

Comparación de la adhesividad por diferentes ensayos *in vitro* para dispersiones poliméricas de uso oftálmico

Comparison of different *in vitro* adhesiveness testing methods for polymeric dispersion of ophthalmic use

MARÍA E. VIEIRA^{A,*}, ISABEL C. ANDUEZA^A

Resumen

Los colirios son ampliamente utilizados en las afecciones del segmento anterior del ojo, no obstante, la dinámica del sistema ocular pudiera afectar la biodisponibilidad de los ingredientes activos. Los vehículos viscosos y bio/mucoadhesivos, son estrategias innovadoras que favorecen su efectividad. Resulta útil conocer la adhesividad *in vitro* para correlacionar su posible comportamiento *in vivo*. En este trabajo se estudió la adhesividad del Escleroglucano (Scl) con mezclas poliméricas de Quitosano (Qs) o Dextrano (Dex) bajo condiciones simuladas del fluido lagrimal, empleando dos métodos de ensayo: texturométrico y viscosimétrico. En el primero se obtuvo la fuerza adhesiva, con un analizador de textura Brookfield CT3-1000 con un ciclo de compresión (profundidad/tiempo 5 mm/60 seg). El método viscosimétrico determinó la viscosidad debida a la bioadhesión (η_b , mPa.seg) y la fuerza de bioadhesión (F, din/cm²), en presencia de mucina (1:20), utilizando un viscosímetro/reómetro Brookfield DV-II+Pro (3 min/100 rpm). Las concentraciones máximas de Scl-Qs mostraron una mayor fuerza adhesiva que las de Scl-Dex, debido a su capacidad para interactuar con la sonda del texturómetro, por lo que se esperaría un comportamiento favorable *in vivo*. Asimismo, la η_b y la F de las mezclas con Qs, resultaron superiores al Scl y Scl-Dex, probablemente debido a las interacciones entre la carga positiva del Qs y la negativa del ácido siálico presente en la mucina. Las condiciones experimentales pueden influir en la determinación del potencial adherente, siendo estos métodos herramientas complementarias, interesantes y útiles en la evaluación *in vitro*.

Palabras Clave: Adhesividad, polímero, método texturométrico, método viscosimétrico, dispersiones oftálmicas.

Abstract

The eye drops are widely used for the treatment of anterior segment's diseases. The dynamic exchange of the ocular system might affect the bio-availability of the active ingredients. The use of viscous and bio/mucoadhesivos vehicles are innovative strategies that enhance their effectiveness. It is useful to know the *in vitro* adhesiveness to correlate with possible behavior *in vivo*. In this work we have studied the adhesiveness of the Scleroglucan (Scl) with polymer mixtures of Chitosan (Qs) or Dextran (Dex) under simulated conditions, employing two testing methods: texturometric and viscosimetric. Regarding the first one, the adhesive strength was obtained using a texture analyzer Brookfield CT3-1000 within a cycle of compression. The viscosimetric method determined viscosity due to the bioadhesion (η_b , mPa.seg) and the strength of bioadhesion (F, din/cm²), with mucin (1:20), using a viscometer/rheometer Brookfield DV-II+Pro (3 min/100 rpm). Maximum concentrations of Scl-Qs's associations showed a greater adhesive force than the mixtures with the Dex due to its capacity to interact with the texturometer's probe. In this sense, a better behavior *in vivo* would be expected. Likewise, the η_b and the F with Qs mixtures showed a greater adhesive force than the Scl and Scl-Dex probably due to the interactions between the positive charge of the polymeric system and the negative charge of the sialic acid into the mucin. The experimental conditions can influence the determination of the adherent potential. These methods are complementary, interesting and useful tools in the evaluation *in vitro*.

Key words: Adhesiveness, polymer, texturometric method, viscosimetric method, ophthalmic dispersion.

^A Unidad de Formulación, Caracterización y Optimización, Instituto de Investigaciones Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

* Correspondencia: vieiramaríaesther@gmail.com.

Introducción

El fenómeno de la bio/mucoadhesión y los agentes bio/mucoadhesivos ha cobrado importancia durante las últimas décadas en el campo de la Tecnología Farmacéutica, debido a que al ser incorporados en diversas formas de dosificación tópicas, pueden prolongar el tiempo de contacto del ingrediente activo con el sustrato biológico, optimizando la efectividad del mismo, lo cual tiene relevancia en el campo de la salud (Patel y col., 2013). Para que exista la bio/mucoadhesión debe establecerse una interacción de fuerzas intermoleculares entre las sustancias y el tejido, como las fuerzas de van der Waals, las atracciones electrostáticas, la formación de puentes de hidrógeno y las interacciones hidrófobas (Rahamatullah y col., 2011).

De este modo, a nivel del sistema ocular, el desarrollo de formas de dosificación oftálmicas con propiedades mucoadhesivas a través del empleo de sistemas coloidales hidrófilos o agentes poliméricos, ofrece como ventaja el incremento en el tiempo de residencia precorneal, presentando como beneficio el aumento de la efectividad del tratamiento y la disminución de las dosis a ser administradas, lo cual representaría una mayor aceptabilidad del producto farmacéutico por parte del paciente (Carvalho y col., 2010; Saraswathi y col., 2013).

