

Informe final publicable de proyecto Desarrollo de un dispositivo intraocular antibiótico/antiinflamatorio de liberación sostenida

Código de proyecto ANII: FMV_3_2020_1_162645

18/12/2023

MIRANDA FIERRO, Pablo Sebastián (Responsable Técnico - Científico)

CASTRO CASTRO, Analía Victoria (Investigador)

PARDO MINETTI, Helena (Investigador)

TÁRTARA, Luis Ignacio (Investigador)

VILLANUEVA STARK, Juan Pablo (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA/FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS \\
FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

Resumen del proyecto

El objetivo de este trabajo fue desarrollar, caracterizar y optimizar un dispositivo intraocular biodegradable de liberación prolongada para el tratamiento de procesos inflamatorios e infecciones post cirugía de cataratas. La formulación consistió de una matriz polimérica de PLGA conteniendo un antibiótico de amplio espectro (moxifloxacina) y un antiinflamatorio corticosteroide (dexametasona). La fabricación fue realizada mediante extrusión en caliente, y la caracterización por diversos análisis fisicoquímicos y una batería de estudios de control de calidad. Como resultado se obtuvieron insertos cilíndricos de 4 mm de largo y 0.60 mm de diámetro, pensados para colocarse en la cámara anterior del ojo durante una cirugía de cataratas. La idea era por un lado evitar posibles infecciones derivadas del procedimiento, y por otro acelerar la recuperación de los pacientes. Considerando que la mayoría de las cirugías de cataratas se realizan en pacientes añosos, y que el tratamiento posterior consiste en la instilación de gotas varias veces al día, un dispositivo como el de este proyecto se vuelve muy importante. La novedad del desarrollo radica en que en este caso ambos fármacos serían liberados directamente en el sitio de acción durante el tiempo necesario para completar el tratamiento. Tras el desarrollo se realizaron estudios in vivo en ojos de conejo para conocer el perfil farmacocinético de los principios activos. Como resultados más importantes, se puede destacar que ambos fármacos llegan a concentraciones en humor acuoso, varias veces superiores a las que podrían alcanzarse empleando gotas. Por otro lado, se determinó que dexametasona presenta un perfil de liberación prolongada, siendo cuantificable incluso 24 días tras la colocación del inserto. Moxifloxacina presentó un clearance mucho mayor, siendo eliminada completamente del ojo aproximadamente en 5 días. Por último, es importante destacar que el inserto es biodegradable, y tiene una duración aproximada de 20 días en el ojo.

Ciencias Médicas y de la Salud / Otras Ciencias Médicas / Otras Ciencias Médicas / Ciencias farmacéuticas

Palabras clave: Implante oftálmico biodegradable / / /

Introducción

La cavidad vítrea y la cámara anterior se encuentran aisladas de la circulación periférica por las barreras hematorretiniana (BRB) y hematoacuosa (BAB) respectivamente. La introducción de fármacos en ambos espacios puede realizarse de forma pasiva con formulaciones tópicas, pero es más eficiente por procedimientos invasivos de inyección, definiéndose así a las vías intravítrea e intracameral respectivamente. Sin embargo, su desventaja es el daño asociado a la repetición de inoculaciones. En el caso de la administración intracameral, su principal uso es la introducción de antibióticos para el tratamiento de la endoftalmitis. Los principios activos (APIs) más comúnmente usados para esta situación son clorhidrato de moxifloxacina (MOX HCl), cefuroxime y vancomicina, siendo este último el menos usual. Tanto la vía intracameral como la intravítrea presentan alta biodisponibilidad y baja incidencia de efectos secundarios sistémicos, ya que se ve restringido el pasaje de fármacos hacia y desde la sangre por la presencia y eficiente separación realizada por la BRB y la BAB. Por otro lado, las formulaciones aplicables sobre el exterior del ojo exhiben una tasa de absorción considerablemente baja, debido al drenado lacrimal. Por ejemplo, las gotas de uso oftálmico presentan valores de biodisponibilidad menores a 7 %. Teniendo en cuenta estas consideraciones, es evidente que una formulación de liberación prolongada colocada in situ en la cámara anterior del ojo, podría tener un impacto significativo en los tratamientos farmacológicos actuales. Tal es así que en la década del 2000, hubo un intento por desarrollar un medicamento de este estilo. Surodex ha sido hasta el momento la única formulación implantable intracameral aprobada para uso humano. Se trataba de un pequeño pellet biodegradable que utilizaba PLGA como matriz, y contenía dexametasona como principio activo. Se introducía durante la cirugía de cataratas para reducir la inflamación derivada del procedimiento.

El desarrollo del inserto de este proyecto ANII-FMV tomó como punto de partida información acerca de la formulación de Surodex, intentando por un lado aumentar la dosis de corticosteroide entregada, y por otro combinando a su vez la introducción de un antibiótico de amplio espectro (moxifloxacina) con el objetivo de evitar las posibles infecciones que pudiesen ocurrir durante la cirugía de cataratas. La vehiculización de fármacos en implantes para tratamientos intraoculares no es nueva. De hecho, existen varias formulaciones que han sido aprobadas para uso humano, la mayoría para la vía intravítrea (no intracameral como es el caso de este proyecto). Sin embargo, requiere de un equipamiento

específico, que permita aplicar la metodología de extrusión en caliente. Esta técnica implica dispersar APIs no termolábiles y con un punto de fusión elevado, en una matriz amorfa caliente para luego forzar el pasaje de la mezcla a través de un orificio (nozzle). El proceso permite la fabricación de una masa de material uniforme en cuanto a densidad, forma y composición. Es además una tecnología de fácil escalado y puede utilizarse para preparar formas farmacéuticas de sustancias cuyos puntos de fusión superan la temperatura de transición vítrea de la matriz. Se ha observado además, que mejora la biodisponibilidad de APIs poco solubles, pudiéndose incluso fabricar sistemas de liberación modificada. En Latinoamérica, esta tecnología farmacéutica únicamente se está aplicando en México, Brasil y Argentina. A nivel regional se puede afirmar entonces que son realmente muy contados los grupos que ocupan este nicho. En Uruguay es nuestro grupo el único que trabaja en este tipo de desarrollos a partir de la adquisición de una extrusora de calidad farmacéutica en el marco del llamado a "PROYECTOS PARA LA ADQUISICIÓN DE EQUIPAMIENTO CIENTÍFICO DE PUNTA INEXISTENTE A NIVEL NACIONAL", Convocatoria 2013, número de postulación EQC_X_2013_1, de título "Aplicación de tecnología de punta para el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas". Asimismo, se ha finalizado con éxito un proyecto del tipo Alianzas para la Innovación, convocatoria 2014, Código del Proyecto: ALI_1_2014_1_5021 de título: "Formulación, preparación y evaluación de un dispositivo implantable de aplicación oftalmológica". El mismo ha permitido desarrollar las capacidades del grupo en la temática de implantes intraoculares.

