

Aporte al desarrollo de un nanogel para la liberación controlada de latanoprost

Mónica Fernández Lozano^{1a}, Diana Millán^{2b}, Ronald A Jiménez Cruz^{1b*}

¹Universidad El Bosque, Facultad de Ciencias, Programa de Química Farmacéutica, Semillero ABC, Grupo de investigación en Química Aplicada INQA, Bogotá D.C., Colombia.

²Universidad El Bosque, Facultad de Medicina, Grupo de investigación básica y translacional (GIBAT), Bogotá D.C., Colombia.

Correos electrónicos:

^{1a}mfernandezl@unbosque.edu.co, ^{2a}millandiana@unbosque.edu.co, ^{1b}rajimenez@unbosque.edu.co

*Autor de correspondencia.

Recibido: 19 de abril de 2023

Revisado: 27 de julio de 2023

Aceptado: 30 de julio de 2023

RESUMEN

Introducción: el glaucoma es considerado como la segunda causa de ceguera en el mundo. El desarrollo de alternativas que brinden una mejor calidad de vida ha sido uno de los propósitos más importantes en el campo de las ciencias farmacéuticas. Los nanogel debido a su alto contenido de agua y tamaño nanométrico son una alternativa adecuada para la administración ocular. **Objetivo:** diseñar un prototipo de nanogel a base de gelatina mediante el método emulsión-gelación para la administración ocular de latanoprost, que fueron caracterizados por su tamaño y distribución de tamaños, capacidad de sorción, eficiencia de carga, propiedades viscoelásticas, isotonicidad y citotoxicidad. **Resultados:** se obtuvieron nanogel con un tamaño entre 225 a 874 nm, un rendimiento entre 16-30%, una capacidad de sorción entre 22-46% y una eficiencia de carga del 58%. Adicionalmente, estos sistemas se ajustan a una cinética Korsmeyer Peppas. Las propiedades reológicas muestran un comportamiento viscoelástico con flujo pseudoplástico recomendable para lograr una residencia controlada en la conjuntiva y esclerótica del ojo. Los nanogel obtenidos no fueron citotóxicos para fibroblastos e isotónicos. **Conclusiones:** los resultados obtenidos indican que los nanogel con latanoprost son una alternativa en el tratamiento del glaucoma.

Palabras clave: Nanogel, gelatina, latanoprost, emulsión-gelación, glaucoma.

SUMMARY

Contribution to the development of a nanogel for the controlled release of latanoprost

Introduction: Glaucoma is considered the second cause of blindness in the world. The development of alternatives that provide a better quality of life has been one of the most important purposes of pharmaceutical sciences. Due to their high-water content and nanometric size, nanogels are a suitable alternative for ocular administration. **Aim:** To design a prototype gelatin-based nanogel using the emulsion-gelation method for the ocular administration of latanoprost, characterized by their size and size distribution, sorption capacity, loading efficiency, viscoelastic properties, isotonicity, and cytotoxicity. **Results:** Nanogels with a size between 225 and 874 nm, a yield between 16-30%, a sorption capacity between 22-46%, and loading efficiency of 58% were obtained. Additionally, these systems conform to Korsmeyer-Peppas's kinetics. The rheological properties show a viscoelastic behavior with a pseudoplastic flow that is recommended to achieve a controlled residence in the conjunctiva and sclera of the eye. The nanogels obtained were not cytotoxic for fibroblasts and were isotonic. **Conclusions:** The results obtained indicate that nanogels with latanoprost are an alternative in the treatment of glaucoma.

Keywords: Glaucoma, nanogel, latanoprost, controlled release, ocular administration.

RESUMO

Contribuição para o desenvolvimento de um nanogel para liberação controlada de latanoprost

Introdução: o glaucoma é considerado a segunda causa de cegueira no mundo. O desenvolvimento de alternativas que proporcionem uma melhor qualidade de vida tem sido um dos propósitos mais importantes no campo das ciências farmacêuticas. Devido ao seu alto teor de água e tamanho nanométrico, os nanogéis são uma alternativa adequada para administração ocular. **Objetivo:** projetar um protótipo de nanogel à base de gelatina usando o método de emulsão-gelificação para administração ocular de latanoprost, que foram caracterizados por tamanho e distribuição de tamanho, capacidade de sorção, eficiência de carregamento, propriedades viscoelásticas, isotonicidade e citotoxicidade. **Resultados:** nanogéis com tamanho entre 225 a 874 nm, rendimento entre 16-30%, capacidade de sorção entre 22-46% e

eficiência de carga de 58% foram obtidos. Além disso, esses sistemas estão em conformidade com a cinética de Korsmeyer Peppas. As propriedades reológicas mostram um comportamento viscoelástico com fluxo pseudoplástico que é recomendado para alcançar uma residência controlada na conjuntiva e esclera do olho. Os nanogéis obtidos foram não citotóxicos para fibroblastos e isotônicos. **Conclusões:** os resultados obtidos indicam que os nanogéis com latanoprost são uma alternativa no tratamento do glaucoma.

Palavras-chave: Nanogel, gelatina, latanoprost, emulsão-gelificação, glaucoma.

INTRODUCCIÓN

El glaucoma es una enfermedad neurodegenerativa del nervio óptico, que representa un importante problema de salud pública a nivel mundial, ya que, es considerada como la segunda causa principal de ceguera en el mundo [1]. Actualmente, se encuentran alrededor de 78 millones de personas con esta patología y se estima que este número llegará a 111.8 millones para 2040 [1]. En Colombia, a través de algunos estudios se ha detectado que más de 2.300.000 de personas presentan dicha patología, en donde, alrededor de 50% de ellos no lo saben [2].