Los sistemas bio/mucoadhesivos involucran formulaciones que contienen polímeros de carácter aniónico, no iónico o catiónico, cuyos grupos funcionales son capaces de interactuar con las glicoproteínas de la mucina que cubren el epitelio corneal y conjuntival, esto aunado al incremento de la viscosidad de las preparaciones que los contiene resulta beneficioso su empleo. Es importante

señalar que la tendencia en el desarrollo de estas formas de dosificación, se orienta al uso de polímeros preferiblemente de origen natural, siendo su biodegradabilidad y menor toxicidad, una gran ventaja al incluirlo en las formulaciones, entre los que cabe destacar al Escleroglucano (Scl), el Quitosano (Qs) y el Dextrano 70 (Dex) (Tamboli y col., 2012; Vieira y col., 2013; Andueza y Hochhaus, 2015).

En la actualidad se dispone de numerosas publicaciones que exponen varias metodologías para la determinación de la adhesividad *in vitro*, por su utilidad para inferir el comportamiento *in vivo* de los materiales, vehículos o las formulaciones farmacéuticas. Generalmente en estos ensayos se estudian las interacciones macroscópicas que pueden involucrar o no la presencia de mucus o mucina.

Las técnicas *in vitro* incluyen ensayos de destrucción de la unión adhesiva por fuerzas de corte y por tensión. Estos se caracterizan por la realización de pruebas mecánicas que son capaces de medir la fuerza de adhesión. El ensayo más simple para medir macroscópicamente la adhesividad consiste en emplear equipos como el analizador de textura o texturómetro, el cual consiste en una sonda de material acrílico que entra en contacto con la muestra del producto a evaluar, a una determinada profundidad y por un tiempo establecido, donde luego se procede a medir la fuerza necesaria para separar las dos superficies. Adicionalmente a través de esta técnica se pueden evaluar otros parámetros mecánicos del sistema (dureza y trabajo de extensibilidad), que tienden a ser relevantes a la hora de formular, empleando estos materiales mucoadhesivos (Carvalho y col., 2010; Kumar y col., 2010; Stasiak y col., 2011).

Otro de los métodos *in vitro* ampliamente utilizado, corresponde al método reológico/viscosimétrico desarrollado por Hassan y Gallo (1990). Esta metodología está basada en los cambios de la viscosidad que ocurren cuando un polímero potencialmente bio/mucoadhesivo es mezclado con la mucina. De esta forma, simula el proceso de interpenetración que sucede en el proceso de la mucoadhesión material-mucina. Un polímero es considerado mucoadhesivo si la viscosidad total del sistema (polímero-mucina) es mayor que la suma correspondiente a la obtenida del blanco (mucina) y la relativa a la dispersión polimérica que considera la interacción entre sus propias moléculas (fuerzas cohesivas). Este incremento es debido a las interacciones mecánicas (rearrreglos moleculares) o interacciones físicas entre la cadena polimérica y la mucina. Como resultado del ensayo se obtienen dos parámetros directamente relacionados con las propiedades mucoadhesivas: la viscosidad debida a la bioadhesión (η_b) y la fuerza de bioadhesión (F) e incluye el concepto de sinergismo reológico cuando estos valores resultan elevados, destacando la interacción entre el material polimérico y la mucina. Varios trabajos han sido publicados empleando esta metodología, describiendo la interacción bajo condiciones fisiológicas de diferentes polímeros (Rossi y col., 2001; Carvalho y col., 2010; Kumar y col., 2010).

La presente investigación se centró en el estudio de la adhesividad de mezclas de dispersiones poliméricas de origen natural del Scl, un polímero novedoso que pudiera exhibir una gran utilidad en las dispersiones de uso oftálmico, asociadas con el Qs o el Dex a diferentes concentraciones, bajo condiciones simuladas del fluido lagrimal, por medio de dos metodologías: texturométrica y viscosimétrica.

Materiales y métodos

El Scl empleado de 5000 kilo Dalton (kDa) resultó ser el Tinocare GL® de BASF (número de lote: 0008886294) (Tinocare GL®, 2011), que se presenta como una dispersión acuosa del polímero al 1% p/p. El Qs de la investigación fue adquirido de Sigma-Aldrich® (50-190 kDa con 75-85 % p/p de desacetilación de la molécula) y la muestra de Dex (70 kDa) utilizada fue de Gentec Pharmaceutical Group. Se empleó una solución amortiguadora de ácido acético (0,20 M) / acetato de sodio trihidratado (0,20 M) con un pH de $5,0 \pm 0,2$.

Las sales grado reactivo usadas para la preparación de la solución salina lagrimal (SSL) fueron: bicarbonato de sodio, cloruro de potasio y cloruro de sodio. La mucina tipo II empleada como sustrato biológico procedió de estómago porcino, (número de lote 107K0127) de Sigma-Aldrich® (uniones de ácido siálico alrededor de 1% p/p) que se presentó bajo la forma de polvo.

PREPARACIÓN DE LAS DISPERSIONES POLIMÉRICAS Y SUS MEZCLAS

Se prepararon por duplicado dispersiones acuosas a $\text{pH} = 5,0 \pm 0,2$ del Scl al 0,15% p/p y 0,25% p/p. Del mismo modo, se realizaron mezclas del polímero a esas mismas concentraciones con las preparaciones acuosas a $\text{pH} = 5,0 \pm 0,2$ del Qs o el Dex (**Tabla I**).