La formulación planteada en este proyecto es a su vez el tema principal de la tesis de doctorado del Q.F. Pablo Miranda, titulada "Desarrollo y Caracterización de Implantes Biodegradables Conteniendo Clorhidrato de Moxifloxacina y Dexametasona para Prevención y/o Tratamiento de Infecciones Bacterianas y Procesos Inflamatorios Intraoculares". La idea fundamental de dicho trabajo es generar y aportar una alternativa terapéutica para la comunidad médica, capaz de superar en rendimiento a las gotas oftálmicas en cuanto al tratamiento posterior a la cirugía de cataratas. En ese sentido, se decidió por un lado incorporar un corticosteroide para controlar la inflamación, y por otro un antibiótico de amplio espectro para prevenir la posible aparición de infecciones oportunistas. Es importante mencionar que no existe en el mundo una formulación de este estilo.

El ojo es un desafío único cuando se piensa en la terapéutica de sus estructuras internas. Terapias tópicas y sistémicas, no permiten un tratamiento adecuado en algunas patologías. Mediante el uso del dispositivo implantable que se propuso en este trabajo, la liberación de ambos fármacos elegidos es regulada por la tasa de degradación del propio implante el cual es insertado por el profesional en la cámara anterior durante el procedimiento de la cirugía de cataratas. El problema con la administración por gotas es que la biodisponibilidad se reduce drásticamente debido a que el ojo es un sistema de difícil acceso desde un punto de vista estructural. Desde el exterior, la secreción lacrimal limita la entrada de moléculas hidrosolubles, ya que constantemente se renueva y se drena arrastrando consigo sustancias exógenas. Por otro lado, la esclerótica es una capa compuesta por fibras colágenas densamente empaquetadas, lo cual hace incluso más difícil la permeación de moléculas desde el exterior. Desde el interior, la barrera hematorretiniana aísla de forma efectiva el pasaje de moléculas desde la sangre hacia el interior del ojo, por lo que fármacos circulando de manera sistémica no tienen una buena biodisponibilidad en la zona. Sumado a estos inconvenientes, es importante resaltar que el uso de gotas está librado a la dosificación que realiza el paciente, la cual a veces puede no ser repetible. Por otro lado, el tratamiento inyectable también presenta desventajas importantes. Múltiples inyecciones acarrearán efectos secundarios y el adicional de la toxicidad retinal. Las inyecciones intraoculares son métodos dolorosos, pero eficientes en términos de concentraciones (al menos en el muy corto plazo) tanto para el segmento posterior como anterior del ojo.

Las cirugías de cataratas representan actualmente un altísimo porcentaje de las intervenciones quirúrgicas oftalmológicas. Dichos procedimientos son en general realizados sobre pacientes ancianos, puesto que la enfermedad de cataratas está altamente correlacionada con la edad. Una vez realizada la operación, el proceso de recuperación involucra la instilación de gotas oftálmicas con una frecuencia muy elevada. Esto evidentemente es un problema desde el punto de vista de la adhesión del paciente, si uno considera el rango etario al cual está destinado el procedimiento. En general, el tratamiento no se sigue de la mejor manera, ya sea por olvidos, inadecuada instilación o administración errática en el tiempo. En muchas ocasiones el paciente necesita contar con una atención dedicada justamente para ayudar a mantener la adhesión al tratamiento. Lograr de alguna manera eliminar esta dependencia a la instilación constante de gotas para acelerar la recuperación, y a la probable necesidad de tener que requerir ayuda ajena para cumplir el tratamiento, sería lógicamente un gran avance en el tema.

Las limitaciones de los tratamientos convencionales mencionados demuestran que las mejores posibilidades de recuperación y/o mejora de afecciones oculares internas deberían estar dadas por procedimientos mínimamente

invasivos, destinados a realizar administraciones de formulaciones capaces de lograr una liberación sostenida a partir de una matriz polimérica biodegradable y biocompatible. El dispositivo que se propuso desarrollar pretende incidir justamente en los aspectos antes descritos, ya que permite lograr la liberación controlada del fármaco objetivo mediante su implantación en el segmento anterior del ojo una vez finalizado el acto quirúrgico.

El objetivo general de esta propuesta fue diseñar, fabricar, optimizar y caracterizar un sistema implantable de aplicación ocular que permitiese la entrega sostenida y controlada de ambos fármacos in vitro, mediante su inclusión en una matriz polimérica biocompatible y biodegradable empleando la tecnología de extrusión en caliente. Se planteó a su vez fabricar implantes cuyo perfil de liberación prolongada fuese tal que se mantuviesen concentraciones terapéuticas durante aproximadamente 10 días, y cuya inserción fuese en el segmento anterior del ojo al finalizar el acto quirúrgico. Para ello se empleó en una primera etapa una metodología de diseño experimental con el fin de obtener una formulación que se ajustase a tales requerimientos. A su vez, fue necesario validar una metodología analítica capaz de cuantificar adecuadamente ambos fármacos en humor acuoso.

En concreto, se planteó fabricar implantes biodegradables en base a PLGA de forma cilíndrica. De acuerdo a resultados obtenidos en pruebas iniciales, se determinó que la longitud óptima de los insertos sería de 4 mm, y su diámetro de 0,60 - 0,65 mm. En base a bibliografía científica, se seleccionaron dexametasona y clorhidrato de moxifloxacina como mejores candidatos de APIs en este desarrollo, y al PLGA como matriz soporte biodegradable. Las dosis seleccionadas fueron 0.2 mg de dexametasona y 1 mg de clorhidrato de moxifloxacina (dosis que en principio deberían ser suficientes para completar el tratamiento en el lapso de tiempo seleccionado, también según bibliografía). Como resultado al finalizar este proyecto debería haberse logrado la fabricación exitosa de implantes con las características antes mencionadas tanto desde el punto de vista morfológico como del de su perfil de liberación in vitro de los principios activos. Asimismo, al finalizarse este proyecto debería haberse realizado una caracterización físico-química exhaustiva del sistema final que se haya logrado desarrollar. Por último, se esperaría observar in vivo que las concentraciones alcanzadas por ambos principios activos fuesen superiores a las de sus formulaciones equivalentes tópicas. Esto por supuesto, a partir de la determinación de su perfil farmacocinético.

