0
Leve (fina opacidad del humor acuoso)	1
Moderado (hay opacidad, pero se identifica claramente el iris y el cristalino)	2
Grave (poco visible el iris y el cristalino)	3
Severo (coagulación del humor acuoso, no visible el iris y cristalino por presencia de fibrina	4
D. Opacidad del cristalino	**Puntaje**
Nulo	0
Leve (zonas opalescentes, sin dificultad para observar el segmento posterior)	1
Moderado (zonas opalescentes mayores, pero sin dificultad para ver el segmento posterior)	2
Grave (opacidad que impide observar detalles del segmento posterior)	3
Severo (no se observa en absoluto el segmento posterior)	4
E. Tamaño de la Pupila post tropicamida	**Puntaje**
8 mm o mayor	0
4 a 7 mm	1
3 mm o menor	2
Resultado final: A + B + C + D + E	

3.8.7 – Análisis Farmacocinético

Para abordar este punto, se consideró en primer lugar, la bibliografía disponible acerca de los perfiles de concentración intraoculares conocidos de ambos APIs. Sobre DEX, existen reportes en humor vítreo de Ozurdex® (Chang-Lin et al, 2011), y en cámara anterior de gotas oftálmicas (Sigurdsson et al, 2007). En el caso de MOX HCl, se conocen datos de administración intracameral en bolo y también mediante la instilación de colirios (Robertson et al, 2005). Asimismo, se han descrito perfiles farmacocinéticos obtenidos a partir de LIOs de acrílico para DEX (Siqueira et al, 2006) y MOX HCl (Filipe et al, 2019).

Sin embargo, dada la novedad de la formulación desarrollada en este trabajo, se anticipó que las curvas determinadas podían diferir de las previamente publicadas, debido a la vía de colocación, la matriz polimérica y la liberación prolongada desde el implante. Con el fin de confirmarlo, se estudió la farmacocinética intraocular de ambos APIs a partir de las concentraciones calculadas en muestras de humor acuoso obtenidas de ojos afáquicos y sin intervención quirúrgica. Se utilizó para ello el software Monolix® (Lixoft, Francia), que permite ajustar perfiles individuales/poblacionales mediante análisis compartimental.

Su funcionamiento se basa en la metodología de efectos mixtos no lineales (NLME). Este enfoque contempla la inclusión de covariables y la cuantificación estadística de la variabilidad interindividual (Drikvandi, 2017). Para ello, considera la presencia de efectos aleatorios con posible influencia en la predicción de las métricas del modelo. Algunos de los parámetros que pueden obtenerse por NLME son la constante de absorción (k_a), el clearance (CL), el volumen de distribución (V_D) y el flujo intercompartimental (Q). Es decir, se enfoca en determinar variables estructurales del modelo de efectos fijos.

Adicionalmente, una vez obtenidos los parámetros poblacionales, el empleo del software Simulx® permite hallar el perfil farmacocinético más probable mediante simulaciones de Monte Carlo. Estos datos luego pueden utilizarse para determinar métricas de exposición por análisis no compartimental. En ese sentido, los perfiles simulados se cargan en el software PK Analix®, que es capaz de estimar parámetros gráficos funcionales de forma semi empírica sin asumir modelos predefinidos (Gabrielsson & Weiner, 2012). Algunos valores que se pueden determinar mediante dicho enfoque son, constante de eliminación, área bajo la curva, concentración máxima ($c_{máx}$) y el tiempo al que esta ocurre ($t_{máx}$).

4 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 – Validación Analítica *In Vitro*

4.1.1 – Verificación de la Limpieza de los Recipientes

Tabla 11. Análisis por HPLC de los enjuagues de lavado

Número de ciclos con cada solvente	Señal DEX	Señal MOX HCl
0	Saturación	Saturación
1	0.02	0.02
2	< LOD	2.80×10^{-3}
3	< LOD	< LOD

El estudio se planteó con carácter exploratorio, con el objetivo de determinar el número de ciclos de lavado necesario para que dejara de detectarse señal cromatográfica atribuible a los APIs. Una vez concluido el tercer ciclo, la respuesta correspondiente a ambos compuestos fue inferior al LOD, pese a sus diferentes polaridades. Dado el carácter exploratorio del ensayo y la ausencia de réplicas independientes del procedimiento completo de limpieza, no se realizó una estimación estadística de su variabilidad.

4.1.2 – Diferencias Generadas por el Proceso de Filtración

Tabla 12. Efecto de las membranas de PVDF para ambos APIs

Fármaco	Nivel bajo (%)	Nivel medio (%)	Nivel alto (%)
DEX (GI)	$0.82 \pm 6.51 \times 10^{-3}$ [a] Δ% ≤ 5 % (p = 0.03)	$0.21 \pm 6.93 \times 10^{-4}$ [b] Δ% ≤ 5 % (p = 0.03)	$0.19 \pm 6.51 \times 10^{-4}$ [b] Δ% ≤ 5 % (p = 0.03)
MOX HCl (GI)	2.90 ± 0.02 [a] Δ% ≤ 5 % (p = 0.03)	0.89 ± 0.01 [b] Δ% ≤ 5 % (p = 0.03)	$0.97 \pm 3.88 \times 10^{-3}$ [b] Δ% ≤ 5 % (p = 0.03)
DEX (GII)	$1.04 \pm 5.01 \times 10^{-3}$ [a] Δ% ≤ 5 % (p = 0.03)	$1.05 \pm 5.46 \times 10^{-3}$ [a] Δ% ≤ 5 % (p = 0.03)	$1.35 \pm 6.99 \times 10^{-3}$ [a] Δ% ≤ 5 % (p = 0.03)
MOX HCl (GII)	1.09 ± 0.01 [a] Δ% ≤ 5 % (p = 0.03)	$0.92 \pm 4.19 \times 10^{-3}$ [a] Δ% ≤ 5 % (p = 0.03)	1.26 ± 0.01 [a] Δ% ≤ 5 % (p = 0.03)
Influencia del cambio de concentración (GI): DEX → p = 0.03 MOX HCl → $p = 9.19 \times 10^{-3}$			
Influencia del cambio de concentración (GII): DEX → p = 0.18 MOX HCl → p = 0.15			

Los resultados obtenidos indican que la pérdida porcentual de API asociada a la filtración se mantuvo en todos los casos por debajo del límite de aceptación de 5 % ($p = 0.03$). Esto permite concluir que las membranas de PVDF no introducen un sesgo analítico relevante en la cuantificación. Por otro lado, el cambio de concentración afecta significativamente la retención observada en GI ($p = 0.03$ y $p = 9.19 \times 10^{-3}$ para DEX y MOX HCl). No obstante, GII no presentó cambios importantes ($p = 0.18$ DEX y $p = 0.15$ MOX HCl).

Este comportamiento puede explicarse por la masa total de API enfrentada a la membrana de filtración, ya que, a concentraciones más altas, una pérdida absoluta representa una fracción más pequeña respecto al contenido de la muestra. En ese sentido, la disminución del porcentaje no implica necesariamente una retención menor en el filtro, sino un efecto de dilución del error relativo asociado al aumento de la cantidad inicial del analito.

4.1.3 – Estimación del CO

Tabla 13. Evaluación del efecto de arrastre entre inyecciones

Fármaco	Nivel bajo (%)	Nivel medio (%)	Nivel alto (%)
DEX (GI)	1.09 ± 0.59 [a] CO ≤ 5 % ($p = 0.03$)	0.62 ± 0.26 [a] CO ≤ 5 % ($p = 0.03$)	0.27 ± 0.08 [b] CO ≤ 5 % ($p = 0.03$)
MOX HCl (GI)	0.68 ± 0.16 [a] CO ≤ 5 % ($p = 0.03$)	0.45 ± 0.08 [a] CO ≤ 5 % ($p = 0.03$)	0.23 ± 0.02 [b] CO ≤ 5 % ($p = 0.03$)
DEX (GII)	0.12 ± 0.03 [a] CO ≤ 5 % ($p = 0.03$)	0.03 ± 0.02 [b] CO ≤ 5 % ($p = 0.03$)	$0.01 \pm 1.71 \times 10^{-3}$ [b] CO ≤ 5 % ($p = 0.03$)
MOX HCl (GII)	$0.02 \pm 5.27 \times 10^{-3}$ [a] CO ≤ 5 % ($p = 0.03$)	$0.01 \pm 1.83 \times 10^{-3}$ [b] CO ≤ 5 % ($p = 0.03$)	$0.01 \pm 2.55 \times 10^{-3}$ [b] CO ≤ 5 % ($p = 0.03$)
Influencia del cambio de concentración GI: DEX → $p = 0.03$ MOX HCl → $p = 3.03 \times 10^{-3}$ Influencia del cambio de concentración GII: DEX → $p = 5.25 \times 10^{-3}$ MOX HCl → $p = 8.65 \times 10^{-3}$			

Según los resultados, todas las medias para CO se mantuvieron estadísticamente por debajo del valor de aceptación de 5 % ($p = 0.03$). A su vez, el cambio de concentración tiende a disminuir CO tanto en GI ($p = 0.03$ DEX y $p = 3.03 \times 10^{-3}$ MOX HCl) como en GII ($p = 5.25 \times 10^{-3}$ y $p = 8.65 \times 10^{-3}$ MOX HCl) en términos porcentuales. Se concluyó entonces que el sistema cromatográfico no introdujo un arrastre de analito relevante.

4.1.4 – <u>Evaluación de la Degradación</u>

Tabla 14. Resultados tras aplicar condiciones de stress a ambos APIs

Tratamiento	D DEX (%)	D MOX HCl (%)	R DEX	R MOX HCl
Ácido	5.95 ± 0.02	2.34 ± 0.01	13.79 ± 0.12	1.43 ± 0.02
Básico	11.73 ± 0.14	1.72 ± 0.01	1.95 ± 0.01	1.74 ± 0.03
Hidrolítico	3.65 ± 0.23	3.78 ± 0.05	23.93 ± 0.07	23.93 ± 0.07
Lumínico	4.42 ± 0.04	4.01 ± 0.04	18.95 ± 0.09	1.37 ± 0.01
Oxidante	$0.39 \pm 1.55 \times 10^{-3}$	2.05 ± 0.01	18.69 ± 0.06	1.37 ± 0.01
Térmico	$0.49 \pm 3.77 \times 10^{-3}$	$1.28 \pm 1.43 \times 10^{-3}$	20.45 ± 0.10	1.70 ± 0.04

El tratamiento ácido tuvo un efecto significativo únicamente sobre DEX, observándose una degradación en el rango objetivo de 5 – 20 % ($5 \leq D \leq 20\ \% \rightarrow p = 0.03$). Por otro lado, la exposición de DEX a un medio básico también produjo el mismo resultado en el intervalo definido como óptimo ($5 \leq D \leq 20\ \% \rightarrow p = 0.03$). El cambio porcentual para ambos fármacos asociado a tratamientos en condiciones de alta temperatura, fotodescomposición, hidrólisis y oxidación se ubicó por debajo de 5 %. Asimismo, es importante destacar que, con excepción de la exposición al agua y la luz, el resto de los experimentos generaron algún PD. A continuación, se listan los compuestos producidos.

Tabla 15. PDs obtenidos por degradación forzada

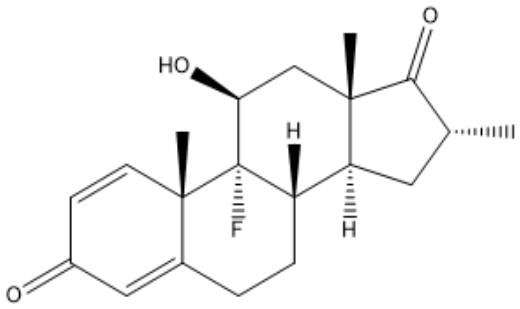
Compuesto	t_{ret} (min)	R	Procedencia	Pico del espectro (nm)
PDA1	3.53 ± 0.01	8.20 ± 0.09	DEX	257
PDB1	6.35 ± 0.03	20.97 ± 0.09	DEX	242
PDB2	8.18 ± 0.04	3.70 ± 0.02	DEX	242
PDB3	8.92 ± 0.01	2.00 ± 0.03	DEX	242
PDO1	$7.82 \pm 3.09 \times 10^{-3}$	3.51 ± 0.01	DEX	241
PDT1	$2.70 \pm 2.39 \times 10^{-3}$	2.70 ± 0.04	MOX HCl	294

Durante los análisis de UC, en varios cromatogramas se constató la aparición de un pico posterior a DEX. El analito detectado presentaba un espectro UV-visible y un t_{ret} similares a lo observado en PDO1. Debido a la aparición de este pico en distintas muestras, se decidió avanzar en su elucidación estructural. Esta decisión se fundamentó no solo en la necesidad de comprender el comportamiento químico de DEX durante la extrusión, sino también en que, ante una eventual presentación del desarrollo a registro, la identificación y caracterización de impurezas constituye un requisito de las autoridades regulatorias.

Con el fin de determinar la identidad del compuesto, se solicitó un estudio de elucidación estructural al Laboratorio de Instrumentos Analíticos de la Facultad de Química. La determinación realizada con un espectrómetro de masas LC-MS 8040 (Shimadzu, Japón), confirmó que se trataba efectivamente de PDO1, y que es en realidad el PR "E" de DEX (17-oxodexametasona) reportado en Farmacopea. En ese sentido, los resultados sugieren que el proceso de extrusión podría favorecer un efecto oxidante sobre DEX.

Tal hallazgo resulta consistente con las condiciones de procesamiento empleadas durante la fabricación de los insertos, ya que la combinación de temperatura elevada, esfuerzo mecánico, presión y exposición al oxígeno podrían promover procesos de degradación oxidativa del API. La formación del PR mencionado indicaría que, aunque no demasiado significativa, DEX presenta cierta susceptibilidad química. Este comportamiento parece producirse particularmente mientras el material permanece sometido a calentamiento y cizallamiento a lo largo de todo el sistema de extrusión. Asimismo, la detección reiterada del compuesto en diferentes muestras sugiere que no se trataría de una interferencia analítica aislada, sino de un fenómeno asociado al propio proceso tecnológico.

La identificación de este PR durante la etapa de desarrollo adquiere relevancia desde el punto de vista de la estabilidad y calidad del sistema, debido a que la generación de PDs podría afectar tanto el perfil de liberación como la seguridad del producto final. En ese contexto, sería pertinente en futuros estudios refinar el control del proceso de extrusión, con el fin de evaluar el impacto de la temperatura y la velocidad de giro de los tornillos (ambas afectando la presión de salida y el tiempo de residencia), sobre la formación de PDO1. Asimismo, se podrían considerar estrategias de mitigación, incluyendo la incorporación de un antioxidante como excipiente de la formulación.



17-oxodexametasona
Peso molecular = 332,41 Da

Figura 15. Estructura química de PDO1

4.1.5 – Indicadores Fundamentales de Calidad del Método Cromatográfico

Tabla 16. Resumen de los parámetros obtenidos en el punto medio (GI-GII)

Compuesto	Ajuste	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	Exactitud (%)	Precisión (%)
DEX (I)	0.9991	$0.09 \pm 3.70 \times 10^{-3}$	0.29 ± 0.01	99.44 ± 0.69	RSD = 0.45
DEX (II)	0.9999	$0.08 \pm 3.43 \times 10^{-3}$	0.27 ± 0.01	100.43 ± 0.87	RSD = 0.64
MOX HCl (I)	0.9990	$0.05 \pm 8.77 \times 10^{-3}$	0.15 ± 0.03	99.75 ± 0.69	RSD = 0.32
MOX HCl (II)	0.9999	$0.07 \pm 2.69 \times 10^{-3}$	0.23 ± 0.01	101.40 ± 0.88	RSD = 1.01
Tanto DEX como MOX HCl cumplieron el requisito de robustez > 95 % para ambos grupos					

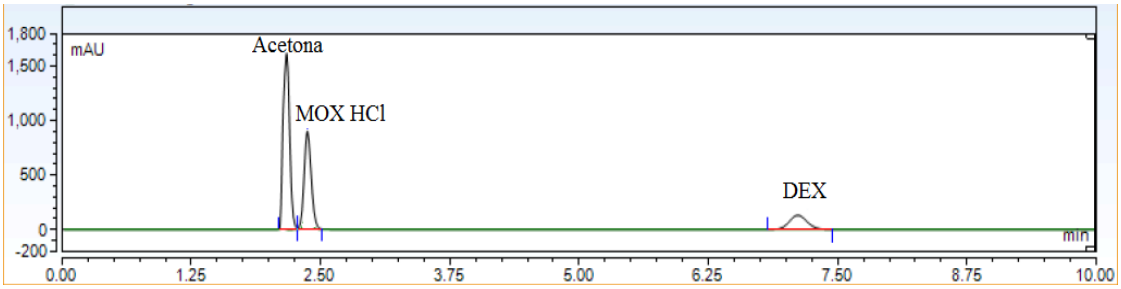


Figura 16. Cromatograma optimizado (GII, nivel medio)

Los resultados indican que el método analítico permitió una adecuada cuantificación de DEX y MOX HCl en ambos grupos evaluados. El ajuste fue cercano a la unidad, mientras que LOD y LOQ se ubicaron en niveles razonables respecto a las concentraciones analizadas. Asimismo, la exactitud se mantuvo próxima al 100 % para ambos APIs al igual que la precisión, como denotan los bajos valores de RSD obtenidos.

4.2 – Preparación Previa a la Extrusión

4.2.1 – DTP antes y después de la Molienda

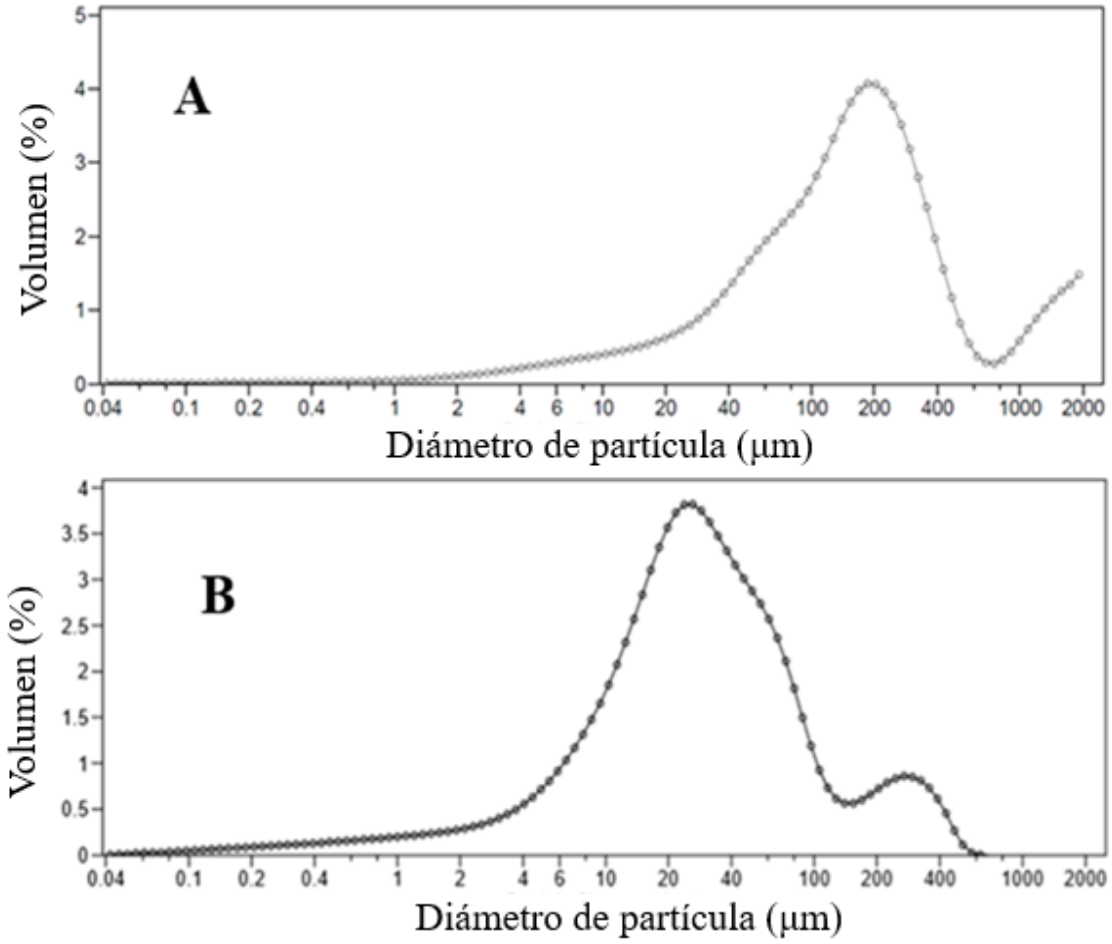


Figura 17. DTP para RG502H (A) y MOX HCl (B) evaluada por difracción láser

Como puede observarse en los gráficos, el polímero presentó una DTP heterogénea, con poblaciones que incluso superaron el límite superior del rango de medición del equipo utilizado. En ese sentido, la DTP promedio en volumen para RG502H fue ≈ 282 μm. Si bien era de esperar que la molienda de este material permitiese mejorar la homogeneidad de la DTP, se decidió no realizar el procedimiento por dos razones fundamentales.

El primer motivo fue de carácter económico. El mecanismo de molienda utilizado presenta el inconveniente logístico de que las pérdidas de masa total tras el procedimiento son muy significativas. Dicho de otra manera, gran parte del material queda adherido en las paredes del recipiente y es muy difícil de recuperar. En ese sentido, dado que el PLGA es un componente de elevado costo, desperdiciar una cantidad importante no es viable.

El segundo motivo fue que la reducción de la DTP del polímero posiblemente aceleraría la liberación de los APIs, pudiendo poner en riesgo el diseño de la formulación respecto al perfil prolongado esperado. Por otro lado, la molienda tampoco se llevó a cabo para MOX HCl, cuya DTP promedio en volumen fue de ≈ 10 µm. La razón fue su elevada solubilidad inherente en agua, la cual, sumada a un incremento en el área superficial expuesta al solvente probablemente aumentaría demasiado la tasa de liberación.

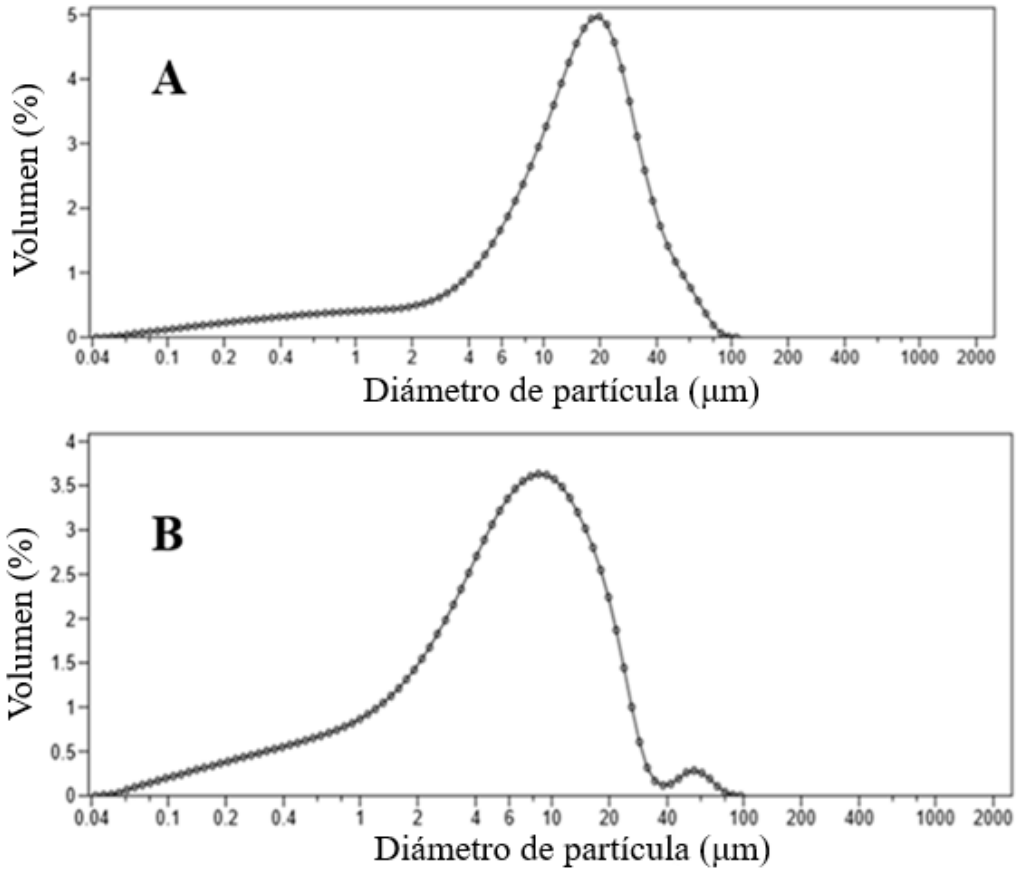


Figura 18. DTP para DEX por difracción láser antes de (A) y tras la molienda (B)

En el caso de DEX se aplicó un proceso de reducción de tamaño para disminuir DTP a niveles más adecuados. Esta decisión se tomó en base experimentos de prueba, en los cuales se comprobó que, de no realizarse, la liberación transcurría muy lentamente. En ese sentido, se intentó seguir las recomendaciones de la patente de Ozurdex® en cuanto a DTP. Para ello se implementó un paso de molienda con una duración de tres horas, luego del cual los porcentajes en volumen de partículas pasaron de ≈ 68 % a ≈ 93 % por debajo de 20 µm, y de ≈ 37 % a ≈ 72 % en las menores de 10 µm. Estos valores se consideran adecuados en una formulación implantable intraocular, según la patente de Ozurdex®.

4.2.2 – Tiempo Óptimo de Mezclado

Tabla 17. Evolución de la homogeneidad de la mezcla

Tiempo (min)	DEX (%)	MOX HCl (%)
60	86.81 ± 13.45 [a]	98.81 ± 3.78 [a]
90	98.11 ± 2.87 [a]	98.45 ± 2.97 [a]
120	99.41 ± 2.76 [a]	99.17 ± 2.88 [a]
150	95.11 ± 7.32 [a]	94.14 ± 7.65 [a]
180	90.47 ± 3.42 [a]	89.08 ± 3.88 [a]

El estudio fue realizado sobre cinco muestras representativas de la mezcla. En ese sentido, los resultados corresponden a los promedios obtenidos para ambos APIs en cada set de réplicas. En el caso de DEX no fue posible hallar diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.10$) entre todos los tiempos evaluados. Si se consideran los valores de incertidumbre, se observa que la dispersión de algunos resultados fue en sí bastante elevada. Esto probablemente explique la falta de significancia estadística observada en el ANOVA, y a su vez sugiere que el mezclado a ciertos tiempos fue menos eficiente.

Cabe recordar que DEX es el componente minoritario de la formulación (10 % m/m). En consecuencia, para que su mezclado sea eficiente, se requiere un tiempo sustancial. No obstante, puede observarse que el resultado más coherente en cuanto a homogeneidad e incertidumbre se obtuvo a 90 o 120 minutos. Más allá de este umbral, continuar con el mezclado fue contraproducente, dado que la dispersión se incrementó.

Para MOX HCl, ocurrió algo similar a lo observado en el caso de DEX, no constatándose diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.06$) entre los tiempos evaluados. Sin embargo, las incertidumbres fueron más acotadas. Este comportamiento posiblemente se deba a que MOX HCl es el componente mayoritario en masa con un 50 % de la mezcla, comparable con el PLGA que completa el 40 % restante. En base a todo lo anterior, se tomó 120 minutos como el tiempo óptimo de mezclado, dado que sus valores de homogeneidad fueron los más cercanos a 100 %, y sus incertidumbres las más acotadas.

4.3 – Diseño Experimental

4.3.1 – DOE con DEX

Tabla 18. Perfil de liberación y contenido de corticosteroide en los implantes

Lote	UC (%)	L Día 1 (%)	L Día 2 (%)	L Día 3 (%)	L Día 7 (%)	L Día 10 (%)
1	96.45 ± 1.14	1.83 ± 0.24	2.40 ± 0.50	3.62 ± 0.86	14.22 ± 1.25	29.41 ± 3.10
2	94.74 ± 1.07	3.04 ± 0.91	4.28 ± 0.86	5.91 ± 0.91	19.95 ± 1.47	30.39 ± 2.13
3	97.64 ± 0.96	0.88 ± 0.18	1.88 ± 0.35	3.45 ± 0.36	15.54 ± 1.21	29.78 ± 2.07
4	96.13 ± 1.77	1.81 ± 0.16	2.95 ± 0.38	4.96 ± 0.47	15.38 ± 1.72	25.19 ± 2.64
5	93.27 ± 1.38	2.34 ± 0.40	3.66 ± 0.34	5.08 ± 0.51	15.59 ± 0.68	27.65 ± 2.38
6	94.85 ± 0.92	1.01 ± 0.11	1.86 ± 0.33	3.72 ± 0.40	13.23 ± 0.64	23.22 ± 3.71
7	97.25 ± 0.96	1.06 ± 0.19	2.27 ± 0.78	3.49 ± 0.91	13.92 ± 1.68	23.74 ± 3.53
8	94.91 ± 1.13	1.77 ± 0.32	2.85 ± 0.56	4.69 ± 1.26	16.91 ± 2.64	28.68 ± 4.20
9	98.01 ± 1.24	1.44 ± 0.27	3.09 ± 0.53	4.70 ± 0.96	18.01 ± 3.01	27.19 ± 5.22
10	99.08 ± 1.06	1.05 ± 0.09	2.31 ± 0.46	4.20 ± 0.77	14.93 ± 1.95	27.59 ± 3.35
General	96.23 ± 1.11	1.47 ± 0.33	2.75 ± 0.48	4.38 ± 0.51	15.77 ± 1.26	27.28 ± 1.55
Liberación (µg)	-	3.11 ± 0.78	5.29 ± 0.88	8.43 ± 0.94	30.37 ± 2.33	52.55 ± 2.91
Densidad = 1.22 ± 0.04 g/mL **Uniformidad de masa** = 97.44 ± 0.13 %						

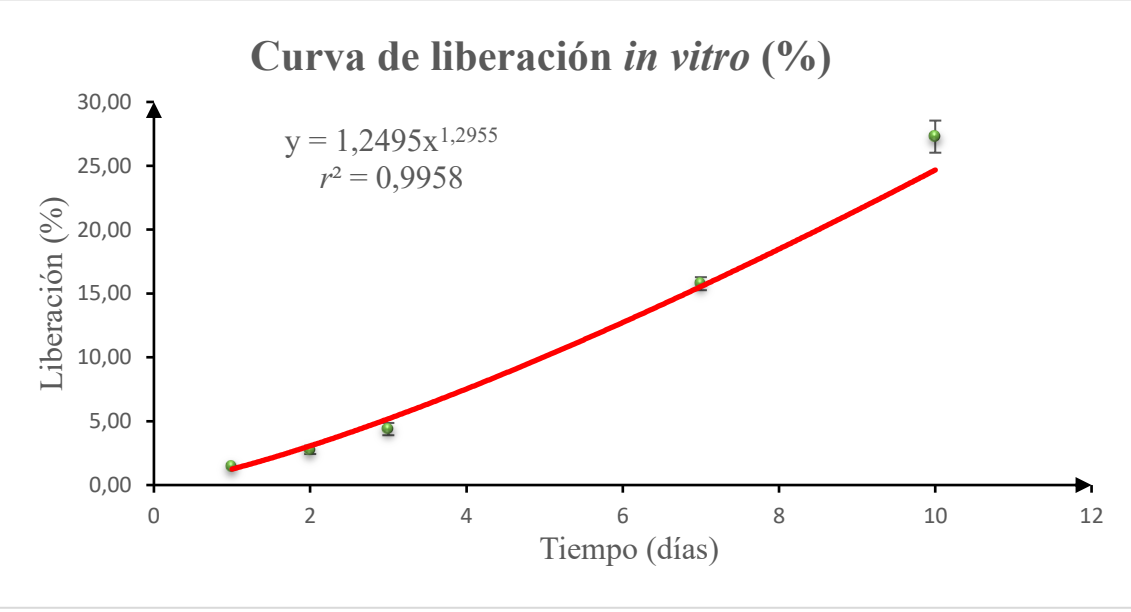


Figura 19. Curva de liberación *in vitro* genérica para DEX

Según los resultados, la formulación fue capaz de proporcionar en promedio ≈ 53 µg de API en 10 días (≈ 27 % del total), lo cual es una cantidad acumulada comparable en magnitud a la reportada originalmente para Surodex®. Por otro lado, el gradual aumento en la velocidad de liberación podría explicarse por la dependencia de DEX respecto a la degradación del PLGA, pero además por la cantidad de MOX HCl presente en el inserto.