Para los sistemas individuales del Scl, se realizó la pesada de la cantidad del producto Tinocare GL® necesario para alcanzar las concentraciones adecuadas del polímero en una balanza electrónica (sensibilidad 0,1 g) (marca Ohaus modelo Adventurer ARC120) y se incorporó a la solución amortiguadora de ácido acético

Tabla I
Composición de los sistemas poliméricos

Ingrediente Fórmula	SCL	QS	DEX
	% P/P		
S1	0,15	-	-
S2	0,25	-	-
S1Q1	0,15	0,20	-
S2Q1	0,25	0,20	-
S1Q2	0,15	0,40	-
S2Q2	0,25	0,40	-
S1D1	0,15	-	0,20
S2D1	0,25	-	0,20
S1D2	0,15	-	0,40
S2D2	0,25	-	0,40

Nomenclatura: Scl: Escleroglucano; Qs: Quitosano;
Dex: Dextrano 70

(0,20 M) / acetato de sodio (0,20 M) de pH = $5,0 \pm 0,2$, previamente pesada y se agitó en una plancha electromagnética (Corning PC-351) a una velocidad aproximada igual a 120 revoluciones por minuto (rpm) a temperatura ambiente (26 ± 2 °C). Una vez incorporado todo el polímero, se verificó el peso y de ser necesario, se completó con la solución amortiguadora hasta el peso final requerido. Luego se continuó la agitación durante una hora, para garantizar la homogeneidad de las preparaciones.

Para la elaboración de las mezclas, se combinaron dispersiones poliméricas más concentradas, bajo las mismas condiciones señaladas antes, en una proporción igual a 1:1 con la finalidad de obtener mezclas poliméricas con idénticas concentraciones, como se indica en la **tabla I**.

Todas las fórmulas fueron evaluadas a las 48 horas posteriores a su fabricación.

EVALUACIÓN DE LA ADHESIVIDAD

La determinación de la adhesividad a través de los métodos texturomérico y viscosimétrico de los sistemas poliméricos de la presente investigación, fueron evaluados bajo condición simulada del fluido lagrimal.

En este sentido, para representar la incorporación de una gota de un colirio a nivel ocular y su dilución en las lágrimas, se mezclaron cada una de las dispersiones poliméricas indicadas en la **tabla I**, con una SSL en una proporción igual a 40:7 (polímero:SSL) en términos de peso. El proceso de agitación duró 1 hora a temperatura ambiente (26 ± 2 °C), en una plancha electromagnética (Corning PC-351) a una velocidad aproximada igual a 120 rpm. La composición de la SSL isotónica fue la siguiente: cloruro de sodio al 0,678% p/v, bicarbonato de sodio al 0,218% p/v y cloruro de potasio al 0,138% p/v (Qi y col., 2007; Yeole e Iyer, 2011).

Asimismo, las mediciones por ambas metodologías fueron realizadas a una temperatura igual a 35 ± 2 °C, con el fin de asemejar las condiciones fisiológicas correspondiente al saco conjuntival ocular (Qi y col., 2007; Lou y col., 2014).

ESTUDIO TEXTUROMÉTRICO

El ensayo texturométrico se realizó en un analizador de textura Brookfield CT3-1000 (celda de carga 1000 g) con la sonda cilíndrica TA25/1000 (50,8 mm de diámetro) a una velocidad de ensayo igual a 1 mm/seg, con un ciclo de compresión.

Para ello, se pesaron 50 g de las muestras diluidas con la SSL en envases cilíndricos de dimensiones idénticas (75 mm de diámetro) y una vez iniciado el

programa TexturePro CT V1.2 del equipo, la sonda fue introducida en la muestra hasta una profundidad definida (5 mm) manteniéndose en reposo durante 60 segundos. Una vez transcurrido el tiempo, la sonda ascendió regresando a su posición inicial (Gratieri y col., 2010; Bhattarai y col., 2011). En la **figura 1** se muestra la gráfica obtenida en función del movimiento de la sonda durante el estudio. Las mediciones se realizaron por cuadruplicado para cada uno de los sistemas poliméricos evaluados.

A través de este ensayo pudo obtenerse la fuerza adhesiva, que corresponde a la fuerza máxima para superar las fuerzas de atracción entre la superficie de la muestra y la sonda. Se corresponde con la fuerza máxima negativa en la gráfica obtenida (carga vs tiempo), durante la descompresión (**Figura 1**). Los resultados se expresaron en miliNewton (mN) y se evaluó aplicando prueba de t de comparación de promedios con 95% de exactitud (Mendenhall y col., 2010; Brookfield, 2011; Vieira y col., 2013).

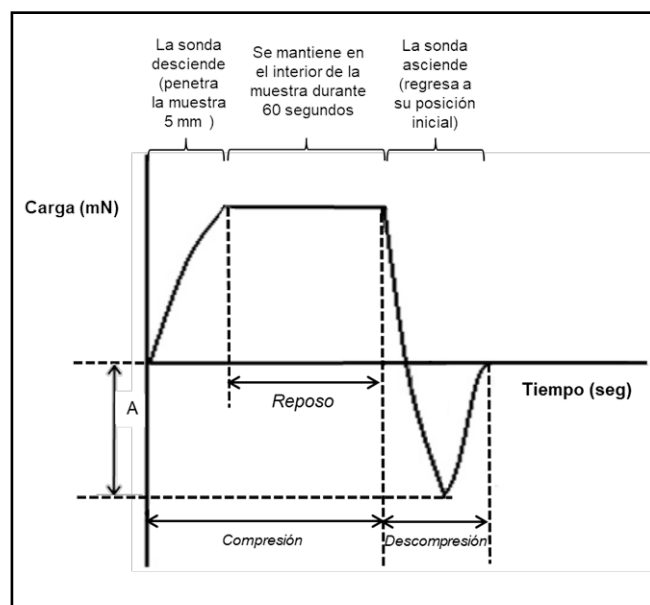


Figura 1. Modelo de gráfica obtenida a través del estudio texturométrico, reflejando el movimiento de la sonda con el parámetro: Fuerza adhesiva (A)

ESTUDIO VISCOSIMÉTRICO

La F se obtuvo empleando el método viscosimétrico. En este sentido, se determinó la viscosidad de los sistemas poliméricos (η_p) en equilibrio con la SSL y la correspondiente a éstas mismas dispersiones en presencia de mucina (η_t : viscosidad total del sistema polímero-SSL con la mucina) (Hassan y Gallo, 1990; Kesavan y col., 2010; Pawar y col., 2013).