Su tratamiento principalmente es manejado con gotas oftálmicas de principios activos hidrófobos como lo son los análogos de prostaglandinas donde se encuentran el bimatoprost y latanoprost, los cuales son usados como fármacos de primera línea debido a que presentan una mayor capacidad en la reducción de la presión intraocular entre un 28–33% [3]. Sin embargo, estos fármacos presentan una gran limitación a nivel comercial, debido a que el 90% de las formulaciones oftálmicas comercializadas son formas farmacéuticas líquidas de liberación inmediata [4], y tan solo hay sistema de implante de bimatoprost aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) en el 2020; no obstante, estas formas presentan un gran desafío en cuanto a la barrera fisiológica y al alto recambio del líquido lagrimal, lo que limita el tiempo de retención del fármaco, además de que el uso crónico requiere de sistemas multidosis con agentes conservantes, que se asocian con un aumento de la toxicidad y de los efectos adversos (irritación, fotofobia o ardor por su aplicación diaria) afectando la eficacia terapéutica y una baja adherencia del paciente al tratamiento [3].

En los últimos veinte años las publicaciones y citas sobre investigaciones relacionadas con la administración ocular de fármacos aumentaron un 746,15%, evidenciando las tendencias actuales, los patrones de colaboración global, los puntos críticos de investigación y las fronteras emergentes en este tema, donde la administración ocular de

fármacos para el tratamiento de glaucoma se encuentra dentro de las principales líneas de investigación [5].

Por lo tanto, surge la necesidad de buscar nuevas estrategias para administrar principios activos con una liberación controlada, para reducir los intervalos de administración, reduciendo los costos del tratamiento y mejorando la adherencia de los pacientes al tratamiento. Los nanogeles son sistemas de administración, que ofrecen grandes ventajas como: una mayor biodisponibilidad, liberación controlada, mejor adherencia y una reducción de los efectos adversos al ser sistemas más amigables y biocompatibles [4].

De acuerdo con lo anterior, se propuso el diseño de un nanogel a base de polímeros naturales como la gelatina por su buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y bajo costo, mediante el método de emulsión-gelación, en el cual, se variaron las condiciones que afectaron el tamaño de partícula como la cantidad de fase acuosa y tensoactivo, el porcentaje de amplitud de onda, el tiempo de homogenización por sonda ultrasónica, el tiempo y revoluciones de agitación.

METODOLOGÍA

Materiales

Gelatina tipo B, glutaraldehído 25% (GTA), monooleato de sorbitan 80 y dimetilsulfóxido empleados fueron marca SIGMA-ALDRICH. Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suero fetal bovino, antibióticos, vitaminas, MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromuro) y PBS para los ensayos de citotoxicidad fueron marca GIBCO. Otros reactivos empleados fueron de grado analítico.

Preparación de Nanogeles

Los nanogeles fueron preparados modificando la metodología emulsificación-gelación descrita por Jiménez *et al.* [6]. Se prepararon dispersiones de gelatina en agua purificada a una concentración final de 2,5% p/p con 0,1% p/p de glutaraldehído a 70 °C por 10 minutos con agitación magnética 500 rpm hasta la dispersión total de la gelatina. Posteriormente, 10 mL de cada dispersión fue adicionada lentamente sobre 40 mL de la fase oleosa compuesta de aceite mineral con un 10% de monooleato de sorbitán 80, esta mezcla fue homogenizada empleando una sonda ultrasónica (60 Hz con una amplitud del 50%) por 10 min, en un baño de hielo para favorecer la gelación de las partículas [6], seguido de agitación magnética constante por 1 hora a 1400 rpm. Finalmente, la emulsión formada fue almacenada a 4 °C por 24 horas hasta la gelación

total de los nanogeles, que fueron purificados por centrifugación ($1850 \times g / 30 \text{ min}$) y lavados con mezclas etanol: agua 1:1. Se elaboraron tres lotes de nanopartículas.

Incorporación de latanoprost en los Nanogeles

La incorporación del latanoprost en los nanogeles se realizó mediante sorción [6] de una solución saturada del principio activo (0,0129 mg/mL) sobre los nanogeles por 12 horas. Posteriormente, se retiró el exceso de solución de latanoprost y los nanogeles cargados fueron almacenados a 4°C . Fueron cargados tres lotes independientes de nanopartículas. Los pesos iniciales y finales de los nanogeles fueron tomados para determinar la capacidad de sorción de los nanogeles.

Liberación *In vitro* de latanoprost

Para el estudio de liberación *in vitro* de latanoprost se tomaron 100 mg de nanogeles cargados en tubos eppendorf con 1 mL del medio de liberación (buffer de fosfatos con pH 7,4). Se colocaron las muestras en un agitador orbital a 100 rpm a 37°C . A diferentes tiempos (1, 24, 48, 72, 96, 168 h) se tomaron los sobrenadantes y el latanoprost fue cuantificado por UV-Vis.

Cuantificación de latanoprost

El porcentaje de *latanoprost* liberado, se determinó empleando un Espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis a una longitud de 210 nm [7]. Se construyó una curva de calibración con concentraciones de 0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 y 10,0 $\mu\text{g/mL}$ de latanoprost.

Eficiencia de carga

La eficiencia de carga de las nanogeles se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\%EE = \frac{\text{Cantidad de latanoprost en el nanogel}}{\text{Cantidad de latanoprost adicionada en la elaboración del nanogel}} \times 100\%$$

Cinética de liberación de fármacos

La cinética de liberación de latanoprost, los datos obtenidos en la liberación *in vitro* se ajustaron a diferentes modelos cinéticos: Orden Cero ($m_0 - m = K_t$), primer orden ($\log m = \log m_0 - K_t / 2,303$), modelo Korsmeyer-Peppas ($m_0 - (m / m_0) = Kt^n$) y modelo Higuchi ($m_0 - m = Kt^{1/2}$) donde m es la cantidad de fármaco restante en la formulación en el momento t y m_0 es la cantidad inicial del fármaco en la formulación. Con los valores del coeficiente de correlación (R)² se encontró el modelo que más se ajusta a la liberación obtenida.