A medida que el antibiótico se disuelve, más partículas de DEX se exponen al medio, lo cual favorece su solubilización. Tal es así que la cinética de DEX se ajusta a un modelo de Korsmeyer-Peppas (Bruschi, 2015), super caso II según su exponente n > 1 (asociado a cambios estructurales del inserto). A su vez, como se indica en el siguiente gráfico, existe una correlación entre las masas liberadas por ambos APIs que reproduce prácticamente el mismo perfil observado para la liberación de DEX. Esto apoya la hipótesis de que la disolución del antibiótico modifica la accesibilidad de DEX al medio.

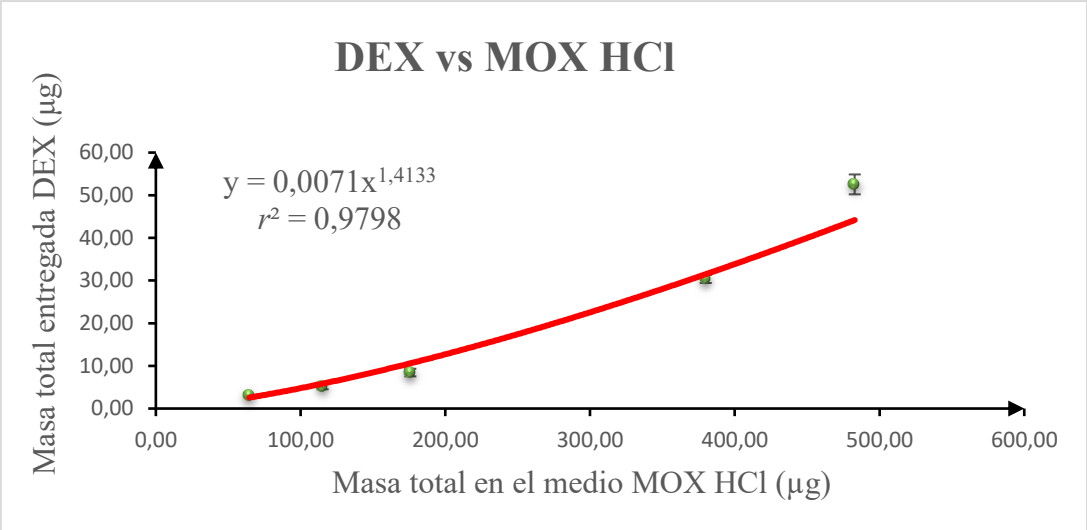


Figura 20. Correlación observada en la liberación de ambos APIs

En cuanto al DOE aplicado, no se obtuvieron modelos estadísticamente significativos que permitiesen describir el comportamiento del inserto. Este resultado podría indicar la ausencia de una correlación relevante entre factores y variables de salida. No obstante, tal posibilidad resulta poco probable, ya que la temperatura y la velocidad de giro de los tornillos deberían afectar la presión en la tobera. Esta a su vez incide en la compactación de los insertos y sobre el perfil de liberación de ambos APIs. Una explicación más plausible podría remitirse a la elevada variabilidad inherente a la logística del proceso de extrusión, siendo algunas de sus causas las que se describen a continuación.

En este contexto, una de las limitaciones del trabajo fue el alto costo del PLGA, lo cual obligó a trabajar sistemáticamente con la mínima alimentación compatible con el normal funcionamiento del equipo, imposibilitando alcanzar un régimen estacionario. A su vez, la recolección de la fibra a velocidad no constante introdujo variabilidad en el diámetro de los insertos, mientras que el fraccionamiento manual generó dispersión en su longitud.

En consecuencia, se puede inferir que el comportamiento de los implantes en el espacio de trabajo explorado no presentó diferencias apreciables entre lotes. Incluso al considerar la presencia de PDO1, no se observaron anomalías atribuibles a la extrusión. De hecho, es posible que la variabilidad intrínseca del proceso fuese la causa por la cual no se logró establecer un umbral operativo claro para minimizar la aparición de este PD. Fue así que en base a todo lo anterior, se decidió seleccionar como condiciones genéricas de trabajo, una temperatura de extrusión de 150 °C y una velocidad de giro de 280 rpm.

4.3.2 – DOE con MOX HCl

Tabla 19. Perfil de liberación y contenido de antibiótico en los implantes

Lote	UC (%)	L Día 1 (%)	L Día 2 (%)	L Día 3 (%)	L Día 7 (%)	L Día 10 (%)
1	102.76 ± 1.13	10.97 ± 2.64	12.36 ± 1.54	17.65 ± 2.61	35.09 ± 1.43	48.57 ± 1.82
2	103.70 ± 1.15	7.49 ± 1.54	14.47 ± 2.63	18.87 ± 2.61	39.86 ± 1.70	49.33 ± 2.57
3	102.05 ± 0.99	3.68 ± 0.39	7.01 ± 1.21	11.14 ± 0.73	36.98 ± 1.82	47.66 ± 3.66
4	102.27 ± 1.18	6.54 ± 0.28	13.38 ± 1.49	20.39 ± 1.24	35.79 ± 1.86	39.78 ± 2.60
5	105.12 ± 1.60	10.18 ± 2.98	15.96 ± 2.26	18.32 ± 1.58	36.18 ± 1.67	44.56 ± 1.92
6	101.99 ± 1.02	4.26 ± 0.44	9.43 ± 1.62	18.62 ± 1.56	38.23 ± 1.95	50.76 ± 3.28
7	102.32 ± 0.99	4.58 ± 0.75	9.11 ± 3.83	15.24 ± 3.91	39.98 ± 2.45	52.28 ± 4.22
8	101.39 ± 1.06	6.10 ± 0.91	10.23 ± 2.26	17.38 ± 3.86	34.31 ± 1.86	44.03 ± 2.82
9	101.84 ± 1.26	5.01 ± 0.81	11.49 ± 2.42	18.73 ± 3.44	39.54 ± 2.47	50.48 ± 4.50
10	102.15 ± 1.05	4.07 ± 0.36	8.50 ± 1.51	14.77 ± 1.95	33.97 ± 1.77	42.94 ± 2.66
Promedio	102.27 ± 0.40	6.29 ± 1.59	11.19 ± 1.76	17.11 ± 1.67	36.99 ± 1.42	47.04 ± 2.50
Masa (µg)	-	64.60 ± 16.41	115.09 ± 18.87	182.38 ± 12.42	379.76 ± 14.86	482.67 ± 23.97
Densidad = 1.22 ± 0.04 g/mL **Uniformidad de masa** = 97.44 ± 0.13 %						

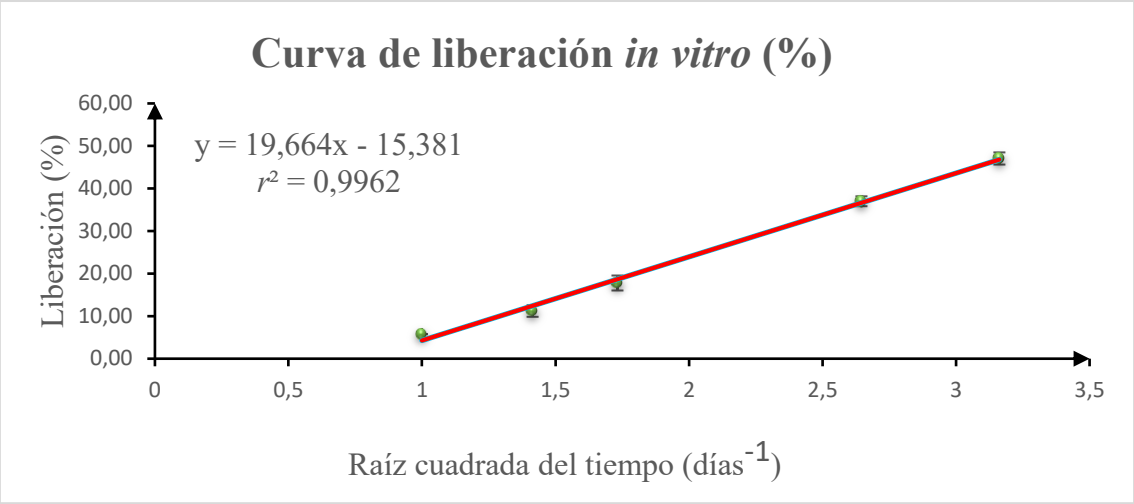


Figura 21. Curva de liberación *in vitro* genérica para MOX HCl

Pese a cumplirse las condiciones sink, la cantidad de antibiótico en el medio alcanzó una meseta con el tiempo. Tal fenómeno usualmente se debe a una disminución del gradiente de concentración o a un agotamiento progresivo de la cantidad de API en la matriz. Este segundo caso parece más razonable, en vista de que el gráfico del porcentaje de liberación de MOX HCl se ajusta a una cinética de Higuchi. Es decir, la masa presente en el medio depende linealmente de la raíz cuadrada del tiempo: $m_A = k_H \sqrt{t}$. Este comportamiento aparece cuando el mecanismo de liberación principal es la difusión (ley de Fick). En ese sentido, el flujo del API hacia el medio decrece con el tiempo porque va quedando menos en la matriz del reservorio, lo cual resulta en una reducción en la masa observada.

En promedio la cantidad de API liberada el primer día fue de ≈ 65 µg/d (≈ 6.50 %). A su vez, el total al final del estudio fue ≈ 483 µg (≈ 47 %). Por lo tanto, al igual que para DEX, puede considerarse que se llegó a un perfil de liberación prolongada. La diferencia observada probablemente se deba a la diferente solubilidad en agua de ambos APIs, y a que la cantidad de DEX en solución depende de la masa de MOX HCl en el implante.

Con el resultado de liberación inicial de MOX HCl *in vitro*, es posible estimar que la velocidad obtenida de ≈ 65 µg/día permitiría (siempre como cálculo teórico simplificado) alcanzar en 24 horas concentraciones cercanas a los 16 µg/mL originalmente propuestos con el fin de contemplar el MIC_{90} reportado en ≈ 95 % de los casos de endoftalmitis. Así, los insertos en principio tendrían un potencial adecuado para prevenir y/o controlar infecciones provocadas por la mayoría de las bacterias asociadas a la patología.

En cuanto al DOE, tampoco fue posible obtener un modelo estadísticamente significativo que describiese matemáticamente el comportamiento del sistema, posiblemente debido a los problemas logísticos inherentes a la fabricación de los implantes. No obstante, es importante destacar que, incluso considerando todas las limitaciones mencionadas, las condiciones de trabajo de esta tesis permitieron preparar insertos viables (control de calidad adecuado) y funcionales sin mayores inconvenientes farmacotécnicos.

4.3.3 – Perfiles *In Vitro* luego de la Irradiación

Tabla 20. Liberación de DEX en lotes esterilizados

Parámetro	Sin irradiar	15 kGy	20 kGy	25 kGy	30 kGy
UC (%)	96.47 ± 1.03	95.94 ± 1.00	96.44 ± 1.52	94.35 ± 0.81	95.75 ± 0.98
ATR (%)	1.28 ± 0.38	1.59 ± 0.08	1.66 ± 0.06	1.60 ± 0.07	1.62 ± 0.06
Liberación 1 (%)	1.29 ± 0.13	1.67 ± 0.10	1.64 ± 0.50	1.81 ± 0.32	1.87 ± 0.37
Liberación 2 (%)	2.08 ± 0.28	3.89 ± 0.68	3.16 ± 0.98	3.84 ± 0.83	5.09 ± 1.22
Liberación 3 (%)	4.76 ± 0.75	5.36 ± 0.57	4.13 ± 1.03	5.92 ± 0.77	7.34 ± 1.53
Liberación 7 (%)	18.81 ± 2.03	19.09 ± 3.61	20.38 ± 5.50	22.74 ± 4.47	27.56 ± 3.73
Liberación 10 (%)	32.59 ± 1.98	36.32 ± 4.89	34.70 ± 6.10	37.86 ± 5.70	41.72 ± 3.94

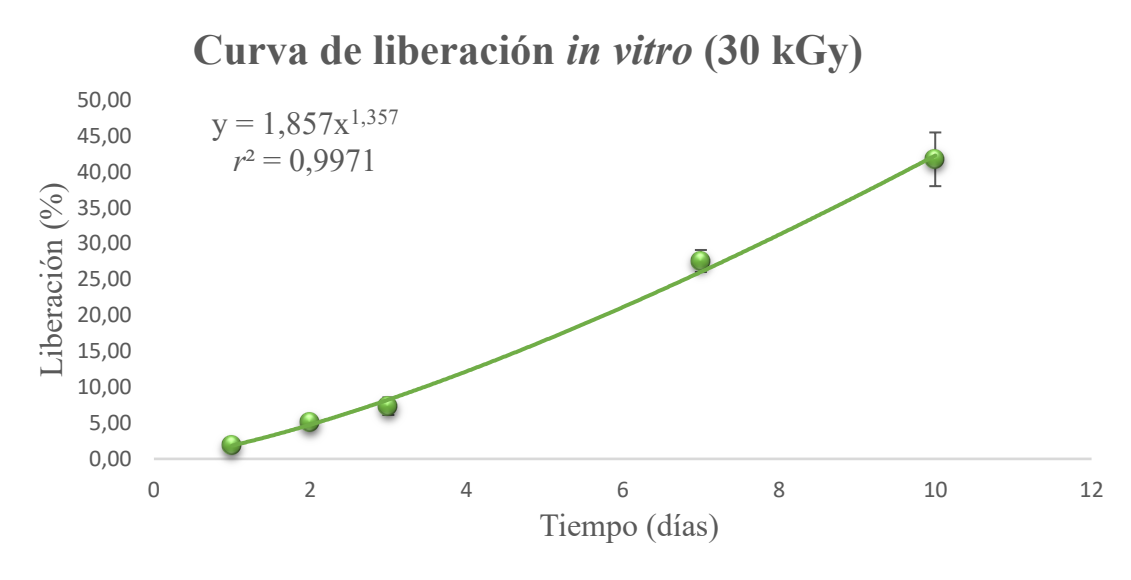


Figura 22. Curva de liberación *in vitro* para DEX con irradiación de 30 kGy

Con el fin de evaluar el efecto de la esterilización, se estudió el comportamiento de los insertos luego de tratamientos a 15, 20, 25 y 30 kGy respectivamente. En ese sentido, UC permaneció inalterada incluso a la dosis más alta de 30 kGy ($p = 0.24$). No obstante, se observó un aumento significativo en la degradación de DEX a partir de dosis de 20 kGy ($p = 4.32 \times 10^{-3}$). Por otro lado, la diferencia absoluta tras la irradiación a 30 kGy fue de ≈ 0.34 %. En términos reales esto equivale a pasar de 1.28 % a 1.62 % ($p = 1.52 \times 10^{-3}$).

El valor obtenido se ajusta sin ningún problema a la tolerancia total de 2 % indicada en la patente de Ozurdex® para posibles PDs o impurezas presentes luego del proceso de extrusión. A su vez, dado que según la bibliografía consultada (Dumasia et al, 1986) PDO1 ha sido reportado como un metabolito de DEX en caballos, posiblemente no presente toxicidad relevante en humanos a las cantidades detectadas en este trabajo.

Por otro lado, se observó que solo la exposición a 30 kGy aumentó para DEX tanto la tasa de liberación inicial ($p = 0.01$) como la final ($p = 0.02$). Estos resultados sugieren una posible degradación de la matriz de PLGA a dosis altas de radiación. Asimismo, la diferencia porcentual al final del estudio de liberación fue bastante elevada (≈ 9 %). Una posible explicación es que la cinética de DEX depende de la cantidad de MOX HCl presente en el implante y del estado de la matriz de PLGA. En ese sentido, la variabilidad de los insertos asociada a las restricciones logísticas mencionadas, podría acrecentar las diferencias hacia el final del estudio, donde aparecen valores acumulados más elevados.

Tabla 21. Liberación de MOX HCl en lotes esterilizados

Parámetro	Sin irradiar	15 kGy	20 kGy	25 kGy	30 kGy
UC (%)	103.11 ± 0.99	104.03 ± 0.97	105.49 ± 2.04	103.32 ± 0.68	104.01 ± 0.74
Liberación 1 (%)	4.78 ± 0.80	7.02 ± 1.28	6.78 ± 2.30	8.72 ± 1.08	8.10 ± 1.54
Liberación 2 (%)	9.13 ± 1.15	15.31 ± 2.92	11.72 ± 3.52	15.93 ± 0.88	15.01 ± 2.24
Liberación 3 (%)	16.72 ± 2.12	19.99 ± 2.57	15.77 ± 3.04	21.89 ± 1.09	21.03 ± 3.06
Liberación 7 (%)	39.68 ± 1.39	37.99 ± 1.54	34.90 ± 4.05	39.80 ± 2.25	40.85 ± 4.05
Liberación 10 (%)	50.45 ± 2.18	48.57 ± 2.36	46.26 ± 5.83	49.95 ± 4.37	52.93 ± 5.54

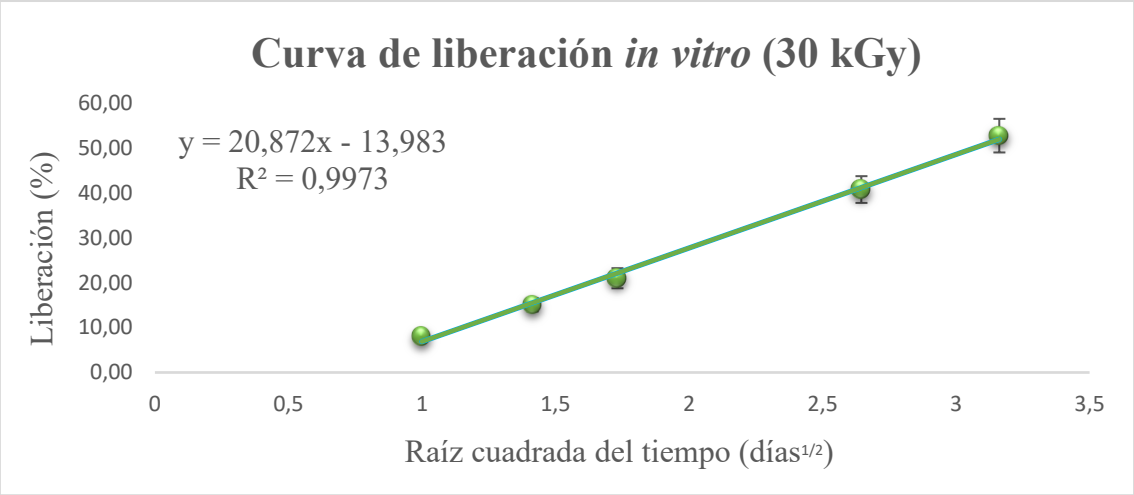


Figura 23. Curva de liberación *in vitro* para MOX HCl con irradiación de 30 kGy

En primer lugar, no hubo cambios en UC tras aplicar la esterilización, permaneciendo inalterada la cantidad de MOX HCl incluso a la dosis de 30 kGy ($p = 0.19$). Por otra parte, la tasa de liberación siguió un comportamiento similar al de DEX. En ese sentido, se observó un incremento estadísticamente significativo para el día 1 ($p = 0.02$), pero no en el día 10 ($p = 0.21$). En términos absolutos, la diferencia en ambos casos fue de ≈ 3 %.

Sin embargo, en el primer día dicho cambio duplicó la tasa de liberación, mientras que, al final del estudio el impacto fue marginal. Tal fenómeno puede explicarse combinando dos mecanismos. En primer lugar, MOX HCl difunde al medio por difusión. Por otro lado, la radiación aplicada podría alterar la estructura de la matriz de PLGA generando poros. Ambos efectos favorecen la liberación inicial del antibiótico. No obstante, con el tiempo los canales formados colapsan, dejando de contribuir a la aceleración de la difusión. En consecuencia, el comportamiento observado permitiría alcanzar concentraciones terapéuticas rápidamente, y luego mantenerlas por liberación gradual.

En relación con la esterilización del sistema, cabe destacar que se desestimó la realización de estudios microbiológicos para validar este punto. La decisión se tomó en base a que la probabilidad de supervivencia a una dosis de radiación gamma de 30 kGy es muy pequeña. Además, la carga microbiana inicial debería ser baja, dada la manipulación en condiciones asépticas y el propio proceso de fabricación de los insertos que aplica calor seco a 150 °C por al menos 30 minutos. A su vez, se contempló el problema de que la presencia del antibiótico interferiría con los ensayos microbiológicos de esterilidad.

4.4 – Análisis Instrumental

4.4.1 – DSC

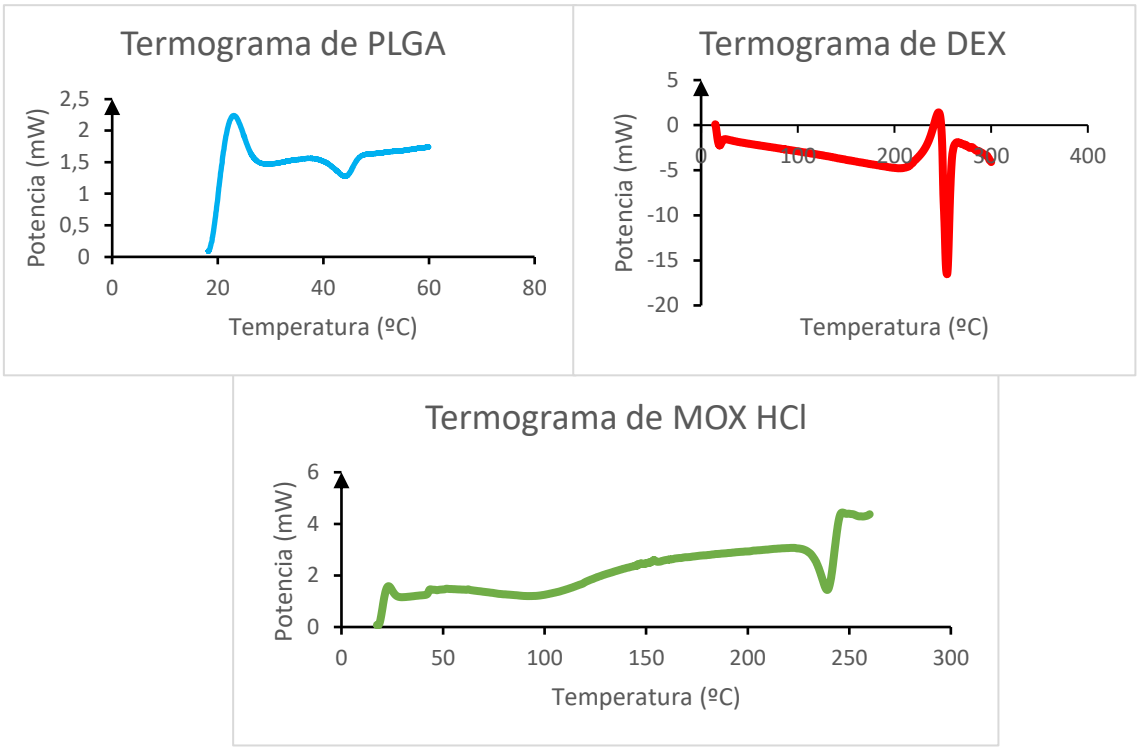


Figura 24. Estudios exploratorios por DSC para insertos y materias primas

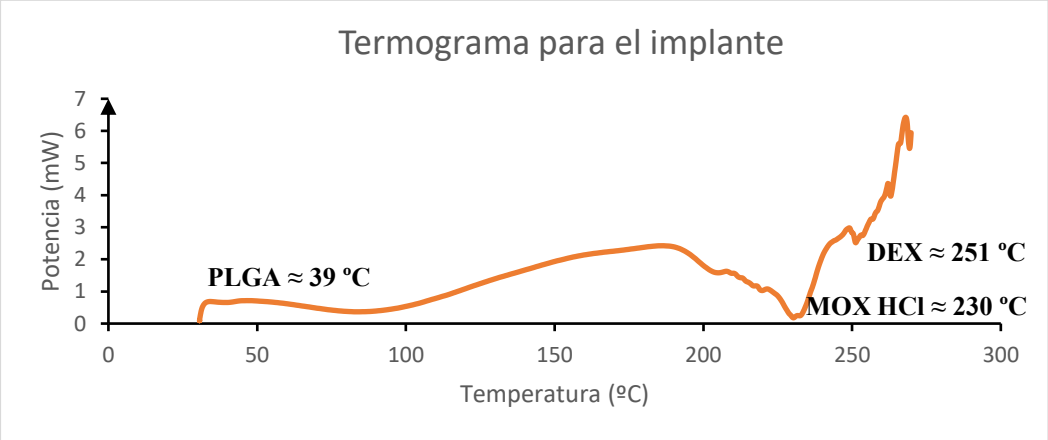


Figura 25. DSC para el implante final irradiado

Al estudiar el PLGA, se observó su transición vítrea en el rango de 42 – 43 ºC. No obstante, este evento térmico se encontró desplazado en el implante hacia una temperatura de ≈ 39 ºC, mostrando una menor amplitud. En el caso de los APIs materia primera, los termogramas mostraron eventos endotérmicos asociados a la fusión y/o al inicio de la degradación de MOX HCl entre 238 y 242 ºC, y de DEX en el rango 262 – 264 ºC.

Ambos se encontraban desplazados hacia temperaturas menores en el implante, también con disminución de amplitud. Una posible explicación radica en cambios en la capacidad calorífica global, atribuibles a las distintas proporciones de los componentes de la masa total de la formulación. Esto es consistente con un comportamiento térmico integrado del sistema y sugiere adecuada dispersión de los APIs y el PLGA en la matriz.

4.4.2 – XRD

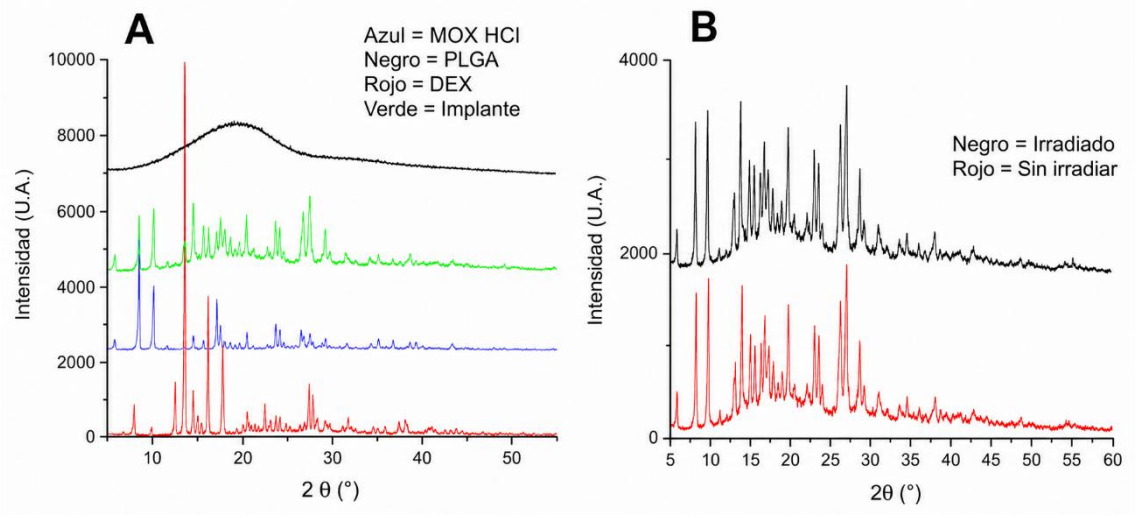


Figura 26. Difractogramas individuales (A) y del inserto tras irradiación (B)

Como se observa en los gráficos presentados, la excelente definición y nitidez de los picos correspondientes a ambos APIs es consistente con su naturaleza cristalina. A su vez, dichas señales aparecen también en el implante. Esto sugiere que el proceso de HME no modificó significativamente la organización atómica original. En consecuencia, dentro de los márgenes detectables por la técnica empleada, no se observan evidencias de fusión con pérdida de la estructura cristalina de los APIs. Tampoco son visibles procesos de recristalización en polimorfos diferentes, ni la aparición de PDs. En contraste, PLGA presenta la típica banda difusa y poco definida presente en materiales amorfos.

Por otro lado, se realizó una comparación entre los difractogramas obtenidos para los implantes antes y después de la irradiación. En ambos casos se observó una diferencia en la línea de base atribuible a contribuciones amorfas del polímero. A pesar de ello, la superposición adecuada de los picos cristalinos de los APIs en ambas condiciones indica que tras la irradiación no se produjeron alteraciones significativas en la organización cristalina de los fármacos, ni transformaciones estructurales detectables en el material.

4.4.3 – SEM

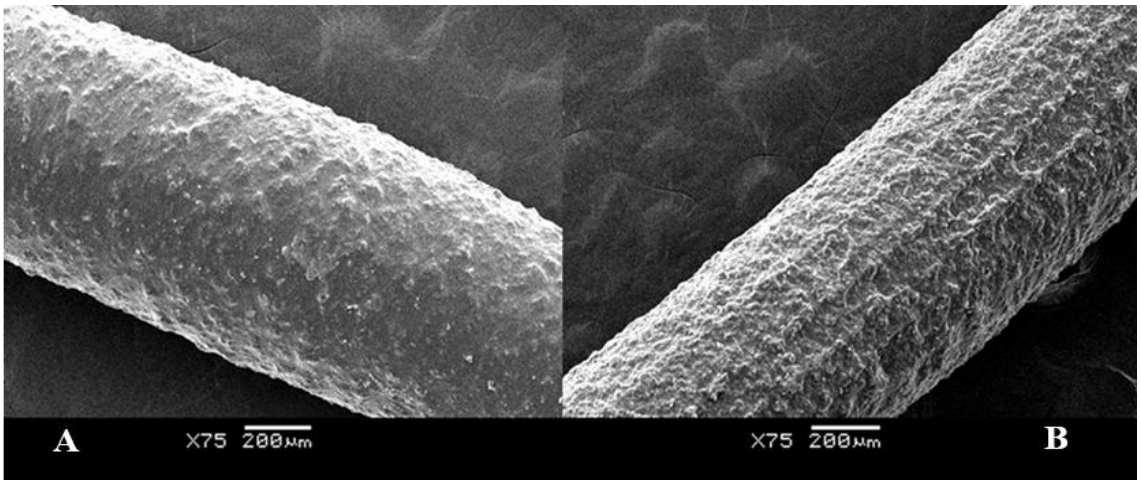


Figura 27. Micrografía SEM del implante sin irradiar (A) y del tratado a 30 kGy(B)

La exploración por SEM permitió observar la morfología superficial de los insertos. A grandes rasgos, se distingue una estructura continua y compacta, sin facetas cristalinas ni dominios puntuales definidos. Esto es consistente con una adecuada coalescencia de los componentes (APIs + PLGA) durante el proceso de extrusión. Por otro lado, las micrografías tomadas en insertos que fueron expuestos a una dosis de radiación gamma de 30 kGy, muestran que la esterilización provocó un aumento apreciable en la rugosidad superficial. Este cambio podría reflejar modificaciones estructurales inducidas por el proceso de esterilización y, eventualmente, extenderse a regiones internas no evaluadas por SEM, contribuyendo a las diferencias observadas en la tasa de liberación.

4.4.4 – CRM

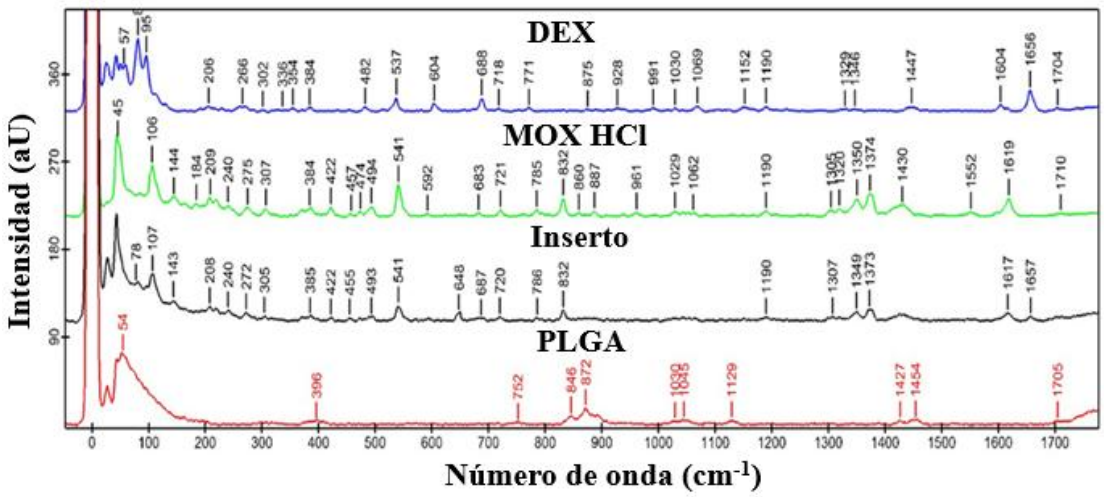


Figura 28. Espectros Raman obtenidos para el implante final y sus materias primas

La imagen muestra que las señales correspondientes a APIs y polímero están también presentes en el implante, con adecuada superposición y sin desplazamiento significativo de sus bandas características. Tal resultado indica que los materiales forman una mezcla física sin evidencias de asociaciones específicas detectables por CRM. La técnica se empleó en este caso para evaluar posibles interacciones intermoleculares capaces de generar desplazamientos de las señales, al comparar los insertos y sus componentes individuales. En ese sentido, se obtuvieron los espectros Raman correspondientes a DEX (azul), MOX HCl (verde), PLGA (rojo) y de la formulación final (en negro).