Para la determinación del valor de η_t , se procedió a mezclar una parte de la cantidad de polímero presente en la dispersión diluida con veinte partes de la mucina en términos de peso (1:20), por lo que la cantidad añadida del sustrato biológico varió en función de la concentración total de polímeros presentes en el sistema evaluado. Esto es con la finalidad de garantizar suficiente cantidad de glicoproteína que pueda interactuar con los sitios activos de los posibles vehículos bioadhesivos en estudio. La mucina empleada resultó comercial proveniente de estómago porcino, en lugar de aquella obtenida de manera natural, ya que presenta como ventaja que se disminuye la variabilidad entre lotes (Rossi y col., 2001). Una vez incorporada la mucina, la mezcla se mantuvo con agitación continua durante 5 horas, a través del empleo de una plancha electromagnética (Corning PC-351) a una velocidad aproximada de 120 rpm y a temperatura ambiente (26 ± 2 °C).

Por su parte, para calcular la η_b se aplicó la siguiente ecuación:

$$\eta_b = \eta_t - \eta_m - \eta_p$$

(Ecuación 1) (Hassan y Gallo, 1990)

En donde η_m es la viscosidad de la mucina diluida en ausencia de polímero,

es decir, una parte de la dilución buffer:SSL (40:7) con 20 partes de mucina en términos de peso (buffer-SSL:mucina en proporción 1:20) (Hassan y Gallo, 1990; Kesavan y col., 2010; Pawar y col., 2013).

La F se calculó de acuerdo al método viscosimétrico utilizado por Hassan y Gallo (1990) a través de la ecuación:

$$F = \eta b \cdot \sigma$$

(Ecuación 2)

En la cual σ es la velocidad de deformación aplicada por el viscosímetro en unidades de segundo⁻¹ (seg⁻¹) en función de la aguja empleada. Los resultados de la F se expresaron en dinas/cm² (Hassan y Gallo, 1990; Kesavan y col., 2010; Pawar y col., 2013).

Las mediciones de los parámetros anteriores (η_p , η_t y η_m) se realizaron en un viscosímetro rotacional Brookfield DV-II+Pro, con la aguja SC4-31 correspondiente al adaptador de pequeñas muestras, así como, la aguja LV4. La escogencia de la aguja se realizó en función del grado de viscosidad de las muestras. Las mezclas fueron sometidas durante 3 minutos a una velocidad de deformación constante igual a 100 rpm. Las mediciones se realizaron por triplicado y los valores de viscosidad se expresaron en miliPascal/segundo (mPa.seg).

Cada parámetro se evaluó aplicando análisis de varianza (ANOVA).

Resultados y discusión

El análisis de textura es una herramienta de interés que ha sido utilizada en la caracterización y desarrollo de las formulaciones tópicas, ya que describe los parámetros mecánicos a través del

programa Texture Pro CT, entre los que destaca la adhesividad, que como ya se indicó es una propiedad relacionada con las características bioadhesivas, que son tan importantes a considerar en el desarrollo de este tipo de formulaciones (Coviello y col., 2005; Andrews y col., 2009).

En las **figuras 2 a 4**, se representan algunos de los perfiles de fuerza de las dispersiones del Scl y su asociación con el Qs o el Dex, bajo la condición establecida en el estudio, el cual se graficó en unidades de fuerza (mN) contra tiempo (segundos) (**Figuras 2, 3 y 4**).

Con éste método la adhesividad fue obtenida a través de la fuerza necesaria para separar la sonda de la superficie de la muestra, permitiendo caracterizar la interacción entre ambos sustratos e inferir su comportamiento *in vivo* (Accili y col., 2004; Kesavan y col., 2010). De esta forma el despegue de la sonda de la dispersión depende de la ruptura de los enlaces internos de la muestra (fuerza cohesiva), así como de la interrelación entre la sonda y la muestra (fuerza adhesiva), cuyos resultados se pueden evidenciar en las **figuras 5 y 6**.

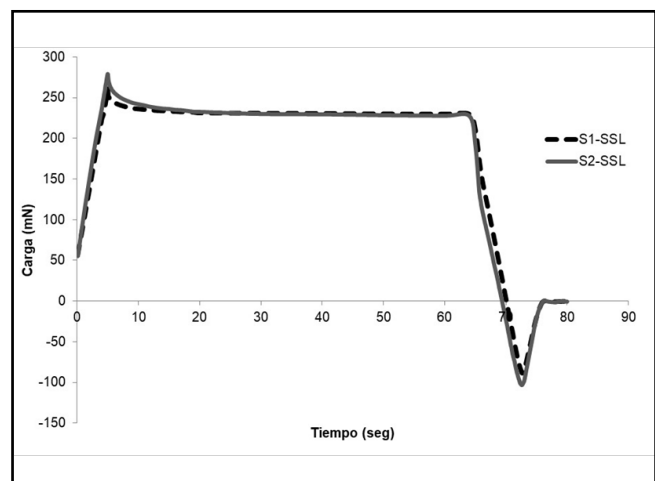


Figura 2. Perfiles de fuerza (mN) vs el tiempo (seg) de las dispersiones del Scl 0,15%p/p (S1) y 0,25%p/p (S2). Temperatura 35 ± 2°C