Análisis de espectrometría infrarroja con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Se realizó ATR-FTIR en un espectrómetro ALPHA II BRUKER en un rango de 4000-650 cm^{-1} con 25 escáneres por muestra.

Microscopía óptica

El tamaño de los nanogeles obtenidos cargados y sin cargar se estudió mediante microscopía óptica usando un microscopio invertido Primo Vert en 40x acoplado a un *Software* ZEN lite. Para cada réplica se analizaron 200 diámetros de partículas diferentes con ayuda del programa ImageJ. Para cada lote se determinó la distribución de tamaño de partícula y el índice de polidispersión (PDI), empleando la siguiente ecuación:

$$\text{PDI} = \left[\frac{\sigma}{2a} \right]^2$$

donde, σ corresponde a la desviación estándar y a corresponde a la media del diámetro de las nanopartículas.

Pruebas reológicas

El comportamiento viscoelástico se estudió empleando hidrogeles de gelatina. Dispersiones de gelatina en agua purificada a diferentes concentraciones (2,5% y 5% p/p) con 0,1% p/p de glutaraldehído a 70 °C con agitación magnética (400 rpm / 10 min) fueron preparadas. Posteriormente, cada dispersión fue servida en moldes de plástico que fueron almacenados a 4 °C por 24 horas hasta la gelación del hidrogel. Las propiedades viscoelásticas se evaluaron en un reómetro oscilatorio Anton Paar equipado con una geometría placa / placa bajo condiciones de frecuencia constante (1Hz), un rango de deformación entre 0,01 a 100% y un rango de tasa de corte entre 0 a 100 s^{-1} a temperatura ambiente [8]. Para el registro y análisis de los datos se utilizó el *software* RheoCompass.

Ensayo de Citotoxicidad

La evaluación de la reactividad biológica *in vitro* de los nanogeles fue realizada de acuerdo con la norma ISO-10993-5 [9]. Fibroblastos L929 fueron cultivados en medio DMEM, suplementado con suero fetal bovino al 10%, antibióticos y vitaminas, en cajas de cultivo de 96 pozos, a una densidad de 10^5 células por pozo, durante 24 horas, a 37 °C y 5% CO_2 . Extractos de los nanogeles en solución salina estéril 0,9% a una concentración de 0,2 g/mL fueron incubados por 24 horas. Después de la incubación, 100 μL del sobrenadante fueron colocados sobre los fibroblastos y cultivados durante

24 horas, a 37 °C y 5% CO₂. La viabilidad celular fue determinada empleando MTT y cuantificado por UV-Vis a 560 nm.

Osmolaridad

Se empleó un osmómetro FPOSM- V2.0 para determinar la osmolaridad de diferentes dispersiones de nanogeles en agua purificada (0,1%, 0,5% y 1,0%).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La administración ocular de fármacos para el tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas presenta una serie de desafíos desde el punto de vista del diseño de sistemas de entrega. Para el caso de enfermedades del globo ocular, estos deben ser biocompatibles con la conjuntiva y tejidos circundantes, permitir la liberación controlada para reducir los efectos secundarios indeseados y ser económicos para favorecer el acceso a este tipo de tratamientos. Los geles a escala micro y nano son una alternativa para desarrollar sistemas de entrega compatibles debido a su alto contenido de agua [10] y facilidad de escalamiento. Nosotros, propusimos el desarrollo de un sistema de entrega ocular para la liberación de latanoprost biocompatible, de bajo costo y de fácil transferencia tecnología a la aplicación clínica, a partir de un polímero derivado del colágeno, principal componente de la matriz extracelular de tejidos blandos, económico y biocompatible.

Preparación de nanogeles

El método de preparación emulsificación-gelación es ampliamente utilizado para la obtención de tamaños micro y nanométricos, debido a su fácil manejo y altos rendimientos [6]. Sin embargo, existen diferentes factores que afectan el tamaño y eficiencia tanto de la estructura como la encapsulación de los fármacos en los nanogeles, como el polímero seleccionado, su viscosidad, relación de fases (acuosa-oleosa) y método de homogeneización [6]. La Tabla 1 muestra las condiciones utilizadas para la estandarización del tamaño de partículas para la obtención de los nanogeles con mejores propiedades y tamaño.

Los parámetros de proceso que más influyeron en la obtención de tamaños nanométricos fueron las concentraciones de gelatina y de tensoactivo, la amplitud de sonicación (energía) y agitación.

Una mayor concentración de polímero favorece un mayor tamaño de partícula y eficiencia de encapsulación, debido a la rápida solidificación de las partículas, además de un aumento en la viscosidad, lo cual, reduce la porosidad de estos sistemas [11]. Al dis-

minuir la concentración de gelatina al 2,5 % se logró un menor tamaño de partícula, sin embargo, así mismo se obtuvieron bajas eficiencias como se observa en el anexo 4 del material suplementario. La mayor concentración de tensoactivo favorece a reducir el crecimiento de gota de la fase interna -fenómeno de Oswald- presente en estos sistemas heterodispersos, y reducir de esta forma el tamaño de la partícula [12].

Tabla 1. Condiciones para la estandarización de nanogeles de gelatina.

Condición 1	Condición 2	Condición 3	Condición Final
Fase W: 0,5 g de gelatina con 9,52 g de agua y 37,7 μ L de GTA Monooleato de sorbitán 5 % Sonicación 30 % de amplitud / 10 min Agitación 1140 rpm por 1 hora Diámetro de partícula: 27-5 μ m	Fase W: 0,5 g de gelatina con 9,52 g de agua y 37,7 μ L de GTA Monooleato de sorbitán 5 % Sonicación 50 % de amplitud / 10 min Agitación 1400 rpm por 1 hora Diámetro de partícula: 11-2 μ m	Fase W: 0,5 g de gelatina con 9,52 g de agua y 37,7 μ L de GTA Monooleato de sorbitán 10% Sonicación 50 % de amplitud / 10 min Agitación 1400 rpm por 1 hora Diámetro de partícula: 612 nm - 3 μ m	Fase W: 0,25 g de gelatina con 9,8 g de agua y 37,7 μ L de GTA Monooleato de sorbitán 10% Sonicación 50 % de amplitud / 10 min Agitación 1200 rpm por 1 hora Diámetro de partícula: 225-860 nm

Por otra parte, la homogeneización por sonda ultrasónica -es un método de alta energía- permite superar las limitaciones de viscosidad para dispersar la fase interna de la emulsión en pequeñas gotas de tamaño nanométrico que forman los nanogeles tras la reticulación con el GTA a bajas temperaturas [13], razón por la cual se seleccionó una amplitud de 50% en 10 min [14].