Además de proveer un análisis espectral, CRM permitió también determinar de forma cualitativa la homogeneidad en los insertos. Dicho parámetro es muy importante, dado que una buena distribución de los APIs es esencial para asegurar una correcta UC. Si la homogeneidad de la mezcla no es adecuada, partes de la formulación podrían contener un exceso o déficit de los APIs, lo cual puede distorsionar el perfil de liberación.

A partir de los datos espectrales individuales (fármacos, polímero e implante), se obtuvo una imagen de la distribución espacial de cada material presente en los insertos. En ese sentido, puede observarse que, a una escala de 20 µm todos los componentes del implante (rojo = PLGA, azul = DEX, verde = MOX HCl) aparecen aleatoriamente dispersos con buena homogeneidad, en concordancia cualitativa con las proporciones de la formulación.

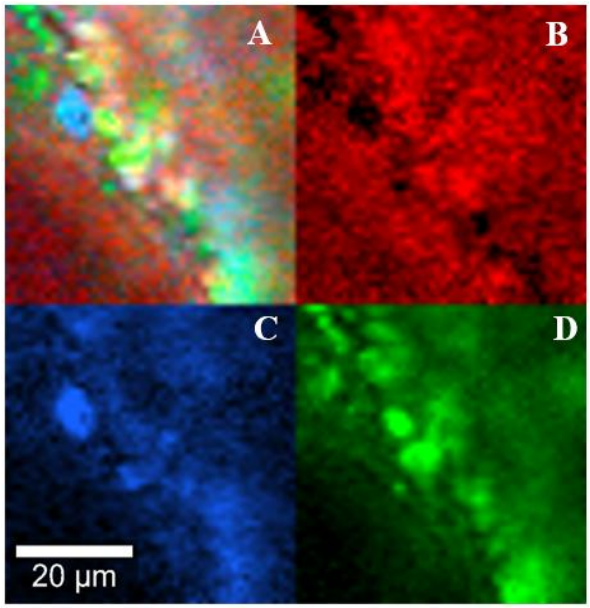


Figura 29. Distribución en el implante (A) de PLGA (B), DEX (C) y MOX HCl (D)

4.5 – Control de Calidad

4.5.1 – Análisis de Rutina

Tabla 22. Certificado de análisis tentativo para la formulación

Estudio	Especificación (sin irradiar)	Resultado (irradiado)
Homogeneidad del polvo (%)	95 – 105	103.17 ± 4.17 (DEX) 96.81 ± 3.71 (MOX HCl)
ATR (%)	≤ 2.00	1.62 ± 0.06 (DEX)
Densidad (g/mL)	1.14 – 1.24	1.16 ± 0.08
Uniformidad de masa (%)	Hasta 2 unidades desviadas	97.50 ± 0.67 (sin desvíos)
UC	AV ≤ 15 para 10 unidades	AV = 7.10 (DEX) AV = 5.61 (MOX HCl)
Liberación *in vitro* Día 1 (%)	1.14 – 1.79 (DEX) 4.70 – 7.87 (MOX HCl)	1.87 ± 0.37 (DEX) 8.10 ± 1.54 (MOX HCl)
Liberación *in vitro* Día 2 (%)	2.27 – 3.24 (DEX) 9.43 – 12.96 (MOX HCl)	5.09 ± 1.22 (DEX) 15.01 ± 2.24 (MOX HCl)
Liberación *in vitro* Día 3 (%)	3.87 – 4.89 (DEX) 15.44 – 18.78 (MOX HCl)	7.34 ± 1.53 (DEX) 21.03 ± 3.06 (MOX HCl)
Liberación *in vitro* Día 7 (%)	14.51 – 17.03 (DEX) 35.57 – 38.41 (MOX HCl)	27.56 ± 3.73 (DEX) 40.85 ± 4.05 (MOX HCl)
Liberación *in vitro* Día 10 (%)	25.74 – 28.83 (DEX) 44.55 – 49.54 (MOX HCl)	41.72 ± 3.94 (DEX) 52.93 ± 5.54 (MOX HCl)

Estos resultados refieren a cada estudio de control de calidad de rutina, y a sus correspondientes límites de referencia nominales. Para la homogeneidad se definió como ± 5 % respecto al valor de 100 %. En uniformidad de masa y UC, se adoptaron criterios generales establecidos en Farmacopea. En cuanto a densidad y ATR, la referencia fue la patente de Ozurdex®. Por otro lado, para la liberación *in vitro*, se informaron rangos de tolerancia derivados de los promedios de las 10 corridas del DOE sin irradiar. No obstante, tras la esterilización se observó que los valores obtenidos excedieron los rangos definidos originalmente. En consecuencia, el certificado de análisis debería refinarse a futuro incluyendo los resultados de un mayor número de lotes irradiados a 30 kGy.

4.5.2 – Efecto del Almacenamiento en la Estabilidad

Tabla 23. Resultados tras tres meses en condiciones aceleradas para DEX/MOX HCl

Estudio	Inicial	90 días	p (DEX)	p (MOX HCl)
ATR (%)	1.33 ± 0.08	1.84 ± 0.12	9.44×10^{-4}	-
UC (%)	96.70 ± 1.05 108.71 ± 1.28	94.24 ± 1.04 103.68 ± 1.12	5.13×10^{-3}	0.04
Liberación Día 1 (%)	1.73 ± 0.49 9.15 ± 2.21	2.99 ± 0.38 5.68 ± 0.64	0.01	0.01
Liberación Día 2 (%)	3.37 ± 0.35 15.86 ± 1.44	4.53 ± 0.35 17.84 ± 2.14	0.01	0.14
Liberación Día 3 (%)	4.96 ± 0.61 20.96 ± 1.53	7.23 ± 0.37 24.10 ± 1.51	0.01	0.04
Liberación Día 7 (%)	15.32 ± 1.04 35.36 ± 1.86	22.77 ± 2.02 42.20 ± 2.08	0.01	0.01
Liberación Día 10 (%)	23.85 ± 1.76 44.26 ± 2.32	34.29 ± 3.40 53.71 ± 3.18	0.01	0.01

Tras 90 días en condiciones aceleradas, se observaron diferencias estadísticamente significativas para ATR, UC y liberación *in vitro*. Un comportamiento similar también se constató al evaluar MOX HCl. En ambos casos, los resultados fueron consistentes con un aumento de la degradación y de la tasa de liberación. A su vez, luego de seis meses de exposición se observó que la estructura del inserto se desintegró dejando un remanente amorfo. Este comportamiento podría atribuirse a la degradación de la matriz de PLGA.

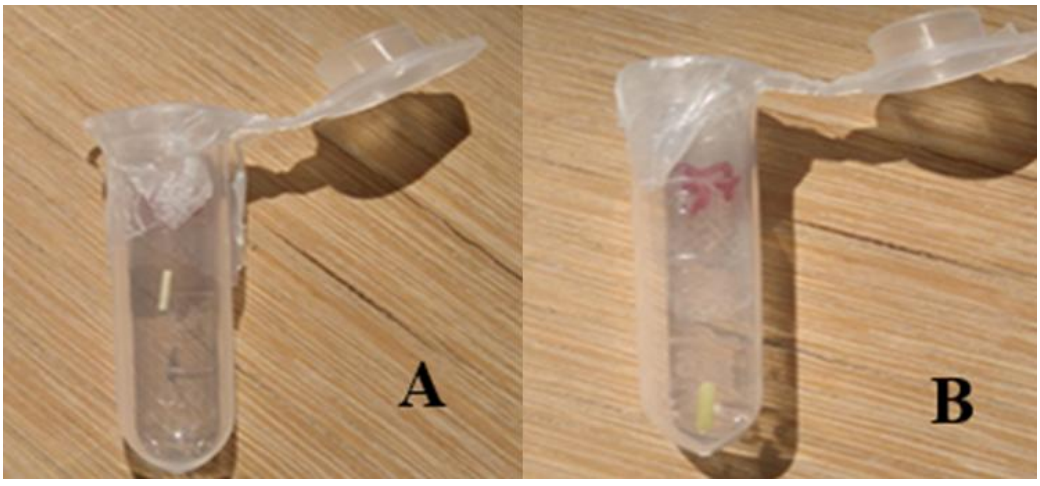


Figura 30. Degradación del implante

En la imagen se observa cómo a los tres meses el inserto mantiene su forma original (A), mientras que a los 180 días exhibe cambios macroscópicos (B). Debido a la pérdida de integridad del implante, se optó por no determinar ni UC ni el perfil de liberación *in vitro*, ya que no hubiesen representado bien a la formulación como tal. El efecto observado probablemente se debió a la estabilidad térmica de la matriz, ya que el almacenamiento se realizó al vacío. En ese sentido, aunque la transición vítrea del PLGA ocurre a ≈ 42 ºC, son posibles también procesos de degradación a temperaturas menores si el tiempo de exposición es prolongado, y sobre todo si HRA está elevada. En contraposición, para los estudios de estabilidad a largo plazo sí se realizaron todos los análisis propuestos.

Tabla 24. Resultados tras 12 meses en condiciones naturales para DEX/MOX HCl

Estudio	**Inicial**	**90 días**	**180 días**	**270 días**	**365 días**
ATR (%)	1.33 ± 0.08	1.44 ± 0.05	1.46 ± 0.05	1.42 ± 0.05	1.39 ± 0.07
UC (%)	96.70 ± 1.05 108.71 ± 1.28	98.52 ± 0.99 105.34 ± 1.02	101.24 ± 0.97 107.85 ± 1.11	94.10 ± 0.96 102.67 ± 1.08	97.19 ± 1.15 106.64 ± 1.30
Liberación Día 1 (%)	1.73 ± 0.49 9.15 ± 2.21	3.81 ± 0.25 10.59 ± 0.60	1.65 ± 0.32 8.29 ± 1.40	2.61 ± 0.34 10.98 ± 1.51	1.60 ± 0.09 6.82 ± 1.04
Liberación Día 2 (%)	3.37 ± 0.35 15.86 ± 1.44	5.47 ± 0.49 12.16 ± 0.94	3.34 ± 0.51 14.78 ± 1.44	4.78 ± 0.66 18.27 ± 1.46	4.34 ± 0.67 17.27 ± 1.86
Liberación Día 3 (%)	4.96 ± 0.61 20.96 ± 1.53	7.10 ± 0.84 19.07 ± 1.42	5.02 ± 0.90 20.55 ± 1.89	6.93 ± 0.87 23.10 ± 1.80	5.37 ± 0.80 19.98 ± 2.11
Liberación Día 7 (%)	15.32 ± 1.04 35.36 ± 1.86	18.90 ± 5.33 34.57 ± 2.37	16.36 ± 2.41 35.44 ± 1.69	20.18 ± 2.48 38.53 ± 2.34	18.61 ± 2.88 30.58 ± 4.10
Liberación Día 10 (%)	23.85 ± 1.76 44.26 ± 2.32	28.78 ± 5.71 47.35 ± 2.97	25.30 ± 3.34 43.88 ± 2.50	30.90 ± 3.34 48.96 ± 2.64	24.21 ± 2.70 42.21 ± 4.85

En el estudio a largo plazo, no se observaron diferencias significativas en ATR ($p = 0.38$) o UC ($p = 0.52$ para DEX y $p = 0.27$ en el caso de MOX HCl). Lo mismo ocurrió con la liberación inicial y final de DEX ($p = 0.68$ y $p = 1$) y MOX HCl ($p = 0.14$ y $p = 0.84$). En consecuencia, los datos sugieren que los insertos mantienen su estabilidad al menos por 12 meses en condiciones de almacenamiento refrigerado a 8 ºC y sellado al vacío en bolsas impermeables al vapor de agua. Este resultado es consistente con lo observado en implantes de DEX/PLGAs desarrollados por nuestro grupo entre 2016 – 2018.

4.6 – Ensayos en Animales

4.6.1 – Evaluación de la Reacción General al Proceso de Inserción

Los primeros ensayos preliminares permitieron evaluar cualitativamente, a lo largo de un total de 35 días, el comportamiento de los implantes y la tolerancia de los animales a los mismos. Cinco conejos recibieron un inserto (irradiado a una dosis de 15 kGy en esta etapa exploratoria) en uno de sus ojos, mientras que el contralateral ofició de control. Los implantes se colocaron sin mayores dificultades dentro de la cámara anterior, y se comprobó que su posición no varió significativamente durante el estudio.

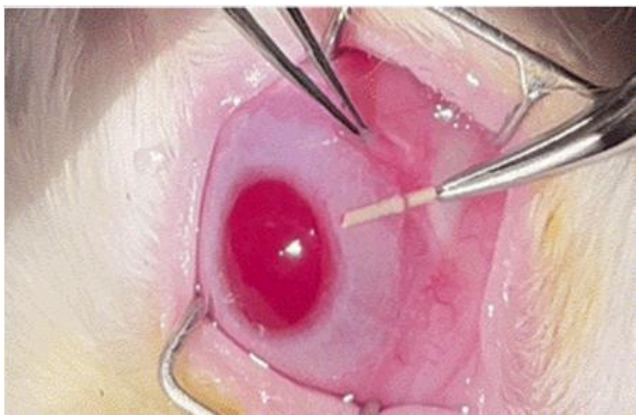


Figura 31. Inserción quirúrgica

A su vez, ningún ojo desarrolló signos clínicos de endoftalmitis. Tampoco se observó síndrome tóxico del segmento anterior, caracterizado por inflamación aguda y edema corneal. No obstante, se comprobó una tendencia a la formación de sinequias (adhesiones entre estructuras internas del ojo, asociadas a irritación). Esto podría deberse a que, en presencia del cristalino, el inserto limita el volumen y la dinámica de la cámara anterior.



Figura 32. Sinequias en pruebas piloto

Por ende, un implante colocado en un ojo al cual no se le realizó la inducción de afaquia, no tiene la posibilidad de moverse libremente y llegar al tercio inferior. Tal es así que, en presencia del cristalino, el inserto contacta con estructuras internas como el iris y las irrita, produciendo sinequias. No obstante, estos eventos ya no ocurrieron una vez que se mejoró la técnica de implantación. Por otro lado, pudo observarse que los insertos se degradaron completamente *in vivo* entre los 20 – 30 días luego de colocados. En la secuencia de imágenes mostrada a continuación, se aprecia la evolución de un implante con el tiempo.

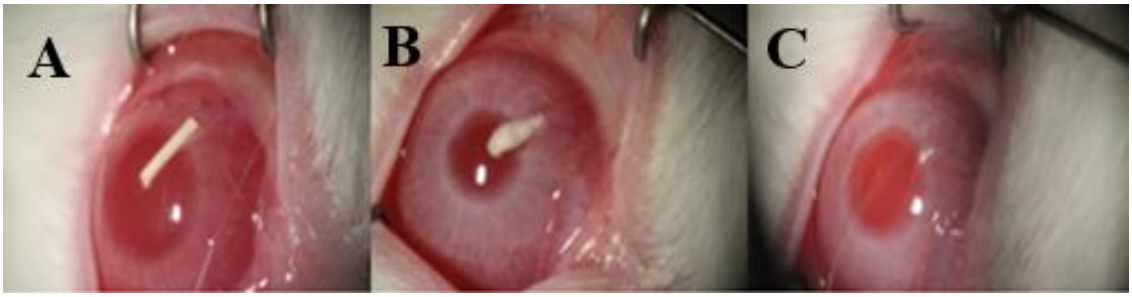


Figura 33. Evolución de los insertos en ojos sanos los días 1 (A), 9 (B) y 15 (C)

4.6.2 – <u>Estudios Preliminares del Sistema Implantable luego de una Cirugía</u>

La siguiente etapa de prueba consistió en evaluar el comportamiento cualitativo del inserto en un modelo de afaquia inducida mediante ECC (también conocida como lensectomía). Para ello, tres conejos fueron sometidos a una cirugía en ambos ojos. En uno de ellos se colocó un implante en el tercio inferior de la cámara anterior (entre iris y córnea), mientras que el otro fue utilizado como control. En este caso, la incidencia de sinequias fue menos acusada. Sin embargo, se observó la aparición de una membrana blanca formada por fibrina, atribuida a la presencia de un edema corneal.

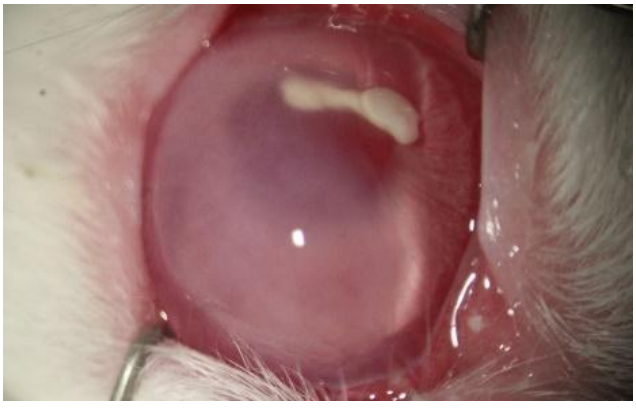


Figura 34. Edema corneal grave tras una ECC

En varios ojos se comprobó la presencia de flare según la escala SUN. Esta establece la severidad de un cuadro inflamatorio intraocular. Si bien el inserto puede contribuir a la inflamación al ser un elemento exógeno al sistema ocular, en este caso el flare grave observado estuvo asociado principalmente a la injuria generada por la ECC. Esto se debe a que dicha cirugía es más agresiva que técnicas modernas como la facoemulsificación, y a que depende en gran medida de la experiencia del cirujano en el procedimiento.

Por otro lado, tras la implantación se observó la aparición de una pseudomembrana blanquecina transitoria. La estructura no presentó características inflamatorias clínicas y su desaparición fue rápida. Si bien no se realizó un análisis composicional, su formación podría estar asociada a una liberación inicial veloz de MOX HCl, lo cual generaría poros y flujos locales capaces de arrastrar partículas de DEX y matriz que se disolverían o depurarían con el paso de la horas debido a la propia dinámica del humor acuoso.



Figura 35. Presencia de la pseudomembrana (A) y su posterior desaparición (B)

Por otro lado, los ojos con ECC no presentaron un aumento significativo de la PIO. Esto podría deberse a que la cirugía desestabiliza la homeostasis intraocular. En consecuencia, se limitaría la evaluación de un posible efecto hipertensor del implante. Por último, no se observó mejora clínica al comparar ojos con y sin inserto. Esto podría deberse a que la ECC produjo un grado de injuria superior al que compensa la dosis de DEX del implante.

4.6.3 – <u>Confirmación de la Actividad Antiinflamatoria del Inserto</u>

La ausencia de diferencias clínicas significativas entre ojos con y sin implante observada en los experimentos de ECC generó la pregunta de si DEX efectivamente se estaba liberando correctamente desde el dispositivo. Con el objetivo de evaluar esta hipótesis, tres conejos fueron sometidos en primer lugar a una facoemulsificación. El procedimiento se realizó de forma bilateral, reservando siempre uno de los ojos como control no tratado.

Posteriormente se aguardó por la resolución natural de la inflamación (7 – 14 días), con el objetivo de replicar las condiciones del modelo de afaquia, y eliminar la variabilidad inflamatoria de la injuria causada por el procedimiento quirúrgico. Luego se insertó el implante en uno de los ojos, e inmediatamente se inyectó en ambos por vía intravítrea (a 6 mm del limbo corneal) una solución de LPS de *Escherichia coli* con concentración de 1 ng/µL. La aparición de una uveítis por el método descripto es rápida, con un máximo a las 24 horas y un valor de flare reproducible y fácilmente visible mediante una lámpara de hendidura como una neblina intensa (parte derecha de la imagen).

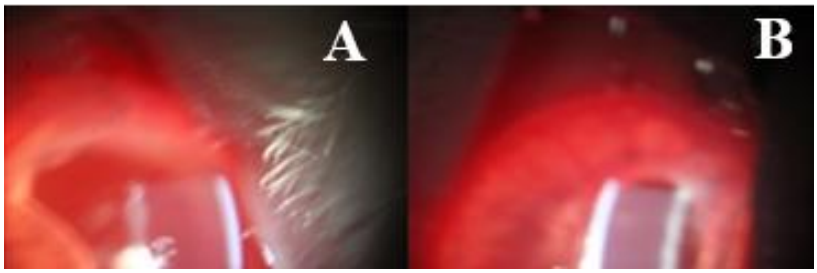


Figura 36. Ojo normal (A) y con flare tras LPS (B)

En este caso, sí se observó una respuesta antiinflamatoria clínicamente significativa. Los tres ojos control desarrollaron una uveítis severa (grado 3 – 4 según la escala SUN). En comparación, el flare en el grupo con inserto no superó el valor de 1 luego de transcurridas 24 horas. Por otro lado, el tiempo de recuperación fue mayor en los ojos no implantados, retornando al estado basal tras siete días, frente a cinco o seis en el caso de los tratados.

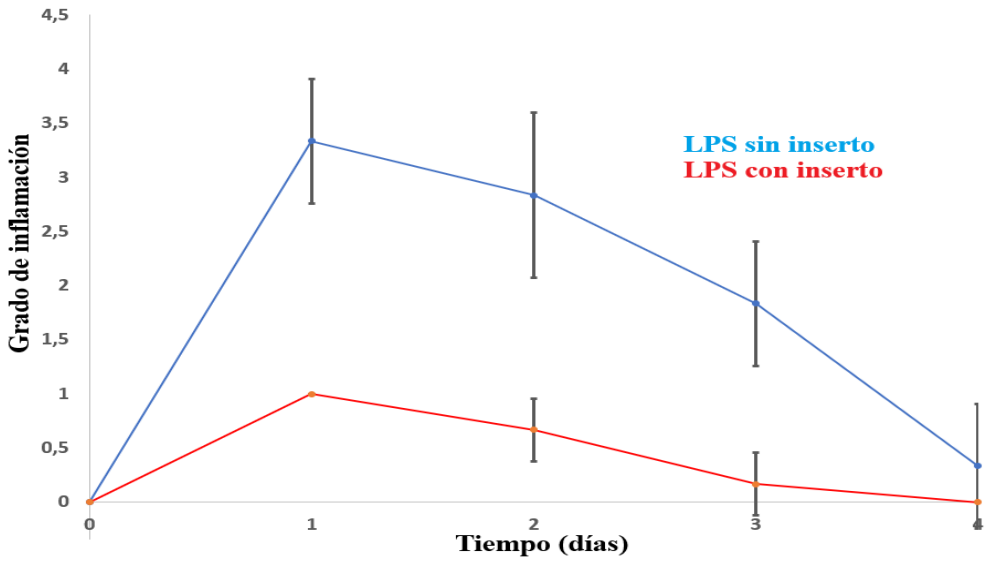


Figura 37. Comparación de la inflamación en ojos con y sin inserto tras LPS

La evolución observada concuerda con modelos ya publicados sobre uveítis en conejos (Ohia et al, 1992), en los que la administración intravítrea de LPS de *Escherichia coli* produjo a las 24 horas ruptura de la barrera hematoacuosa e infiltración leucocitaria, mientras que DEX redujo significativamente la inflamación. En el presente trabajo, la reducción del flare en los ojos implantados junto con el acortamiento del tiempo de recuperación, constituye evidencia preliminar de liberación activa de DEX.

4.6.4 – Desempeño del Dispositivo luego de una Facoemulsificación

Como ya se explicó, al comenzar los estudios *in vivo* exploratorios se optó por realizar una ECC para adquirir experiencia en el manejo quirúrgico de los animales. No obstante, este procedimiento se asocia con mayor injuria y tiempo de recuperación. A su vez, dicha cirugía tiene una curva de aprendizaje pronunciada y es muy dependiente de la experiencia quirúrgica. Este fue uno de los motivos por los cuales fue necesario realizar múltiples procedimientos de entrenamiento, con el fin de dominar la técnica de ECC, la posterior colocación del inserto, y adaptarse a su vez a la anatomía y a la fisiología de los ojos de los conejos, que no son directamente equivalentes a los de humanos.



Figura 38. Inserto ya colocado

Como ya se mencionó, el implante podría contribuir en parte a la inflamación inicial por tratarse de un elemento exógeno al sistema intraocular. No obstante, la ausencia de una respuesta clínica observable tras la ECC, posiblemente se debió al contexto de injuria significativa producido por la cirugía. Por tal motivo, se decidió cambiar de intervención y pasar a una facoemulsificación. Esta técnica es menos agresiva y permite una más rápida recuperación. De hecho, es el estándar actual para cirugía de cataratas. En ese sentido, este procedimiento permitió trabajar en un modelo quirúrgico menos traumático y más adecuado a un eventual uso clínico. Tal es así que, las muestras para determinación de los perfiles farmacocinéticos en ojos afáquicos, se obtuvieron tras una facoemulsificación.

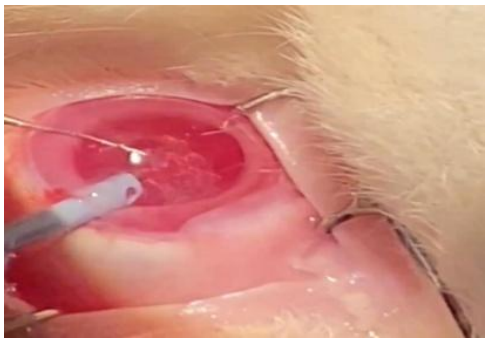


Figura 39. Facoemulsificación en ojos de conejo

4.6.5 – Cuantificación de la Actividad Antiinflamatoria

La función de mejor ajuste de la curva de calibración en el rango de 15.6 – 1000 pg/mL se obtuvo por regresión sin normalización de absorbancia, con el modelo 4PL. Para ello se utilizó la herramienta online GainData®. Como resultado, el ajuste indicó un $r^2 = 0.994$ en la ecuación $y = d + [(a - d)/(1 + [x/c]^b)]$. En este caso, las letras a, b, c, d son parámetros ajustados con un algoritmo iterativo no lineal. Por otro lado, la variable "y" corresponde a la absorbancia medida, mientras que "x" es la concentración en el pocillo. Despejando "x" del modelo 4PL se obtiene $x = c10^{Log\left(\frac{a-d}{y-d}-1\right)/b}$ en escala logarítmica. Por último, la concentración de cada pocillo se calcula multiplicando "x" por el factor de dilución usado.

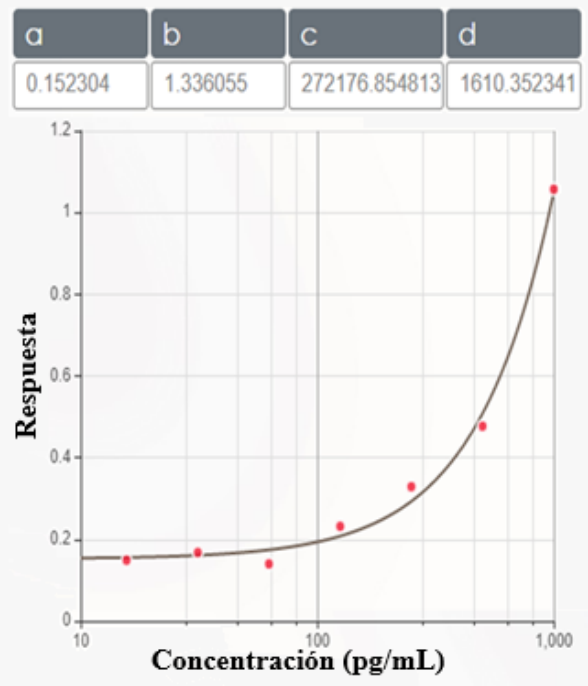


Figura 40. Ajuste de la curva de calibración para el estudio ELISA

Las muestras analizadas correspondían a extracciones de humor acuoso realizadas a lo largo de 35 días, en ojos con y sin inserto. Sin embargo, el volumen recolectado fue variable en cada caso. De hecho, en algunas ocasiones la cantidad recogida fue escasa, posiblemente debido al estado general de los cuerpos ciliares. No obstante, según las instrucciones del fabricante, la realización de las medidas requería 100 µL de muestra por pocillo. Tal cantidad superaba en varios casos lo recolectado en las tomas. Por tal motivo, se decidió llevar 10 o 20 µL de las 33 muestras disponibles, hasta un volumen final de 250 µL con el buffer del kit. Sin embargo, dado que se desconocían las concentraciones esperadas, existía un riesgo elevado de falsos negativos debido al factor de dilución usado.

Tabla 25. Resultados del estudio ELISA

Muestra	**Toma (µL)**	**c (ng/mL)**	**SUN**	**Muestra**	**Toma (µL)**	**c (ng/mL)**	**SUN**
3-1	20	-	3+	2-5	20	1.01	0.50+
6-1	10	-	1+	3-5	20	-	0+
8-1	20	-	1+	4-5	20	-	0+
1-2	20	3.22	3+	8-5	10	-	0+
2-2	20	0.44	3+	2-6	10	1.32	0+
3-2	20	-	3+	3-6	20	-	0+
4-2	20	-	2+	4-6	20	-	0+
5-2	20	-	0.50+	5-6	20	-	0+
8-2	20	2.17	0.50+	4-4	20	-	0+
2-3	20	-	3+	7-6	20	0.26	0+
3-3	20	-	3+	8-6	20	1.86	0+
6-6	20	1.26	0+	1-7	20	0.87	1+
2-4	20	-	0.50+	2-7	20	-	0+
5-3	20	-	0.50+	4-7	10	-	0+
6-4	20	-	0+	7-7	20	-	0+
7-4	20	-	0+	6-8	10	-	0+
1-5	20	-	3+	-			

Diluir las muestras no respondió solo a la necesidad de contar con un volumen suficiente para poder realizar el ensayo. Si bien al hacer esto se esperaba observar falsos negativos, los valores positivos corresponderían, en contraposición, a las más concentradas. Así, se podría obtener una estimación preliminar de los niveles a los que IL-1 resulta detectable tras una facoemulsificación. En ese sentido, la muestra de mayor concentración (1-2) corresponde a un ojo cuya evaluación clínica indicaba una inflamación muy elevada (grado 3+ en la escala SUN). Esto sería, en principio, consistente con el comportamiento esperado. No obstante, no se observó una correlación clínica clara para el resto de señales positivas. Por ejemplo, se hallaron valores altos de IL-1 en ojos recuperados.

Por otro lado, IL-1 no se detectó en muestras de casos con inflamación clínicamente evidente. Tales resultados podrían corresponder a valores atípicos dentro del contexto experimental o tal vez a un posible exceso de dilución en los pocillos. A su vez, hay que considerar la variabilidad interindividual propia de los modelos animales. También puede existir una tendencia de IL-1 a permanecer por un largo tiempo en la zona afectada. De hecho, está reportado que los marcadores inflamatorios se encuentran presentes incluso cuando clínicamente la uveítis o la IPO se consideran quiescentes (Pei et al, 2019). Para correlacionar estado clínico con presencia de IL-1 harían falta más réplicas y estudios orientados a ajustar la dilución correcta y las concentraciones esperables. Sin embargo, en este caso la cantidad de muestra disponible permitió la realización de un único ensayo.

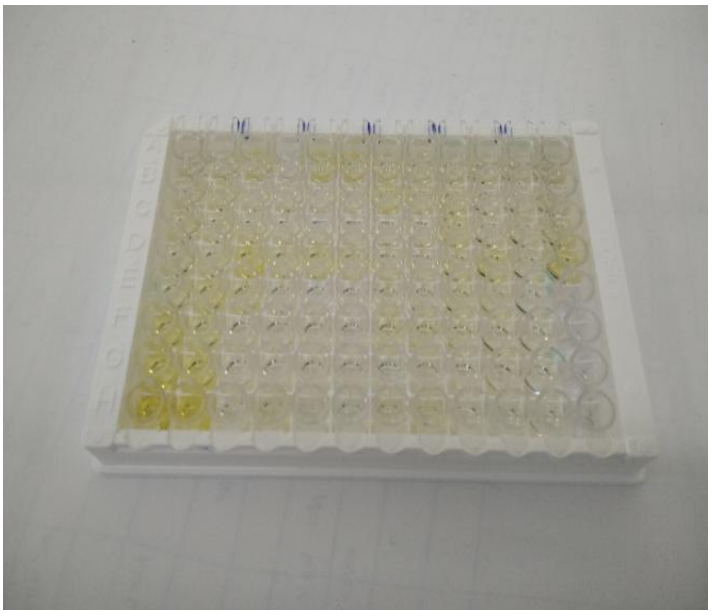


Figura 41. Placa ELISA para la determinación de IL-1

4.6.6 – Modelo de Endoftalmitis

Se observó que el grupo A (control) presentó un 100 % de incidencia de casos de infección. Debido al estado de sus ojos todos los animales tuvieron que ser eutanasiados a las 48 horas tras la inoculación según los protocolos éticos aprobados para disminuir el sufrimiento. Para los grupos B (80 µL de ceftazidima intravítrea 2 mg/mL) y C (insertos), no hubo signos compatibles con infección, ni diferencias estadísticamente significativas entre ambos por seis días consecutivos (test de Mann-Whitney, $p = 0.28$). Esto sugiere un comportamiento clínico comparable de los insertos respecto a la terapia convencional.