Metodología/diseño del estudio

La primera etapa del proyecto consistió en el desarrollo del inserto de liberación prolongada, su caracterización (mediante microscopía electrónica de barrido, calorimetría diferencial de barrido, microscopía Raman confocal, difracción de rayos X), y la puesta a punto de las diferentes metodologías de control de calidad. En este último caso, se pueden destacar la liberación in vitro, y el estudio de uniformidad de unidades de dosis, para los cuales fue necesario validar un método de HPLC que contemplase la posibilidad de cuantificar 2 principios activos y sus correspondientes productos de degradación. Para las determinaciones analíticas, se modificó y validó un método isocrático para cuantificar a la vez DEX, MOX HCl y posibles productos de degradación de ambos APIs. El método cromatográfico validado se adaptó tomando como referencias los criterios de aceptación de materias primas publicados en las monografías oficiales de USP 42 NF 37. Los análisis se llevaron a cabo con un equipo HPLC modelo Dionex Ultimate 3000 equipado con detector de arreglo de diodos. La longitud de onda de determinación fue 242 nm, la temperatura del sistema 30 °C y el flujo de fase móvil 1.50 mL/min. La columna empleada fue una BDS Hypersil C8 de 250 X 4.60 mm y tamaño de partícula de 5 µm. La fase móvil fue una mezcla de 56 % de metanol y 44 % de buffer fosfato preparado disolviendo 2.72 g de KH₂PO₄ en 1 L de agua milliQ + 1 mL de trietilamina (bloqueador de silanoles) y ajustando el pH a 2.80 con H₃PO₄ concentrado. La fase móvil se seleccionó considerando que en dichas condiciones de acidez el corticosteroide queda sin ionizar y el antibiótico existe casi totalmente como contraión del clorhidrato.

El desarrollo del inserto partió de la base de información previa obtenida de diferentes fuentes bibliográficas. DEX y MOX HCl han sido utilizados con éxito en conjunto por vía intracameral para tratar endoftalmitis, uveítis y otros procesos inflamatorios. Se sabe a su vez que este antibiótico no causa lesiones de córnea ni síndrome tóxico del segmento anterior (STSA) a concentraciones inferiores a 500 µg/mL. En el caso de DEX, son seguras dosis de aproximadamente hasta 500 µg. Las inyecciones intracamerales utilizadas normalmente en la práctica clínica se preparan en el momento a partir de gotas oftálmicas. La FDA desaconseja esta práctica por el alto riesgo de pérdida de esterilidad e introducción de agentes inductores de STSA. La inserción de un implante de liberación prolongada evitaría repetir dosis y la entrada de contaminantes. Un sistema conteniendo a la vez DEX y MOX HCl permitiría tratar en simultáneo procesos inflamatorios y distintos tipos de infecciones. Si se lograra a su vez mantener altas concentraciones intracamerales, se reduciría el riesgo de promover resistencia bacteriana.

Los tratamientos con colirios de MOX HCl se extienden normalmente de 5 a 10 días. La prevención usual contra endoftalmitis tras una cirugía de cataratas consta de inyecciones intracamerales de 100 μ L al 0.10 % m/V (500 μ g) de antibiótico. En la mayoría de casos de endoftalmitis (85.87 %), la concentración inhibitoria mínima para el 90 % de las bacterias susceptibles (MIC90) no supera los 16 μ g/mL. El valor más alto registrado es 32 μ g/mL, en una cepa muy resistente de *Staphylococcus aureus*. Asumiendo una liberación lineal, la velocidad de entrega de MOX HCl necesaria para obtener una concentración capaz de controlar patógenos con MIC90 < 16 μ g/mL en 24 horas es de aproximadamente unos 64 μ g/día.

En cuanto a DEX, 2 son las formulaciones que pueden tomarse como base para el desarrollo de los implantes de este trabajo. En primer lugar, el producto más ampliamente utilizado satisfactoriamente ha sido el Ozurdex. Sus implantes cuentan con dimensiones de 6 mm de largo y 0.50 mm de diámetro, y contienen 60 % de API (700 μ g) y 40 % de una mezcla de PLGAs éster/ácido en proporción 1/3. Su diseño permite 30 – 60 días de liberación sostenida desde el humor vítreo, siendo detectable el fármaco incluso a los 6 meses luego de su introducción. El segundo ejemplo a tener en cuenta es Surodex, primera formulación implantable en cámara anterior aprobada en humanos. Con dimensiones de 1 mm de largo y 0.50 mm de diámetro, contenía 60 μ g de DEX distribuidos en una matriz de PLGA. Su diseño permitía una liberación sostenida durante unos 7 – 10 días, tras su colocación dentro del surco ciliar. La performance de Surodex fue demostrada como superior en comparación con gotas oftálmicas del mismo fármaco. Pese a que se registró en China y Singapur, fue discontinuado. En Estados Unidos no llegó a mercado porque los seguros médicos no aceptaron cubrir a la vez su colocación y la cirugía de cataratas.

Considerando todo lo anterior, en este trabajo se decidió desarrollar implantes novedosos conteniendo 200 μ g de DEX y 1000 μ g de MOX HCl. La experiencia previa con el proyecto Alianzas mencionado anteriormente, permitió generar un inserto prototipo considerando las dosis planteadas. Las proporciones seleccionadas en porcentajes fueron: 10 % DEX, 50 % MOX HCl y 40 % PLGA. Particularmente en este caso se optó por utilizar el PLGA ácido porque su solubilidad en agua es mayor y su biodegradación más rápida. Nótese que esto es diferente a lo que sucede con Ozurdex, que utiliza una mezcla de PLGA ácido y éster, lo cual permite una liberación más prolongada. En el caso del implante de este trabajo, no se buscaba una liberación de meses, sino de días. A su vez, uno de los componentes era extremadamente soluble (MOX HCl), lo cual podría tener un efecto importante en el perfil final.