Estudio del tamaño de nanogel mediante Microscopía óptica

El tamaño nanométrico de las partículas obtenidas es un parámetro de suma importancia, ya que, favorece la administración de fármacos a nivel oculares debido a que ayudan a minimizar la irritación en el tejido ocular, disminuyen la visión borrosa y mejoran la permeación ocular [15].

En la Figura 1A se puede observar las nanopartículas vistas por microscopio y la distribución de tamaño de los nanogeles (Figura 1B). Se obtuvieron nanogeles con una baja dispersión en la distribución de tamaño, con índices de Polidispersión (PdI) de 0,025, 0,010 y 0,011 respectivamente, con una media de 0,015. Estos resultados son adecuados para la administración de estos sistemas en el ojo, ya que, se reporta que el tamaño adecuado para no generar molestias en los ojos son partículas hasta 10 μ m [16].

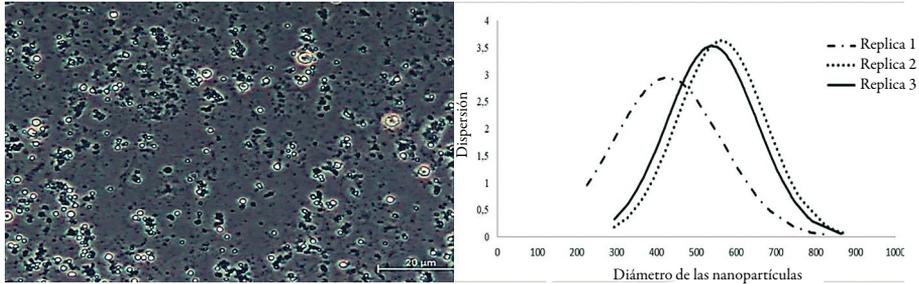


Figura 1. Tamaño y distribución de los nanogeles. Figura 1A. Imagen de microscopía óptica de los nanogeles. Figura 1 B. Gráfica de distribución de tamaño de las réplicas de los nanogeles.

Rendimiento de los nanogeles

Se obtuvieron rendimientos del 30, 21 y 16 % del proceso de obtención de nanogeles. Estos porcentajes son bajos para los nanogeles desarrollados por un método de alta energía como la Sonicación, el cual es favorable para la obtención de nanopartículas con mayores rendimientos [13]. Sin embargo, estos resultados se atribuyen al complejo proceso de purificación, en donde se requieren largos tiempos de centrifugación y extensivos lavados para lograr una buena separación de las fases y así lograr la eliminación total de la fase oleosa sin presentar pérdida de la fase acuosa [17].

Estudio de liberación *in vitro* de latanoprost

La figura 2 muestra el perfil de liberación *in vitro* de latanoprost. Se observó una liberación sostenida del activo durante los primeros ocho días. Siendo, más rápida las primeras 48 horas (mayor pendiente de la gráfica) y luego se observó una liberación más lenta hasta el octavo día del ensayo. Tan solo el 15% de la cantidad total de latanoprost cargado en los nanogeles fue liberado. El fármaco remanente puede ser liberado a medida que los nanogeles se degradan [18].

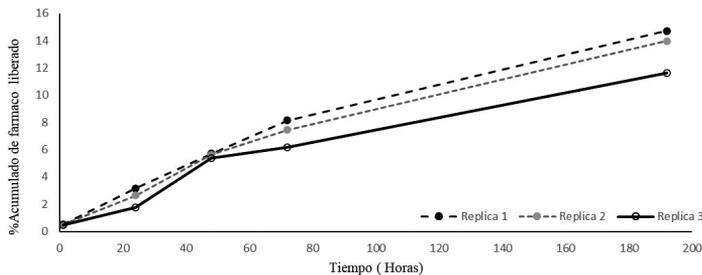


Figura 2. Estudio de liberación *in vitro* de latanoprost. La flecha indica el cambio de velocidad de la liberación.

Cinética de liberación

Las diferentes cinéticas de liberación *in vitro* de latanoprost se observan en el anexo 2 del material suplementario. El modelo con mejor R^2 fue el modelo Korsmeyer Peppas (Tabla 2). Este modelo describe el mecanismo de liberación controlada en sistemas poliméricos que presentan hinchamiento [19]. Por lo cual, se puede inferir que los nanogeles funcionan como sistemas de liberación controlada por la relajación de las cadenas poliméricas que permite generar la penetración del medio de disolución en la matriz, formando poros y erosionándola, la cual, mediante el proceso de difusión hace que el fármaco se libere constantemente [20].

Tabla 2. Coeficientes de correlación de los modelos cinéticos ajustados al perfil de liberación nanogeles.