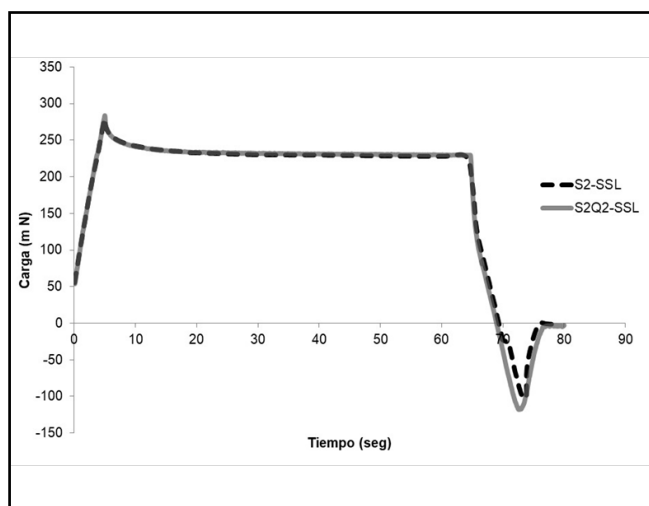


Figura 3. Perfiles de fuerza (mN) vs el tiempo (seg) de la dispersión del Scl 0,25%p/p (S2) y su mezcla con el Qs al 0,40%p/p (S2Q2). Temperatura $35 \pm 2^\circ\text{C}$

La fuerza adhesiva del Scl al 0,25% p/p resultó significativamente superior que el mismo polímero a la concentración de 0,15% p/p. Con relación a las mezclas del Qs al 0,20% p/p y 0,40% p/p con el Scl al 0,15% p/p, mostraron valores superiores del referido parámetro al compararlo con el Scl como monocomponente a la misma concentración. Por su parte, las mezclas de Qs con el Scl al 0,25% p/p, evidenciaron una fuerza adhesiva superior en la mayor proporción de Qs.

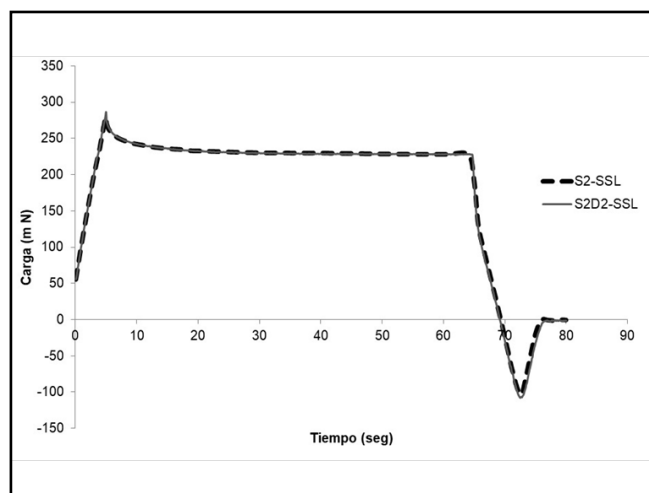


Figura 4. Perfiles de fuerza (mN) vs el tiempo (seg) de la dispersión del Scl 0,25%p/p (S2) y su mezcla con el Dex al 0,40%p/p (S2D2). Temperatura $35 \pm 2^\circ$

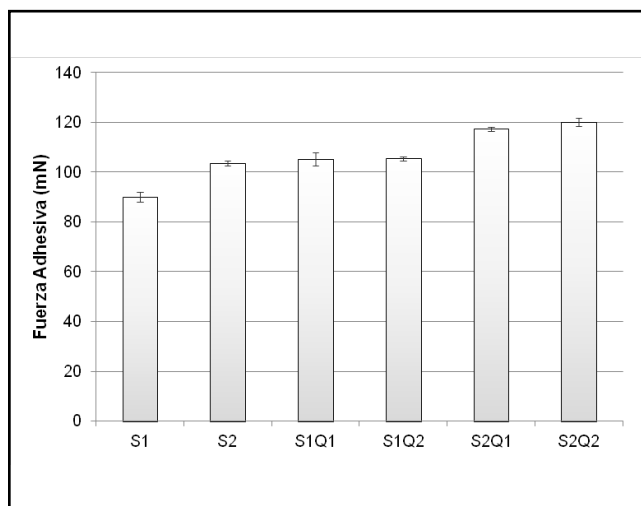


Figura 5. Fuerza adhesiva promedio (mN) de las dispersiones del Scl a diferentes concentraciones y sus mezclas con el Qs. Temperatura $35 \pm 2^\circ\text{C}$

Todas las mezclas del Dex con el Scl presentaron valores similares de fuerza adhesiva al compararlos con el polímero individual Scl a la misma concentración, e incluso en algunos casos resultó inferior, por lo que la mezcla de ambos polímeros neutros no influyó en este parámetro texturométrico.