El desarrollo del inserto fue realizado mediante la metodología quality by design (QbD). El Comité Internacional para la Armonización (ICH) le define como un conjunto de conceptos empleados con el fin de garantizar la calidad de un desarrollo farmacéutico, mediante un eficiente uso de recursos y la detección de riesgos asociados al producto. Todo en base a información científica previa disponible sobre el mismo. El primer punto del QbD es el perfil de calidad del producto (TPP). Esta sección trata sobre los objetivos del sistema a desarrollar. Si bien ICH lo contempla dentro de otra sección más amplia, puede ser evaluado por separado. El siguiente punto es el perfil de calidad del producto objetivo (QTPP). Este refiere a rangos de tolerancia para cumplir los requisitos del diseño. El siguiente punto es de atributos críticos de calidad (CQA). Se trata de todas las características del sistema, cuya desviación corrompería el desempeño del producto. Luego, se deben definir los atributos críticos de los materiales (CMA). Estos refieren a propiedades de APIs, excipientes y otros reactivos que pueden afectar la calidad del producto y el método de fabricación. Por último, se deben identificar los parámetros críticos del proceso (CPP). Estos corresponden a variables del método de fabricación que probablemente impacten significativamente en la calidad producto final. Es importante destacar también que la metodología QbD recomienda encarecidamente apoyarse en la estadística a través de la aplicación de un diseño experimental para generar una superficie de respuesta capaz de optimizar las características del producto final.

Fue así que se decidió implementar un diseño del tipo central compuesto. El espacio de trabajo se determinó a partir del comportamiento del sistema y la evaluación de prototipos de implantes obtenidos en pruebas piloto. Los factores elegidos en este caso fueron velocidad de giro de los tornillos y temperatura de extrusión. Se decidió mantener esta última constante en el troquel y en todas las estaciones del cañón de la extrusora. Por otro lado, las variables de respuesta elegidas respecto a ambos APIs fueron potencia (uniformidad de contenido) y velocidad de entrega de fármaco (VEF). Esta última se relaciona directamente con los porcentajes de liberación observados in vitro. El análisis estadístico para la optimización de la formulación y la creación de la superficie de respuesta se llevó a cabo maximizando las VEFs y manteniendo ambas potencias en determinado rango.

Por otro lado, la segunda etapa del proyecto consistió en la realización de estudios in vivo en conejos para determinar el perfil farmacocinético de los 2 principios activos seleccionados. Se utilizaron en total 4 conejos albinos hembra tipo New Zealand (2 – 2.50 kg de peso). Los animales recibieron agua y comida ad libitum en una habitación con temperatura controlada (21 ± 5 °C), y se les expuso a ciclos diarios de luz/oscuridad de 12 horas aproximadamente durante 1 semana de adaptación. El manejo y los procedimientos aplicados a los conejos, fueron realizados según pautas previamente definidas por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, perteneciente a la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Argentina). El protocolo (aprobado por resolución 44/2017) se redactó de manera tal que coincidiera con las guías recomendadas por el National Institute of Health (USA). A su vez, todas las intervenciones quirúrgicas/toma de muestras fueron realizadas por el Dr. Luis Ignacio Tártara (cirujano oftalmólogo). En líneas generales, los animales se anestesiaron intramuscularmente con una mezcla de ketamina/xilacina, y localmente con proparacaína. Luego se les dilató la pupila con gotas de tropicamida/fenilefrina. Para evitar el reflejo de cierre palpebral se colocó un blefaróstat. Los conejos recibieron un implante en uno de sus ojos, tomándose muestras para estudiar el perfil farmacocinético del sistema. Posteriormente se realizaron estudios de seguimiento clínico (evaluación del flare por biomicroscopía con lámpara de hendidura adaptada para fotografía digital, y medición de la presión intraocular con tonómetro digital). Al finalizar los ensayos, se anestesiaron los animales con ketamina/xilacina y se sacrificaron en cámara de CO₂.

Tras colocar los insertos, 50 µL de humor acuoso fueron removidos por punción de los animales, los días 1, 2, 3, 7, 10, 14, 24. Las fracciones obtenidas se almacenaron en congelador a – 25 °C hasta su uso. Para la determinación analítica de las muestras in vivo, el método cromatográfico consistió en un gradiente iniciando cada solvente en 50 %, llegando a 56 % de metanol tras 5 minutos. En ambos casos (in vivo, in vitro), el tiempo de corrida total fue de 10 minutos. Tanto para DEX como para MOX HCl, existen publicaciones que describen el comportamiento farmacocinético en humor acuoso de la absorción tópica a partir de gotas. Las gráficas observadas sugieren claramente modelos bicompartimentales. Aprovechando esta información y la idea de que el sistema de entrega en este trabajo puede considerarse como una administración extravasal con absorción de primer orden, se determinó un modelo farmacocinético utilizando el paquete informático Monolix. A partir de estos datos, se comparó a grandes rasgos el comportamiento del implante respecto a las gotas.

Resultados, análisis y discusión

Para el diseño experimental, en el caso de DEX solo fue posible derivar un modelo estadísticamente significativo para potencia y VEF1, mientras que con el resto de las velocidades se utilizó el promedio como descriptor. La alta variabilidad del proceso reflejada en los r^2 ajustados obtenidos, se debió a cuestiones logísticas. Por ejemplo, el costo del PLGA motivó que se trabajara con la mínima alimentación indispensable, siendo imposible alcanzar condiciones de estado estacionario en una extrusora diseñada para producción piloto/industrial. A su vez, la fibra se recolectó manualmente a velocidad no constante. Esto introdujo variabilidad en el diámetro. Finalmente, los implantes fueron fraccionados por corte manual acotando su peso. Esto agregó variabilidad en su longitud. Considerando todo lo anterior, la optimización matemática se centró en mantener la potencia entre 95 – 105 %, y en maximizar las VEFs. De tal operación surgió como combinación de factores, $T = 148$ °C y $v = 279$ rpm. Durante los experimentos, se observó la aparición de un producto de degradación consistente con la oxidación de dexametasona. Este fue detectado de forma recurrente, aunque no de manera constante en los estudios de uniformidad de contenido (potencia). Básicamente, para los distintos lotes se observó en algunos, en ninguno o en la totalidad de los insertos analizados. Por lo tanto, su presencia probablemente se debió a la combinación de ciertas condiciones de presión y temperatura en el troquel tras superar un determinado límite. Debido a las variaciones intrínsecas del proceso, fue imposible determinar dicho umbral. En el caso de MOX HCl, sí fue posible obtener un modelo estadísticamente significativo para potencia y VEF. Nótese que en este caso se habla de una sola VEF, debido a que el antibiótico se libera a velocidad constante. Los r^2 calculados en el diseño experimental reflejaron nuevamente la variabilidad intrínseca del sistema.