Lote	Orden cero (R^2)	Primer orden (R^2)	Modelo de Higuchi (R^2)	Korsmeyer-Peppas (R^2)
1	0,965	0,636	0,981	0,994
2	0,966	0,648	0,977	0,987
3	0,943	0,662	0,962	0,951

Eficiencia de Carga

El método de sorción del principio activo permitió obtener una eficiencia de carga entre 46- 58%, la cual, es representativa teniendo en cuenta los bajos rendimientos y capacidad de carga que se obtuvieron en los nanogeles, debido a la concentración de gelatina y su efecto en las propiedades viscoelásticas. Además, se ha encontrado en la literatura que la eficiencia de carga para estos sistemas puede ser baja, dependiendo del material, concentración o agente reticulante empleado [16]. Por ejemplo, se ha reportado en la literatura que un sistema híbrido de nanopartículas de gelatina-HPMC para administrar fármacos agentes reductores de la PIO (Presión intraocular) tuvieron una eficiencia de carga del $58,7 \pm 3,8$ % [21]. Por otra parte, Cheng y su equipo realizaron un hidrogel de quitosano/gelatina/fosfato de glicerol para la liberación sostenida de latanoprost, obteniendo como resultado una eficiencia de carga del $67,72 \pm 4,25$ % [22].

Espectros FT-IR

La Figura 3 muestra el espectro FT-IR de los nanogeles, se observan señales representativas como la señal en 3278 cm^{-1} , el cual se asocia al enlace N-H de los grupos amina libres en los terminales de la estructura de gelatina libres que no reaccionaron con el glutaraldehído. Las señales en 2925 cm^{-1} y 2863 cm^{-1} , corresponden a vibraciones del enlace C-H que está presente a lo largo de la cadena de gelatina. La tensión en 1627 cm^{-1} corresponde a las vibraciones del enlace C=O que se asocia a residuos de

glutaraldehído que quedaron sin reaccionar, así como la señal en 1526 cm^{-1} correspondiente a vibraciones del enlace $\text{C}=\text{N}$ que está directamente relacionado con la reacción de entrecruzamiento formando el grupo imina [23].

Los espectros infrarrojos de las nanopartículas cargadas con latanoprost (material suplementario anexo 3) no mostraron señales nuevos o eliminación de alguno de los anteriormente descritos. Indicando que los nanogeles son sistemas prometedores para la incorporación de latanoprost al no presentar problemas de interacción o inestabilidad química con la composición del sistema (Gelatina).

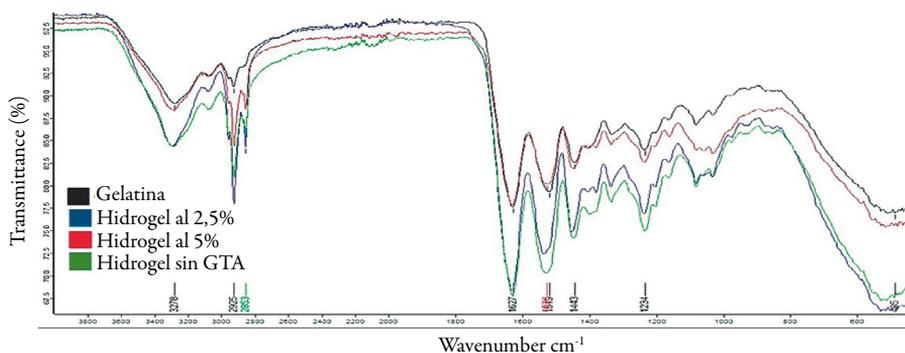


Figura 3. Espectro FT-IR de hidrogeles sin latanoprost. Las flechas muestran las señales más representativas.

Pruebas Reológicas

Las propiedades reológicas de estos sistemas son importantes, pues brindan información sobre el comportamiento del material, su estabilidad en el tiempo y por tanto su vida útil [24]. Se encontró que estos sistemas presentan una viscosidad tipo viscoelástico, en la cual a medida que aumenta la tasa de corte va disminuyendo la viscosidad [25], como se observa en la Figura 4, lo cual, es favorable para la administración y estabilidad de estos sistemas en el ojo.

La figura 4, muestra que la viscosidad es mayor en los hidrogeles con GTA en comparación con el hidrogel sin GTA (color rojo en 2,5% y verde en 5%), lo cual, indica que la reticulación favorece el aumento de la viscosidad haciendo más estables estos sistemas [26]. Por otra parte, se obtuvo con las gráficas una viscosidad general para cada hidrogel de $1879,6\text{ mPa}\cdot\text{s}$ para los hidrogeles de 2,5% y $2110,3\text{ mPa}\cdot\text{s}$ para los de 5%.

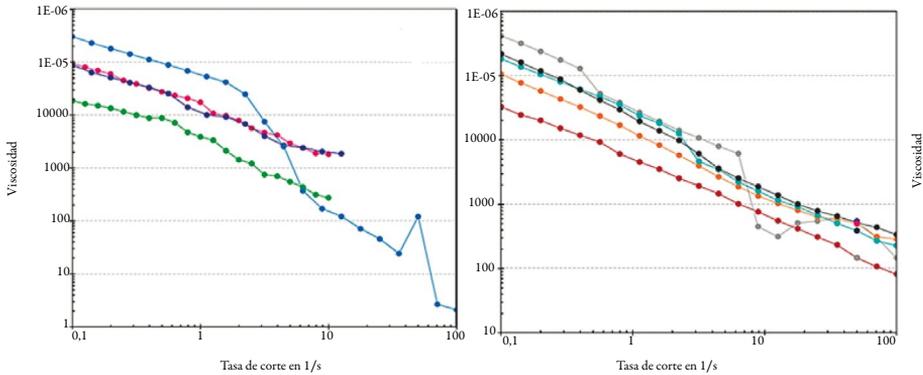


Figura 4. Propiedades viscoelásticas de los hidrogeles. A. Viscosidad (mPa·s) en función de la tasa de corte de los hidrogeles al 2,5 %. B. Viscosidad en función de la tasa de corte de los hidrogeles al 5 %.

Los módulos de pérdida y almacenamiento de energía de los hidrogeles se observan en la figura 5. Se observó un comportamiento similar en cada réplica iniciando con un módulo de almacenamiento G' (componente elástico) mayor hasta cierto punto donde hay un cambio y el gel empieza su tendencia a ser un material viscoelástico al aumentar el módulo de pérdida (comportamiento viscoso). De igual manera, se observa como al incrementar la concentración de gelatina hay un aumento (hasta 715 Pa) en el módulo de almacenamiento en comparación con los hidrogeles al 2,5% que presenta un máximo de 200 Pa. Mientras que ocurre lo contrario para el módulo de pérdida [6].