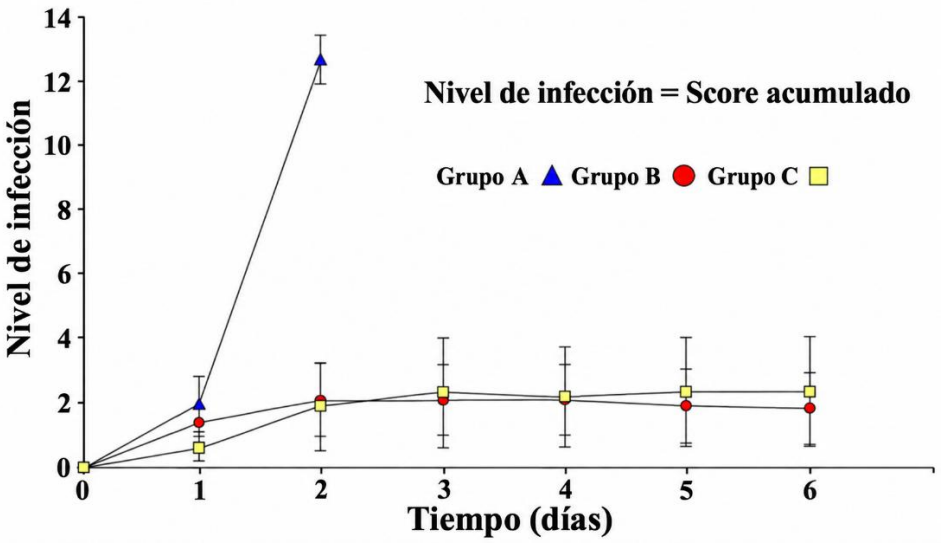


Figura 42. Respuesta general luego de la inoculación

Los conejos del grupo A desarrollaron endoftalmitis severa tras 24 – 48 horas. Sus ojos presentaban secreciones, turbidez y una marcada inflamación. La diferencia con los grupos tratados al segundo día fue tan elevada ($p = 1.06 \times 10^{-3}$), que los animales debieron ser eutanasiados por criterios humanitarios. En contraposición, no se constataron signos de infección en ninguno de los ojos en B y C. Sin embargo, en el grupo C se observó la pseudomembrana transitoria, aunque no pareció comprometer el efecto antibiótico.

Por otro lado, se constató que un porcentaje de ojos en B (36 %) y C (12.50 %) desarrolló signos leves de inflamación, asociados posiblemente a la inyección/implantación. La diferencia puede explicarse por la presencia de DEX en los insertos, y su efecto farmacológico propio. Esto probablemente contribuyó a mitigar en cierta medida los signos de inflamación mencionados anteriormente y atribuidos a las inyecciones.



Figura 43. Ojos control (A), con ceftazidima (B) e inserto (C) tras la inoculación

El 100 % de incidencia observado en el grupo sin tratar resulta consistente con reportes de la introducción intravítrea de ≈ 6 UFC de *Pseudomonas aeruginosa*. Esta producía de manera reproducible una infección fulminante en ojos afáquicos de conejo. El inóculo efectivo empleado en este trabajo se encuentra prácticamente en ese intervalo. Dicha carga infectiva fue bastante menor que la requerida en modelos intracamerales.

La ausencia de infección en los ojos implantados también concuerda cualitativamente con estudios (Mammen et al, 2016) en los que se demostró que una formulación de liberación controlada de MOX previno la aparición de endoftalmitis en el 100 % de los conejos desafiados. No obstante, las diferencias en microorganismo, vía de administración y carga bacteriana impiden una comparación cuantitativa directa con el modelo propuesto.

Un detalle a tener en cuenta en este trabajo es que la inoculación se realizó por vía intravítrea para establecer una endoftalmitis grave, rápida y reproducible, y no de recrear estrictamente la vía inicial de contaminación durante una cirugía de cataratas. El humor vítreo presenta menor recambio y capacidad de depuración que la cámara anterior. Esto favorece la retención y proliferación bacteriana poco variable y con inóculos menores.

Por otro lado, la ceftazidima se administró también por vía intravítrea debido a que la misma constituye una vía convencional de tratamiento de la endoftalmitis, al permitir alcanzar inmediatamente concentraciones elevadas en el compartimento donde se desarrolla la infección. Esto evita las limitaciones impuestas por las barreras oculares y la penetración desde la circulación sistémica o la cámara anterior respectivamente. Por otro lado, la ceftazidima presenta actividad frente a bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* y se utiliza habitualmente por vía intravítrea junto con vancomicina en el tratamiento empírico de la endoftalmitis ya establecida. Por tal motivo, resultó ser un control farmacológico positivo más que apropiado para este estudio.

Un aspecto particularmente destacable es que el implante se colocó en la cámara anterior, mientras que el desafío bacteriano se estableció directamente en el humor vítreo. Por el contrario, la ceftazidima fue administrada en el mismo compartimento del inóculo, por lo que contó con la ventaja de alcanzar inmediatamente concentraciones elevadas en el sitio de infección. A pesar de esta diferencia anatómica, ninguno de los ojos tratados con el implante desarrolló signos clínicos de endoftalmitis y no se detectaron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo tratado con antibiótico intravítreo. Este resultado es compatible con que MOX HCl alcanzó una exposición intraocular suficiente para controlar un desafío infeccioso potente en un compartimento más profundo.

4.6.7 – Monitorización de la PIO

El estudio y seguimiento de la PIO es relevante porque los glucocorticoides, incluida DEX, pueden producir hipertensión ocular en una fracción susceptible de individuos, denominados respondedores a corticosteroides. El efecto se relaciona con modificaciones celulares y acumulación de matriz extracelular en la malla trabecular, que aumentan la resistencia al drenaje del humor acuoso. En ese sentido, la magnitud de la respuesta a los tratamientos con DEX presenta una importante variabilidad interindividual.

Dado que la ausencia de cambios en la mayoría de los sujetos no excluye elevaciones clínicamente relevantes en algunos casos, la evaluación longitudinal de la PIO constituye un parámetro esencial de seguridad para cualquier sistema intraocular de liberación sostenida de DEX. Por ello, en este trabajo se realizó un seguimiento de las variaciones de la PIO en ambos modelos animales, comparando contra un control no quirúrgico.

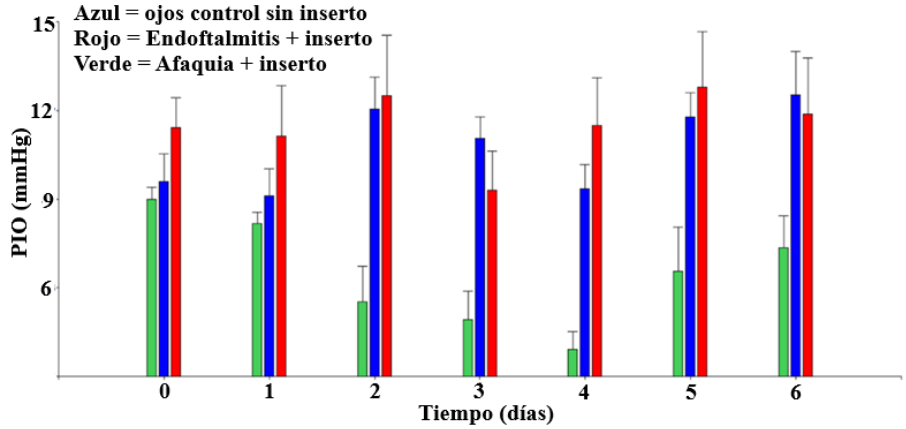


Figura 44. Variación de PIO en control no quirúrgico y en modelos animales

Los seis conejos con afaquia inducida por facoemulsificación (n = 6) presentaron una gran diferencia estadística respecto al resto (test de Kruskal-Wallis, $p = 2.20 \times 10^{-3}$). Esto puede explicarse porque la remoción del cristalino incrementa el volumen de la cámara anterior, lo cual modifica la dinámica del humor acuoso. En ese sentido, sería interesante evaluar también por un lapso de tiempo considerable (30 – 60 días) qué sucedería en términos de PIO si se coloca un LIO. Esto permitiría mantener un volumen de cámara anterior más acotado y estudiar el posible efecto hipertensor del inserto.

Aparte del modelo de afaquia, la PIO fue evaluada en ocho animales inoculados con *Pseudomonas aeruginosa*, recibiendo en simultáneo un implante (n = 8). En ese caso, no hubo diferencias estadísticamente significativas (test de Mann-Whitney, p = 0.16) durante seis días respecto a cinco conejos fáquicos no implantados (n = 5). Esto sugiere que el inserto no produce un aumento relevante de la PIO en el corto plazo. A su vez, el estudio realizado sobre cinco animales fáquicos implantados (n = 5) por 35 días, indica que la PIO parece permanecer inalterada en presencia del inserto (test de Friedman, p = 0.07).

La ausencia de una elevación estadísticamente significativa de la PIO en estos ojos implantados contrasta con lo reportado en bibliografía, donde se observó un aumento en conejos tratados con otro implante de PLGA conteniendo DEX y MOX en presentación conjunta. Las diferencias en dosis, matriz, localización del dispositivo (saco capsular), presencia de LIO y esquema temporal de medición podrían explicar la discrepancia. En conjunto, estos resultados indican que el efecto hipertensor no es una consecuencia inevitable del concepto DEX/MOX/PLGA, pero debe evaluarse para cada formulación.

4.6.8 – <u>Método Cromatográfico en Ensayos *In Vivo*</u>

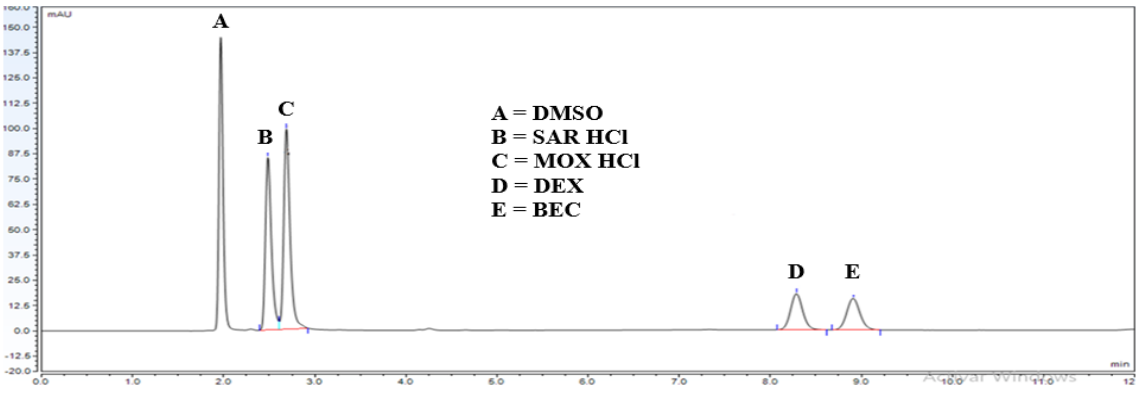


Figura 45. Cromatograma para la validación *in vivo* (APIs y estándares internos)

Como puede observarse, todos los componentes de la mezcla se separaron con adecuada resolución. No obstante, debido a la poca cantidad de humor acuoso disponible para llevar a cabo la validación completa de este método, se optó por evaluar únicamente linealidad y límites instrumentales (LOD y LOQ respectivamente). En ese sentido, se trabajó con DEX en el rango [0.30 – 5] µg/mL y [1.50 – 25] µg/mL para MOX HCl. El ajuste de la curva de calibración fue $r^2 = 0.9997$ en ambos casos. En cuanto a límites instrumentales, para DEX se obtuvo LOD = 0.055 µg/mL y LOQ = 0.18 µg/mL. En el caso de MOX HCl, se estimaron LOD = 0.022 µg/mL y LOQ = 0.074 µg/mL respectivamente.

4.6.9 – Modelos Farmacocinéticos para DEX

Antes de llegar a los resultados correspondientes al corticosteroide, es necesario aclarar ciertos puntos. Originalmente, los estudios fueron pensados en base a datos de los ensayos *in vitro*. Por ejemplo, se había observado que la forma del inserto se mantenía inalterada durante 10 días. A su vez, las concentraciones calculadas indicaban que restaban por liberarse aproximadamente ≈ 70 % del contenido de DEX y ≈ 55 % del de MOX HCl.

No obstante, durante los estudios *in vivo* exploratorios, se observó que el intercambio de masa entre los insertos y el humor acuoso era más rápido de lo esperado. De hecho, los implantes no duraban más de 20 días en el ojo. Por tanto, se esperaba observar importantes diferencias en las concentraciones. Considerando esto, como punto de partida se planteó un esquema de tomas recolectando humor acuoso los días 1, 2, 3, 7, 10, 14, 17 y 24. Para ello, se emplearon ocho conejos divididos en dos grupos idénticos. Los ojos numerados 1 – 4 (uno por animal) se sometieron a una facoemulsificación, recibiendo un inserto. Los restantes 5 – 8 (uno por cada conejo) fueron implantados sin inducción de afaquia.

No obstante, si bien se cumplió el esquema de muestreo propuesto, las tomas presentaron complicaciones asociadas al estado general del ojo, que no fue el mismo en todos los conejos. Esto se debió a los distintos grados de distorsión interna producidos por la facoemulsificación. En ese sentido, en ocasiones se extrajo muy poca cantidad o incluso nada de humor acuoso. Tal fue el caso que, el volumen total de toma fue variando entre 10 y 50 µL. En algunas situaciones, directamente no se pudo recolectar líquido. Estos datos y las concentraciones calculadas se resumen a continuación. Por otro lado, las tomas paras las cuales no se logró extraer humor acuoso se indican con un guion "–".

Tabla 26. Concentraciones de DEX (µg/mL) en el estudio farmacocinético

Ojo	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Día 1	2.49	3.39	1.92	2.66	2.75	2.88	-	2.21
Toma (µL)	20	50	50	10	40	15	-	10
Día 2	2.14	2.87	1.85	2.61	2.68	2.67	-	1.83
Toma (µL)	50	20	50	50	50	10	-	10
Día 3	2.04	2.72	1.54	2.04	2.54	2.40	-	-
Toma (µL)	50	30	50	50	50	10	-	-
Día 7	1.63	2.36	1.08	1.32	1.67	1.35	1.42	-
Toma (µL)	20	50	30	10	50	50	50	-
Día 10	1.45	0.62	0.76	0.73	0.70	-	1.13	0.61
Toma (µL)	50	20	50	50	25	-	50	50
Día 14	0.60	0.61	0.73	0.52	0.64	-	0.74	0.60
Toma (µL)	50	25	50	50	50	-	50	50
Día 17	0.57	-	0.56	0.51	0.56	0.66	0.60	0.35
Toma (µL)	50	-	30	50	50	50	50	50
Día 24	0.54	0.53	0.54	0.38	0.38	0.34	0.55	0.29
Toma (µL)	50	50	30	50	50	50	50	50

Los perfiles farmacocinéticos con (en rojo) y sin afaquia inducida (en verde) se presentan por separado, y muestran que DEX permaneció detectale en humor acuoso al menos hasta el día 24. Sin embago, la concentración en el vial para varias muestras se encontró entre LOD (0.055 µg/mL) y LOQ (0.18 µg/mL). Usualmente, en Monolix® estos datos se censuran indicando que $0 \leq c < LOQ$. No obstante, las señales cromatográficas obtenidas eran claramente observables y distinguivles del ruido de fondo. En estas condiciones, el enfoque All data (Keizer et al, 2015), recomienda conservar como observaciones continuas los valores medidos entre LOD y LOQ. Esta metodología sugiere que, cuando existe una señal detectable, su incorporación produce menor sesgo y error en la estimación de los parámetros farmacocinéticos que su censura, sustitución o eliminación.

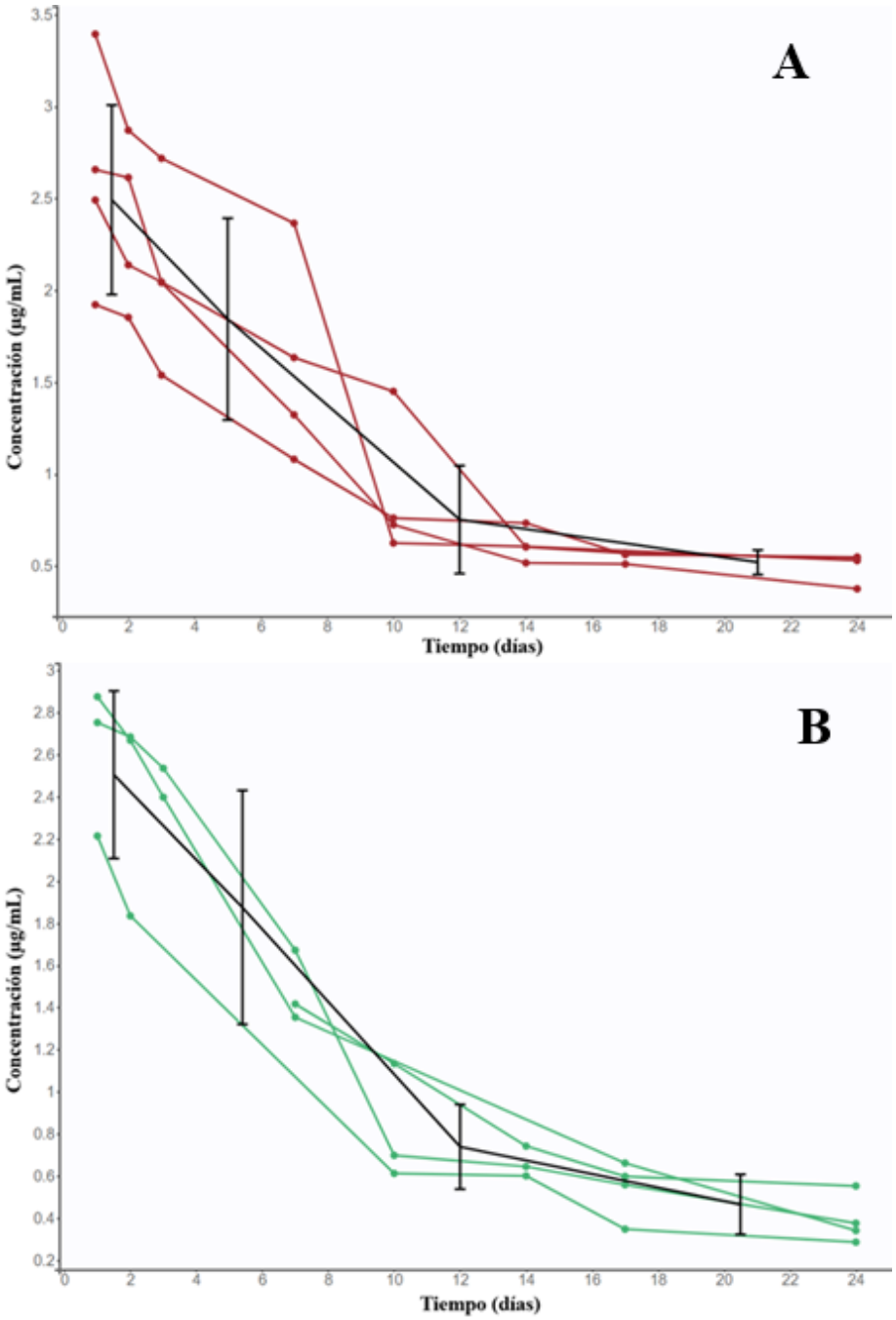


Figura 46. Datos crudos para DEX en ojos con (A) y sin afaquia (B)

Los gráficos permitieron visualizar un perfil de eliminación típico de un modelo bicompartimental, con una primera fase de distribución, y otra marcada por un cambio en la pendiente de la curva. Este fue el punto de partida para el ajuste farmacocinético. El modelo matemático elegido fue un bicompartimental por administración extravasal sin tiempo de retraso, con absorción de primer orden y eliminación lineal. El ajuste se realizó por NLME con el software Monolix® 2024 R1, considerando inicialmente variabilidad sobre todos los efectos fijos (k_a, CL, V_{D1}, Q, V_{D2}) y error residual proporcional.

En cada iteración se aplicó el algoritmo auto-init con sus últimos estimados como punto de partida. Luego se fueron quitando términos de desviación estándar de efectos aleatorios (ω) que presentaban alta imprecisión. Para ello se aplicó *backwards elimination* como estrategia. La decisión de remover un parámetro se tomó según el error estándar relativo (RSE) observado. En cada paso de iteración se descartó el ω con el mayor RSE, considerando también el coeficiente de variación como insumo en casos de magnitud similar. Por otro lado, se verificó que las modificaciones introducidas mejorasen el ajuste global. En ese sentido, se consideró el criterio de información de Akaike (AIC), el cual es más favorable cuanto menor sea su valor. A continuación, se describen los modelos obtenidos para DEX (términos marcados con "-" no forman parte del ajuste realizado).

Tabla 27. Parámetros poblacionales de DEX

Término	**k_a (d^{-1})**	**V_{D1} (mL)**	**CL (mL/día)**	**Q (mL/día)**	**V_{D2} (mL)**	**ωV_1**	**ωCL**	**ωQ**
Afaquia	2.27	66.17	4×10^{-6}	9.02	446.48	0.28	-	0.15
Sano	1.82	59.15	4.86	4.80	88.95	-	0.17	-
RSE (%)	69.30	15.40	Sin identificar	12.50	17.40	48.90	-	53.90
	42.30	10.50	18.70	20.50	53.60	-	44	-
Error residual en ojos con afaquia: Proporcional = 0.19 con RSE (%) = 15.50 %								
Error residual en ojos sanos: Proporcional = 0.14 con RSE (%) = 15.70 %								

Debido a que el implante fue colocado directamente en la cámara anterior, es decir, en el mismo espacio anatómico donde se determinaron las concentraciones, se asumió una biodisponibilidad local unitaria para la fracción liberada, al no existir una barrera de absorción entre el sistema y el humor acuoso. No obstante, dado que no se determinó independientemente la cantidad de dosis implantada efectivamente entregada en el sistema *in vivo*, los parámetros de escala deben considerarse estrictamente aparentes.

Para esta formulación, k_a ha de interpretarse a modo de constante efectiva de entrada desde el implante hacia el compartimento central muestreado, y no como una medida de absorción extravascular clásica. Este parámetro reúne los procesos que determinan la aparición de DEX en el humor acuoso, entre ellos la hidratación del inserto, la disolución del API, su difusión a través de la matriz polimérica y su transferencia inmediata al medio.

Por tanto, el mayor valor de k_a estimado para los ojos afáquicos es compatible con una llegada más rápida de DEX en el humor acuoso. Este comportamiento podría relacionarse con modificaciones anatómicas o hidrodinámicas posteriores a la extracción del cristalino, así como con cambios en el contacto del inserto con el medio y con los tejidos adyacentes. No obstante, debido a la ausencia de muestras anteriores a las 24 horas y a la elevada incertidumbre en la estimación de k_a, dicha diferencia debe considerarse una hipótesis mecanística y no una demostración de una liberación más rápida *in vivo*.

La similitud de V_{D1} entre ambas condiciones indica que el modelo no requirió diferencias importantes en el factor de escala correspondiente al compartimento central. No obstante, esto no demuestra por sí solo que el volumen fisiológico del humor acuoso ni la distribución local de DEX sean idénticos, dado que V_{D1} es un parámetro aparente. Los mayores valores de V_{D2} y Q en el modelo afáquico son compatibles con una capacidad aumentada del compartimento periférico y con un intercambio importante desde el central. Dicho de otra manera, DEX parece redistribuirse en dirección a estructuras internas una vez que el cristalino es removido luego de la operación de cataratas.

La velocidad de estos procesos se interpreta más adecuadamente mediante los cocientes Q/V_{D1} y k_{21} Q/V_{D2}, que describen matemáticamente de forma sencilla la transferencia desde el compartimento central hacia el periférico y el retorno a partir de este último respectivamente. En particular, un aumento de Q/V_{D1} respalda una salida más rápida de DEX del humor acuoso en dirección a regiones fisiológicas más internas. Tal resultado es compatible con una mayor accesibilidad después de la extracción del cristalino, al compartimiento periférico (redistribución). Sin embargo, este constituye una representación agrupada y no puede asignarse a una estructura anatómica específica.

Tanto V_{D1} como V_{D2} son volúmenes aparentes no necesariamente fisiológicos, estimados en base a una fracción absorbida variable que depende de múltiples factores biológicos y fisicoquímicos (tasa de disolución, permeabilidad tisular, retención local, redistribución, transferencia de masa). Algo similar ocurre para los demás parámetros del modelo. En ese sentido, todo lo anterior aporta a la variabilidad interindividual general. Por tal motivo, antes de continuar con la discusión, es importante tener en cuenta cómo se interpreta por convención la calidad de la estimación en los parámetros poblacionales.

Tabla 28. Criterios de aceptabilidad de la variabilidad en NLME

RSE (%)	Aceptabilidad	Interpretación
0 – 10	Óptimo	Parámetro determinado con alta confianza
10 – 20	Bueno	Estimación sólida
20 – 30	Aceptable	Resultado aceptable sin impacto en conclusiones estructurales
30 – 50	Baja	Parámetro con bastante incertidumbre que puede afectar al modelo
50 – 70	Límite	Problemas de identificabilidad parcial, pero útil cualitativamente
> 70	Inaceptable	El modelo es incapaz de estimar de forma confiable el parámetro

El CL de los ojos afáquicos presentó una estimación poco precisa, mientras que k_a también mostró una incertidumbre elevada. Estos resultados indican que los datos disponibles contienen poca información para estimar separadamente dichos parámetros, pero no demuestran que sus valores fisiológicos sean necesariamente bajos o altos. Del mismo modo, la eliminación de determinados términos ω durante el ajuste no implica que no exista variabilidad interindividual, sino que esta no pudo cuantificarse de manera estable con el número y la frecuencia temporal de las observaciones disponibles.

La ausencia de muestras anteriores a las 24 horas impidió caracterizar la fase de entrada y debilitó la separación entre liberación, distribución y eliminación. En consecuencia, parte de la caída registrada en las concentraciones del humor acuoso puede ser explicada por la transferencia hacia el compartimento periférico, sin necesidad de atribuirla a un CL irreversible. Más allá de todo lo anterior, los datos permiten afirmar que la fase observada es compatible con una combinación de liberación prolongada, redistribución y eliminación, sin precisar la contribución individual de cada proceso.

Finalmente, el diagnóstico por los gráficos de chequeo de predicción visual (VPC) no mostró discrepancias sistemáticas importantes entre las concentraciones observadas y las previstas dentro del intervalo temporal estudiado. Esto respalda la utilidad descriptiva de los modelos, que resultan adecuados para describir las tendencias generales y formular hipótesis sobre los procesos involucrados, pero sus parámetros individuales deben interpretarse con cautela exploratoria y no como estimaciones fisiológicas definitivas.

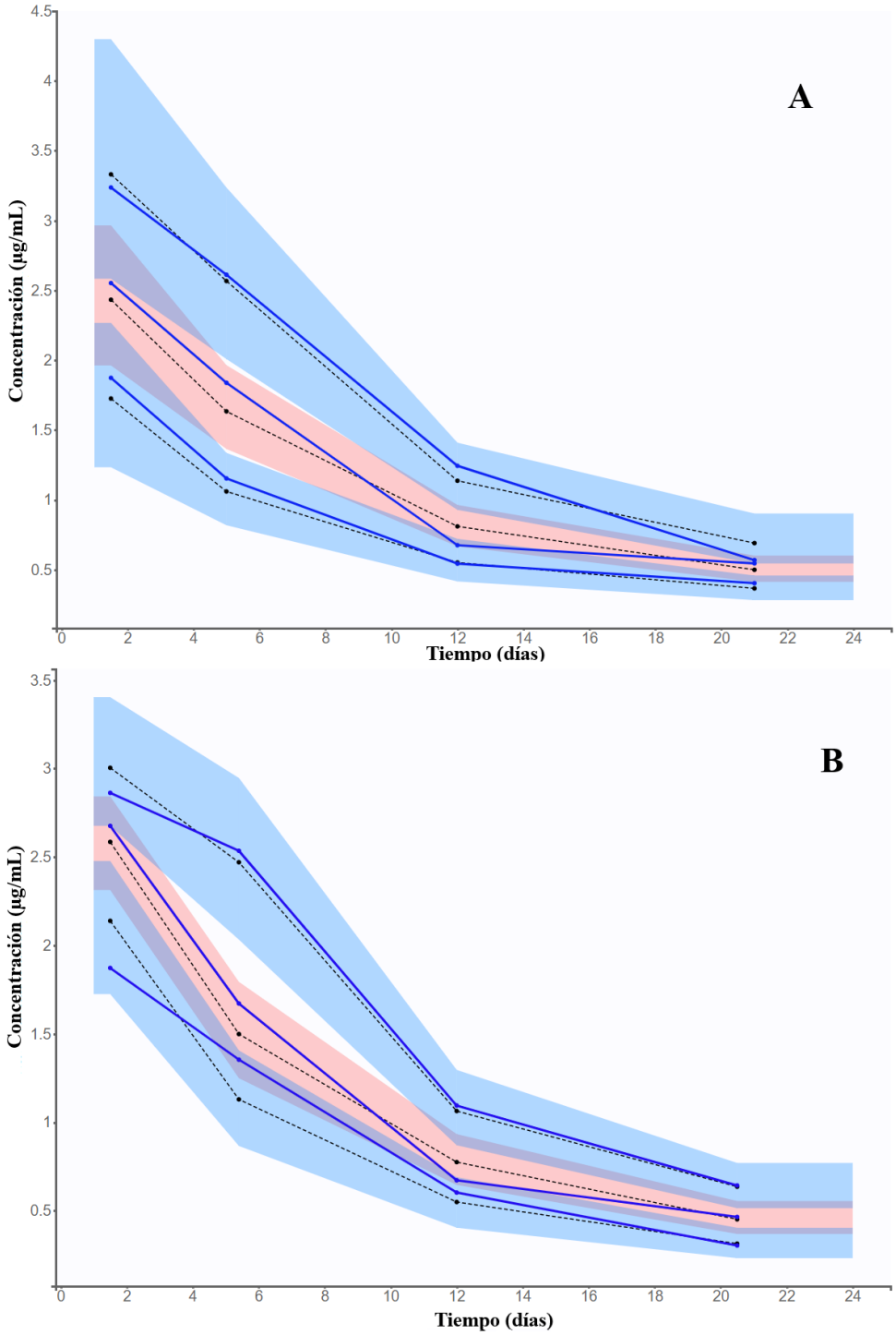


Figura 47. Gráficos de diagnóstico VPC de DEX en ojos con (A) y sin afaquia (B)

El VPC es una herramienta gráfica que evalúa si un modelo farmacocinético reproduce la tendencia central y la dispersión de los datos observados. Para construirlo, el programa genera numerosos conjuntos mediante simulaciones de Monte Carlo, respetando el diseño original del estudio. Las observaciones y los resultados producidos se agrupan por tiempos o intervalos (bins), dentro de los que se calculan los cuantiles correspondientes.

En general se presentan los percentiles 5, 25, 50, 75 y 95 %, siendo la mediana el corte central. Las bandas coloreadas muestran los intervalos predictivos estimados para cada cuantil simulado. En el gráfico, las líneas azules dan los valores empíricos 5, 50 y 95 %, mientras que las punteadas indican la referencia creada por el sistema. Una coincidencia razonable mediana/predicción respalda una descripción adecuada de la tendencia central.

Para valorar la variabilidad, cada percentil experimental debe contrastarse con la franja construida en su cuantil. La aparición de áreas rojas señala que alguna estimación quedó fuera del intervalo previsto a partir de las réplicas. Una desviación aislada puede deberse al escaso número de muestras, a un valor atípico o a imprecisión analítica. En cambio, discrepancias amplias o persistentes sugieren problemas en la estructura, el error residual o el patrón de variación interindividual. Por ello, este diagnóstico valora la dispersión total reproducida por el modelo, pero no identifica el origen de cada componente.

Por otro lado, es importante destacar que el error residual (diferencia entre lo predicho y lo medido experimentalmente) presente en ambos modelos fue de tipo proporcional, con valores de 0.19 y 0.14 (19 y 14 %) con RSEs de 15.50 y 15.70 (estimados de forma sólida). La mínima discrepancia existente se explica porque la facoemulsificación puede incorporar mayor heterogeneidad biológica al entorno de muestreo. Para continuar la discusión, de la misma manera que con los parámetros poblacionales, es importante tener en cuenta otra regla general con el fin de interpretar la viabilidad de los resultados.