En cuanto a los estudios de liberación in vitro, en promedio se entregaron 79.64 µg de DEX en 10 días, superando en casi 20 µg a Surodex. Estadísticamente, VEF se mantuvo constante los primeros 3 días, y luego aumentó significativamente. Dado que DEX es el componente minoritario del implante, su liberación depende de la cantidad de PLGA y MOX HCl en el inserto. A medida que el polímero se degrada y el antibiótico se disuelve, más partículas de DEX se exponen al solvente. Esto permite que VEF aumente con el tiempo, ajustándose a un modelo de Korsmeyer-Peppas. Al graficar las masas entregadas de DEX en función de las de MOX HCl, se observa cómo se replica el perfil de liberación del corticosteroide. Esto sugiere que MOX HCl presenta el mayor efecto sobre la liberación de DEX. La linealidad observada para la liberación

de MOX HCl se debe fundamentalmente a las condiciones sink establecidas en el ensayo, y a que el API es en masa el componente mayoritario del implante. El valor de VEF supera los 70 µg/día, entregando al finalizar el estudio un promedio de 705.05 ± 27.78 µg (70 %).

Sobre el lote final, se realizaron también estudios de caracterización fisicoquímica. Por calorimetría diferencial de barrido, en los estudios originales sobre materias primas se observan claramente los eventos endotérmicos asociados a la transición vítrea del PLGA (42 – 43 °C), y a la fusión tanto de MOX HCl (238 – 242 °C) como de DEX (262 – 264 °C). Todos estos cambios de fase también se distinguen en el gráfico del implante, sin detectarse otras transformaciones. No obstante, se observa una reducción en las temperaturas originales (39 °C para PLGA, 230 °C en MOX HCl, 251 °C en DEX), y una disminución en la intensidad de los valles de cada evento endotérmico. Este comportamiento se debe fundamentalmente a la presencia de diferentes componentes en distintas proporciones en la mezcla. En el análisis cristalográfico, puede apreciarse que ambos APIs presentan claramente estructura cristalina, mientras que en el polímero se observa el perfil envolvente típico de un material amorfo. Por otro lado, todos los picos relevantes de los fármacos aparecen también en el implante. En cuanto al estudio por espectroscopía Raman confocal, la primera parte de la evaluación consistió en la obtención de las señales correspondientes a todas las materias primas del inserto. Se observó una correcta superposición de picos entre todos los componentes del implante. Con los datos recolectados, se construyó una imagen de la distribución espacial de cada material. Pudo observarse que, a una escala de 10 µm todos los componentes aparecen aleatoriamente dispersos en las proporciones dadas en la formulación, y con pocas zonas inhomogéneas. Una vez que el inserto fue optimizado y caracterizado, se procedió a realizar estudios in vivo.

Los primeros ensayos preliminares permitieron determinar cualitativamente a lo largo de 36 días, el comportamiento de los implantes. Los 3 conejos originales recibieron un inserto (esterilizado por radiación gamma con una dosis de 30 kGy) en uno de sus ojos, mientras que el contralateral se tomó como control. Los implantes se colocaron sin dificultades en la cámara anterior y su posición no varió durante el estudio. En ningún caso pudo visualizarse evidencia alguna de endoftalmítis. Sí se observó una tendencia a la formación de sinequias (inflamación causada por la adhesión entre sí de las estructuras internas del ojo). Esto se explica por el hecho de que la presencia del cristalino limita el tamaño de la cámara anterior. Dicho de otra manera, un inserto colocado en un ojo al cual no se le realizó la operación de cataratas, no tiene la posibilidad de moverse libremente y colocarse en el tercio inferior. En presencia del cristalino, el implante contacta con las estructuras internas como el iris, produciendo inflamación e irritación que desencadenan la formación de sinequias duraderas. En cuanto a la presión intraocular, solo se encontró diferencia estadísticamente significativa en 2 de los 5 ojos que recibieron el inserto. Por otro lado, pudo observarse que los implantes se degradan totalmente entre 20 y 30 días luego de colocados.

Los estudios in vivo posteriores tenían como objetivo determinar el perfil farmacocinético de los insertos en ojos sanos de conejo. Para ello, se implantaron en total 4 ojos, y fueron tomándose muestras de humor acuoso a lo largo de varios días. La toma de muestras se basó en el comportamiento observado durante los estudios in vitro. En ese sentido, se decidió realizar extracciones de humor acuoso los días 1, 2, 3, 7, 10, 14 y 24 respectivamente. A su vez, se fue monitoreando el estado ocular general, y de malestar de los conejos. Se observó que en algunos casos (sobre todo al principio), los animales se mostraban muy inquietos y molestos, claramente por la sensación de cuerpo extraño que les producía el implante. Recuérdese que la idea de estos implantes es ser introducidos en el ojo una vez que se completa la operación de cataratas. En dicha situación, la remoción del cristalino incrementa el volumen de la cámara anterior, y entonces el inserto puede ser colocado con más holgura. En un ojo que todavía conserva el cristalino, el volumen es menor, y por lo tanto el inserto contacta más con las estructuras internas del ojo produciendo una molestia, y hasta incluso un aumento en la presión ocular en algunos casos.

Una vez tomadas todas las muestras, se procedió a su análisis mediante un método HPLC validado para tal fin. En los estudios realizados, las concentraciones determinadas para dexametasona estuvieron en el rango 0.30 - 4 µg/mL, mientras que para MOX HCl, el rango fue de 2 - 40 µg/mL. El objetivo principal de este estudio era conocer el comportamiento farmacocinético preliminar, para tener una idea de concentraciones esperadas, modelo general asociado, velocidades de eliminación, etc. Estos resultados serán tomados como insumos para posteriores ensayos que permitan refinar varios aspectos prácticos. 2 puntos fundamentales a tener en cuenta en estudios farmacocinéticos son el timing de la toma de muestras, y el número de individuos con los cuales se trabaja. En ese sentido, una población más grande permite reducir la variabilidad de los resultados, la cual en farmacocinética es realmente muy amplia en la mayoría de los casos. A su vez, una correcta selección del régimen de muestreo permite obtener puntos en las distintas

etapas del proceso del LADME (liberación, absorción, distribución, metabolización y excreción). Dichos insumos son indispensables para que un software realice un modelado adecuado y refinado del sistema farmacocinético estudiado.