Por su parte, de igual forma el análisis viscosimétrico de mezclas polímero-mucina nos brinda un modelo *in vitro* que resulta representativo del posible

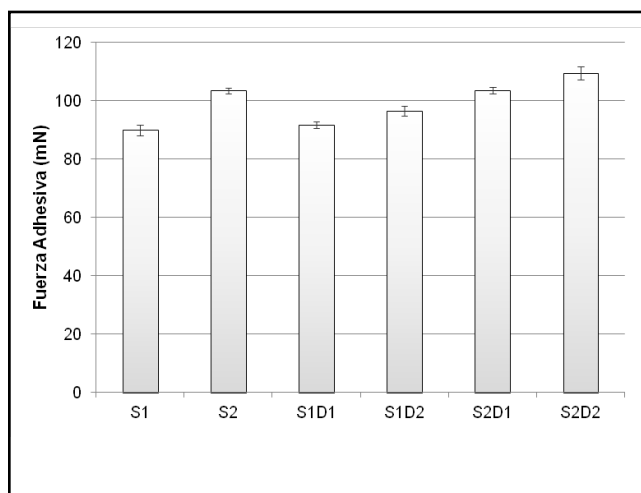


Figura 6. Fuerza adhesiva promedio (mN) de las dispersiones del Scl a diferentes concentraciones y sus mezclas con el Dex. Temperatura $35 \pm 2^\circ\text{C}$

comportamiento *in vivo* de un polímero mucoadhesivo. En este sentido, Hassan y Gallo (1990) implementaron las técnicas reológicas para el estudio de las propiedades mucoadhesivas de varios polímeros; en este evaluaron la F de los sistemas poliméricos al registrar los cambios viscosimétricos de los polímeros y sus mezclas al interactuar con la mucina. La energía asociada con los enlaces físicos y químicos de la interacción polímero-mucina es reflejada en los rearrreglos de las macromoléculas que están involucrados en los procesos bioadhesivos y originan cambios en la viscosidad del sistema (Kesavan y col., 2010; Pawar y col., 2013; Singh y col., 2015).

En la **tabla II**, se presentan los valores de la η_b y la F obtenidos aplicando las ecuaciones 1 y 2. Como ya fue señalado, estos parámetros fisicoquímicos, nos brindan una estimación directa de las interacciones polímero-mucina que podrían ocurrir durante el proceso de bio/mucoadhesión para los sistemas estudiados.

De acuerdo a los resultados obtenidos se registró un aumento en la η_t , que resulta de la medición viscosimétrica de la mezcla polimérica con la SSL y la mucina, comparada con la η_p , lo que denota un sinergismo reológico, cuya magnitud fue dependiente de la proporción y tipo de mezcla polimérica. Esto indica posiblemente la formación de rearrreglos moleculares y enlaces secundarios entre los polímeros y la mucina.

La η_b de todas las asociaciones poliméricas, así como el valor de la F, resultaron superiores al compararlos con los valores del Scl como monocomponente, en especial aquellas mezclas con el polímero cargado Qs.

Tabla II
Valores promedios de viscosidad de: los sistemas poliméricos (η_p), total (η_t) y la debida a la bioadhesión (η_b), con su respectiva fuerza de bioadhesión (F) en SSL

Sistema polimérico	$\eta_p \pm DE$ (mPa.seg)	$\eta_t \pm DE$ (mPa.seg)	η_b (mPa.seg)	F (din/cm ²)
S1	31,89 \pm 0,17	42,69 \pm 0,35	1	0,34
S2	73,48 \pm 0,01	90,14 \pm 0,59	2	0,68
S1Q1	54,19 \pm 0,17	213,05 \pm 4,66	139,66	47,48
S1Q2	54,79 \pm 0,62	237,35 \pm 1,51	153,77	52,28
S2Q1	86,28 \pm 0,35	254,85 \pm 2,27	139,98	47,59
S2Q2	149,97 \pm 0,01	697,85 \pm 3,46	535,38	-
S1D1	40,19 \pm 0,30	70,78 \pm 1,30	11,39	3,87
S1D2	41,39 \pm 0,30	118,37 \pm 0,34	48,19	16,38
S2D1	76,78 \pm 0,31	149,47 \pm 1,05	44,1	14,99
S2D2	78,48 \pm 0,17	230,35 \pm 1,42	122,85	41,77

DE = Desviación estándar

Las dispersiones conformadas por ambas concentraciones del Qs con el Scl al 0,15% p/p incrementaron su η_b a 139,66 mPa.seg y 153,77 mPa.seg, para S1Q1 y S1Q2, respectivamente. Esta misma observación se evidenció para las combinaciones de Qs con el Scl al 0,25% p/p, siendo la mayor η_b para la mezcla S2Q2 (535,38 mPa.seg). Por su parte, se obtuvo un comportamiento similar con las mezclas del Dex con el Scl, no obstante, los valores resultaron inferiores al compararlos con las asociaciones Scl-Qs, oscilando entre 11,39 mPa.seg para la menor concentración y 122,85 mPa.seg para la mayor concentración del ingrediente polimérico. La F aumentó de igual forma como se incrementó la η_b .

Para el cálculo de la F, se requirió la velocidad de deformación aplicada por el

viscosímetro expresada en seg^{-1} , el cual es el parámetro σ de acuerdo a la ecuación 2. Este valor σ es el resultado del producto de la velocidad empleada en rpm (100 rpm) por el valor de la constante de velocidad, SRC de acuerdo a sus siglas en inglés (*Shear Rate Constant*) arrojado por el manual de operación del viscosímetro Brookfield DV-II+Pro; siendo para la aguja SC4-31 igual a 0,34, obteniéndose en este caso un valor de σ igual a 34 seg^{-1} . Como se puede evidenciar en la **tabla II**, no pudo obtenerse el valor de la F para la combinación polimérica S2Q2 motivado a la alta viscosidad de la mezcla, por lo que requirió el empleo de la aguja L4, la cual no reporta un valor de SRC en el manual del viscosímetro Brookfield DV-II+Pro (Brookfield, s.f.). Sin embargo, ese valor tan elevado de la η_b debería reflejar un incremento de la F.