Por otra parte, se evidencia un punto de cruce definido en cada una, indicando el punto donde G' y G'' asumen el mismo valor, el cual, es representativo de un gel con propiedades viscoelásticas. De esta manera, se analiza de la figura 5A que los hidrogeles cargados con el principio aumentaron el porcentaje de deformación en que se encontraba el punto de gel viscoelástico, mientras que en la Figura 5B se observa como los hidrogeles al 2,5% de gelatina mostraron una disminución en el porcentaje de deformación en un con respecto a los hidrogeles sin principio, concluyendo que la incorporación de latanoprost tiene un mayor impacto sobre las propiedades viscoelásticas en hidrogeles con concentraciones menores, ya que, se va a requerir una menor deformación para lograr esta propiedad viscoelástica que favorece la administración de fármacos oculares [27].

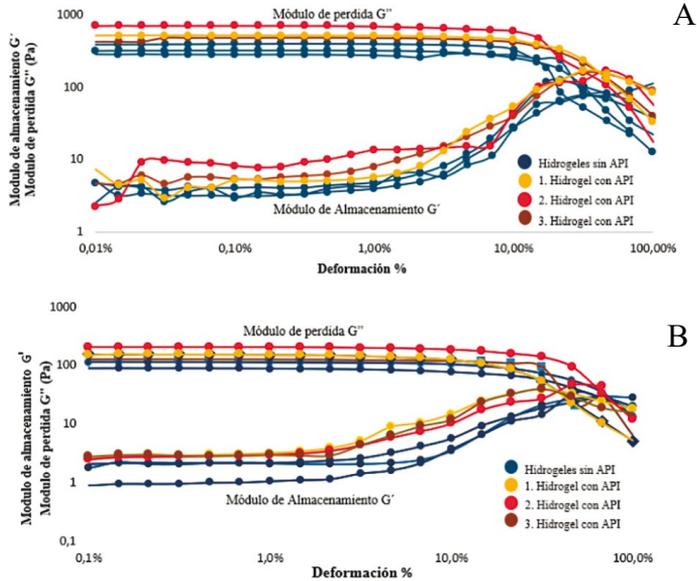


Figura 5. Propiedades viscoelásticas de los hidrogeles. A. Módulo de almacenamiento G' y pérdida G'' de hidrogeles al 2,5%. B. Módulo de almacenamiento G' y pérdida G'' de hidrogeles al 5%.

Osmolaridad

Las dispersiones nanogel cargadas a las diferentes concentraciones presentaron una osmolaridad de 262,4 a 285,0 mEq/g. Estos resultados se encuentran en los rangos permitidos para sistemas de administración ocular, reduciendo el riesgo de lisis celular e irritabilidad tisular [28].

Citotoxicidad

Los nanogel sin carga y cargados con latanoprost mostraron valores de viabilidad celular superiores al 90%. Estos resultados sugieren que el método de elaboración, purificación y carga con latanoprost no dejó residuos tóxicos.

CONCLUSIÓN

En este estudio se logró la optimización de las condiciones de elaboración para un prototipo de nanogel mediante el método emulsificación-gelación, evidenciando que las variables más significativas en la obtención de tamaños nanométricos son las concentraciones de gelatina y tensoactivos empleados, igualmente la amplitud y tiempo de agitación por sonda ultrasónica. Con estas variables de procesos definidas, se pudie-

ron obtener nanogeles cargados con latanoprost, un tamaño y distribución de tamaño, viscoelasticidad y reactividad biológica *in vitro* (citotoxicidad y osmolaridad) para ser administrados por vía ocular.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores manifiestan no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. World glaucoma week. URL: <https://www.worldglaucomaweek.org/what-is-glaucoma/>. Revisado en octubre de 2021.
2. D. Cabrera, *En Colombia más de dos millones de personas sufren de glaucoma*, 2021. URL: <https://www.rcnradio.com/recomendado-del-editor/en-colombia-mas-de-dos-millones-de-personas-sufren-deglaucoma#:~:text=En%20Colombia%20m%C3%A1s%20de%202.300,que%20padecen%20esa%20enfermedad%20ocular>, Revisado en octubre de 2021.
3. J.R. Franca, G. Foureaux, L.L. Fuscaldi, T.G. Ribeiro, R.O. Castilho, M.I. Yoshida, V.N. Cardoso, S.O.A Fernandes, S. Cronemberger, J.C. Nogueira, A.J. Ferreira, A.A.G. Faraco, Chitosan/hydroxyethyl cellulose inserts for sustained-release of dorzolamide for glaucoma treatment: *In vitro* and *in vivo* evaluation, *International Journal of Pharmaceutics*, **570**, 118662 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118662>
4. A. Patel, K. Cholkar, V. Agrahari, A.K. Mitra, Ocular drug delivery systems: An overview, *World Journal of Pharmacology*, **2**, 47-64 (2013). Doi: <https://doi.org/10.5497/wjp.v2.i2.47>
5. Ch. Peng, L. Kuang, J. Zhao, A.E. Ross, Zh. Wang, J.B. Ciolino, Bibliometric and visualized analysis of ocular drug delivery from 2001 to 2020, *Journal of Controlled Release*, **345**, 625-645 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.03.031>
6. R.A. Jiménez, D. Millán, A. Sosnik, M.R. Fontanilla, Aloe vera–eluting collagen I microgels: physicochemical characterization and *in vitro* biological performance, *Materials Today Chemistry*, **23**, 100722 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2021.100722>