Para dexametasona, el perfil farmacocinético fue bastante bien determinado como un modelo bicompartimental de administración extravasal con eliminación por clearance. Se estima que la concentración máxima se alcanza antes de las 24 horas tras la administración, y que es de alrededor de 3.50 µg/mL (lo cual es más de 20 veces lo alcanzado con una administración tópica por gotas del mismo fármaco). El clearance fue calculado aproximadamente en 4.4.X 10⁻⁸ mL/día, lo cual explica que incluso después de 24 días, las concentraciones de dexametasona en el humor acuoso estaban en el entorno de los 500 ng/mL, mucho mayor incluso que lo alcanzado por una aplicación tópica. Los parámetros del modelo farmacocinético determinado para dexametasona fueron: $k_a = 0.75 \text{ días}^{-1}$, $CL = 4.4.X 10^{-8} \text{ mL/día}$, $V_1 = 24.33 \text{ mL}$, $Q = 17.16 \text{ mL/día}$, $V_2 = 355.19 \text{ mL}$. Si bien el perfil estuvo relativamente bien determinado, podría haberse refinado aún más incrementando el número de puntos al inicio, es decir antes de las 24 horas. De esa manera se podría haber modelado la absorción mucho mejor. Por otro lado, existe un momento en la toma de muestras en el que se esperan varios días para retirar humor acuoso. Esto ocurre entre los días 3 y 7 respectivamente. Ahí también se podría agregar algún punto extra. De nuevo, considerando todo lo anterior, los resultados obtenidos significan una primera aproximación al comportamiento in vivo de este novedoso sistema terapéutico, y es necesario continuar probando y refinando los análisis.

Para moxifloxacina, el perfil farmacocinético no fue tan bien determinado como el de dexametasona, pero de todas maneras se pudo ajustar con el mismo modelo. La razón fue que el fármaco presentó un clearance extremadamente alto, tanto que luego de la tercera toma (a los 3 días) ya no fue posible detectarlo en humor acuoso. Se estima que la presencia de moxifloxacina en el ojo no duraría más de 5 días. La magnitud de la eliminación impresiona aún más, cuando se estima que las concentraciones máximas a las que llega el fármaco en el interior del ojo están entre 20 y 30 µg/mL, lo cual es muchísimo mayor que dexametasona, y también unas 20 o 30 veces lo que se puede obtener a partir de gotas oftálmicas de moxifloxacina. Al presentar el fármaco un clearance tan elevado, la necesidad de muestrear a tiempos más cercanos al momento de la inserción aumenta. En el caso de moxifloxacina, no solo el muestreo planteado se perdió toda la etapa de absorción, sino que también muchos de los puntos planificados no pudieron ser utilizados porque el fármaco ya había desaparecido del humor acuoso. Dicho de otra manera, los resultados son muy aproximados, y fueron derivados únicamente de los puntos correspondientes a una porción de la etapa de eliminación del fármaco. Así y todo, los parámetros calculados fueron los siguientes: $k_a = 1.66 \text{ días}^{-1}$, $CL = 0.6 \text{ mL/día}$, $V_1 = 36.15 \text{ mL}$, $Q = 36.15 \text{ mL/día}$, $V_2 = 214.23 \text{ mL}$. Comparando los parámetros obtenidos para moxifloxacina y dexametasona, queda claro que este último presenta una tasa de absorción menor (por tener k_a menor), una eliminación más lenta desde ambos compartimientos del modelo (por presentar en ambos casos un clearance menor) y una afinidad mucho más alta por los tejidos (por presentar un volumen de distribución más alto en el segundo compartimiento). Nótese que en el compartimiento 1 (correspondiente al humor acuoso), moxifloxacina presenta un volumen de distribución mayor, lo cual es lógico considerando su alta solubilidad. Sin embargo, dexametasona al ser lipófilo, queda más retenido en el compartimiento 2, que corresponde a las estructuras celulares del ojo en equilibrio dinámico con el humor acuoso.

Conclusiones y recomendaciones

A continuación, se describen las conclusiones más importantes obtenidas a partir de los resultados de este proyecto.

Parte Analítica:

Se desarrollaron métodos de determinación de ambos fármacos para liberación in vitro e in vivo respectivamente. A su vez, se pusieron a punto diversas técnicas de control de calidad.

Modelos Estadísticos por Diseño Experimental:

Fue posible obtener modelos estadísticamente significativos solo para ciertos parámetros de respuesta, tanto para DEX como para MOX HCl. La alta variabilidad en los resultados se atribuyó a limitaciones logísticas, como la necesidad de efectuar una alimentación mínima por el alto costo del PLGA en una extrusora pensada para escala piloto, la recolección de la fibra a velocidad no constante, y el corte manual de los implantes.

Optimización del Proceso:

La optimización se centró en mantener la potencia entre 95-105% y maximizar las VEFs, resultando en la combinación de factores $T = 148 \text{ °C}$ y $v = 279 \text{ rpm}$. Se observó la presencia de un producto de degradación relacionado con la oxidación de dexametasona.

Liberación in vitro de DEX y MOX HCl:

Se observó una liberación constante de MOX HCl y un aumento significativo en la liberación de DEX con el tiempo, ajustándose a un modelo de Korsmeyer-Peppas. Este comportamiento tiene que ver con el hecho de que DEX es el componente minoritario del implante, y su liberación es altamente dependiente de la cantidad de MOX HCl presente. A medida que el antibiótico se libera, más cantidad de DEX tiene acceso al medio y por eso su velocidad de liberación también aumenta.

Caracterización Físicoquímica:

No se observaron anomalías por asociaciones químicas, cambios de fase inesperados o inhomogeneidades, tanto en los implantes como en las materias primas, luego de caracterizar mediante técnicas tales como difracción de rayos X, calorimetría diferencial de barrido y espectroscopía Raman confocal.

Estudios In Vivo:

Los implantes se degradaron totalmente entre 20 y 30 días después de la colocación. Por otro lado, se observó una tendencia a la formación de sinequias, posiblemente debido a que la presencia del cristalino quita volumen al ojo para permitir al inserto colocarse adecuadamente. Recuérdese que en realidad, el inserto está pensado para implantarse en un ojo sin cristalino. Más allá de eso, no se observó síndrome tóxico del segmento anterior.