Es importante resaltar que la obtención de la η_b y la F por éste método y del parámetro de la fuerza adhesiva a través del análisis texturométrico, son métodos complementarios que contribuyen a la explicación *in vitro* de los fenómenos mucoadhesivos.

En las combinaciones Scl-Qs, el método viscosimétrico evidenció que las mezclas con mayor concentración de Qs reflejaron una mayor η_b , muy probablemente debido a la formación de una fuerte interacción iónica de los grupos aminos cargados del polímero con los grupos de ácido siálico presente en la mucina. Esto no pudo observarse en el método texturométrico, donde el factor preponderante fue el aumento de la concentración del Scl presente en los sistemas y no la concentración de la mezcla de polímeros (**Tabla III**).

El aumento en la concentración polimérica del Dex y el Scl en las mezclas

Tabla III
Medida de la adhesividad de los sistemas poliméricos Scl-Qs de acuerdo al método texturométrico (fuerza adhesiva) y viscosimétrico (η_b)

Sistema polimérico	Concentración polimérica total (% p/p)	Fuerza adhesiva	η_b
S1	0,15	+	+
S1Q1	0,35	+++	+++
S1Q2	0,55	+++	++++
S2	0,25	+++	+
S2Q1	0,45	++++	+++
S2Q2	0,65	+++++	+++++

tuvo influencia en los resultados de la η_b obtenidos por el método viscosimétrico, posiblemente debido al establecimiento de puentes de hidrógeno entre los polímeros, que a su vez se asocian con la mucina. En el método texturométrico prevaleció de igual forma que en los sistemas con Qs, el aumento de la concentración de Scl (**Tabla IV**).

Como podemos notar, el método texturométrico no toma en consideración la interacción química que puede suceder con la mucina, sino únicamente las fuerzas físicas que se establecen entre las dispersiones y la superficie de la sonda, lo cual se evidenció en los resultados obtenidos.

Tabla IV
Medida de la adhesividad de los sistemas poliméricos Scl-Dex de acuerdo al método texturométrico (fuerza adhesiva) y viscosimétrico (η_b)

Sistema polimérico	Concentración polimérica total (% p/p)	Fuerza adhesiva	η_b
S1	0,15	+	+
S1D1	0,35	+	++
S1D2	0,55	++	++++
S2	0,25	+++	+
S2D1	0,45	+++	+++
S2D2	0,65	++++	+++++

Sin embargo, habría que continuar la caracterización de la mucoadhesión a través del análisis texturométrico. El texturómetro puede ser programado para medir la fuerza requerida para separar la interacción que pudiera desarrollarse entre la dispersión polimérica a ser estudiada y una membrana modelo, constituida por una dispersión de mucina o un tejido biológico (membrana mucosa animal) (Carvalho y col., 2010; Kumar y col., 2010). Esta metodología ha sido desarrollada por varios investigadores para la evaluación del poder adhesivo de diversos sistemas poliméricos o formulaciones farmacéuticas (Accili y col., 2004; Hagesaether y Sande, 2007; Thirawong y col., 2007; Cevher y col., 2008; Carvalho y col., 2013).

En general, basado en los resultados de las evaluaciones realizadas en el presente estudio, podemos señalar que las asociaciones poliméricas del Scl resultaron ventajosas al compararlo con el polímero como monocomponente, pudiendo ser consideradas como mezclas prometedoras que formen parte de formulaciones diseñadas para la administración oftálmica de ingredientes activos farmacéuticos.

Conclusiones

El desarrollo de innovadores formulaciones oftálmicas bajo la forma de colirios que contengan vehículos poliméricos con características adhesivas como los estudiados en esta investigación, han mostrado particular interés en el campo de la tecnología farmacéutica, en virtud de que estudios *in vitro/in vivo* correlacionan este parámetro con el aumento del tiempo de retención precorneal de la formulación y por ende del ingrediente activo. Esto contribuye a mejorar la efectividad del tratamiento,

reducir la frecuencia de aplicación y disminuir la velocidad de eliminación precorneal beneficiando menores efectos sistémicos adversos.

Por tal motivo, la aplicación de métodos *in vitro* complementarios como el Texturométrico y Viscosimétrico, que determinen la adhesividad de los posibles vehículos con potencial utilidad tópica oftálmica, resulta una herramienta imprescindible para asegurar la escogencia del mejor sistema vehicular de acuerdo al comportamiento bio/mucoadhesivo mostrado y predecir su posible comportamiento *in vivo*.

Agradecimientos

Este trabajo fue subvencionado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela a través del proyecto N° PG-06-8824-2013. A la empresa Biofina C.A. y Laboratorios L.O. Oftalmi C.A. por colaborar con la donación de las materias primas indispensables para la ejecución de la investigación.

Referencias bibliográficas

- Accili D, Menghi G, Bonacucina G, Di Martino P, Palmieri G. 2004. Mucoadhesion dependence of pharmaceutical polymers on mucosa characteristics. *Eur J Pharm Sci* 22(4): 225–234.
- Andrews G, Laverty T, Jones D. 2009. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *Eur J Pharm* 71(3): 505–518.
- Andueza I, Hochhaus G. 2015. Dextrano: Polímero transportador para la liberación de fármacos intraoculares. *Rev Fac Farm UCV* 78(1 y 2): 29–33.
- Bhattarai S, Brunt C, Rathbone M, Alany R. 2011. Phase behavior, rheological and mechanical properties of hydrophilic polymer dispersions. *Pharm Dev Technol* 16(3): 259–268.