Tabla 29. Criterios de aceptabilidad al estimar el error residual

Valor obtenido (%)	< 10	10 – 20	20 – 30	30 – 50	> 50
Aceptabilidad	Excelente	Muy bueno	Aceptable	Mediocre	Deficiente

Otro de los métodos visuales de diagnóstico empleados en este trabajo fue el gráfico comparativo entre observaciones individuales y predichas, el cual permite comprobar si existen puntos que se desvían significativamente de la tendencia ideal. En el caso de DEX, el porcentaje de *outliers* en ojos con y sin afaquia fue de solo 9.68 % y 12 % respectivamente. Estos valores van en línea con los bajos errores residuales estimados, lo cual resulta satisfactorio, si se considera que se analizaron cuatro animales por estudio.

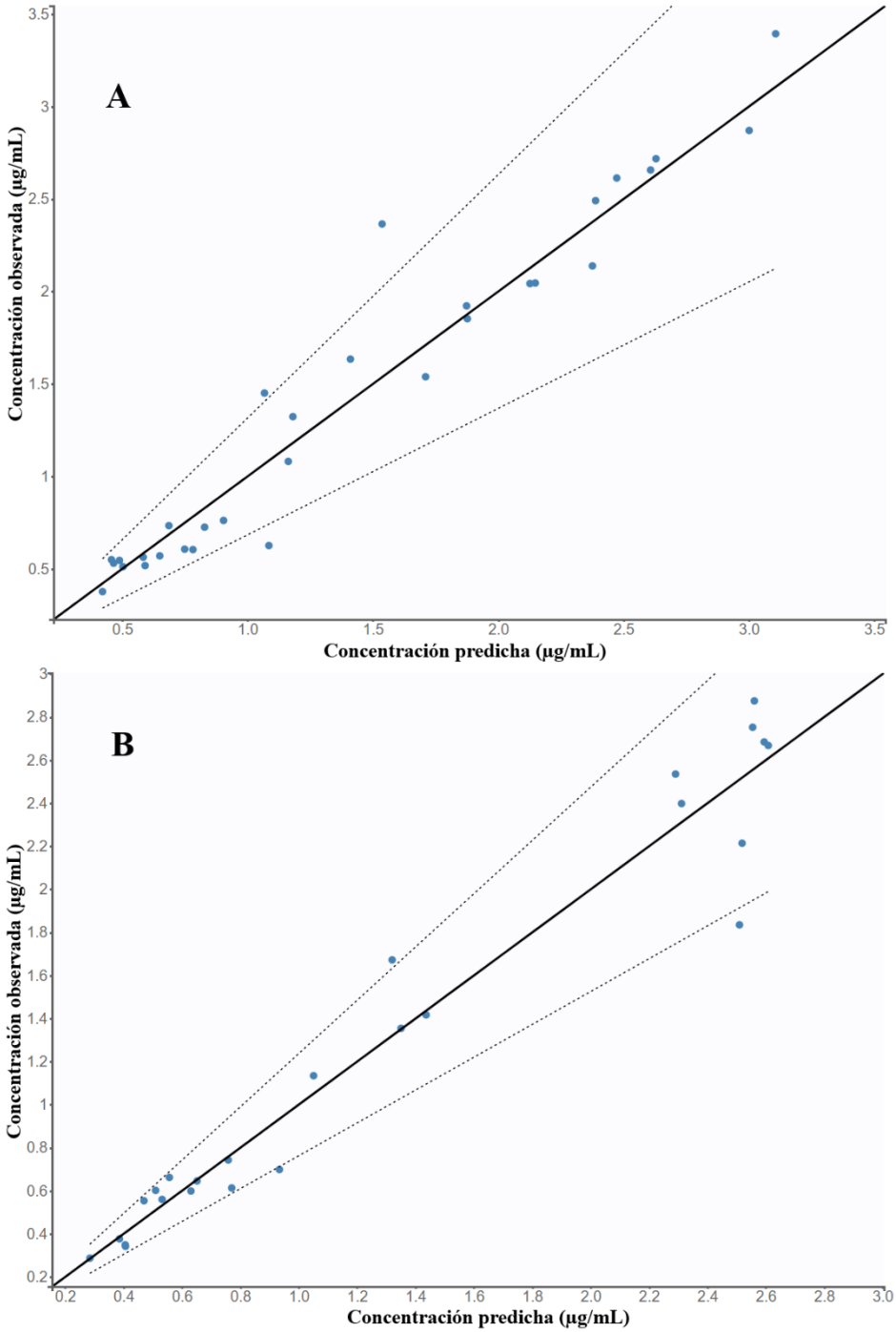


Figura 48. Observaciones para DEX en ojos con (A) y sin afaquia (B)

La recta negra sólida es la referencia de predicción ideal de los datos experimentales. Las líneas punteadas corresponden al intervalo de confianza definido por el error residual, el cual va expandiéndose por ser proporcional. En ambos casos solo unos pocos puntos caen por fuera del mismo (*outliers*). El siguiente paso fue extrapolar la estimación a un conjunto amplio de individuos virtuales, utilizando para ello el software Simulx®.

4.6.10 – Perfiles Poblacionales de DEX

Para comenzar con este estudio exploratorio, los parámetros farmacocinéticos del modelo de afaquia fueron exportados a Simulx®. Dicho software permite mediante simulaciones de Monte Carlo, evaluar la evolución de un sistema generando miles de individuos virtuales en base a la variabilidad de los datos experimentales. Así, es posible extender el estudio del perfil a un nivel poblacional. Se llevaron a cabo en total 10000 simulaciones de Monte Carlo explorando el comportamiento global de DEX desde el momento de colocación del inserto hasta el día 30, con un paso de muestreo de 0.10 d.

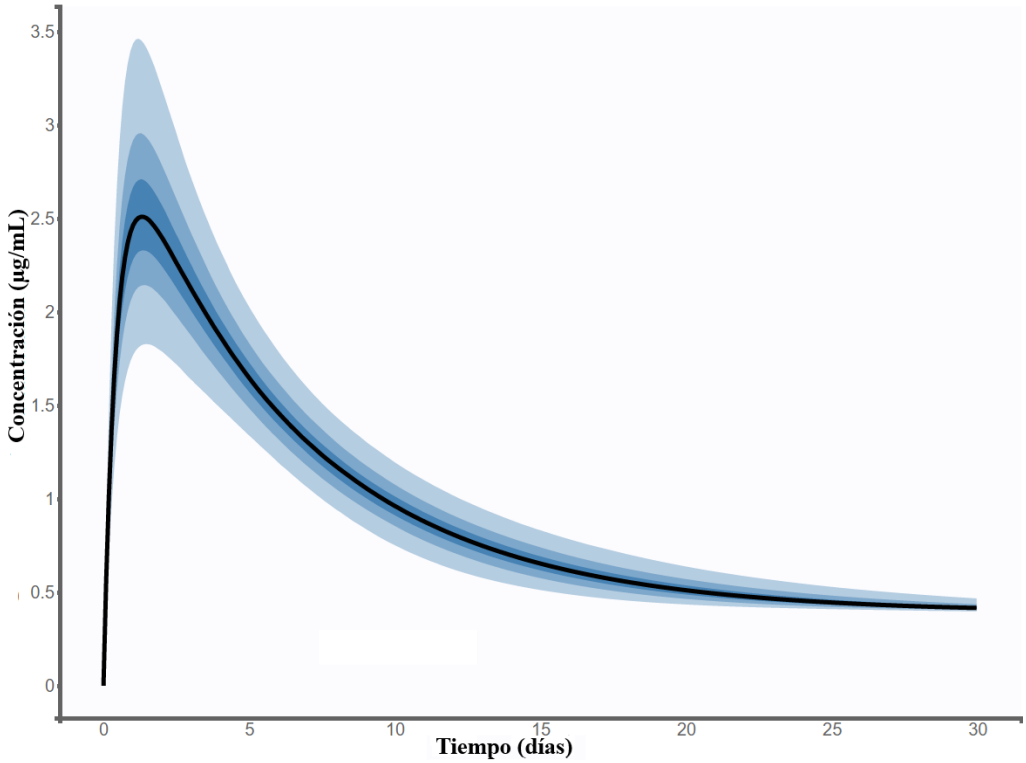


Figura 49. Perfil poblacional de DEX simulado para ojos con afaquia

El gráfico anterior presenta una descripción intuitiva del comportamiento de DEX en un entorno de facoemulsificación. En ese sentido, es importante explicar cómo interpretar lo que se observa. La curva negra central representa la mediana poblacional correspondiente a las 10000 simulaciones generadas por Simulx®. Por debajo de la línea se encuentra el 50 % de los individuos virtuales, y por encima el otro 50 %. Se puede decir entonces, que se trata del perfil poblacional representativo. Por otro lado, las bandas en tonos azulados representan los intervalos de predicción simulados y se distribuyen alrededor de la mediana (tres por debajo y también por encima de la misma). Comenzando desde la parte inferior, se trata de los percentiles 5 – 20, 20 – 35, 35 – 50, 50 – 65, 65 – 80, y 80 – 95 %.

Con los datos de las 10000 simulaciones, se efectuó un análisis no compartimental empleando el software PK Analix®. Los resultados indican que, $c_{máx} \approx 2.50$ µg/mL, y que $t_{máx} \approx 31$ horas. Esto supera ampliamente las concentraciones obtenidas por instilación de gotas oftálmicas, que en general llegan a ng/mL. A su vez, se correlaciona con la actividad observada en el experimento de uveítis con LPS. De hecho, el efecto antiinflamatorio de DEX ya es visible a partir de ≈ 390 ng/mL según bibliografía (Nehmé & Edelman, 2008).

Tomando ese dato como referencia, si se observa el perfil obtenido mediante Simulx®, resulta evidente que el fármaco se mantiene en concentraciones potencialmente terapéuticas en humor acuoso (al menos en la mayoría de la población evaluada) incluso 30 días tras la implantación en cámara anterior. Estos resultados permitieron consolidar un flujo de trabajo coherente, que luego fue aplicado a los datos obtenidos en ojos sanos.

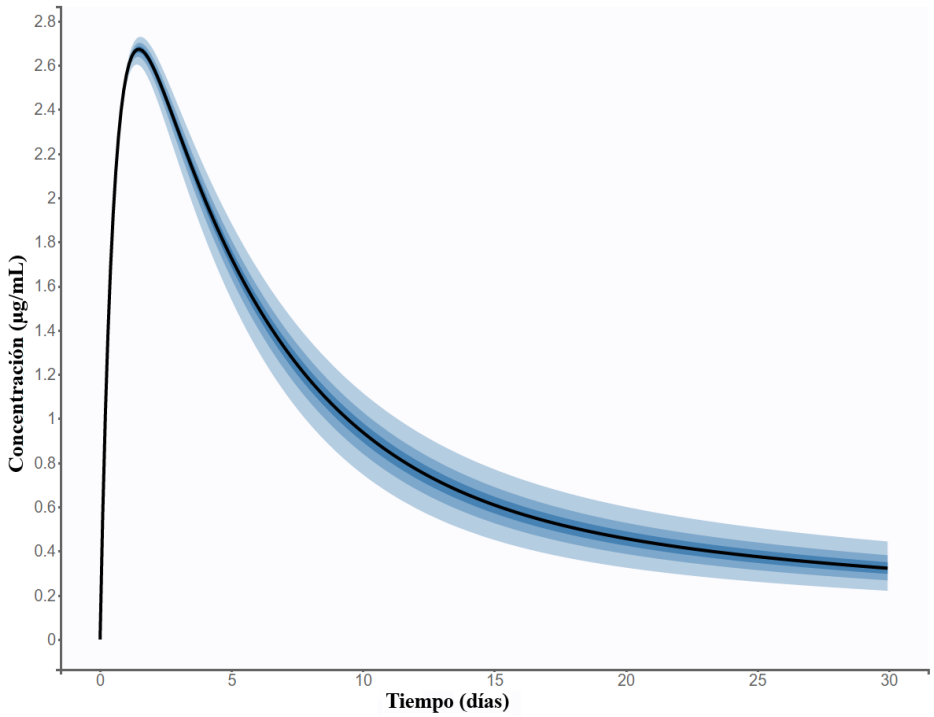


Figura 50. Perfil poblacional de DEX simulado para ojos sanos

Los resultados obtenidos a través de PK Analix® indican que, $c_{máx} \approx 2.70$ µg/mL, y que $t_{máx} \approx 36$ horas. Dado que ambos modelos ajustados generan valores similares, es posible concluir que el comportamiento farmacocinético de DEX no depende de la homeostasis intraocular. No obstante, sí parece evidente que la distorsión de este factor introduce gran variabilidad en los primeros días, como puede observarse en los percentiles simulados.

Para finalizar esta discusión sobre DEX, es importante resaltar que, alcanzar un modelo más robusto requiere una serie de mejoras. En primer lugar, lo ideal sería muestrear a tiempos menores a 24 horas. No obstante, el ojo es una zona especialmente sensible anatómicamente, y mucho más tras una facoemulsificación. Eso se debe a que la cirugía distorsiona de forma importante la homeostasis interna, afectando la producción de humor acuoso en los procesos ciliares y provocando además molestias relevantes en los conejos.

Por otro lado, si bien la presencia de DEX disminuye la inflamación, no la elimina por completo en 24 horas. En ese sentido, forzar la extracción de humor acuoso en estas condiciones, haría sufrir de forma innecesaria a los animales. La única alternativa viable sería destinar conejos específicos para la toma de muestra antes de las 24 horas. Así, se obtendrían puntos únicos que aportarían datos sobre la etapa de entrada del API. Otra mejora podría ser incrementar el número de conejos para reducir la variabilidad interindividual. Por último, también sería útil muestrear cada 24 horas desde el día tres.

4.6.11 – Modelos Farmacocinéticos para MOX HCl

En este caso, la gran mayoría de los puntos medidos a partir del día siete correspondieron a tomas en las que MOX HCl no pudo ser detectada. De hecho, solo una muestra de ese día presentó una concentración superior al LOQ = 0.074 µg/mL para la solución analizada mediante HPLC. En las restantes, hasta el día 24, no se observó señal cromatográfica. Por tanto, aunque estos registros se agruparon de forma general como por debajo del LOQ (BLQ), analíticamente eran inferiores a LOD = 0.022 µg/mL. Este perfil es compatible con una rápida disolución de MOX HCl y su posterior remoción desde el humor acuoso.

Sin embargo, la ausencia de señal pudo también deberse a la dilución necesaria para analizar cada muestra. En este punto es importante diferenciar los límites propios del procedimiento analítico, del umbral de censura utilizado en el modelo. El LOD y el LOQ del método HPLC fueron valores fijos, referidos a la concentración de la solución evaluada. No obstante, las muestras de humor acuoso se llevaron a un volumen final de 200 µL a partir de volúmenes de toma variables. En consecuencia, el límite equivalente en la muestra original fue diferente en cada registro y se calculó como $200/V_{toma}$. El valor no es un nuevo LOD instrumental ni una concentración medida. En sí, es un límite de censura expresado en igual escala que los valores determinados en humor acuoso.

La falta de señal observada para MOX HCl solo permitía afirmar que la concentración original cumplía $0 \leq c < LOD$, sin conocer su valor exacto. Por tal motivo, se utilizó el LOD, en lugar del LOQ. Si se hubiera detectado una respuesta analítica insuficiente para cuantificarla con precisión, el LOQ habría sido el límite superior más apropiado. Cada observación fue entonces incorporada en Monolix® como dato censurado, con un umbral específico según su factor de dilución. De esta forma, el programa incluyó durante el ajuste la probabilidad que la concentración se encontrara entre cero y dicho límite, en vez de asignarle un valor nulo o eliminarla del conjunto de datos. Esto permitió conservar la información aportada por las tomas sin señal. A su vez, redujo el sesgo que habría introducido su sustitución directa por cero. A continuación, se dan los datos procesados.

Tabla 30. Concentraciones de MOX HCl (µg/mL) en el estudio farmacocinético

Ojo	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Día 1	9.31	14.63	13.36	10.73	16.40	17.08	-	15.68
Toma (µL)	20	50	50	10	40	15	-	10
Día 2	5.42	10.11	5.58	7.28	13.11	9.84	-	12.23
Toma (µL)	50	20	50	50	50	10	-	10
Día 3	3.59	6.43	4.24	2.12	7.64	5.77	-	-
Toma (µL)	50	30	50	50	50	10	-	-
Día 7	2.72	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	-
Toma (µL)	20	50	30	10	50	50	50	-
Día 10	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	-	BLQ	BLQ
Toma (µL)	50	20	50	50	25	-	50	50
Día 14	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	-	BLQ	BLQ
Toma (µL)	50	25	50	50	50	-	50	50
Día 17	BLQ	-	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Toma (µL)	50	-	30	50	50	50	50	50
Día 24	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Toma (µL)	50	50	30	50	50	50	50	50

Esta situación ejemplifica la complejidad de incluir en una misma formulación dos APIs muy diferentes en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas: en términos farmacocinéticos pueden comportarse de manera muy distinta. En el caso de MOX HCl, el CL aparente parece muy marcado, tanto que hacia el día siete ya no se detecta el API en las alícuotas analizadas. Esta característica hizo que el muestreo propuesto no obtuviese suficientes datos para describir correctamente su entrada al humor acuoso, ni su etapa de eliminación.

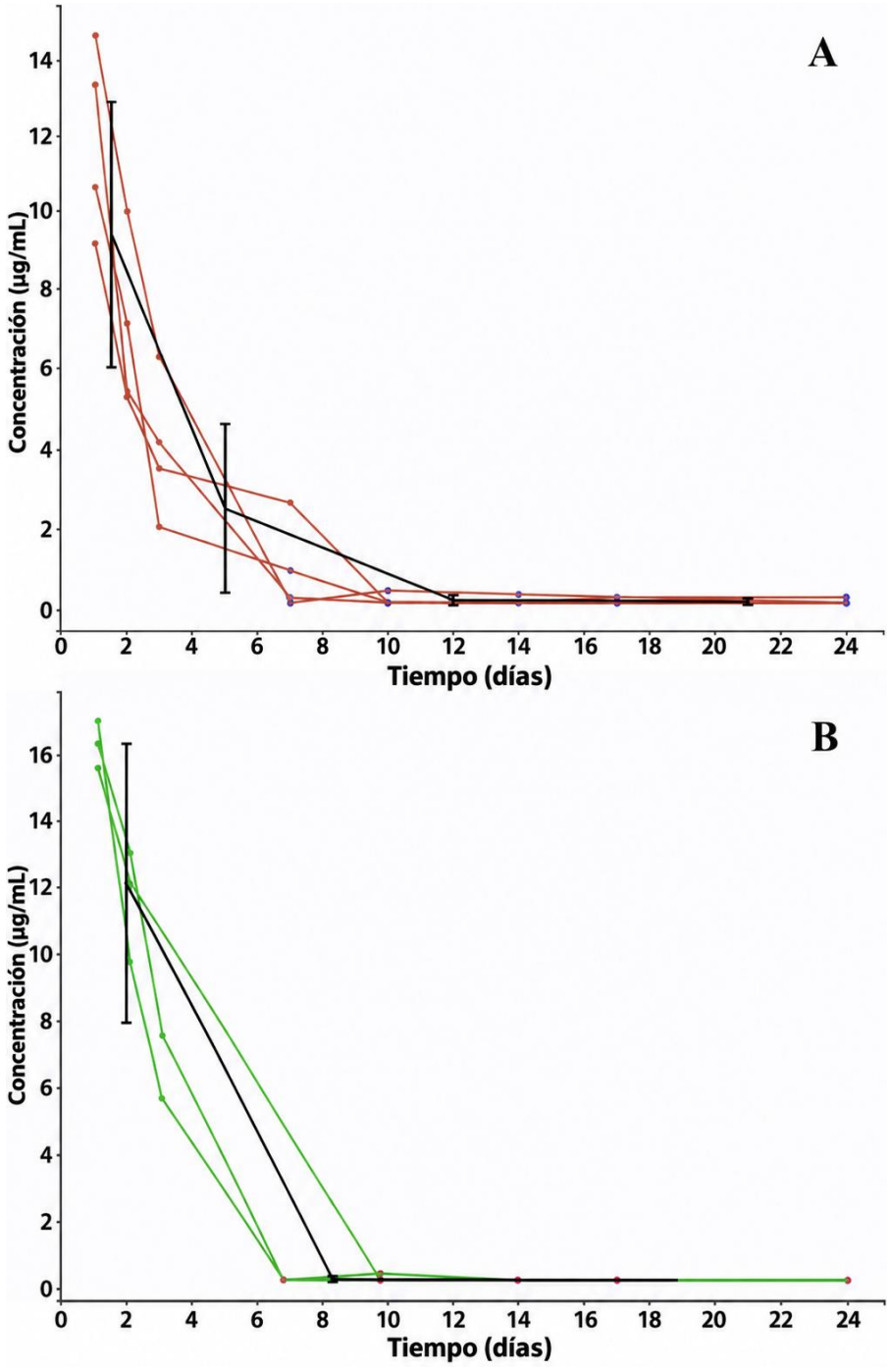


Figura 51. Datos crudos para MOX HCl en ojos con (A) y sin afaquia (B)

Un matiz a tener en cuenta al observar los gráficos, refiere a que los puntos marcados en azul corresponden a las tomas en las que no se detectó API (catalogados como BLQ). Por otro lado, en este caso no fue posible visualizar con tanta definición el cambio de pendiente típico de un modelo bicompartimental. Por lo tanto, fue necesario enfocar el ajuste de otra manera, teniendo en cuenta ese detalle observado en el gráfico.

En ese sentido, se optó por un modelo monocompartimental de administración extravasal sin tiempo de retraso, con absorción de primer orden y eliminación lineal. El error residual fue proporcional en ojos con afaquia, pero constante en los sanos. Por otro lado, la metodología de ajuste para MOX HCl fue levemente distinta a la empleada en el caso de DEX. Dado que el perfil monocompartimental consta de menos parámetros estructurales (k_a, V_D, CL), directamente se computaron todas las posibles opciones considerando configuraciones con tres, dos o incluso un único efecto aleatorio asociado. El modelo final se eligió como un consenso entre reducción del AIC, evaluación adecuada del VPC y calidad de estimación de los valores poblacionales. A continuación, se describen los resultados para MOX HCl (términos marcados con "-" no forman parte del ajuste).

Tabla 31. Parámetros poblacionales determinados para MOX HCl

Término	**k_a (d^{-1})**	**V_D (mL)**	**CL (mL/día)**	**ωk_a**	**ωV_D**	**ωCL**
Afaquia	1.18	40.04	33.04	-	-	0.35
Sano	2.10	27.80	20.74	0.74	0.26	-
RSE (%)	33.20	35.20	23.40	-	-	40.90
	48.10	16.80	1.03	43.10	60.20	-
Error residual en ojos con afaquia: Proporcional = 0.50 con RSE (%) = 19.50 % Error residual en ojos sanos: Constante = 0.17 con RSE (%) = 16.70 %						

Los modelos ajustados permitieron describir los perfiles farmacocinéticos de MOX HCl razonablemente, incluso en presencia de varios puntos censurados y sin haber capturado adecuadamente la etapa inicial de entrada al humor acuoso. No obstante, no todos los parámetros fueron estimados con igual precisión. En particular, en ojos afáquicos k_a presentó un RSE de 33.20 %, y CL de 35.20. En los sanos, 47.40 % fue el RSE de k_a. Por tanto, las diferencias asociadas a estos parámetros deben interpretarse con cautela.

En primer lugar, k_a fue aproximadamente 44 % menor tras la cirugía, pasando de 2.10 a 1.18 día^{-1}. En este contexto, k_a representa la velocidad efectiva de aparición del API en el humor acuoso y no la fracción total disponible. Por ello, su disminución sugiere una entrada aparente más lenta desde el inserto, pero no demuestra que una menor cantidad de API haya alcanzado la cámara anterior. Este resultado también pudo estar influido por la falta de muestras tempranas y por la correlación entre los parámetros del modelo.

Por otro lado, V_D aumentó aproximadamente 30 %, mientras que CL pasó de 20.74 a 33.04 mL/día, lo que representa un incremento cercano a 59 %. Sin embargo, ambos parámetros crecieron casi en la misma proporción. Como consecuencia, la constante de eliminación CL/V_D bastante similar en ambas condiciones estudiadas: 0.75 día^{-1} en ojos sanos y 0.82 día^{-1} en aquellos que recibieron una operación de cataratas.

Las semividas estimadas también resultaron muy similares para ambos casos, con valores de 0.93 y 0.84 días, respectivamente. Por tanto, los resultados no indican una modificación sustancial de la velocidad de eliminación terminal. Esta cinética relativamente rápida es consistente con la ausencia de señal a partir del día siete, aunque dicha observación no debe atribuirse únicamente al valor absoluto de CL.

El aumento proporcional de V_D y CL podría reflejar un cambio en la fracción de la dosis nominal representada en el compartimento muestreado. Si esta fuera menor tras la facoemulsificación, ambos parámetros aumentarían sin modificar el cociente CL/V_D. Una posible explicación sería que la extracción del cristalino facilitara el acceso de MOX HCl a otras estructuras intraoculares, reduciendo su representación relativa en el humor acuoso. Dicho de otra manera, en esta situación podría estar ocurriendo una redistribución localizada muy rápida, tanto que no se estaría identificando un nuevo compartimiento.

No obstante, al tratarse de un modelo monocompartimental sin mediciones tisulares, lo anterior constituye una hipótesis compatible con los resultados, pero no un proceso demostrado directamente. En consecuencia, los datos sugieren que la facoemulsificación modifica la entrada efectiva y la escala aparente de distribución de MOX HCl, mientras que su velocidad terminal permanece esencialmente constante. A continuación, se presentan los VPC generados con el modelo ajustado para ojos con y sin afaquia.

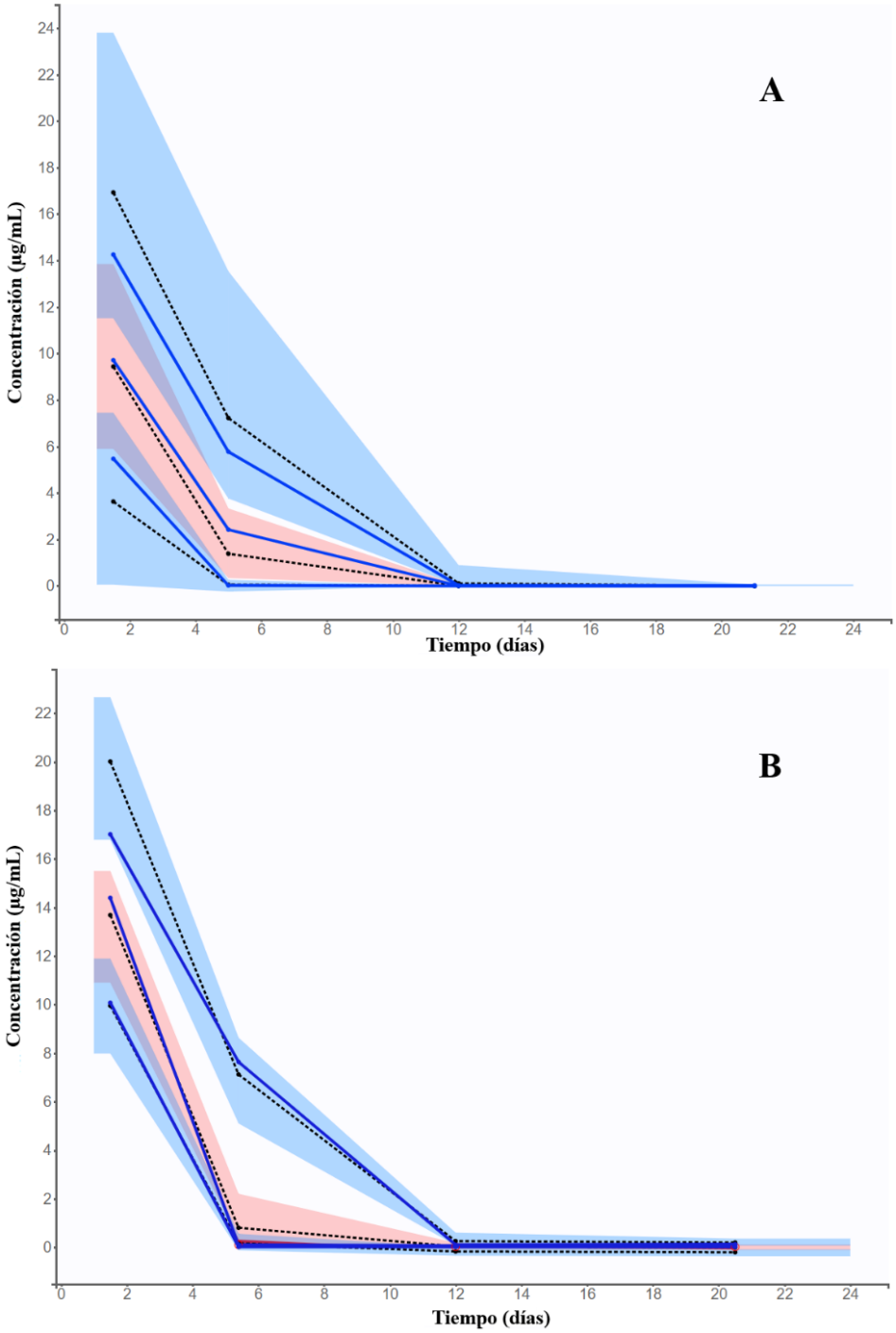


Figura 52. Gráficos de VPC de MOX HCl en ojos con (A) y sin afaquia (B)

En el VPC del modelo asociado a facoemulsificación, puede observarse una correcta reproducción de la tendencia central de los percentiles empíricos. Esto es lo esperado con un ajuste adecuado. No obstante, existe para los ojos sanos una mínima zona problemática asociada a los tiempos a los cuales se concentran los puntos BLQ. Pese a este detalle, el modelo también reproduce muy bien su tendencia central. A continuación, se presentan a su vez los gráficos comparativos entre observaciones y predicciones individuales.

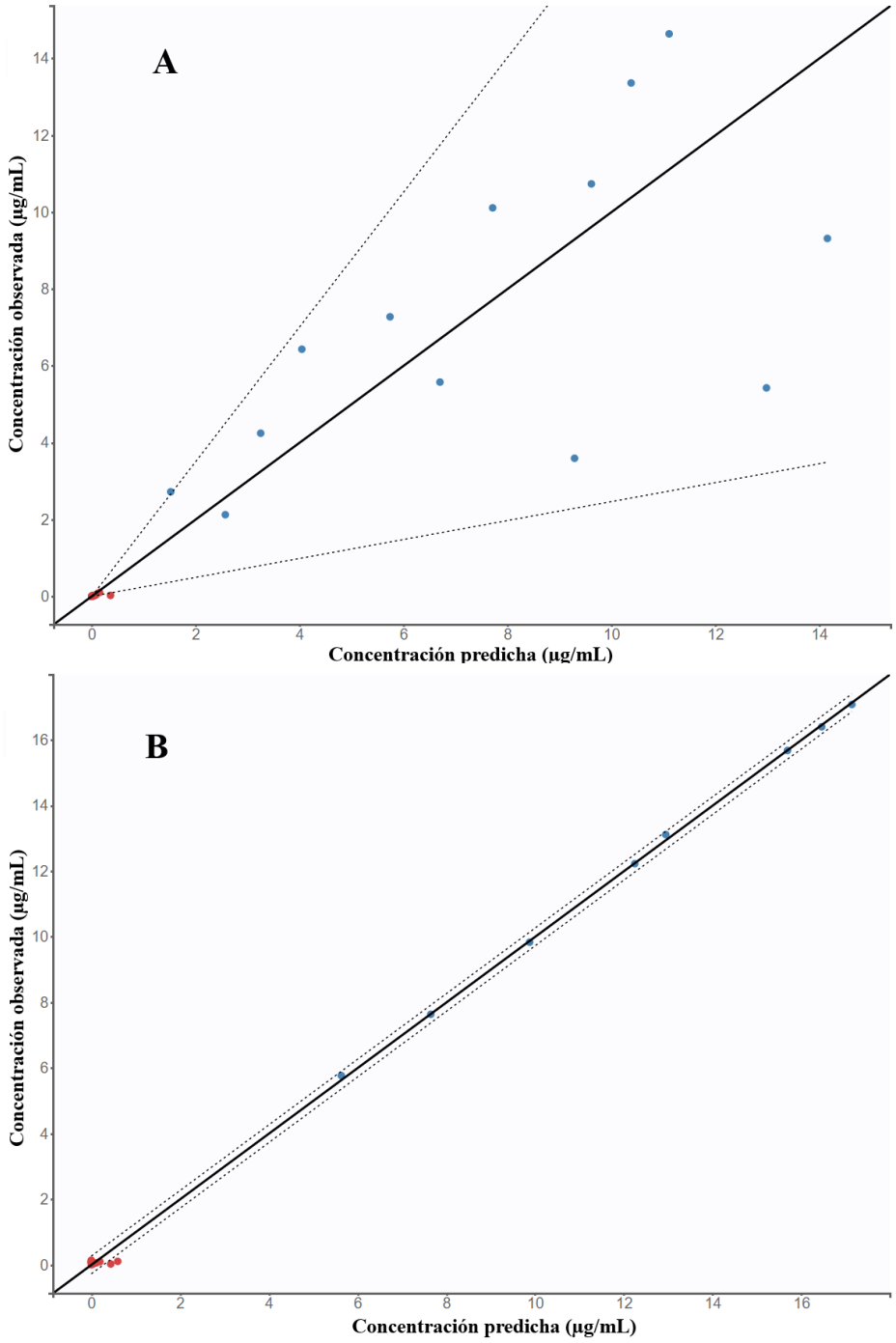


Figura 53. Observaciones para MOX HCl en ojos con (A) y sin afaquia (B)

En este caso, es visible una vez más el efecto de la facoemulsificación en la dinámica intraocular del humor acuoso, introduciendo gran variabilidad en los datos del modelo asociado a la cirugía de cataratas. En esta situación, la cantidad de *outliers* detectados fue de 9.68 %. Por otro lado, el intervalo presentado para ojos sanos es mucho más estrecho, y las observaciones se encuentran prácticamente sobre la recta ideal. Esto se debe al error constante seleccionado, pero no puede descartarse la propia calidad del modelo.