Farmacocinética:

Se logró determinar un perfil farmacocinético preliminar para DEX y MOX HCl. Ambos fármacos presentan en principio un modelo bicompartimental con eliminación constante (clearance), y las concentraciones estimadas están muy por encima de lo que puede esperarse tras una administración por gotas oftálmicas. MOX HCl presentó un clearance extremadamente alto, limitando la detección en el humor acuoso probablemente después de 5 días de colocado el inserto. En el caso de DEX, el fármaco se mantiene cuantificable en humor acuoso por mucho más tiempo, persistiendo aún hasta el último día del estudio realizado (24 días en total tras la inserción).

A continuación se describen las recomendaciones más importantes obtenidas a partir de los resultados de este proyecto.

Optimización del Proceso:

Con el fin de reducir la variabilidad en el contenido de fármacos en los implantes y en el comportamiento final del producto, lo más importante sería intentar automatizar el proceso de fabricación lo más posible. Para ello es necesario contar con determinados aditamentos que permitan que la fibra obtenida de la extrusora, pueda ser recolectada a velocidad constante y que los implantes se fraccionen todos de la misma manera. Por otro lado, cabe destacar que el uso de una extrusora de menor tamaño es recomendable para abaratar costos en cuanto al uso del PLGA, factor que también se vuelve una limitante puesto que impide alcanzar condiciones de estado estacionario.

Estudios In Vivo:

Una vez dilucidado el comportamiento del inserto en el interior del ojo, y evaluadas las metodologías de inserción, se vuelve interesante comenzar a probar los implantes en modelos patológicos. En ese sentido, es necesario desarrollar modelos de cirugía de cataratas y de endoftalmítis, con el fin de enfrentar los insertos a situaciones patológicas reales.

Determinación de los perfiles Farmacocinéticos:

Los estudios in vivo en este proyecto tuvieron 2 problemas fundamentales. El primero de ellos fue el número de conejos que fueron empleados. En farmacocinética la variabilidad es muy elevada, por lo que se hace necesario contar con una población lo suficientemente amplia como para poder estimar el coeficiente de variación poblacional. De esta manera, los parámetros obtenidos para el modelo adquieren una robustez mayor. En humanos, por ejemplo, normalmente los estudios para determinar estos perfiles suelen realizarse con al menos 10 voluntarios. Sería conveniente entonces pensar para próximos estudios aumentar el número de conejos a implantar. El segundo problema tiene que ver con el muestreo. Definitivamente los resultados de este estudio preliminar permitirán en el futuro ajustar el régimen de toma de muestras para obtener una buena descripción del perfil en sus 3 etapas fundamentales: absorción, máximo de concentración y eliminación. Es necesario entonces intentar muestrear más puntos durante las primeras 24 horas tras la inserción, y de ser posible, reducir siempre el intervalo de toma de muestras a 12 horas en lugar de 24.

Referencias bibliográficas

- Al Omari, M. M. H., et al. (2014). ISBN: 9780128004012.
- Arshinoff, S. A., & Modabber, M. (2016). DOI: 10.1016/j.jcrs.2016.10.017.
- Asena, L., et al. (2013). DOI: 10.3109/02713683.2012.763101.
- Avgoustakis, K. (2005). DOI: 10.1081/E-EBBE-120013950.
- Belfort, R., et al. (2012). DOI: 10.1007/s12325-012-0018-8.
- Bhagat, R., et al. (2014). DOI: 10.1089/jop.2014.0082.
- Bhoite, K., Kakandikar, G. M., & Nandedkar, V. M. (2015). DOI: 10.1016/j.matpr.2015.07.003.
- Blessy, M., et al. (2014). DOI: 10.1016/j.jpha.2013.09.003.
- Box, G. E. P., & Behnken, D. (1960). DOI: 10.2307/1266454.
- Box, G. E. P., & Cox, D. R. (1964). DOI: j.2517-6161.1964.tb00553.x.
- Box, G. E. P., & Wilson, K. B. (1951). DOI: 10.1007/978-1-4612-4380-9_23.
- Braga-Mele, R., et al. (2014). DOI: 10.1016/j.jcrs.2014.10.010.
- Brazis, P. W., Stewart, M., & Lee, A. G. (2004). DOI: 10.1097/01.nrl.0000131145.26326.ff.
- Breitenbach, J. (2002). DOI: 10.1016/s0939-6411(02)00061-9.
- Bruschi, M. L. (2015). DOI: 10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9.
- Carlson, M., & Thompson, R. D. (2000). DOI: 10.1093/chromsci/38.2.77.
- Chan, K. P., et al. (2006). DOI: 10.1016/j.ab.2006.03.016.
- Chan, A., Leung, L. S., & Blumenkranz, M. S. (2011). DOI: 10.2147/OPHTH.S13775.
- Chang, D. T. W., et al. (2009). DOI: 10.2147/ophth.s5730.
- Chang-Lin, J. E., et al. (2011). DOI: 10.1167/iovs.10-5285.
- Chen, Q., et al. (2008). DOI: 10.1016/j.jpba.2008.07.010.
- Cheng, K. C., & Wu, W. C. (2006). DOI: 10.1016/S1607-551X(09)70318-3.
- Chokshi, R., & Zia, H. (2004). DOI: 10.22037/IJPR.2010.290.
- Chu, K. R., et al. (2012). DOI: 10.1007/s12272-012-0709-3.
- Chung, C. I. (2010). DOI: 10.3139/9781569907382.002.

Clark, J. P. (2009). DOI: 10.1007/978-1-4419-0420-1_2.

Cramer, D. (1996). DOI: 10.4324/9780203430897.

Cunha-Vaz, J. (1979). DOI: 10.1016/0039-6257(79)90158-9.

Cunha-Vaz, J., Bernardes, R., & Lobo, C. (2011). DOI: 10.5301/EJO.2010.6049.

Das, T., et al. (1999). DOI: 10.1136/bjo.83.9.1050.

Dash, S., et al. (2010). PMID: 20524422.

Djurdjevic, P., et al. (2009). DOI: 10.1016/j.jpba.2009.03.029.

Donnenfeld, E., & Holland, E. (2018). DOI: 10.1016/j.opht.2017.12.029.

Durairaj, C. (2016). DOI: 10.1007/164_2016_32.

FDA (Food and Drug Administration). (2008). Drug Registration and Listing.

FDA. (2009). Drug Stability Guidelines.

Fialho, S. L., et al. (2007). DOI: 10.1016/S1773-2247(07)50013-4.