- Brookfield Co. Brookfield DV-II+Pro Viscometer. Operating Instructions. Manual N° M03-165-F0612. Brookfield Engineering Laboratories, Inc. s.f., USA pp. 76, 77, 89.
- Brookfield Co.: Viscometers, Rheometers, Texture Analyzers, Powder Flow Testers. Brookfield Engineering Laboratories, Inc. USA 2011. pp. 56–57.
- Carvalho F, Bruschi M, Evangelista R, Daflon M. 2010. Mucoadhesive drug delivery systems. *Braz J Pharm Sci* 46(1): 1–17.
- Carvalho F, Calixto G, Hatakeyama I, Luz G, Daflon M, Chorilli M. 2013. Rheological, mechanical and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm* 39(11): 1750–1757.
- Cevher E, Taha M, Orlu M, Araman A. 2008. Evaluation of mechanical and mucoadhesive properties of clomiphene citrate gel formulations containing carbomers and their thiolated derivatives. *Drug Deliv* 15(1): 57–67.
- Coviello T, Alhaique F, Parisi C, Matricardi P, Bocchinfuso G, Grassi M. 2005. A new polysaccharidic gel matrix for drug delivery: preparation and mechanical properties. *J Control Release* 102(3): 643–656.
- Gratieri T, Gelfuso G, Rocha E, Sarmiento V, de Freitas O, Vianna R. 2010. A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 75(2):186–193.
- Hagesaether E, Sande S. 2007. *In vitro* measurements of mucoadhesive properties of six types of pectin. *Drug Dev Ind Pharm* 33(4): 417–425.
- Hassan E, Gallo J. 1990. A simple rheological method for the *in vitro* assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength. *Pharm Res* 7(5): 491–495.
- Kesavan K, Nath G, Pandit J. 2010. Sodium alginate based mucoadhesive system for gatifloxacin and its *in vitro* antibacterial activity. *Sci Pharm* 78(4): 941–957.
- Kumar V, Gupta A, Kumar R, Yadav J, Kumar B. 2010. Mucoadhesive polymers: Means of improving the mucoadhesive properties of drug delivery system. *J Chem Pharm Res* 2(5): 418–432.
- Lou J, Hu W, Tian R, Zhang H, Jia Y, Zhang J, Zhang L. 2014. Optimization and evaluation of a thermoresponsive ophthalmic in situ gel containing curcumin-loaded albumin nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 9(1): 2517–2525.
- Mendenhall W, Beaver R, Beaver B. Introducción a la probabilidad y estadística. 13° ed. Cengage Learning: USA, 2010. pp. 746.
- Patel A, Cholkar K, Agrahari V, Mitra A. 2013. Ocular drug delivery systems: An overview. *World J Pharmacol* 2(2): 47–64.
- Pawar P, Kashyap H, Malhotra S, Sindhu R. 2013. Hp- β -CD-Voriconazole in situ gelling system for ocular drug delivery: *In vitro*, stability and antifungal activities assessment. *Biomed Res Int* (Internet). Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/341218>.
- Qi H, Chen W, Huang C, Li L, Chen C, Li W et al. 2007. Development of a poloxamer analogs/carbopol-based in situ gelling and mucoadhesive ophthalmic delivery system for puerarin. *Int J Pharm* 337(1 y 2): 178–187.
- Rahamatullah S, Raj T, Garland M, Woolfson A, Donnelly R. 2011. Mucoadhesive drug delivery systems. *Pharm Bioallied Sci* 3(1): 89–100.
- Rossi S, Ferrari F, Bonferoni M, Caramella C. 2001. Characterization of chitosan hydrochloride-mucin rheological interaction: Influence of polymer concentration and polymer: mucin weight ratio. *Eur J Pharm Sci* 12(4): 479–485.
- Saraswathi B, Balaji A, Umashankar M. 2013. Polymers in mucoadhesive drug delivery system-latest updates. *Int J Pharm Pharm Sci* 5(3): 423–430.
- Singh T, Jones D, Andrews G, Sheshala R. Characterization of Bioadhesion. In: *Bioadhesion and Biomimetics from nature to applications*. Eds: Bianco-Peled H, Davidovich-Pinhas M. Pan Stanford Publishing: USA, 2015. pp. 23–42.
- Stasiak P, Placzek M, Lepek P, Sznitowska M. 2011. Influence of polymer type, active substance and experimental model on mucoadhesive properties of selected drug formulations. *J Disper Sci Technol* 32(12):1780–1785.

- Tamboli V, Mishra G, Mitra A. 3. Biodegradable polymers for ocular drug delivery. In: Advances in ocular drug delivery. Eds: Mitra A. Research Signpost: India, 2012. pp. 65–86.
- Thirawong N, Nunthanid J, Puttipipatkachorn S, Sriamornsak P. 2007. Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: An *in vitro* evaluation using texture analyzer. Eur J Pharm Biopharm 67(1): 132–140.
- Tinocare GL®. Technical Information. Natural polysaccharide for cosmetics. Basf SE
- The chemical company: Ludwigshafen, Alemania, 2011.
- Vieira M, Rodríguez G, Andueza I. 2013. Determinación de las propiedades reológicas y mecánicas de sistemas poliméricos para uso tópico. influencia de agentes humectantes. Rev Fac Farm UCV 76(1 y 2): 8–14.
- Yeole P, Iyer D. 2011. Thermosensitive *in situ* gel of Timolol Maleate for the treatment of open angle glaucoma. RJPBCS 2(3):1048–1064.