No obstante, se debe siempre considerar la posibilidad de un sobreajuste. Al observar los parámetros poblacionales reportados en el modelo, el único término con RSE muy bajo fue CL (1.03 %). Por el contrario, k_a, V_D y el error residual presentaron valores razonables, mientras que para los efectos aleatorios RSE fue algo elevado. Esto reduce significativamente la probabilidad de que el resultado observado sea sobreajuste.

4.6.12 – Perfiles Poblacionales de MOX HCl

Terminada la determinación de los parámetros del modelo, la siguiente etapa del flujo de trabajo actual corresponde a la evaluación de resultados para ojos afáquicos con Simulx®, estudiando en total 10000 individuos virtuales hasta el día 30, con un paso de muestreo de 0.10 d. En el caso de MOX HCl, este punto permite conocer los tiempos durante los cuales el API se encuentra en la ventana terapéutica ejerciendo su efecto antibiótico.

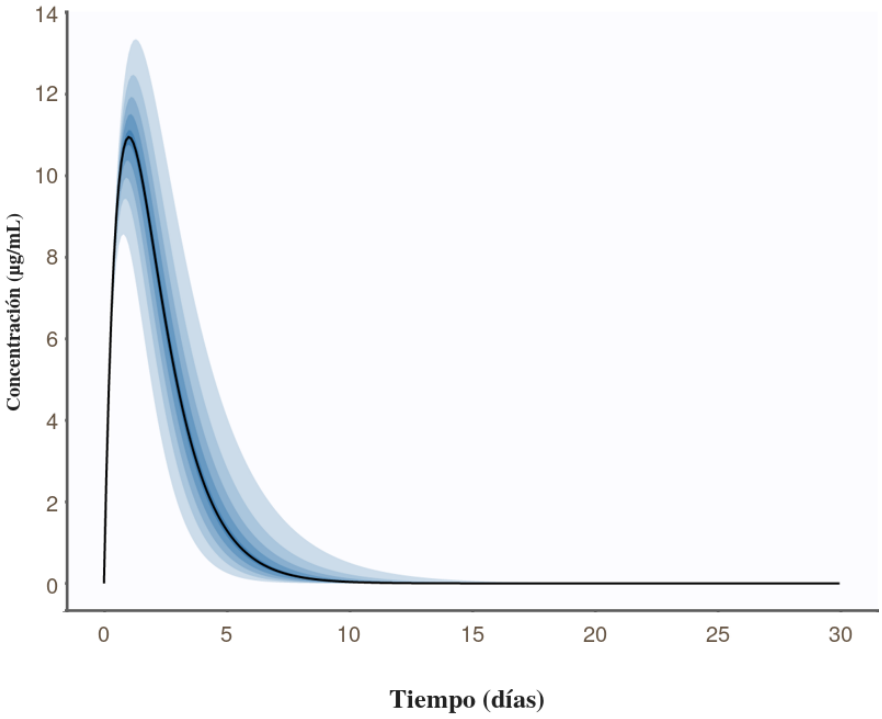


Figura 54. Perfil poblacional de MOX HCl simulado para ojos con afaquia

Según PK Analix® la mediana del pico de $c_{máx}$ fue de 10.86 µg/mL y se alcanzó en un $t_{máx}$ de 24 horas. A su vez, nótese cómo el modelo logra (aún con la variabilidad incorporada por la afaquia) describir correctamente el comportamiento observado *in vivo* (marcado descenso de la concentración hasta caer a niveles no cuantificables a partir del día 7). Todo lo anterior tiene implicancias importantes en la actividad antibiótica.

Como ya se mencionó, muchas de las bacterias patógenas implicadas en endoftalmitis presentan $MIC_{90} \leq 8$ µg/mL. Según la mediana del modelo de afaquia, la ventana terapéutica respecto los microorganismos más resistentes del rango se extiende entre ≈ 10 y 49 horas tras la implantación. A su vez, la concentración permanece por encima del MIC_{90} por más de cinco días para las bacterias más susceptibles. Esto coincide con la duración usualmente establecida en tratamientos antibióticos convencionales.

No obstante, los resultados indican que, en afaquia sería poco probable alcanzar exposiciones suficientes para cubrir microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus* con $MIC_{90} \geq 16$ µg/mL. Por otro lado, el hecho de que ningún ojo inoculado con ATCC 27853 desarrollase endoftalmitis sugiere que, esta cepa resultó susceptible a MOX HCl. Para finalizar, se evaluará el perfil de 10000 individuos virtuales mediante Simulx® en ojos sanos, hasta el día 30 con paso de muestreo de 0.10 d.

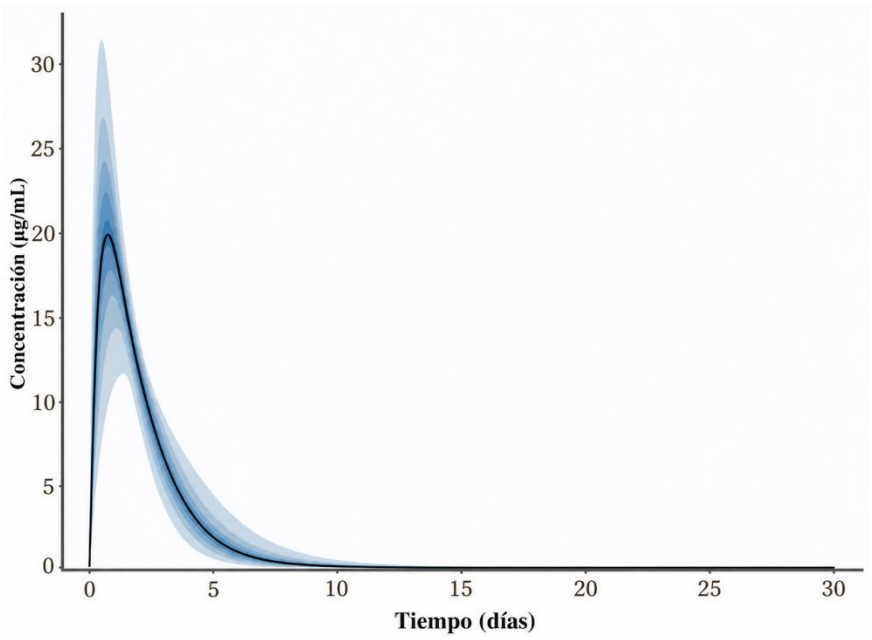


Figura 55. Perfil poblacional de MOX HCl simulado para ojos sanos

En este modelo destaca nuevamente la correcta representación de la rápida eliminación del API desde el humor acuoso. Por otro lado, es visible una diferencia de variabilidad si se compara con el perfil de ojos con afaquia inducida. Claramente, aquellos que conservan el cristalino presentan bandas percentiles más estrechas en la simulación. Asimismo, una vez exportados los datos y procesados mediante el software PK Analix®, se determinó que el pico de $c_{máx}$ fue de 19.52 µg/mL y se alcanzó en un $t_{máx}$ de 19.20 horas.

Por un lado, $c_{máx}$ fue más elevada en los ojos sanos que en aquellos con afaquia. Por otro, la entrada del API al humor acuoso ocurrió más rápidamente. Este comportamiento es compatible con una mayor permanencia inicial del API en la cámara anterior, lo cual podría favorecer el desempeño antibiótico del inserto. Según Simulx®, la concentración correspondiente a la mediana poblacional superaría una MIC_{90} de 16 μg/mL aproximadamente entre las 8.40 y 31.70 horas posteriores a la inserción.

Por otro lado, los valores objetivo convencionales de AUC/MIC_{90} y $c_{máx}/MIC_{90}$ establecidos a partir de concentraciones sistémicas pueden no ser suficientes. En este caso, la administración dentro de un espacio anatómico restringido evita la dilución sistémica y mantiene un contacto local prolongado. Además, los cocientes calculados a partir del humor acuoso no representan necesariamente la exposición alcanzada en todas las estructuras intraoculares. En ese sentido, el resultado biológico constituye una evidencia más directa: el inserto previno la infección en el 100 % de los ojos tratados. No obstante, el 100 % de los controles desarrolló endoftalmitis fulminante.

Esto sugiere que, en las condiciones del ensayo, la exposición fue suficiente para impedir el establecimiento de la infección por *Pseudomonas aeruginosa*, incluso cuando el implante y el inóculo se localizaron en regiones anatómicas diferentes. La baja carga no resta relevancia al resultado, ya que este microorganismo presenta una elevada virulencia intraocular y puede multiplicarse rápidamente a partir de pocas unidades.

Finalmente, debe considerarse que, en la práctica, el inserto se utilizaría en ojos pseudofáquicos, luego de colocar un LIO. Aunque sería esperable un perfil intermedio entre los modelos sano y afáquico, una LIO no restituye el volumen ni la función de barrera del cristalino. Por ello, la farmacocinética podría aproximarse más a la condición afáquica o presentar características propias, sin ser necesariamente un consenso.

A futuro sería interesante evaluar estos perfiles tras reemplazar el cristalino por una LIO comercial. Dicho proyecto requerirá poner a punto un nuevo modelo animal, adaptar la técnica de colocación y verificar su reproducibilidad. También resultaría conveniente estudiar la exposición sistémica luego de implantar el sistema, especialmente para descartar concentraciones plasmáticas de DEX capaces de producir efectos adversos.

5 – CONCLUSIONES

5.1 – Puntos Clave

5.1 – Formulación objetivo

En el presente trabajo de tesis se desarrolló exitosamente una plataforma de insertos intraoculares biodegradables destinada a la liberación prolongada de DEX y MOX HCl en cámara anterior. Aplicando la metodología QbD, se diseñó un sistema farmacéutico en presentación conjunta, orientado a proporcionar simultáneamente protección antiinflamatoria y antibiótica posterior a una operación de cataratas. En ese sentido, una de las ventajas de la formulación es que permitiría sustituir la administración usual de gotas, lo cual incrementaría significativamente la adhesión del paciente.

5.2 – Proceso de fabricación

Como parte de este desarrollo, se obtuvieron insertos por HME mediante una metodología reproducible y escalable. Asimismo, se estandarizaron las condiciones de fabricación, seleccionándose una temperatura de trabajo de 150 °C y una velocidad de rotación de tornillos de 280 rpm, parámetros que permitieron preservar la integridad fisicoquímica de los APIs y favorecer una adecuada mezcla con la matriz polimérica de PLGA.

5.3 – Controles de calidad

Se desarrollaron y validaron métodos cromatográficos por HPLC para cuantificar ambos APIs tanto en la formulación terminada como en muestras procedentes de matrices biológicas. Esto permitió implementar un conjunto de procedimientos de dosificación: homogeneidad del polvo de alimentación, UC, y liberación *in vitro* e *in vivo*. Asimismo, se caracterizó la formulación con técnicas instrumentales avanzadas como CRM, DSC, SEM y XRD. De esta manera, se determinó la adecuada incorporación y distribución de los fármacos en la matriz y la ausencia de modificaciones fisicoquímicas relevantes.

5.4 – Evaluación de la estabilidad

En primer lugar, se determinó que el proceso de esterilización no compromete de forma relevante el desempeño de los insertos. Por otro lado, los estudios de estabilidad natural demostraron que los implantes mantienen sus principales atributos de calidad durante al menos 12 meses bajo refrigeración. Estos resultados aportan evidencia favorable respecto a la viabilidad de almacenamiento y conservación del sistema desarrollado.

5.5 – Estudios *in vivo*

Desde el punto de vista biológico, se logró adaptar y validar distintos modelos animales en conejos para el estudio de IPO, uveítis y endoftalmitis bacteriana. Tal enfoque permitió comprobar experimentalmente que los insertos presentan una adecuada actividad antiinflamatoria y antibiótica *in vivo*. Este punto es de gran importancia, puesto que, se valida el desarrollo realizado, al demostrarse que el sistema conserva sus propiedades farmacológicas en el modelo animal y genera los efectos terapéuticos esperados.

En particular, la liberación sostenida de DEX permitió reducir significativamente la respuesta inflamatoria ocular, acortando el tiempo requerido para retornar al estado basal en los conejos. Por otro lado, la presencia de MOX HCl proporcionó protección efectiva frente a la infección con *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando un comportamiento comparable al tratamiento antibiótico convencional utilizado como referencia.

5.6 – Perfiles farmacocinéticos

Se llevó a cabo una caracterización exploratoria mediante modelos matemáticos poblacionales basados en la metodología NLME. En ese sentido, se obtuvieron estimaciones preliminares de los perfiles farmacocinéticos de ambos APIs en el medio intraocular. A partir de dichos modelos fue posible realizar simulaciones poblacionales que permitieron estimar perfiles de concentración representativos, y parámetros relevantes tales como $c_{máx}$ y $t_{máx}$, que permiten caracterizar el comportamiento del sistema. Los resultados obtenidos sugieren que la plataforma implantable desarrollada es capaz de alcanzar y mantener concentraciones intraoculares compatibles con actividad terapéutica antiinflamatoria y antibiótica, durante intervalos de tiempo prolongados.

5.7 – Resumen final

En conjunto, en esta tesis de doctorado se desarrolló una estrategia integral para el diseño, fabricación, caracterización, control de calidad y evaluación preclínica de una plataforma de insertos intraoculares biodegradables de liberación prolongada. Los resultados obtenidos constituyen una base sólida de cara a futuras etapas de optimización, validación y eventual transferencia tecnológica, aportando además conocimiento original sobre el comportamiento farmacotécnico, farmacocinético y biológico de sistemas implantables orientados al tratamiento y prevención de complicaciones oftalmológicas postquirúrgicas.

Más allá de la formulación lograda, el principal aporte del trabajo radica en haber demostrado la viabilidad tecnológica de desarrollar insertos intraoculares biodegradables contemplando la liberación combinada de DEX y MOX HCl en cámara anterior. A esto se suman su perfil de desempeño favorable en modelos animales y su potencial para alcanzar concentraciones compatibles con actividad antiinflamatoria y antibiótica.

Un aspecto particularmente relevante de esta tesis es que constituye, hasta donde se pudo constatar el primer desarrollo en Uruguay de una forma farmacéutica obtenida mediante HME con fines terapéuticos. Esto representa un aporte que introduce localmente una tecnología de manufactura avanzada, consolidada a nivel internacional y cada vez más importante en el diseño de sistemas modernos de administración de fármacos.

A diferencia de muchas técnicas convencionales, la HME permite procesar mezclas sólidas sin recurrir al uso de solventes, y favorece también la obtención de matrices homogéneas. A su vez, puede utilizarse para desarrollar diversas formulaciones de liberación modificada, incluyendo implantes, películas, filamentos y otros dispositivos cargados con fármacos. Además, su carácter continuo y escalable la ubica dentro de las estrategias promovidas internacionalmente como una alternativa de producción confiable.

En este contexto, la tesis contribuye a instalar capacidades científicas y tecnológicas nacionales en un área de clara relevancia estratégica, abriendo una línea de trabajo con proyección hacia otros sistemas terapéuticos de liberación prolongada y plataformas combinadas. Asimismo, los resultados obtenidos aportan conocimiento sobre la relación entre composición, procesamiento y comportamiento fisicoquímico de dispositivos implantables biodegradables destinados a la administración intraocular de fármacos.

Desde esta perspectiva, uno de los aportes centrales de la tesis radica en haber adaptado una tecnología de frontera al desarrollo de una forma farmacéutica no convencional, biodegradable y con doble carga terapéutica. El trabajo requirió integrar criterios de formulación, procesabilidad, control de calidad, caracterización fisicoquímica, desempeño *in vitro*, respuesta *in vivo* y modelado farmacocinético. Por tanto, la tesis representa no solo un avance en el desarrollo de insertos intraoculares, sino también un precedente nacional para la aplicación de HME en tecnología farmacéutica.

5.8 – Perspectivas Futuras

Los resultados obtenidos establecen una prueba de concepto favorable para la utilización de implantes biodegradables de DEX y MOX HCl en cámara anterior. No obstante, será necesario ampliar el número de lotes. Esto permitirá establecer rangos de aceptación más robustos para los controles de calidad, en particular en cuanto a contenido y uniformidad de los APIs, las propiedades físicas de los insertos y sus perfiles de liberación.

Asimismo, deberá profundizarse el estudio de las condiciones de procesamiento que favorecen la formación de 17-oxodexametasona, y también caracterizar el fenómeno transitorio de aparición de la pseudomembrana observado luego de la implantación. Para ello, sería conveniente realizar un seguimiento más frecuente durante las primeras horas y, cuando resulte posible, recuperar muestras del material y efectuar estudios histológicos.

Desde el punto de vista preclínico, será importante evaluar el implante en un modelo de pseudofaquia que incluya la colocación de un lente intraocular. Esta condición representa con más fidelidad la situación clínica quirúrgica. En este contexto, la monitorización de la PIO deberá extenderse temporalmente y contemplar un mayor número de animales de experimentación. También sería conveniente complementar la evaluación clínica con estudios histopatológicos de la malla trabecular, la córnea y otras estructuras.

La caracterización farmacocinética constituye otra línea prioritaria. Para mejorar los modelos poblacionales será necesario incrementar el número de individuos, obtener muestras antes de las 24 horas y aumentar la densidad de muestreo durante los primeros días. Estas modificaciones permitirían caracterizar mejor las etapas de liberación y distribución de ambos APIs. También será de interés determinar sus concentraciones en sangre después de la implantación, con el propósito de estimar la exposición sistémica y descartar picos asociados a posibles efectos adversos, particularmente en el caso de DEX.

Finalmente, la experiencia adquirida en el desarrollo y procesamiento de estos insertos establece una plataforma tecnológica que puede extenderse más allá de la formulación estudiada. La HME podría aplicarse a otros principios activos con baja biodisponibilidad o que requieran una administración local prolongada, adaptando la composición polimérica y las condiciones de trabajo a sus propiedades fisicoquímicas.

6 – ANEXOS

6.1 – Tratamiento Estadístico de los Datos Experimentales

6.1.1 – Generalidades

- Se consideraron réplicas genuinas en las determinaciones.
- Se empleó el software Minitab 20.3 (LLC, USA) para cálculos estadísticos.
- Se planteó H_0 y H_A con $\alpha = 0.05$ (95 % de confianza), rechazándose H_0 si $p < \alpha$.
- Si $n > 30$, se estudió normalidad mediante el test de Ryan-Joiner (TRJ).
- Antes de comparaciones de medias, se aplicó TRJ y se verificó homocedasticidad.
- Este último punto se evaluó utilizando el Test de Bartlett o Levene, según el caso.

6.1.2 – Detección de Outliers

- Los datos se excluyeron por única vez, a partir de medidas experimentales.
- Si $n > 30$ y muestra normal, aplicación del test de Grubbs.
- Si $n \leq 30$ o caso no paramétrico, exclusión de puntos fuera del rango $M_x \pm 1.5IQR$.

6.1.3 – Tests de Hipótesis

- Prueba t de Student para datos normales y/o que cumplen homocedasticidad.
- Si $n \leq 30$ o caso no paramétrico, test de Sign o Mann-Whitney (comparativa).

6.1.4 – ANOVA

- Si $n \leq 30$, test de Friedman o Kruskal-Wallis + prueba de Dunn *a posteriori*.
- Si $n > 30$, ANOVA + *post hoc* (Tukey o Games-Howell según homocedasticidad).
- Se verificó la normalidad de los residuales al final del estudio.
- En caso de no cumplimiento, transformación de datos con LOG_{10} y reanálisis.
- Si continuó disonancia de residuales, test de Kruskal-Wallis + *post hoc* de Dunn.

6.1.5 – Incertidumbre de los Resultados

- Error para instrumentos digitales: Apreciación/$2\sqrt{3}$.
- Incertidumbre de promedios o réplicas experimentales: $t_{\alpha/2,n-1}s/\sqrt{n}$ con $\alpha = 0.05$.
- Error de material volumétrico: Valor informado/1.96 (considerando $\alpha = 0.05$).
- Propagación de incertidumbres: $U = 1.96\sqrt{(\partial h/\partial x)^2\sigma_x^2 + (\partial h/\partial y)^2\sigma_y^2 + (\partial h/\partial z)^2\sigma_z^2}$.

6.2 – Cálculos para Validación Analítica *In Vitro*

6.2.1 – <u>Pipetas Automáticas</u>

$d_{solución} = m_{solución}/V_{matraz} \rightarrow V_{vertido} = m_{toma}V_{matraz}/m_{solución}$. Se halla el porcentaje de desviación del valor nominal como $100\left|(V_{TP} - \overline{V}_{vertido})/V_{TP}\right|$ y la tasa de evaporación del solvente. A partir de allí, se genera una curva de calibración para los volúmenes reales.

<u>Términos de derivadas modificados para la densidad</u>:

1)$\partial^2 m_{toma} = (1/V_{matraz})^2\sigma^2_{m_{toma}}$, con $\sigma_{m_{toma}} = 1 \times 10^{-6}/2\sqrt{3}$ g.

2)$\partial^2 V_{matraz} = (-m_{toma}/V^2_{matraz})^2\sigma^2_{V_{matraz}}$, con $\sigma_{V_{matraz}} = 0.06/1.96$ mL.

<u>Términos de derivadas modificados para el volumen vertido</u>:

1)$\partial^2 m_{toma} = (V_{matraz}/m_{solución})^2\sigma^2_{m_{toma}}$, con $\sigma_{m_{toma}} = 1 \times 10^{-6}/2\sqrt{3}$ g.

2)$\partial^2 V_{matraz} = (m_{toma}/m_{solución})^2\sigma^2_{V_{matraz}}$, con $\sigma_{V_{matraz}} = 0.06/1.96$ mL.

3)$\partial^2 m_{solución} = (-m_{toma}V_{matraz}/m^2_{solución})^2\sigma^2_{m_{solución}}$, con $\sigma_{m_{solución}} = 1 \times 10^{-6}/2\sqrt{3}$ g.

6.2.2 – <u>Solución de Prueba para Lavados</u>

100 mg de DEX (c = 1 mg/mL) y 500 mg de MOX HCl (c = 5 mg/mL) se disolvieron en 10 mL de FM. Dichas concentraciones de referencia, fueron 10 veces mayores que las del punto más alto de la curva de calibración de GII. Esto permite asegurar con alta probabilidad que, la no detección tampoco sucederá en condiciones normales.

6.2.3 – <u>Estándares y otras Soluciones para Dosificación *In Vitro*</u>

<u>GI nivel bajo</u>: 12.50 mg DEX + 62.50 mg MOX HCl en 25 mL (0.50 y 2.50 mg/mL) → si $c_iV_{TSTD} = c_fV_f \rightarrow$ para $V_f = 10$ mL con $V_{TSTD} = 20$ µL → $c_f = 1$ y 5 µg/mL.

<u>GI nivel medio</u>: 12.50 mg DEX + 62.50 mg MOX HCl en 25 mL (0.50 y 2.50 mg/mL) → si $c_iV_{TSTD} = c_fV_f \rightarrow$ para $V_f = 10$ mL con $V_{TSTD} = 200$ µL → $c_f = 10$ y 50 µg/mL.

<u>GI nivel alto</u>: 12.50 mg DEX + 62.50 mg MOX HCl en 25 mL (0.50 y 2.50 mg/mL) → si $c_iV_{TSTD} = c_fV_f \rightarrow$ para $V_f = 10$ mL con $V_{TSTD} = 400$ µL → $c_f = 20$ y 100 µg/mL.

Preparación de SM: Los matraces de 10 mL de GII deben contener 0.20 mg/mL de PLGA y un 10 % de acetona. Esto se logra tomando 1 mL de SM con 20 mg/mL del polímero.

GII nivel bajo: 12.50 mg DEX + 62.50 mg MOX HCl en 25 mL (0.50 y 2.50 mg/mL) → si $c_i V_{TSTD} = c_f V_f$ → para $V_f = 10$ mL con $V_{TSTD} = 200$ µL → $c_f = 10$ y 50 µg/mL.

GII nivel medio: 12.50 mg DEX + 62.50 mg MOX HCl en 25 mL (0.50 y 2.50 mg/mL) → si $c_i V_{TSTD} = c_f V_f$ → para $V_f = 10$ mL con $V_{TSTD} = 1000$ µL → $c_f = 50$ y 250 µg/mL.

GII nivel alto: 12.50 mg DEX + 62.50 mg MOX HCl en 25 mL (0.50 y 2.50 mg/mL) → si $c_i V_{TSTD} = c_f V_f$ → para $V_f = 10$ mL con $V_{TSTD} = 2000$ µL → $c_f = 100$ y 500 µg/mL.

6.2.4 – Membranas de Filtración de 0.45 µm

Se define el parámetro $F_A = 100 - 100(A_F/A_{SF})$ como la variación generada respecto a la referencia clarificada, expresando la diferencia relativa de áreas en escala porcentual. Ya que la relación entre F_A y el cociente A_F/A_{SF} es lineal, la incertidumbre absoluta asociada se traslada directamente a F_A. No obstante, al pasar de $100(A_F/A_{SF})$ a F_A, se modifica el denominador utilizado para el cálculo del error relativo. Esto genera una amplificación aparente de la incertidumbre, por un factor $(100 - F_A)/F_A$. Dicho parámetro debe tenerse en cuenta para evitar sub o sobre estimar la variabilidad. En ese sentido, la corrección se aplica multiplicando la incertidumbre por el factor inverso $F_A/(100 - F_A)$.

Términos de derivadas modificados para la fracción afectada por la filtración:

1) $\partial^2 A_F = (-100/A_{SF})^2 \sigma^2_{A_F}$, con $\sigma_{A_F} = s/\sqrt{n}$.

2) $\partial^2 A_{SF} = (100A_F/A^2_{SF})^2 \sigma^2_{A_{SF}}$, con $\sigma_{A_{SF}} = s/\sqrt{n}$.

ANOVA para cambios de nivel concentración (una vía):

$H_0) \bar{x}_{bajo} = \bar{x}_{medio} = \bar{x}_{alto}.$ $H_A) \bar{x}_i \neq \bar{x}_j.$

6.2.5 – Carry over

$100A_{FM}/A_{STD}$ es la contribución porcentual al área, del efecto de arrastre. Valores por encima de 5 % se consideraron como inaceptables en una determinación por HPLC.

Términos de derivadas modificados para el carry over:

1)$\partial^2 A_{FM} = (100/A_{STD})^2 \sigma^2_{A_{FM}}$, con $\sigma_{A_{FM}} = s/\sqrt{n}$.

2)$\partial^2 A_{STD} = (-100A_{FM}/A^2_{STD})^2 \sigma^2_{A_{STD}}$, con $\sigma_{A_{STD}} = s/\sqrt{n}$.

ANOVA para el cambio de concentración:

$H_0) \bar{x}_{bajo} = \bar{x}_{medio} = \bar{x}_{alto}.$ $H_A) \bar{x}_i \neq \bar{x}_j.$

6.2.6 – Degradación Forzada

Concentración de las soluciones: $c_{STD} = m_{STD}V_{TSTD}/V_{STD}V_{MdilS}$. En el caso de DEX se debe considerar $c_{STD} = (1000)(12.50 \text{ mg})(1 \text{ mL})/(1 \text{ mL} + 9 \text{ mL})(25 \text{ mL}) = 50 \text{ µg/mL}$. Para MOX HCl, $c_{STD} = (1000)(62.50 \text{ mg})(1 \text{ mL})/(1 \text{ mL} + 9 \text{ mL})(25 \text{ mL}) = 250 \text{ µg/mL}$.

Condiciones oxidantes: 10 mL de solución de H_2O_2 al 6 % V/V. Stock de 200 volúmenes es 50 % V/V → $V_{peróxido} = (1000)(6 \text{ \% V/V})(0.01 \text{ L})/50 \text{ \% V/V} = 1.20 \text{ mL}$. El estándar contiene 1 mL de agua milliQ con el fin de simular el agregado de H_2O_2.

Fotodegradación: $H_v = E_v t_{exp} \rightarrow t_{exp} = 1200000/E_v$ para 1200000 lux·h de una exposición luminosa. La iluminancia E_v tiene unidades de lux, es decir lm/m^2. A su vez, la irradiancia es $E_e = P_{fuente}/4\pi r^2 \text{ W/m}^2$. La unidad lm se obtiene a partir de la potencia multiplicando por el factor $\nu_{\lambda máx} = 683 \text{ lm/W}$, corregido con $\nu_{relativo}$ según la curva de sensibilidad del ojo humano. Por lo tanto, $E_v = \nu_{\lambda máx}\nu_{relativo}E_e$ lux (es decir lm/m^2). Se deduce entonces que $t_{exp} = 1200000/[(683)(0.63)E_e]$ horas. La fuente utilizada se calibró tal que, a 20 cm de distancia E_e fuese $1000 \text{ W/m}^2 \rightarrow P_{fuente} = 502.65 \text{ W}$. Para obtener la exposición requerida en 60 minutos, $E_e = 2784.39 \text{ W/m}^2$, lo cual se cumple si $r = \sqrt{P/4\pi E_e} = 0.12 \text{ m}$.

Medio ácido: 50 mL HCl 1 mol/L. $m_{solución} = d_{HCl}V_{HCl} = (1.19 \text{ g/mL})(50 \text{ mL}) = 59.50 \text{ g} \rightarrow m_{HCl} = (37 \text{ \%})(59.50 \text{ g})/100 \text{ \%} = 22.02 \text{ g} \rightarrow n_{HCl} = 22.02 \text{ g}/36.46 \text{ g/mol} = 0.60 \text{ mol} \rightarrow c = (0.60 \text{ mol})/0.05 \text{ L} = 12.08 \text{ mol/L} \rightarrow V_{toma} = 1000(1 \text{ mol/L})(0.05 \text{ L})/(12.08 \text{ mol/L}) \rightarrow$ se requieren 4.14 mL. El estándar debe contener 2 mL de S_{NaCl} 1 mol/L. Dicha solución se prepara disolviendo 90 mg de NaCl en 10 mL de agua milliQ. Para usar el ácido como neutralizante 0.10 mol/L, se diluyen 414 µL de HCl stock a 50 mL con agua milliQ.

Medio básico: 50 mL de NaOH 0.10 mol/L. $n_{NaOH} = (0.10\ mol/L)(0.05\ L) = 5 \times 10^{-3}$ mol $\rightarrow m_{NaOH} = (5 \times 10^{-3}\ mol)(40\ g/mol) = 200$ mg. El estándar contiene en total 2 mL de S_{NaCl} 0.10 mol/L. Esta solución puede ser preparada disolviendo 20 mg de NaCl en un volumen de 10 mL de agua milliQ. Para utilizar la base como neutralizante de concentración 1 mol/L, se deben solubilizar 2 g de NaOH en 50 mL de agua milliQ.

Degradación o cambio real: $D = 100 - \frac{100 m_{cuantificada}}{m_{colocada}} = 100 - \frac{100 A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{MdilM} V_M}{m_{colocada} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM}}$ %.

Análogamente a lo que ocurre con F_A, es necesario aplicar la corrección D/(100 – D).

Términos de derivadas modificados para la degradación real:

1)$\partial^2 A_M = \left(-\frac{100 m_{STD} V_{TSTD} V_{MdilM} V_M}{m_{colocada} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{A_M}$, con $\sigma_{A_M} = s/\sqrt{n}$.

2)$\partial^2 m_{STD} = \left(-\frac{100 A_M V_{TSTD} V_{MdilM} V_M}{m_{colocada} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{m_{STD}}$, con $\sigma_{m_{STD}} = 0.01/2\sqrt{3}$ mg.