Figus, M., et al. (2020). DOI: 10.1007/s00228-020-02863-7.

Filipe, H. P., et al. (2019). DOI: 10.1016/j.jcrs.2019.07.016.

Formela, K., Cysewska, M., & Haponiuk, J. (2014). DOI: 10.14314/polimery.2014.170.

García-Estrada, P., et al. (2021). DOI: 10.3390/pharmaceutics13050701.

Gibaldi, M., & Feldman, S. (1967). DOI: 10.1002/jps.2600561005.

Goel, M., et al. (2010). DOI: 10.2174/1874364101004010052.

Gomes, R. L. R., et al. (2017). DOI: 10.1089/jop.2016.0126.

Gross, H., Blechinger F., & Achtner, B. (2008). DOI: 10.1002/9783527699247.ch1.

Güngör, S. G., et al. (2014). DOI: 10.4103/0301-4738.141045.

Gupta, P., & Bhatia, V. (2008). DOI: 10.1007/s12098-008-0208-1.

Haghjou, N., Soheilian, M., & Abdekhodaie, M. J. (2011). PMID: 22454753.

Haripriya, A., & Chang, D. F. (2018). DOI: 10.1097/ICU.0000000000000445.

Hooper, D. C. (2000). DOI: 10.1086/313677.

Hooper, D. C. (2001). DOI: 10.1086/319370.

Huang, X., et al. (2020). DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101639.

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

ICH Guide Q1AR2. (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.

Jain, R. A. (2000). DOI: 10.1016/s0142-9612(00)00115-0.

Júlio, T. A., et al. (2015). ISSN: 09751491.

Kernt, M., et al. (2009). DOI: 10.1097/ICO.0b013e318191447b.

Kessel, L., et al. (2014). DOI: 10.1016/j.ophtha.2014.04.035.

Khan, F. H., et al. (2016). DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.03.002.

Kodama, M., et al. (2003). DOI: 10.1007/s00417-003-0753-2.

Kuno, N., & Fujii, S. (2011). DOI: 10.3390/polym3010193.

Kunou, N., et al. (2000). DOI: 10.1016/s0168-3659(00)00267-4.

Lakshman, J. P., et al. (2008). DOI: 10.1021/mp8001073.

Lee, D. J. (2015). DOI: 10.3390/jfb6030650.

Lee, A., & Blair, H. A. (2020). DOI: 10.1007/s40265-020-01344-6.

Li, M., Gogos, C. G., & Ioannidis, N. (2015). DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.11.024.

Lipnitzki, I., et al. (2014). DOI: 10.1016/j.jcrs.2013.08.062.

Liu, Y. C., et al. (2017). DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30544-5.

Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). DOI: 10.3390/polym3031377.

Martin, C. (2013). DOI: 10.1007/978-1-4614-8432-5_2.

Matsuura, K., et al. (2013). DOI: 10.1016/j.jcrs.2013.05.036.

Maturi, R. K., et al. (2016). DOI: 10.1097/IAE.0000000000001004.

Michael, R., & Bron, A. J. (2011). DOI: 10.1098/rstb.2010.0300.

Miller, D. (2008). DOI: 10.2147/opth.s1666.

Mudgil, M., & Pawar, P. K. (2013). DOI: 10.3797/scipharm.1204-16.

Nguyen, E. T., & Shorstein, N. H. (2013). DOI: 10.1016/j.jcrs.2013.08.036.

Niyadurupola, N., & Astbury, N. (2008). PMID: 18504468.

Occhiutto, M. L., et al. (2012). DOI: 10.3390/pharmaceutics4020252.

Pandey, S. K., et al. (2002). DOI: 10.1016/s0886-3350(01)01069-0.

Pimenta, A. F. R., et al. (2017). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.04.060.

Radhika, M., et al. (2014). DOI: 10.1186/s12348-014-0022-z.

Razzaq, S. N., et al. (2014). DOI: 10.1016/j.arabjc.2014.11.016.

Repka, M. A., et al. (2008). DOI: 10.1517/17425240802583421.

Robertson, S. M., et al. (2005). DOI: 10.1016/j.survophthal.2005.07.001.

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

Runkle, E. A., & Antonetti, D. A. (2010). DOI: 10.1007/978-1-60761-938-3_5.

Saincher, S. S., & Gottlieb, C. (2020). DOI: 10.1186/s12348-019-0189-4.

Sandri, G., et al. (2014). DOI: 10.1007/978-3-319-00714-4_11.

Sarabia, L. A., & Ortiz, M. C. (2009). DOI: 10.1016/B978-044452701-1.00083-1.

Sarao, V., et al. (2014). DOI: 10.1155/2014/989501.

Sawhney, A. S., et al (2013). US Patent US8409606B2.

Schoenwald, R. D., & Stewart, P. (1980). DOI: 10.1002/jps.2600690407.

Shahidullah, M., Al-Malki, W. H., & Delamere, N. A. (2011). DOI: 10.5772/26559.

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

Shikari, H., & Samant, P. M. (2016). DOI: 10.4103/2320-3897.174429.

Shirasaki, Y. (2008). DOI: 10.1002/jps.21200.

Sigurdsson, H. H., et al. (2007). DOI: 10.1111/j.1600-0420.2007.00885.x.

Siqueira, R. C., et al. (2006). DOI: 10.1159/000094626.

Siqueira-Ferreira, M., et al. (2018). DOI: 10.4155/bio-2018-0079.

Tan, D. T. H., et al. (1999). DOI: 10.1016/S0161-6420(99)90060-X.

Tan, D. T. H., et al. (2001). DOI: 10.1016/s0161-6420(01)00839-9.

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

Varanda, F., et al. (2006). DOI: 10.1021/ie060055v.

Wang, J., et al. (2013). DOI: 10.1155/2013/780634.

Whitcup, S. M., & Robinson, M. R. (2014). DOI: 10.1111/nyas.12824.

Yasukawa, T., et al. (2005). DOI: 10.1016/j.addr.2005.09.005.

Yu, L. X., et al. (2014). DOI: 10.1208/s12248-014-9598-3.

Zeng, W., et al. (2006). DOI: 10.1002/rcm.2353.

Zhang, L., et al. (2015). DOI: 10.1016/j.actbio.2015.05.005.

Zhou, T., et al. (1998). DOI: 10.1016/s0168-3659(98)00061-3.

Licenciamiento

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)