



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**UTILIZACIÓN DE LIPOSOMAS EN  
PREPARADOS TÓPICOS DE ADMINISTRACIÓN  
OCULAR**

Autora: Eva María Montalbán Luquero

Fecha: Junio 2020

Tutora: Irene Teresa Molina Martínez

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
2.1. Concepto de liposoma y características .....	4
2.2. Liposomas en oftalmología: .....	4
i. Ventajas:.....	5
ii. Inconvenientes:.....	5
2.3. Clasificación de los liposomas .....	5
2.4. Métodos de preparación de los liposomas.....	6
2.5. La administración tópica ocular .....	7
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>9</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>10</b>
5.1. Formulaciones liposomales en preparados tópicos oculares.....	10
5.2. Preparados tópicos comercializados.....	10
5.3. Estrategias en el uso de liposomas en preparados tópicos .....	10
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>18</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>19</b>

## 1. RESUMEN

Los liposomas son uno de los nanosistemas más prometedores y pioneros del sector farmacéutico, que además de ser compuestos lipídicos, biodegradables y no tóxicos, cambian el perfil de liberación y transporte de fármacos con mayor selectividad hacia el compartimiento celular deseado, mejoran la biodisponibilidad y logran una acción prolongada del fármaco. En definitiva, estas vesículas compuestas de bicapas lipídicas mejoran las propiedades terapéuticas de los principios activos. Se han diseñado distintos métodos de fabricación lo que permite obtener una amplia variedad de liposomas de distinto tamaño, propiedades y posibles aplicaciones.

El uso de los liposomas enfocado hacia las formulaciones de administración tópica ocular es el tema principal que se aborda en este trabajo. Estos liposomas se cargan de fármaco ayudando a mejorar su absorción tanto por la córnea como por la conjuntiva, y atravesar distintas barreras presentes en el ojo hasta llegar a la diana. Son muchos los beneficios que aporta esta vía para el tratamiento de enfermedades, hasta ahora, del segmento anterior, investigándose como poder llegar al segmento posterior con ayuda de los liposomas.

En diversos estudios se optimizan formulaciones de liposomas según los objetivos planteados. Añadiendo polímeros a los liposomas, se mejora el tiempo de residencia del fármaco en la superficie corneal prolongando el efecto, otra opción, es crear una capa íntima en la superficie corneal con los liposomas cationicos. Al dispersar los liposomas en geles sensibles a iones se obtiene mayor efecto del fármaco. Las lágrimas artificiales compuestas por nanoliposomas dispersados en osmoprotectores conservan mejor la humectabilidad. Por último, la conjugación de transferrina a los liposomas con la finalidad de que el fármaco acceda a las células retinianas a través de endocitosis al unirse a receptores de transferrina, es una reciente posibilidad de aumentar la concentración del fármaco en esta zona tras administración tópica.

Actualmente, la administración tópica ocular es uno de los campos más desafiantes para la investigación farmacéutica existiendo un único preparado comercializado. Sin embargo, se ha visto con diversos estudios que al modificar los liposomas y optimizarlos se conseguían importantes mejoras en cuanto a biodisponibilidad del fármaco y tiempo de retención en la córnea entre otros.

**Palabras clave:** liposoma, administración tópica ocular, barreras oculares, terapia oftálmica, nanosistemas farmacéuticos.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Concepto de liposoma y características

Los liposomas son vesículas esféricas compuestas por una o más bicapas lipídicas formadas por fosfolípidos y colesterol. Los fosfolípidos se organizan de manera que queda la parte hidrófila (cabeza) de la bicapa lipídica hacia el exterior, y la parte hidrófoba (cola) hacia el interior mimetizando a la membrana celular. En el interior del liposoma se localiza medio acuoso.

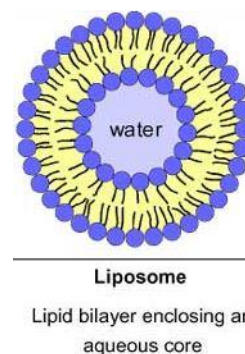
Los lípidos contienen un “grupo esqueleto” central (1) que se encarga de unir la parte hidrofílica e hidrofóbica, y generalmente suelen ser el glicerol o la esfingosina, dando lugar a los denominados fosfogliceridos y esfingolípidos.

Dentro de los fosfogliceridos, el más utilizado para la preparación de liposomas es la fosfatidilcolina, también llamada lecitina que se obtiene fácilmente de la yema del huevo y de la semilla de la soja (1).

A estas vesículas lipídicas también se les puede añadir antioxidantes, como el tocoferol, con el fin de evitar la peroxidación lipídica. Un componente indispensable para la formación del liposoma es el colesterol que da rigidez intercalándose en la bicapa lipídica, mejora el ensamblaje de las moléculas de fosfolípidos y además evita la pérdida de la sustancia encapsulada. En algunos casos se le añaden polímeros como el polietilenglicol (PEG) u otros tipos de sustancias para modificar propiedades intrínsecas y conseguir mejorar algunas de sus características (2)(3).

La elección de los componentes del liposoma y de su proporción es fundamental ya que determina la rigidez o fluidez, la carga electrostática, el pH, la tensión superficial y el tamaño de partícula. Cuanto más pequeños son, más posibilidad tienen de llegar al interno, por ejemplo, en un reciente estudio se vio que los modificados con tamaño menor a 100 nm eran capaces de llegar al segmento posterior del ojo (4).