3)$\partial^2 V_{TSTD} = \left(-\frac{100 A_M m_{STD} V_{MdilM} V_M}{m_{colocada} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{V_{TSTD}}$, con $\sigma_{V_{TSTD}}$ = corregido por $\sigma_{V_{P1000}}$ mL.

4)$\partial^2 V_{MdilM} = \left(-\frac{100 A_M m_{STD} V_{TSTD} V_M}{m_{colocada} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{V_{MdilM}}$, con $\sigma_{V_{MdilM}} = 2.50 \times 10^{-2}/1.96$ mL.

5)$\partial^2 V_M = \left(-\frac{100 A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{MdilM}}{m_{colocada} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{V_M}$, con $\sigma_{V_M} = 0.04/1.96$ mL.

6)$\partial^2 m_{colocada} = \left(\frac{100 A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{MdilM} V_M}{m^2_{colocada} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{m_{colocada}}$, con $\sigma_{m_{colocada}} = 0.01/2\sqrt{3}$ mg.

7)$\partial^2 A_{STD} = \left(\frac{100 A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{MdilM} V_M}{m_{colocada} A^2_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{A_{STD}}$, con $\sigma_{A_{STD}} = s/\sqrt{n}$.

8)$\partial^2 V_{STD} = \left(\frac{100 A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{MdilM} V_M}{m_{colocada} A_{STD} V^2_{STD} V_{MdilS} V_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{V_{STD}}$, con $\sigma_{V_{STD}} = 0.04/1.96$ mL.

9)$\partial^2 V_{MdilS} = \left(\frac{100 A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{MdilM} V_M}{m_{colocada} A_{STD} V_{STD} V^2_{MdilS} V_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{V_{MdilS}}$, con $\sigma_{V_{MdilS}} = 2.50 \times 10^{-2}/1.96$ mL.

10)$\partial^2 V_{TM} = \left(\frac{100 A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{MdilM} V_M}{m_{colocada} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V^2_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{V_{TM}}$, con $\sigma_{V_{TM}}$ = corregido por $\sigma_{V_{P1000}}$ mL.

Tests de hipótesis para la degradación real:

$H_{01}) \bar{x} < 5$ % $H_{02}) \bar{x} > 20$ %. $H_{A1}) \bar{x} \geq 5$ % $H_{A2}) \bar{x} \leq 20$ %.

6.2.7 – <u>Límites Instrumentales</u>

LOD y LOQ son en realidad las concentraciones a las cuales S/N vale 3 y 10 respectivamente. $c_{STD} = 1000P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}/100V_{STD}V_{mdilS}$ µg/mL en la menor dilución posible muestra una cierta S/N → $LOD = 30P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}/(S/N)V_{STD}V_{mdilS}$ µg/mL y finalmente $LOQ = 100P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}/(S/N)V_{STD}V_{mdilS}$ µg/mL. En el presente trabajo, el cálculo del ruido fue efectuado automáticamente en el intervalo 4 – 5 minutos. Se tomó este rango considerando que se trataba de la separación media entre ambos picos.

<u>Términos de derivadas modificados para LOD</u>:

1)∂^2 m_{STD} = $\left(\frac{30P_{STD}A_{FM}V_{TSTD}}{(S/N)V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{m_{STD}}$, con $\sigma_{m_{STD}} = 0.01/2\sqrt{3}$ mg.

2)∂^2 V_{TSTD} = $\left(\frac{30P_{STD}m_{STD}}{(S/N)V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{V_{TSTD}}$, con $\sigma_{V_{TSTD}}$ = corregido por $\sigma_{V_{P1000}}$ o $\sigma_{V_{P100}}$ mL.

3)∂^2 S/N = $\left(-\frac{30P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}}{(S/N)^2V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{S/N}$, con $\sigma_{S/N} = s/\sqrt{n}$.

4)∂^2 V_{STD} = $\left(-\frac{30P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}}{(S/N)V^2_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{V_{STD}}$, con $\sigma_{V_{STD}} = 0.04/1.96$ mL.

5)∂^2 V_{MdilS} = $\left(-\frac{30P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}}{(S/N)V_{STD}V^2_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{V_{MdilS}}$, con $\sigma_{V_{MdilS}} = 2.50 \times 10^{-2}/1.96$ mL.

<u>Términos de derivadas modificados para LOQ</u>:

1)∂^2 m_{STD} = $\left(\frac{100P_{STD}A_{FM}V_{TSTD}}{(S/N)V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{m_{STD}}$, con $\sigma_{m_{STD}} = 0.01/2\sqrt{3}$ mg.

2)∂^2 V_{TSTD} = $\left(\frac{100P_{STD}m_{STD}}{(S/N)V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{V_{TSTD}}$, con $\sigma_{V_{TSTD}}$ = corregido por $\sigma_{V_{P1000}}$ o $\sigma_{V_{P100}}$ mL.

3)∂^2 A_{STD} = $\left(-\frac{100P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}}{(S/N)^2V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{S/N}$, con $\sigma_{S/N} = s/\sqrt{n}$.

4)∂^2 V_{STD} = $\left(-\frac{100P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}}{(S/N)V^2_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{V_{STD}}$, con $\sigma_{V_{STD}} = 0.04/1.96$ mL.

5)∂^2 V_{MdilS} = $\left(-\frac{100P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}}{(S/N)V_{STD}V^2_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{V_{MdilS}}$, con $\sigma_{V_{MdilS}} = 2.50 \times 10^{-2}/1.96$ mL.

6.2.8 – Linealidad

Solución estándar GI: 12.50 mg DEX + 62.50 mg MOX HCl en 25 mL de FM (0.50 y 2.50 mg/mL). Si $c_i V_{TSTD} = c_f V_f \rightarrow$ si $V_f = 50$ mL y $V_{TSTD} = 2$ mL $\rightarrow c_f = 20$ y 100 µg/mL.

Diluciones para la curva de calibración I: $c_i V_i = c_f V_f \rightarrow$ si el volumen final es 2 mL $\rightarrow$ $V_{toma} = (c_{punto}$ µg/mL)(2000 µL)/(c_f µg/mL). Posteriormente se enrasó utilizando una solución de NaCl 0.90 % m/V preparada disolviendo 900 mg de dicha sal en 100 mL de agua milliQ. Para caracterizar adecuadamente la curva de calibración obtenida, se calcularon los parámetros estadísticos S_{xx}, S_{yy}, S_{xy}, S^2, r^2, a, σ_a, b, σ_b respectivamente. El mismo procedimiento se llevó a cabo con el intervalo correspondiente a GII.

Tabla 32. Diluciones para la regresión lineal de GI

V_{toma} (µL)	V_{Enrase} (µL)	[DEX] (µg/mL)	[MOX HCl] (µg/mL)
100	1900	1	5
500	1500	5	25
1000	1000	10	50
1500	500	15	75
1800	200	18	90
2000	0	20	100

Solución estándar GII: 12.50 mg DEX + 62.50 mg MOX HCl en 10 mL de FM (1.25 y 6.25 mg/mL). Si $c_i V_{TSTD} = c_f V_f \rightarrow$ para $V_f = 25$ mL con $V_{TSTD} = 4$ mL $\rightarrow$ en sí quedaría que $c_f = 200$ y 1000 µg/mL. Con el fin de emular las condiciones de extracción, los tubos utilizados deben contener un 10 % de acetona y 0.20 mg/mL de PLGA. Para ello se agregan 200 µL de SM preparada disolviendo 20 mg del polímero en 10 mL del solvente.

Diluciones para la curva de calibración II: $c_i V_i = c_f V_f \rightarrow$ si el volumen final es 2 mL $\rightarrow$ $V_{toma} = (c_{punto}$ µg/mL)(2000 µL)/(c_f µg/mL), enrasando luego con FM. De la misma manera que en GI, para caracterizar adecuadamente la curva de calibración obtenida se calcularon los parámetros estadísticos S_{xx}, S_{yy}, S_{xy}, S^2, r^2, a, σ_a, b, σ_b respectivamente.

Tabla 33. Diluciones para la regresión lineal de GII

V_{toma} (µL)	V_{SM} (µL)	V_{Enrase} (µL)	[DEX] (µg/mL)	[MOX HCl] (µg/mL)
100	200	1700	10	50
200	200	1600	20	100
400	200	1400	40	200
500	200	1300	50	250
800	200	1000	80	400
1000	200	800	100	500

6.2.9 – Exactitud

Medio de recuperación: Para GI, las muestras se obtienen sin tratamiento previo. En el caso de GII, ambos APIs deben extraerse de una matriz de polímero que se aglomera al contacto con metanol. Esto hace necesario aplicar un tratamiento alternativo. Es por ello que el método de extracción requiere el uso de acetona. Para simular las condiciones de este tratamiento, los matraces deben incluir un 10 % de dicho solvente (1 mL de SM). Por ende, el método de extracción es similar al que se utiliza en la determinación de UC.

Tabla 34. Planificación de las concentraciones a evaluar en la recuperación

API/Grupo	Nivel bajo (µg/mL)	Nivel medio (µg/mL)	Nivel alto (µg/mL)
DEX/I	1	10	20
DEX/II	10	50	100
MOX HCl/I	5	50	100
MOX HCl/II	50	250	500

Demostración de las ecuaciones para la recuperación en GI/GII: Considerando que

$c_M = A_M c_{STD}/A_{STD} = \frac{1000 P_{STD} A_M m_{STD} V_{TSTD}}{100 A_{STD} V_{STD} V_{MdilS}}$ µg/mL → $m_{cuantificada} = \frac{P_{STD} A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{MdilM} V_M}{100 A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM}}$ mg →

finalmente se obtiene $R_{\%} = \frac{100 m_{cuantificada}}{m_{colocada}} = \frac{P_{STD} A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{MdilM} V_M}{m_{colocada} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM}}$ %.

Términos de derivadas modificados para el porcentaje de recuperación:

1)∂^2 A_M = $\left(\frac{P_{STD} m_{STD} V_{TSTD} V_{MdilM} V_M}{m_{colocada} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{A_M}$, con $\sigma_{A_M} = s/\sqrt{n}$.

2)∂^2 m_{STD} = $\left(\frac{P_{STD} A_M V_{TSTD} V_{MdilM} V_M}{m_{colocada} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{m_{STD}}$, con $\sigma_{m_{STD}} = 0.01/2\sqrt{3}$ mg.

3)∂^2 V_{TSTD} = $\left(\frac{P_{STD} A_M m_{STD} V_{MdilM} V_M}{m_{colocada} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{V_{TSTD}}$, con $\sigma_{V_{TSTD}}$ = corregido por $\sigma_{V_{P1000}}$ o $\sigma_{V_{P100}}$ mL.

4)∂^2 V_{MdilM} = $\left(\frac{P_{STD} A_M m_{STD} V_{TSTD} V_M}{m_{colocada} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{V_{MdilM}}$, con $\sigma_{V_{MdilM}} = 2.50 \times 10^{-2}/1.96$ mL.

5)∂^2 V_M = $\left(\frac{P_{STD} A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{MdilM}}{m_{colocada} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{V_M}$, con $\sigma_{V_M} = 0.04/1.96$ mL.

6)∂^2 $m_{colocada}$ = $\left(-\frac{P_{STD} A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{MdilM} V_M}{m^2_{colocada} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{m_{colocada}}$, con $\sigma_{m_{colocada}} = 0.01/2\sqrt{3}$ mg.

7)∂^2 A_{STD} = $\left(-\frac{P_{STD} A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{MdilM} V_M}{m_{colocada} A^2_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{A_{STD}}$, con $\sigma_{A_{STD}} = s\sqrt{n}$.

8)∂^2 V_{STD} = $\left(-\frac{P_{STD} A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{MdilM} V_M}{m_{colocada} A_{STD} V^2_{STD} V_{MdilS} V_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{V_{STD}}$, con $\sigma_{V_{STD}} = 0.04/1.96$ mL.

9)∂^2 V_{MdilS} = $\left(-\frac{P_{STD} A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{MdilM} V_M}{m_{colocada} A_{STD} V_{STD} V^2_{MdilS} V_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{V_{MdilS}}$, con $\sigma_{V_{MdilS}} = 2.50 \times 10^{-2}/1.96$ mL.

10)∂^2 V_{TM} = $\left(-\frac{P_{STD} A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{MdilM} V_M}{m_{colocada} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V^2_{TM}} \right)^2 \sigma^2_{V_{TM}}$, con $\sigma_{V_{TM}}$ = corregido por $\sigma_{V_{P1000}}$ o $\sigma_{V_{P100}}$ mL.

6.2.10 – <u>Precisión</u>

Se estima según RSD = $100s/\bar{x}_n$ %.

6.2.11 – <u>Robustez</u>

± 3 %: pH → 2.80 ± 0.08 (2.72 – 2.88). Temperatura → 30 ± 1.50 ºC (28.50 – 31.50). Flujo de FM → 1.50 ± 0.04 mL/minuto (1.46 – 1.54). La robustez es $100(A_{final}/A_{inicial})$.

Términos de derivadas modificados para la robustez:

1)∂^2 A_{final} = $(-100/A^2_{final})^2 \sigma^2_{A_{final}}$, con $\sigma_{A_F} = s/\sqrt{n}$.

2)$\partial^2 A_{inicial}$ = $(100A_{final}/A^2_{inicial})^2 \sigma^2_{A_{inicial}}$, con $\sigma_{A_{inicial}} = s/\sqrt{n}$.

6.3 – Cálculos para Control de Calidad

6.3.1 – Evaluación de la Homogeneidad del Polvo

Pesadas a realizar: En el caso del proceso de extrusión, si DEX = 10 % → para un total de 50 g, m_{DEX} = (50 g)(10 %)/100 % = 5 g. MOX HCl = 50 % → $m_{MOX\ HCl}$ = 25 g → m_{RG502H} = 20 g. En el cálculo de la homogeneidad, es necesario normalizar ambos valores a 100 %. Para ello, primero se define un porcentaje teórico Z del API, y luego se considera que, si Z corresponde al 100 %, $100m_{cuantificada}/m_{análisis}$ será una fracción del mismo.

Diluciones para la muestra: $c_M = m_{análisis}/10\ mL \approx 500$ y 2500 μg/mL. En ese sentido, si $c_iV_{TM} = c_fV_f$ → si c_f = 50 y 250 μg/mL → para V_f = 2 mL → V_{TM} = 200 μL.

Demostración de las ecuaciones finales: El porcentaje teórico de DEX o MOX HCl en la mezcla es $Z = 100[m_{API}/(m_{API1} + m_{API2} + m_{RG502H})]$ %, ≈ 10 % DEX y ≈ 50 % MOX HCl.

$$c_M = A_M c_{STD}/A_{STD} = \frac{1000P_{STD}A_M m_{STD}V_{TSTD}}{100A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\ \mu g/mL \rightarrow m_{cuantificada} = \frac{P_{STD}A_M m_{STD}V_{TSTD}(V_{acetona}+V_{EM})(V_{TM}+V_{acetona2}+V_{EM2})}{100A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}V_{TM}}\ mg$$

$$\rightarrow H = 100\frac{100m_{cuantificada}}{m_{análisis}Z} = \frac{100A_M m_{STD}V_{TSTD}(V_{acetona}+V_{EM})(V_{TM}+V_{acetona2}+V_{EM2})(m_{API1}+m_{API2}+m_{RG502H})}{m_{análisis}A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}V_{TM}m_{API1}}\ \%.$$

Términos de derivadas modificados para el coeficiente de homogeneidad:

$$1)\partial^2\ A_M = \left(\frac{100m_{STD}V_{TSTD}(V_{acetona}+V_{EM})(V_{TM}+V_{acetona2}+V_{EM2})(m_{API1}+m_{API2}+m_{RG502H})}{m_{análisis}A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}V_{TM}m_{API1}}\right)^2 \sigma^2_{A_M}\ .\ \sigma_{A_M} = s/\sqrt{n}\ .$$

$$2)\partial^2\ m_{STD} = \left(\frac{100A_M V_{TSTD}(V_{acetona}+V_{EM})(V_{TM}+V_{acetona2}+V_{EM2})(m_{API1}+m_{API2}+m_{RG502H})}{m_{análisis}A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}V_{TM}m_{API1}}\right)^2 \sigma^2_{m_{STD}}\ .\ \sigma_{m_{STD}} = 0.01/2\sqrt{3}\ mg.$$

$$3)\partial^2\ V_{TSTD} = \left(\frac{100A_M m_{STD}(V_{acetona}+V_{EM})(V_{TM}+V_{acetona2}+V_{EM2})(m_{API1}+m_{API2}+m_{RG502H})}{m_{análisis}A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}V_{TM}m_{API1}}\right)^2 \sigma^2_{V_{TSTD}}\ .\ \sigma_{V_{TSTD}} = \sigma_{V_{P1000}}\ mL.$$

$$4)\partial^2\ V_{acetona} = \left(\frac{100A_M m_{STD}V_{TSTD}(V_{TM}+V_{acetona2}+V_{EM2})(m_{API1}+m_{API2}+m_{RG502H})}{m_{análisis}A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}V_{TM}m_{API1}}\right)^2 \sigma^2_{V_A}\ .\ \sigma_{V_A} = \sigma_{V_{P1000}}\ mL.$$

$$5)\partial^2\ V_{EM} = \left(\frac{100A_M m_{STD}V_{TSTD}(V_{TM}+V_{acetona2}+V_{EM2})(m_{API1}+m_{API2}+m_{RG502H})}{m_{análisis}A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}V_{TM}m_{API1}}\right)^2 \sigma^2_{V_E}\ .\ \sigma_{V_E} = \sigma_{V_{P1000}}\ mL.$$

$$6)\partial^2\ V_{TM} = \left(-\frac{100A_M m_{STD}V_{TSTD}(V_{acetona}+V_{EM})(V_{acetona2}+V_{EM2})(m_{API1}+m_{API2}+m_{RG502H})}{m_{análisis}A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}V^2_{TM}m_{API1}}\right)^2 \sigma^2_{V_{TM}}\ .\ \sigma_{V_{TM}} = \sigma_{V_{P1000}}\ mL.$$

7)∂^2 $V_{acetona2} = \left(\frac{100 A_M m_{STD} V_{TSTD} (V_{acetona} + V_{EM})(m_{API1} + m_{API2} + m_{RG502H})}{m_{análisis} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM} m_{API1}} \right)^2 \sigma^2_{V_{acetona}}$. $\sigma_{V_{acetona}} = \sigma_{V_{P1000}}$ mL.

8)∂^2 $V_{EM2} = \left(\frac{100 A_M m_{STD} V_{TSTD} (V_{acetona} + V_{EM})(m_{API1} + m_{API2} + m_{RG502H})}{m_{análisis} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM} m_{API1}} \right)^2 \sigma^2_{V_{EM}}$. $\sigma_{V_{EM}} = \sigma_{V_{P1000}}$ mL.

9)∂^2 $m_{API1} = \left(-\frac{100 A_M m_{STD} V_{TSTD} (V_{acetona} + V_{EM})(V_{TM} + V_{acetona2} + V_{EM2})(m_{API1} + m_{API2} + m_{RG502H})}{m_{análisis} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM} m^2_{API1}} \right)^2 \sigma^2_{m_{API1}}$. $\sigma_{m_{API1}} = 0.1/2\sqrt{3}$ mg.

10)∂^2 $m_{API2} = \left(\frac{100 A_M m_{STD} V_{TSTD} (V_{acetona} + V_{EM})(V_{TM} + V_{acetona2} + V_{EM2})}{m_{análisis} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM} m_{API1}} \right)^2 \sigma^2_{m_{API2}}$. $\sigma_{m_{API2}} = 0.1/2\sqrt{3}$ mg.

11)∂^2 $m_{RG502H} = \left(\frac{100 A_M m_{STD} V_{TSTD} (V_{acetona} + V_{EM})(V_{TM} + V_{acetona2} + V_{EM2})}{m_{análisis} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM} m_{API1}} \right)^2 \sigma^2_{m_{RG502H}}$. $\sigma_{m_{RG502H}} = 0.1/2\sqrt{3}$ mg.

12)∂^2 $m_{análisis} = \left(-\frac{100 A_M m_{STD} V_{TSTD} (V_{acetona} + V_{EM})(V_{TM} + V_{acetona2} + V_{EM2})(m_{API1} + m_{API2} + m_{RG502H})}{m^2_{análisis} A_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM} m_{API1}} \right)^2 \sigma^2_{m_{análisis}}$. $\sigma_{m_{análisis}} = 0.1/2\sqrt{3}$ mg.

13)∂^2 $A_{STD} = \left(-\frac{100 A_M m_{STD} V_{TSTD} (V_{acetona} + V_{EM})(V_{TM} + V_{acetona2} + V_{EM2})(m_{API1} + m_{API2} + m_{RG502H})}{m_{análisis} A^2_{STD} V_{STD} V_{MdilS} V_{TM} m_{API1}} \right)^2 \sigma^2_{A_{STD}}$. $\sigma_{A_{STD}} = s/\sqrt{n}$.

14)∂^2 $V_{STD} = \left(-\frac{100 A_M m_{STD} V_{TSTD} (V_{acetona} + V_{EM})(V_{TM} + V_{acetona2} + V_{EM2})(m_{API1} + m_{API2} + m_{RG502H})}{m_{análisis} A_{STD} V^2_{STD} V_{MdilS} V_{TM} m_{API1}} \right)^2 \sigma^2_{V_{STD}}$. $\sigma_{V_{STD}} = 0.04/1.96$ mL.

15)∂^2 $V_{MdilS} = \left(-\frac{100 A_M m_{STD} V_{TSTD} (V_{acetona} + V_{EM})(V_{TM} + V_{acetona2} + V_{EM2})(m_{API1} + m_{API2} + m_{RG502H})}{m_{análisis} A_{STD} V^2_{STD} V^2_{MdilS} V_{TM} m_{API1}} \right)^2 \sigma^2_{V_{MdilS}}$. $\sigma_{V_{MdilS}} = 2.50 \times 10^{-2}/1.96$ mL.

6.3.2 – <u>Cálculo de la Densidad</u>

<u>Demostración de las ecuaciones finales</u>: $d_{fibra} = m_{fibra}/V_{fibra}$. $V_{fibra} = V_{matraz} - V_{agua}$ → si la d_{agua} varía con la temperatura → $V_{agua} = m_{agua}/d_{agua}$ → $d_{fibra} = d_I = m_{fibra}/(V_{matraz} - V_{agua})$.

<u>Términos de derivadas modificados para el volumen de agua</u>:

1)∂^2 $m_{agua} = [1/d_{agua}]^2 \sigma^2_{m_{agua}}$, con $\sigma_{m_{agua}} = 0.0001/2\sqrt{3}$ g. El término ∂^2 d_{agua} no fue considerado en la ecuación dado que, al tratarse de una constante, su valor es cero.

<u>Términos de derivadas modificados para la densidad</u>:

1)∂^2 $m_{fibra} = [1/(V_M - V_{agua})]^2$ $\sigma^2_{m_{fibra}}$, con $\sigma_{m_{fibra}} = 0.0001/2\sqrt{3}$ g.

2)∂^2 $V_{matraz} = [- m_{fibra}/(V_M - V_{agua})^2]^2 \sigma^2_{V_M}$, con $\sigma_{V_M} = 0.06/1.96$ mL.

3)∂^2 $V_{agua} = [m_{fibra}/(V_M - V_{agua})^2]^2 \sigma^2_{V_{agua}}$, con $\sigma_{V_{agua}} = \sigma_{m_{agua}}/d_{agua}$ mL.

6.3.3 – Verificación de la Uniformidad de Masa

Factor de desviación: FD = $\left|100-(100m_i/\overline{m})\right|$ %, y UM = 100 – $\overline{FD}$ % referida al 100 %. De forma análoga a lo que ocurría con F_A, es necesario aplicar la corrección $\overline{FD}/100$.

Términos de derivadas modificados para la uniformidad de masa:

1)∂^2 m_i = [– 100/$\overline{m}$]^2 $\sigma^2_{m_i}$, con σ_{m_i} = 0.01/2$\sqrt{3}$ mg.

2)∂^2 $\overline{m}$ =[100m_i/$\overline{m}^2$]^2 $\sigma^2_{\overline{m}}$, con $\sigma_{\overline{m}}$ = s/$\sqrt{n}$ mg.

6.3.4 – UC

Concentración de la muestra y demostración de las ecuaciones: $c_M = m_l/2$ mL, equivalente a 200 y 1000 µg/mL aproximadamente. $c_M = A_M c_{STD}/A_{STD} = \frac{1000P_{STD}A_M m_{STD}V_{TSTD}}{100A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}$ µg/mL

$\rightarrow m_{cuantificada} = \frac{10P_{STD}A_M m_{STD}V_{TSTD}(V_{acetona}+V_{EM})(V_{TM}+V_{EM2})}{A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}V_{TM}}$ µg $\rightarrow P = \frac{100m_{cuantificada}}{LC} = \frac{1000P_{STD}A_M m_{STD}V_{TSTD}(V_{acetona}+V_{EM})(V_{TM}+V_{EM2})}{LCA_{STD}V_{STD}V_{MdilS}V_{TM}}$. Los valores obtenidos deben normalizarse sobre 2 mg mediante $2P/m_{cuantificada}$.

Términos de derivadas modificados para la UC:

1)∂^2 $A_M = \left(\frac{1000P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}(V_{acetona}+V_{EM})(V_{TM}+V_{EM2})}{LCA_{STD}V_{STD}V_{MdilS}V_{TM}}\right)^2 \sigma^2_{A_M}$, con σ_{A_M} = s/$\sqrt{n}$.

2)∂^2 $m_{STD} = \left(\frac{1000P_{STD}A_M V_{TSTD}(V_{acetona}+V_{EM})(V_{TM}+V_{EM2})}{LCA_{STD}V_{STD}V_{MdilS}V_{TM}}\right)^2 \sigma^2_{m_{STD}}$, con $\sigma_{m_{STD}}$ = 0.01/2$\sqrt{3}$ mg.

3)∂^2 $V_{TSTD} = \left(\frac{1000P_{STD}A_M m_{STD}(V_{acetona}+V_{EM})(V_{TM}+V_{EM2})}{LCA_{STD}V_{STD}V_{MdilS}V_{TM}}\right)^2 \sigma^2_{V_{TSTD}}$, con $\sigma_{V_{TSTD}}$ = corregido por $\sigma_{V_{P1000}}$ mL.

4)∂^2 $V_{acetona} = \left(\frac{1000P_{STD}A_M m_{STD}V_{TSTD}(V_{TM}+V_{EM2})}{LCA_{STD}V_{STD}V_{MdilS}V_{TM}}\right)^2 \sigma^2_{V_A}$, con σ_{V_A} = corregido por $\sigma_{V_{P1000}}$ mL.

5)∂^2 $V_{EM} = \left(\frac{1000P_{STD}A_M m_{STD}V_{TSTD}(V_{TM}+V_{EM2})}{LCA_{STD}V_{STD}V_{MdilS}V_{TM}}\right)^2 \sigma^2_{V_E}$, con σ_{V_E} = corregido por $\sigma_{V_{P1000}}$ mL.

6)∂^2 $V_{TM} = \left(-\frac{1000P_{STD}A_M m_{STD}V_{TSTD}(V_{acetona}+V_{EM})V_{EM2}}{LCA_{STD}V_{STD}V_{MdilS}V_{TM}^2}\right)^2 \sigma^2_{V_{TM}}$, con $\sigma_{V_{TM}}$ = corregido por $\sigma_{V_{P1000}}$ mL.

5)∂^2 $V_{EM2} = \left(\frac{1000P_{STD}A_M m_{STD}V_{TSTD}(V_{acetona}+V_{EM})}{LCA_{STD}V_{STD}V_{MdilS}V_{TM}}\right)^2 \sigma^2_{V_{EM}}$, con $\sigma_{V_{EM}}$ = corregido por $\sigma_{V_{P1000}}$ mL.

8)∂^2 $A_{STD} = \left(-\frac{1000P_{STD}A_M m_{STD}V_{TSTD}(V_{acetona}+V_{EM})(V_{TM}+V_{EM2})}{LCA_{STD}^2V_{STD}V_{MdilS}V_{TM}}\right)^2 \sigma^2_{A_{STD}}$, con $\sigma_{A_{STD}}$ = s/$\sqrt{n}$.

9)∂^2 V_{STD} = $\left(-\frac{1000P_{STD}A_M m_{STD}V_{TSTD}(V_{acetona}+V_{EM})(V_{TM}+V_{EM2})}{LCA_{STD}V_{STD}^2 V_{MdilS}V_{TM}}\right)^2 \sigma_{V_{STD}}^2$, con $\sigma_{V_{STD}}$ = 0.04/1.96 mL.

10)∂^2 V_{MdilS} = $\left(-\frac{1000P_{STD}A_M m_{STD}V_{TSTD}(V_{acetona}+V_{EM})(V_{TM}+V_{EM2})}{LCA_{STD}V_{STD}V_{MdilS}^2 V_{TM}}\right)^2 \sigma_{V_{MdilS}}^2$, con $\sigma_{V_{MdilS}}$ = 2.50 × 10^{-2}/1.96 mL.

Aceptación de las unidades: AV = $\left|M-\overline{P}\right|$ + Ks ≤ 15 para los primeros 10 implantes o 0.75M ≤ $100P_i/M$ ≤ 1.25M para las siguientes 20 unidades. Incertidumbre = $t_{\alpha/2,n-1}s/\sqrt{n}$.

Degradación por la extrusión: ATR = $100\sum A_{impurezas}/\left(A_M+\sum A_{impurezas}\right)$.

Términos de derivadas modificados para la degradación:

1)∂^2 $A_{impureza}$ = [– $100A_M/(A_M + A_{impureza})^2$]^2 $\sigma_{A_{impurezas}}^2$, con $\sigma_{A_{impurezas}} = s/\sqrt{n}$.

2∂^2 A_M = [$100A_{impureza}/(A_{AM} + A_{impureza})^2$]^2 $\sigma_{A_{AM}}^2$, con $\sigma_{A_{AM}} = s/\sqrt{n}$.

6.3.5 – Evaluación de la Liberación *In Vitro*

Tasa teórica considerando recambio (turn over) del humor acuoso:
[MOX HCl] = $m_{MOX\ HCl}/V_{HA}$ → para V_{HA} = 0.25 mL y MIC_{90} = 16 µg/mL → se obtiene que [MOX HCl] = 4 µg para llegar a esa concentración. A su vez, si el recambio de V_{HA} es 2.75 µL/minuto → se eliminan 3.96 mL/día, lo cual se traduce en ≈ (63 – 64) µg/día de API. Agregando la masa necesaria para alcanzar 16 µg/mL → ≈ 67 – 68 µg/día. Esta es la mínima velocidad capaz de mantener una concentración constante de 16 µg/mL.

Verificación de condiciones sink: El 100 % de liberación no debe superar el 20 % del límite de solubilidad. Para DEX, $c_{límite}$ = (0.10 mg/mL)(20 %)/100 % = 20 µg/mL. Un implante contiene 200 µg de fármaco → c = (200 µg)/10 mL = 20 µg/mL. En el caso de MOX HCl, $c_{límite}$ = (19.60 mg/mL)(20 %)/100 % = 3.92 mg/mL = 3920 µg/mL. Un implante contiene unos 1000 µg de fármaco → c = (1000 µg)/10 mL = 100 µg/mL.

Demostración de la ecuación para la concentración: El procedimiento es análogo a lo ya utilizado en otros casos. $c_M = c_{medio} = A_M c_{STD}/A_{STD} = \frac{1000P_{STD}A_M m_{STD}V_{TSTD}}{100A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}$ µg/mL.

Términos de derivadas modificados para la concentración en el medio:

1)∂^2 A_M = $\left(\frac{10P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}}{A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{A_M}$, con σ_{A_M} = s/$\sqrt{n}$.

2)∂^2 m_{STD} = $\left(\frac{10P_{STD}A_MV_{TSTD}}{A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{m_{STD}}$, con $\sigma_{m_{STD}}$ = 0.01/2$\sqrt{3}$ mg.

3)∂^2 V_{TSTD} = $\left(\frac{10P_{STD}A_Mm_{STD}}{A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{V_{TSTD}}$, con $\sigma_{V_{TSTD}}$ = corregido por $\sigma_{V_{P100}}$ mL.

4)∂^2 A_{STD} = $\left(-\frac{10P_{STD}A_Mm_{STD}V_{TSTD}}{A^2_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{A_{STD}}$, con $\sigma_{A_{STD}}$ = s/$\sqrt{n}$.

5)∂^2 V_{STD} = $\left(-\frac{10P_{STD}A_Mm_{STD}V_{TSTD}}{A_{STD}V^2_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{V_{STD}}$, con $\sigma_{V_{STD}}$ = 0.04/1.96 mL.