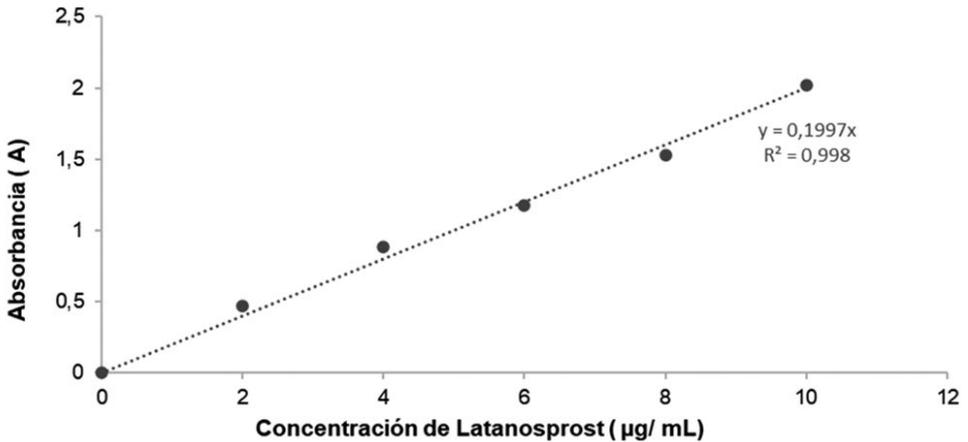
7. S. Sawatdee, H. Phetmung, T. Srichana, Development of a stable latanoprost solution for use as eye drops, *Chiang Mai Journal of Science*, **40**, 656-668 (2013).
8. S.R. Derkach, S.O. Ilyin, A.A. Maklakova, V.G. Kulichikhin, A.Y. Malkin, The rheology of gelatin hydrogels modified by κ -carrageenan, *LWT - Food Science and Technology*, **63**, 612-619 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.024>
9. R.F. Wallin, E.F. Arscott, A practical guide to ISO 10993-5: Cytotoxicity, *Medical Device and Diagnostic Industry*, **20**, 96-98 (1998).
10. F. Pinelli, Ó.F. Ortola, P. Makvandi, G. Perale, F. Rossi, *In vivo* drug delivery applications of nanogels: A review, *Nanomedicine* (Lond), **15**(27), 2707-2727 (2020). Doi: <https://doi.org/10.2217/nnm-2020-0274>
11. H.H. Jayanudin, A review of encapsulation using emulsion crosslinking method, *World Chemical Engineering Journal*, **5**, 37-43 (2021).
12. M.M. Bommana, B. Kirthivasan, S.S. Gupta, A. Shikhar, A. Shah, Nanostructures in pharma: Elixir to oral medicine, en: A.M. Grumezescu (editor), *Nanoparticles in Pharmacotherapy*, William Andrew Publishing, 2019, p. 23-44.
13. T.M. Silva, N.N.P. Cerize, A.M. Oliveira, The effect of high shear homogenization on physical stability of emulsions, *International Journal of Chemistry*, **8**(4), 52-61 (2016).
14. M.A. Cabrera-Trujillo, L.I. Sotelo-Díaz, M.X. Quintanilla-Carvajal, Efecto de la amplitud y pulsación en ultrasonido de sonda a baja frecuencia sobre emulsiones aceite/agua, *DYNA*, **83**, 63-68 (2016).
15. R.S. Abdel-Rashid, D.A. Helal, M.M. Omar, A.M. El Sisi, Nanogel loaded with surfactant based nanovesicles for enhanced ocular delivery of acetazolamide, *International Journal of Nanomedicine*, **14**, 2973-2983 (2019). Doi: <https://doi.org/10.2147/IJN.S201891>
16. S. Maiti, S. Jana, B. Laha, Cationic polyelectrolyte–biopolymer complex hydrogel particles for drug delivery, en: A.M. Grumezescu (editor), *Design and Development of New Nanocarriers*, William Andrew Publishing, 2018, p. 223-256.
17. G. Levourch, N. Lebaz, A. Elaissari, Hydrophilic submicron nanogel particles for specific recombinant proteins extraction and purification, *Polymers* (Basel), **12**, 1413 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3390/polym12061413>

18. X. Xu, S. Shen, R. Mo, Bioresponsive nanogels for protein delivery, *View*, **3**(1), 20200136 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1002/VIW.20200136>
19. D. Yañez, *Evaluación de cinéticas de liberación de alimentos medicados a base de benzoato de emamectina, utilizando medios alternativos de disolución*, Tesis de grado, Universidad Austral de Chile, Valdivia, 2013.
20. N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, O.C. Farokhzad, Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release, *Chemical Reviews*, **116**, 2602-2663 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346>
21. S. Esteban-Pérez, V. Andrés-Guerrero, J.J. López-Cano, I. Molina-Martínez, R. Herrero-Vanrell, I. Bravo-Osuna, Gelatin nanoparticles-HPMC hybrid system for effective ocular topical administration of antihypertensive agents, *Pharmaceutics*, **12**(4), 306 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040306>
22. Y.-H. Cheng, K.-H. Hung, T.-H. Tsai, Ch.-J. Lee, R.-Y. Ku, A.W.-h. Chiu, Sh.-H. Chiou, C.J.-l. Liu, Sustained delivery of latanoprost by thermosensitive chitosan–gelatin-based hydrogel for controlling ocular hypertension, *Acta Biomaterialia*, **10**(10), 4360-4366 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.act-bio.2014.05.031>
23. J.L. Patarroyo, J.S. Florez-Rojas, D. Pradilla, J.D. Valderrama-Rincón, J.C. Cruz, L.H. Reyes, Formulation and characterization of gelatin-based hydrogels for the encapsulation of *Kluyveromyces lactis*—Applications in packed-bed reactors and probiotics delivery in humans, *Polymers* (Basel), **12**, 1287 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3390/polym12061287>
24. K. Oldörp, Product stability and shelf-life - What rheology has to do with it, Thermo Fisher Scientific, Inc. URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Application-Notes/V260-e-Product_Stability_or_Shelf_Life___What_Rheology_Has_to_Do_with_it.pdf, Revisado en febrero de 2022.
25. Anton Paar GmbH, Reología en Polímeros. URL: https://www.youtube.com/watch?v=Z88Ve_eYryY, Consultado en febrero de 2022.
26. P. Panyamao, W. Ruksiriwanich, P. Sirisa-Ard, S. Charumanee, Injectable thermosensitive chitosan/pullulan-based hydrogels with improved mechanical properties and swelling capacity, *Polymers* (Basel), **12**(11), 2514 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3390/polym12112514>