6)∂^2 V_{MdilS} = $\left(-\frac{10P_{STD}A_Mm_{STD}V_{TSTD}}{A_{STD}V_{STD}V^2_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{V_{MdilS}}$, con $\sigma_{V_{MdilS}}$ = 2.50 × 10^{-2}/1.96 mL.

Masa liberada: Para la primera toma, en la demostración de esta ecuación ha de considerarse $c_M = c_{medio} = A_M c_{STD}/A_{STD}$. Desde la segunda extracción es necesario sumar acumulativamente todo lo retirado anteriormente. Para la primera toma, la ecuación queda m = $\frac{1000P_{STD}A_Mm_{STD}V_{TSTD}V_{medio}}{100A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}$ µg, y en las siguientes m_n = $\frac{1000P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}}{100A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\left(A_MV_{medio}+\sum_{i=1}^{n-1}A_{M_i}V_{TM}\right)$ µg. Esta expresión asegura que siempre se tenga en cuenta todo el acumulado hasta el momento.

Términos de derivadas modificados para la masa liberada en la primera toma:

1)∂^2 A_M = $\left(\frac{10P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}V_{medio}}{A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{A_M}$, con σ_{A_M} = s/$\sqrt{n}$.

2)∂^2 m_{STD} = $\left(\frac{10P_{STD}A_MV_{TSTD}V_{medio}}{A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{m_{STD}}$, con $\sigma_{m_{STD}}$ = 0.01/2$\sqrt{3}$ mg.

3)∂^2 V_{TSTD} = $\left(\frac{10P_{STD}A_Mm_{STD}V_{medio}}{A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{V_{TSTD}}$, con $\sigma_{V_{TSTD}}$ = corregido por $\sigma_{V_{P100}}$ mL.

4)∂^2 V_{medio} = $\left(\frac{10P_{STD}A_Mm_{STD}V_{TSTD}}{A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{V_M}$, con σ_{V_M} = 2.50 × 10^{-2}/1.96 mL.

5)∂^2 A_{STD} = $\left(-\frac{10P_{STD}A_Mm_{STD}V_{TSTD}V_{medio}}{A^2_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{A_{STD}}$, con $\sigma_{A_{STD}}$ = s/$\sqrt{n}$.

6)∂^2 V_{STD} = $\left(-\frac{10P_{STD}A_Mm_{STD}V_{TSTD}V_{medio}}{A_{STD}V^2_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{V_{STD}}$, con $\sigma_{V_{STD}}$ = 0.04/1.96 mL.

7)∂^2 V_{MdilS} = $\left(-\frac{10P_{STD}A_Mm_{STD}V_{TSTD}V_{medio}}{A_{STD}V_{STD}V^2_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{V_{MdilS}}$, con $\sigma_{V_{MdilS}}$ = 2.50 × 10^{-2}/1.96 mL.

Términos de derivadas modificados para la masa liberada a partir de la segunda toma:

1)∂^2 A_M = $\left(\frac{10P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}V_{medio}}{A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{A_M}$, con $\sigma_{A_M} = s/\sqrt{n}$.

2)∂^2 m_{STD} = $\left(\frac{10P_{STD}V_{TSTD}}{A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\left(A_M V_{medio} + \sum_{i=1}^{n-1} A_{M_i} V_{TM}\right)\right)^2 \sigma^2_{m_{STD}}$, con $\sigma_{m_{STD}} = 0.01/2\sqrt{3}$ mg.

3)∂^2 V_{TSTD} = $\left(\frac{10P_{STD}m_{STD}}{A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\left(A_M V_{medio} + \sum_{i=1}^{n-1} A_{M_i} V_{TM}\right)\right)^2 \sigma^2_{V_{TSTD}}$, con $\sigma_{V_{TSTD}}$ = corregido por $\sigma_{V_{P100}}$ mL.

4)∂^2 V_{Medio} = $\left(\frac{10P_{STD}A_M m_{STD}V_{TSTD}}{A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{V_{Medio}}$, con $\sigma_{V_{Medio}} = 2.50 \times 10^{-2}/1.96$ mL.

5)∂^2 A_{STD} = $\left(-\frac{10P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}}{A^2_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\left(A_M V_{medio} + \sum_{i=1}^{n-1} A_{M_i} V_{TM}\right)\right)^2 \sigma^2_{A_{STD}}$, con $\sigma_{A_{STD}} = s/\sqrt{n}$.

6)∂^2 V_{STD} = $\left(-\frac{10P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}}{A_{STD}V^2_{STD}V_{MdilS}}\left(A_M V_{medio} + \sum_{i=1}^{n-1} A_{M_i} V_{TM}\right)\right)^2 \sigma^2_{V_{STD}}$, con $\sigma_{V_{STD}} = 0.04/1.96$ mL.

7)∂^2 V_{MdilS} = $\left(-\frac{10P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}}{A_{STD}V_{STD}V^2_{MdilS}}\left(A_M V_{medio} + \sum_{i=1}^{n-1} A_{M_i} V_{TM}\right)\right)^2 \sigma^2_{V_{MdilS}}$, con $\sigma_{V_{MdilS}} = 2.50 \times 10^{-2}/1.96$ mL.

8)∂^2 A_{Mi} = $\left(\frac{10P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}V_{TM}}{A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{A_{M_i}}$, con $\sigma_{A_{M_i}} = \sqrt{\sum_{i=1}^{n-1} s_i^2/n}$.

9)∂^2 V_{TM} = $\left(\frac{10P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}}{A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\sum_{i=1}^{n-1} A_{M_i}\right)^2 \sigma^2_{V_{TM}}$, con $\sigma_{V_{TM}} = 0.05/1.96$ mL.

Liberación: $L = \frac{100m_{cuantificada}}{m_{teórica}} \rightarrow$ en la primera toma $L = \frac{1000000P_{STD}A_M m_{STD}V_{TSTD}V_{medio}}{100m_{teórica}A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}$ %. Si $m_{teórica} = m_{análisis}m_P/\overline{m}$ µg $\rightarrow L = \frac{1000000P_{STD}A_M m_{STD}V_{TSTD}V_{medio}\overline{m}}{100m_{análisis}m_P A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}$ %. Desde la segunda toma se aplica igual criterio considerando masas retiradas $\rightarrow L = \frac{1000000P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}\overline{m}}{100m_{análisis}m_P A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\left(A_M V_{medio} + \sum_{i=1}^{n-1} A_{M_i} V_{TM}\right)$ (%).

Términos de derivadas modificados para la liberación *in vitro* (primera toma):

1)∂^2 A_M = $\left(\frac{1000P_{STD}m_{STD}V_{TSTD}V_{medio}\overline{m}}{m_{análisis}m_P A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{A_M}$, con $\sigma_{A_M} = s/\sqrt{n}$.

2)∂^2 m_{STD} = $\left(\frac{1000P_{STD}A_M V_{TSTD}V_{medio}\overline{m}}{m_{análisis}m_P A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{m_{STD}}$, con $\sigma_{m_{STD}} = 0.01/2\sqrt{3}$ mg.

3)∂^2 V_{TSTD} = $\left(\frac{1000P_{STD}A_M m_{STD}V_{medio}\overline{m}}{m_{análisis}m_P A_{STD}V_{STD}V_{MdilS}}\right)^2 \sigma^2_{V_{TSTD}}$, con $\sigma_{V_{TSTD}}$ = corregido por $\sigma_{V_{P100}}$ mL.

4)∂^2 $V_{medio} = \left(\frac{1000 P_{STD} A_M m_{STD} V_{TSTD} \overline{m}}{m_{análisis} m_P A_{STD} V_{STD} V_{MdilS}} \right)^2 \sigma^2_{V_M}$, con σ_{V_M} = 2.50 × 10^{-2}/1.96 mL.

5)∂^2 $\overline{m}$ $= \left(\frac{1000 P_{STD} A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{medio}}{m_{análisis} m_P A_{STD} V_{STD} V_{MdilS}} \right)^2 \sigma^2_{\overline{m}}$, con $\sigma_{\overline{m}}$ = Valor informado/1.96 mg.

6)∂^2 $m_{análisis} = \left(-\frac{1000 P_{STD} A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{medio} \overline{m}}{m^2_{análisis} m_P A_{STD} V_{STD} V_{MdilS}} \right)^2 \sigma^2_{m_{análisis}}$, con $\sigma_{m_{análisis}} = 0.01/2\sqrt{3}$ mg.

7)∂^2 $m_P = \left(-\frac{1000 P_{STD} A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{medio} \overline{m}}{m_{análisis} m^2_P A_{STD} V_{STD} V_{MdilS}} \right)^2 \sigma^2_{m_P}$, con σ_{m_P} = Valor informado/1.96.

8)∂^2 $A_{STD} = \left(-\frac{1000 P_{STD} A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{medio} \overline{m}}{m_{análisis} m_P A^2_{STD} V_{STD} V_{MdilS}} \right)^2 \sigma^2_{A_{STD}}$, con $\sigma_{A_{STD}} = s/\sqrt{n}$.

9)∂^2 $V_{STD} = \left(-\frac{1000 P_{STD} A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{medio} \overline{m}}{m_{análisis} m_P A_{STD} V^2_{STD} V_{MdilS}} \right)^2 \sigma^2_{V_{STD}}$, con $\sigma_{V_{STD}}$ = 0.04/1.96 mL.

10)∂^2 $V_{MdilS} = \left(-\frac{1000 P_{STD} A_M m_{STD} V_{TSTD} V_{medio} \overline{m}}{m_{análisis} m_P A_{STD} V_{STD} V^2_{MdilS}} \right)^2 \sigma^2_{V_{MdilS}}$, con $\sigma_{V_{MdilS}}$ = 2.50 × 10^{-2}/1.96 mL.

<u>Términos de derivadas modificados para la liberación *in vitro* (enésima toma)</u>:

1)∂^2 $A_M = \left(\frac{1000 P_{STD} m_{STD} V_{TSTD} V_{medio} \overline{m}}{m_{análisis} m_P A_{STD} V_{STD} V_{MdilS}} \right)^2 \sigma^2_{A_M}$, con $\sigma_{A_M} = s/\sqrt{n}$.

2)∂^2 $m_{STD} = \left(\frac{1000 P_{STD} V_{TSTD} \overline{m}}{m_{análisis} m_P A_{STD} V_{STD} V_{MdilS}} \left(A_M V_{medio} + \sum_{i=1}^{n-1} A_{M_i} V_{TM} \right) \right)^2 \sigma^2_{m_{STD}}$, con $\sigma_{m_{STD}} = 0.01/2\sqrt{3}$ mg.

3)∂^2 $V_{TSTD} = \left(\frac{1000 P_{STD} m_{STD} \overline{m}}{m_{análisis} m_P A_{STD} V_{STD} V_{MdilS}} \left(A_M V_{medio} + \sum_{i=1}^{n-1} A_{M_i} V_{TM} \right) \right)^2 \sigma^2_{V_{TSTD}}$, con $\sigma_{V_{TSTD}}$ = corregido por $\sigma_{V_{P100}}$ mL.

4)∂^2 $V_{medio} = \left(\frac{1000 P_{STD} A_M m_{STD} V_{TSTD} \overline{m}}{m_{análisis} m_P A_{STD} V_{STD} V_{MdilS}} \right)^2 \sigma^2_{V_{Medio}}$, con $\sigma_{V_{Medio}}$ = 2.50 × 10^{-2}/1.96 mL.

5)∂^2 $\overline{m}$ $= \left(\frac{1000 P_{STD} m_{STD} V_{TSTD}}{m_{análisis} m_P A_{STD} V_{STD} V_{MdilS}} \left(A_M V_{medio} + \sum_{i=1}^{n-1} A_{M_i} V_{TM} \right) \right)^2 \sigma^2_{\overline{m}}$, con $\sigma_{\overline{m}}$ = Valor informado/1.96.

6)∂^2 $m_{análisis} = \left(-\frac{1000 P_{STD} m_{STD} V_{TSTD} \overline{m}}{m^2_{análisis} m_P A_{STD} V_{STD} V_{MdilS}} \left(A_M V_{medio} + \sum_{i=1}^{n-1} A_{M_i} V_{TM} \right) \right)^2 \sigma^2_{m_{análisis}}$, con $\sigma_{m_{análisis}} = 0.01/2\sqrt{3}$ mg.

7)∂^2 $m_P = \left(-\frac{1000 P_{STD} m_{STD} V_{TSTD} \overline{m}}{m_{análisis} m^2_P A_{STD} V_{STD} V_{MdilS}} \left(A_M V_{medio} + \sum_{i=1}^{n-1} A_{M_i} V_{TM} \right) \right)^2 \sigma^2_{m_P}$, con σ_{m_P} = Valor informado /1.96.

8)∂^2 $A_{STD} = \left(-\frac{1000 P_{STD} m_{STD} V_{TSTD} \overline{m}}{m_{análisis} m_P A^2_{STD} V_{STD} V_{MdilS}} \left(A_M V_{medio} + \sum_{i=1}^{n-1} A_{M_i} V_{TM} \right) \right)^2 \sigma^2_{A_{STD}}$, con $\sigma_{A_{STD}} = s/\sqrt{n}$.

9)∂^2 V_{STD} = $\left(-\frac{1000 P_{STD} m_{STD} V_{TSTD} \bar{m}}{m_{análisis} m_P A_{STD} V_{STD}^2 V_{MdilS}} \left(A_M V_{medio} + \sum_{i=1}^{n-1} A_{M_i} V_{TM} \right) \right)^2 \sigma_{V_{STD}}^2$, con $\sigma_{V_{STD}}$ = 0.04/1.96 mL.

10)∂^2 V_{MdilS} = $\left(-\frac{1000 P_{STD} m_{STD} V_{TSTD} \bar{m}}{m_{análisis} m_P A_{STD} V_{STD} V_{MdilS}^2} \left(A_M V_{medio} + \sum_{i=1}^{n-1} A_{M_i} V_{TM} \right) \right)^2 \sigma_{V_{MdilS}}^2$, con $\sigma_{V_{MdilS}}$ = 2.50 × 10^{-2}/1.96 mL.

11)∂^2 A_{Mi} = $\left(\frac{1000 P_{STD} m_{STD} V_{TSTD} \bar{m} V_{TM}}{m_{análisis} m_P A_{STD} V_{STD} V_{MdilS}} \right)^2 \sigma_{A_{M_i}}^2$, con $\sigma_{A_{M_i}} = \sqrt{\sum_{i=1}^{n-1} s_i^2 / n}$.

12)∂^2 V_{TM} = $\left(\frac{1000 P_{STD} m_{STD} V_{TSTD} \bar{m}}{m_{análisis} m_P A_{STD} V_{STD} V_{MdilS}} \sum_{i=1}^{n-1} A_{M_i} \right)^2 \sigma_{V_{TM}}^2$, con $\sigma_{V_{TM}}$ = 0.05/1.96 mL.

6.3.6 – <u>Estudios *In Vivo*</u>

El uso de estándar interno para cuantificación en muestras biológicas se basa en que el cociente A_{API}/A_{STD} se mantiene relativamente constante durante el procesamiento. No obstante, en este trabajo no existieron pasos de extracción o centrifugación. De hecho, el humor acuoso únicamente se diluyó con FM antes de inyectarse las muestras en el sistema HPLC. Por tal motivo, no se consideró necesario corregir la cuantificación de los APIs.

<u>Curva de calibración</u>: 62.50 mg MOX HCl/SAR HCl + 12.50 mg DEX/BEC en 200 mL de mezcla. Si $c_i V_{TSTD} = c_f V_f \rightarrow$ en V_f = 25 mL con V_{TSTD} = 2.50 mL → c_f = 5 y 25 µg/mL.

<u>Diluciones para la curva de calibración</u>: $c_i V_i = c_f V_f \rightarrow$ si el volumen final es 2 mL → $V_{toma} = (c_{punto}\ \mu g/mL)(2\ mL)/(c_f\ \mu g/mL)$. Luego se halló S_{xx}, S_{yy}, S_{xy}, S^2, r^2, a, σ_a, b, σ_b.

Tabla 35. Diluciones para la regresión lineal *in vivo*

V_{toma} (µL)	**V_{Enrase} (µL)**	**[DEX]/[BEC] (µg/mL)**	**[MOX HCl]/[SAR HCl] (µg/mL)**
120	1780	0.30	1.50
200	1800	0.50	2.50
400	1600	1	5
800	1200	2	10
1200	800	3	15
2000	0	5	25

6.4 – Otros Trabajos Generados durante la Tesis

6.4.1 – Artículos Científicos

-Miranda, P., Tártara, L. I., Castro, A.; Zimet, P., Faccio, R., Palma, S. D., Mombrú, Á. W., Pardo, H. Sustained-Release Biodegradable Intracameral Implants Containing Dexamethasone and Moxifloxacin: Development and In Vivo Primary Assessment. *Pharmaceutics*, 2025, *17*, 1191.
DOI → 10.3390/pharmaceutics17091191.

-Miranda, P., Juarez-Ruiz, L., Manlla, L., Pardo, H., Castro, A., Palma, S. D., Mombrú, Á. W.; Tártara, L. I. Evaluation of the Efficacy of a Biodegradable Intraocular Implant in an Animal Experimental Model of Aphakia and Endophthalmitis. *Pharmaceutics* 2026. EN REVISIÓN.

6.4.2 – Proyectos de Investigación Financiados

Fondo María Viñas FMV_3_2020_1_162645: "Desarrollo de un Dispositivo Intraocular Antibiótico/Antiinflamatorio de Liberación Sostenida" (2021 – 2023). RESPONSABLE CIENTÍFICO.

6.4.3 – Presentaciones en Congresos

AIVO XII (2021): Miranda, P., Pardo, H., Castro, A., Villanueva, J. P., Palma, S., Pereira, L., Zimet, P., Mombrú, A. W., Tártara, I. "Desarrollo y Caracterización de Implantes Intracamerales Biodegradables Cargados con Fármacos".

ENAQUI 8 (2023): Miranda, P., Tártara, I., Castro, A., Palma, S., Zimet, P., Mombrú, A. W., Pardo, H. "Evaluación Preclínica de un Implante Intraocular Mixto DEX-MOX". PREMIO SESIÓN BIOQUÍMICA.

RICIFA (2023): Miranda, P., Castro, A., Palma, S., Zimet, P., Mombrú, A. W., Rodríguez, M. L., Rosano, F., Tártara, L. I., & Pardo, H. "Evaluación Preclínica de un Inserto Intracameral Antibiótico/Antiinflamatorio".

Jornada de Investigación Científica (JIC XXV, 2024): Juárez, L., Miranda, P., Aiassa, V., Manlla, L., Hernández, M. V., Pardo, H., Campana, V., & Tártara, L. I. "Valoración Oftalmológica de la Eficacia de un Implante Biodegradable en un Modelo de Endoftalmitis Bacteriana".

Jornadas Uruguayas de Química Medicinal (2024): Miranda, P., Tártara, I., Castro, A., Palma, S., Zimet, P., Mombrú, A. W., & Pardo H. "Performance Antiinflamatoria/Antibiótica de un Implante Intraocular Mixto DEX/MOX".

ENAQUI 9 (2025): Miranda, P., Tártara, I., Castro, A., Palma, Mombrú, A. W., Pardo, H. "Perfil Farmacocinético Intraocular de un Implante Biodegradable Mixto DEX-MOX y su Actividad Protectora frente a Infecciones Causantes de Endoftalmitis".

6.5 – Bibliografía

-**Abu, S. O., et al. (2018)**. *OJOph*, *8(4)*. DOI 10.4236/ojoph.2018.84026.

-**Arshinoff, S. A., & Modabber, M. (2016)**. *J Cataract Refract Surg*, *42(12)*, 1730 – 1741. DOI 10.1016/j.jcrs.2016.10.017.

-**Asena, L., et al. (2013)**. *Curr Eye Res*, *38(4)*, 472 – 479. DOI 10.3109/02713683.2012.763101.

-**Bhagat, R., et al. (2014)**. *J Ocul Pharmacol Ther*, *30(10)*, 854 – 858. DOI 10.1089/jop.2014.0082.

-**Bhoite, K., et al. (2015)**. *Mater Today Proc*, *2(4 – 5)*, 1700 – 1706. DOI 10.1016/j.matpr.2015.07.003.

-**Blessy, M., et al. (2014)**. *J Pharm Anal*, *4(3)*, 159 – 165. DOI 10.1016/j.jpha.2013.09.003.

-**Box, G. E. P., & Behnken, D. (1960)**. *Technometrics*, *2(4)*, 455 – 475. DOI 10.2307/1266454.

-**Box, G. E. P., & Wilson, K. B. (1951)**. *J R Stat Soc Series B*, *13(1)*, 1 – 45. DOI 10.1007/978-1-4612-4380-9_23.

-**Braga-Mele, R., et al. (2014)**. *J Cataract Refract Surg*, *40(12)*, 2134 – 2142. DOI 10.1016/j.jcrs.2014.10.010.

-**Bruschi, M. L. (2015)**. Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems, Mathematical Models of Drug Release, 63 – 86. DOI 10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9.

-**Champochiaro, P., et al. (2011)**. *Ophthalmology*, *118(4)*, 626 – 635. DOI 10.1016/j.ophtha.2010.12.028.

-**Chan, K. P., et al. (2006)**. *Anal Biochem*, *353(1)*, 30 – 36. DOI 10.1016/j.ab.2006.03.016.

-**Chan, A., et al. (2011)**. *Clin Ophthalmol*, *5*, 1043 – 1049. DOI 10.2147/OPTH.S13775.

-**Chang-Lin, J. E., et al. (2011)**. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *52(1)*, 80 – 86. DOI 10.1167/iovs.10-5285.

-**Chen, Q., et al. (2008)**. *J Pharm Biomed Anal*, *48(3)*, 732 – 738. DOI 10.1016/j.jpba.2008.07.010.

-**Cheng, K. C., & Wu, W. C. (2006)**. *Kaohsiung J Med Sci*, *22(7)*, 321 – 330. DOI 10.1016/S1607-551X(09)70318-3.

-**Chennamaneni, S. R., et al. (2013)**. *Pharm Res*, *31(11)*, 3179 – 3190. DOI 10.1007/s11095-014-1410-7.

-**Clark, J. P. (2009)**. Case Studies in Food Engineering, Dry Mixing, 5 – 15. DOI 10.1007/978-1-4419-0420-1_2.

-**Djurdjevic, P., et al. (2009)**. *J Pharm Biomed Anal*, *50(2)*, 117 – 126. DOI 10.1016/j.jpba.2009.03.029.

-**Donnenfeld, E., & Holland, E. (2018)**. *Ophthalmology*, *125(6)*, 799 – 806. DOI 10.1016/j.ophtha.2017.12.029.

-**Drikvandi, R. (2017)**. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, *44*, 223 – 232. DOI 10.1007/s10928-017-9510-8.

-**Dumasia, M., et al. (1986)**. *J Steroid Biochem*, *25(4)*, 547 – 553. DOI 10.1016/0022-4731(86)90401-2.

-**Faisant, N., et al. (2002)**. *Int J Pharm*, *242(1 – 2)*, 281 – 284. DOI 10.1016/s0378-5173(02)00188-6.

-**FDA. (2008)**. Drug Registration and Listing.

-**FDA. (2009)**. Drug Stability Guidelines.

-**Filipe, H. P., et al. (2019)**. *J Cataract Refract Surg*, *45(12)*, 1808 – 1817. DOI 10.1016/j.jcrs.2019.07.016.

-**Formica, M. L., et al. (2020)**. *Int J Pharm*, *5(573)*. DOI 10.1016/j.ijpharm.2019.118795.

-**Fredenberg, S., et al. (2011)**. *Int J Pharm*, *415(1 – 2)*, 34 – 52. DOI 10.1016/j.ijpharm.2011.05.049.

-**Gabrielsson, J., & Weiner, D. (2012)**. *Methods Mol Biol*, *929*, 377 – 389. DOI 10.1007/978-1-62703-050-2_16.

-**Gibaldi, M., & Feldman, S. (1967)**. *J Pharm Sci*, *56(10)*, 1238 – 1242. DOI 10.1002/jps.2600561005.

-**Gilson. (2007)**. Verification Procedure for Accuracy and Precision. Procedure LT802292/F.

-**Goel, M., et al. (2010)**. *Open Ophthalmol J*, *4(1)*, 52 – 59. DOI 10.2174/1874364101004010052.

-**González-González, O., et al. (2022)**. *Pharmaceutics*, *14(11)*. DOI →10.3390/pharmaceutics14112324.

-**Grimm, W. (1993)**. *Drug Dev Ind Pharm*, *19(20)*, 2795 – 2830. DOI 10.3109/03639049309050178.

-**Gupta, P., & Bhatia, V. (2008)**. *Indian J Pediat*, *75(10)*, 1039 – 1044. DOI 10.1007/s12098-008-0208-1.

-**Haripriya, A., & Chang, D. F. (2018)**. *Curr Opin Ophthalmol*, *29(1)*, 33 – 39.
DOI 10.1097/ICU.0000000000000445.

-**Hooper, D. C. (2000)**. *Clin Infect Dis*, *30(2)*, 243 – 254. DOI 10.1086/313677.

-**ICH Guide Q1B. (1996)**. Photostability Testing of New Drug Substances and Products.

-**ICH Guide Q1A(R2). (2003)**. Stability Testing of New Drug Substances and Products.

-**ICH Guide Q1E. (2003)**. Evaluation for Stability Data.

-**ICH Guide Q2R1. (2005)**. Validation of Analytical Procedures: Methodology.

-**ICH Guide Q8R2. (2009)**. Pharmaceutical Development.

-**ICH Guide Q9. (2015)**. Quality Risk Management.

-**Jabs, D. A., et al. (2005)**. *Am J Ophthalmol*, *140(3)*, 509 – 516. DOI 10.1016/j.ajo.2005.03.057.

-**Jaffe, G. J., et al. (2000)**. *Ophthalmology*, *107(11)*, 2024 – 2033. DOI 10.1016/s0161-6420(00)00466-8.

-**Karaca, E., et al. (2013)**. *Cutan Ocul Toxicol*, *37(2)*, 133 – 138. DOI 10.1080/15569527.2017.1355317.

-**Keizer, R. J., et al. (2015)**. *Pharmacol Res Perspect*, *3(2)*. DOI 10.1002/prp2.131.

-**Khan, F. H., et al. (2016)**. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, *1(1017 – 1018)*, 120 – 128.
DOI 10.1016/j.jchromb.2016.03.002.

-**Kodama, M., et al. (2003)**. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*, *241(11)*, 927 – 933.
DOI 10.1007/s00417-003-0753-2.

-**Kowalski, R. P., et al. (2012)**. *J Ocul Pharmacol Ther*, *28(6)*, 604 – 608. DOI 10.1089/jop.2012.0073.

-**Lee, A., & Blair, H. A. (2020)**. *Drugs*, *80(11)*, 1101 – 1108. DOI 10.1007/s40265-020-01344-6.

-**Li, M., et al. (2015)**. *Int J Pharm*, *478(1)*, 103 – 112. DOI 10.1016/j.ijpharm.2014.11.024.

-**Liu, L. J., et al. (2020)**. *Cornea*, *61(5)*, 55 – 65. DOI 10.1167/iovs.61.5.55.

-**Macoul, K. L., & Pavan-Langston, D. (1975)**. *Arch Ophthalmol*, *93(8)*, 587 – 590.
DOI 10.1001/archopht.1975.01010020571003.

-**Mammen, A., et al. (2016)**. *Transl Vis Sci Technol*. *5(6)*, 12. DOI 10.1167/tvst.5.6.12.

-**Mann, E., et al. (2025)**. *Drugs*, 397 – 414. DOI 10.1007/s40265-025-02157-1.

-**Matsuura, K., et al. (2013)**. *J Cataract Refract Surg*, *39(11)*, 1702 – 1706.
DOI 10.1016/j.jcrs.2013.05.036.

-**Miller, D. (2008)**. *Clin Ophthalmol*, *2(1)*, 77 – 91. DOI 10.2147/opth.s1666.

-**Nehmé, A., & Edelman, J. (2008)**. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*, *49*, 2030 – 2038.
DOI 10.2147/OPTH.S13889.

-**Nguyen, E. T., & Shorstein, N. H. (2013)**. *J Cataract Refract Surg*, *39(11)*, 1778 – 1779.
DOI 10.1016/j.jcrs.2013.08.036.

-**Ohia, E. O., et al. (1992)**. *J Ocul Pharmacol*, *8(4)*, 295 – 307. DOI 10.1089/jop.1992.8.295.

-**Pandey, S. K., et al. (2002)**. *J Cataract Refract Surg*, *28(1)*, 139 – 148.
DOI 10.1016/s0886-3350(01)01069-0.

-**Patil, H., et al. (2016)**. *AAPS PharmSciTech*, *17(1)*, 20 – 42. DOI 10.1208/s12249-015-0360-7.

-**Pei, M., et al. (2019)**. *Curr Eye Res*, *44(2)*, 194 – 199. DOI 10.1080/02713683.2018.1532012.

-**Pollack, I. P., et al. (1976)**. *South Med J*, *69(10)*, 1296 – 1298. DOI 10.1097/00007611-197610000-00013.

-**Preston, S. L. et al, (1998)**. *JAMA*, *279(2)*, 125 – 129. DOI 10.1001/jama.279.2.125.

-**Radhika, M., et al. (2014)**. *J Ophthalmic Inflamm Infect*, *4(22)*, 1 – 9. DOI 10.1186/s12348-014-0022-z.

-**Razzaq, S. N., et al. (2014)**. *Arab J Chem*, *10(3)*, 321 – 328. DOI 10.1016/j.arabjc.2014.11.016.

-**Robertson, S. M., et al. (2005)**. *Surv Ophthalmol*, *50(1)*, 32 – 45. DOI 10.1016/j.survophthal.2005.07.001.

-**Robinson, M. R., et al. (2014)**. US Patent US8647659B2.

-**Sandri, G., et al. (2014)**. Particulate Products, 323 – 341. DOI 10.1007/978-3-319-00714-4_11.

-**Sarkisian, S. R., et al (2024)**. *Ophthalmol Ther*, *13(4)*, 995 – 1014. DOI 10.1007/s40123-024-00898-y.

-**Schoenwald, R. D., & Stewart, P. (1980)**. *J Pharm Sci*, *69(4)*, 391 – 394. DOI 10.1002/jps.2600690407.

-**Shahidullah, M., et al. (2011)**. Glaucoma – Basic and Clinical Concepts, 1 – 32. DOI 10.5772/26559.

-**Shiah, J. G., et al. (2013)**. European Patent EP2329811B1.

-**Shirasaki, Y. (2008)**. *J Pharm Sci*, *97(7)*, 2462 – 2496. DOI 10.1002/jps.21200.

-**Shockley, R., et al. (1985)**. *Acta Ophthalmol*. *63(1)*, 35 – 38. DOI 10.1111/j.1755-3768.1985.tb05212.x.

-**Sigurdsson, H. H., et al. (2007)**. *Acta Ophthalmol Scand*, *85(6)*, 598 – 602.
DOI 10.1111/j.1600-0420.2007.00885.x.

-**Siqueira, R. C., et al. (2006)**. *Ophthalmologica*, *220(5)*, 338 – 342. DOI 10.1159/000094626.

-**Smith, T. J., et al. (1992)**. *Arch Ophthalmol*, *110(2)*, 255 – 258.
DOI 10.1001/archopht.1992.01080140111037.

-**Subhash, N. E., et al. (2025)**. *Drug Deliv Transl Res*, *15*, 508 – 522. DOI 10.1007/s13346-024-01604-y

-**Tan, D. T. H., et al. (1999)**. *Ophthalmology*, *106(2)*, 223 – 231.
DOI 10.1016/S0161-6420(99)90060-X.

-**Tan, D. T. H., et al. (2001)**. *Ophthalmology*, *108(12)*, 2172 – 2181.
DOI 10.1016/s0161-6420(01)00839-9.

-**Testi, I., & Pavesio C. (2019)**. *Ther Deliv*, *10(10)*, 621 – 625. DOI 10.4155/tde-2019-0051.

-**To, C. H., et al. (2002)**. *Clin Exp Optom*, *85(6)*, 335 – 349. PMID 12452784.

-**USP 42 NF 37 (U.S. Pharmacopoeia 42 - National Formulary 37). (2019)**. Dexamethasone and Moxifloxacin Hydrochloride Monographs. Rockville, Md – USA.

-**Werblin, T. P., et al. (1981)**. *Ophthalmology*, *88(1)*, 78 – 81. DOI 10.1016/s0161-6420(81)35074-x.

-**Whitcup, S. M., & Robinson, M. R. (2015)**. *Ann NY Acad Sci*, *1358*, 1 – 12. DOI 10.1111/nyas.12824.

-**WHO. (1996)**. Guidelines for Stability Testing of Pharmaceutical Products.

-**WHO. (2011)**. Good Manufacturing Practices for Sterile Pharmaceutical Products.

-**Zeng, W., et al. (2006)**. *Rapid Commun Mass Spectrom*, *20(4)*, 635 – 640. DOI 10.1002/rcm.2353.