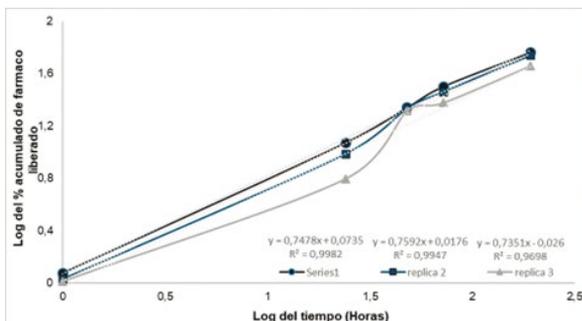
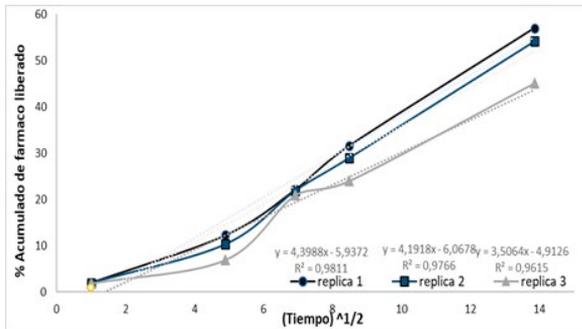
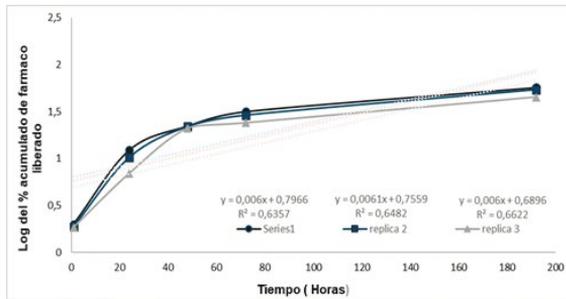
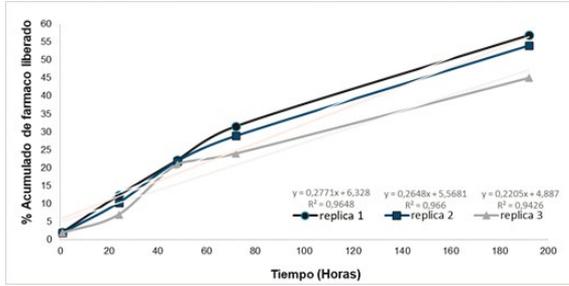
27. X. Hong, J.P. Stegemann, Ch.X. Deng, Microscale characterization of the viscoelastic properties of hydrogel biomaterials using dual-mode ultrasound elastography, *Biomaterials*, **88**, 12-24 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.02.019>
28. S. Nikam, A. Ghule, A. Inde, A. Jambhulkar, Advancement in ocular drug delivery system to overcome ocular barrier, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **71**(2), 90-97 (2021).

MATERIAL SUPLEMENTARIO

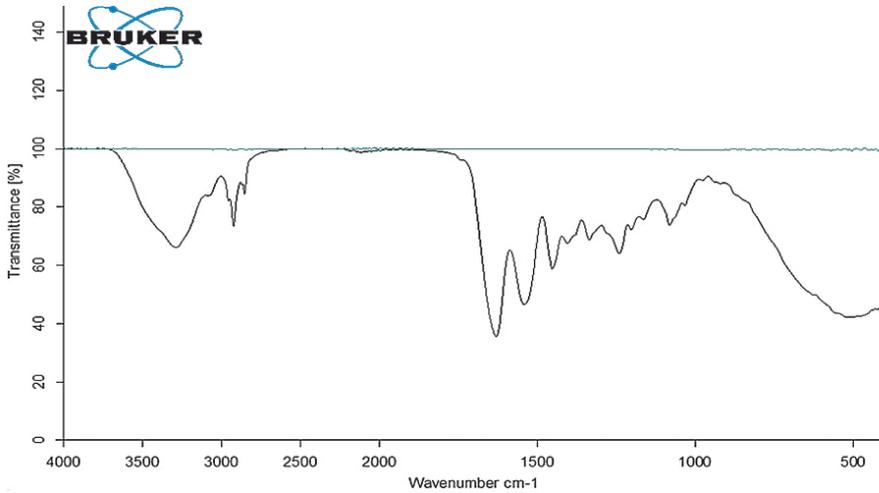
Anexo 1. Curva de calibración para la cuantificación de latanoprost



Anexo 2. Perfiles de liberación *in vitro* ajustadas a las diferentes cinéticas de liberación. (1a) Orden cero, (1b) Primer orden, (1c) modelo de Higuchi y (1d) modelo de Korsmeier-Peppas.



Anexo 3. Espectro IR de los nanogel cargados con latanoprost.



Anexo 4. Tabla resumen de las características obtenidas en cada réplica de nanogel.

Réplica	Tamaño (nm)	PdI	%Rendimiento	% Eficiencia de carga	% Sorción
1	225-860	0,025	30	58	46
2	293-874	0,010	21	55	37
3	294-864	0,011	16	46	22
Desviación	NA	0,015	7	6	12

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

M. Fernández-Lozano, D. Millan, R.A. Jiménez-Cruz, Aporte al desarrollo de un nanogel para la liberación controlada de latanoprost, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 1039-1057 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.110754>