La elección de los distintos ácidos grasos es significativa, ya que las insaturaciones aumentan la permeabilidad del liposoma, pero disminuyen su estabilidad y, por el contrario, los ácidos grasos saturados (palmitato) (5) aportan rigidez formando bicapas impermeables. De este modo, en función de los requerimientos se podrán diseñar unos u otros.



### 2.2. Liposomas en oftalmología:

Figura 1: estructura del liposoma (6)(7).

Los liposomas se utilizan principalmente como vehículo para transportar y liberar fármacos, los hidrófilos quedan retenidos en el interior de la vesícula (medio acuoso interno) protegidos por la bicapa lipídica, mientras que los hidrófobos quedan incluidos en esta.

El liposoma puede interactuar con la célula por más de un mecanismo al mismo tiempo, (i) por endocitosis, (ii) por fusión directa, es decir, el fármaco pasa directamente del liposoma al interior celular por coalescencia, (iii) por intercambio lipídico entre el liposoma y

la célula permitiendo la absorción de fármacos lipófilos que se encuentran en la bicapa, (iv) por adsorción, los liposomas se adhieren a las células diana y por transporte pasivo el principio activo pasa a través de la membrana liposomal y de la membrana celular al interior de la célula (6) (7). Los mecanismos que intervengan dependerán tanto de la composición y carga del liposoma como del tipo de célula y medio extracelular del que se trate (8).

i. Ventajas:

- Han mostrado una **tolerancia excelente** y pueden **encapsular sustancias** con una alta actividad, pudiendo tener un mayor efecto a nivel local.
- La capacidad que poseen para encapsular el fármaco, también **evita la rápida eliminación** por enzimas y, por otro lado, evita **la toxicidad** de fármacos peligrosos, por lo que permite estabilizar el principio activo.
- Son **biodegradables** y **biocompatibles** gracias a su similitud estructural con la membrana celular, lo que les posibilita incluirse en vías de administración alternativas.
- Mejoran la absorción, la penetración y la difusión (6).
- Pueden programarse para una liberación modificada del fármaco en función de sus componentes y preparación (3) (9).

ii. Inconvenientes:

- Tienen limitaciones respecto a la **esterilidad**, requisito imprescindible para la administración ocular.
- Algunos liposomas **no son muy estables**, ya que los componentes lipídicos insaturados se oxidan o sufren hidrólisis fácilmente. Para solucionarlo se incorporan antioxidantes y se procuran almacenar en una atmósfera de nitrógeno (5).
- Pueden sufrir una pérdida de su contenido a través de la bicapa hacia el medio acuoso externo, y **tender a agregarse**, esto último se previene regulando adecuadamente la carga superficial (1)(5).
- Su **viscosidad** hace que no sea suficiente el tiempo de contacto con la córnea por lo que a menudo estos preparados se ven modificados por la introducción de polímeros bioadhesivos. Por ello, muchas nuevas formulaciones optan por añadirles componentes, como es el caso del gel “in situ” sensible a iones (10).

### 2.3. Clasificación de los liposomas

Según el tamaño y el número de bicapas que componen un liposoma se pueden en clasificar en:

**Vesículas unilamelares:** tienen una sola bicapa lipídica esférica que encierra una solución acuosa (10) (11).

- **SUV:** Con tamaños entre 20 y 80 nm. En estos liposomas el porcentaje de encapsulación que se consigue es bajo. Se obtienen por técnicas de ultrasonido.
- **LUV:** El tamaño se encuentra entre 80 y 1000 nm. Al ser grandes, son capaces de transportar gran cantidad de agua en su interior por lo que se recomiendan para el transporte de activos hidrosolubles. Se obtienen por extrusión.
- **GUV:** con un tamaño mayor de 1000nm.

**Vesículas multilamelares:** Están constituidos por varias bicapas lipídicas, formando una estructura multilamelar de esferas concéntricas separadas por capas de agua. Se consiguen mediante técnicas de evaporación.

- **MLV:** Con un tamaño entre 400 nm y varios micrómetros (1).

**Vesículas multivesiculares:** El tamaño es superior a 400 nm. Están constituidos por vesículas unilamelares grandes que en su interior incluyen otras vesículas de menor diámetro (**MVL**).

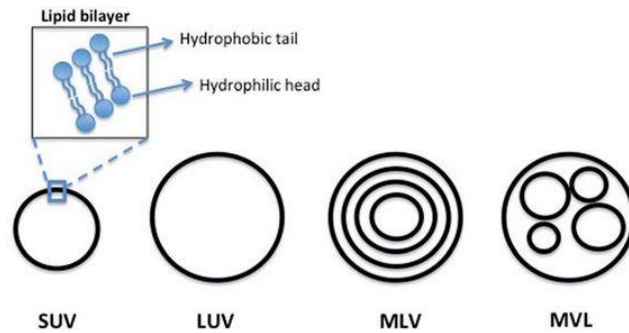


Figura 2: Representación de los diferentes tamaños de liposomas (1).

#### 2.4. Métodos de preparación de los liposomas

El *método de hidratación* de la película lipídica o *método de Bangham* es el más utilizado para abordar ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*. Este, consiste en solubilizar los lípidos en un solvente orgánico, el cual será posteriormente eliminado por evaporización a vacío obteniéndose finas películas de lípidos. Estas finas películas son hidratadas en medio acuoso a una temperatura próxima a la de transición de fase formándose espontáneamente los liposomas (12). Por último, los liposomas se tratan con ultrasonido y extrusión por membranas de policarbonato (2) (8).

El *método de congelación-descongelación* es una variante de la anterior, especialmente elegida para encapsular proteínas. Una vez formados los liposomas son sometidos a procesos de congelación/descongelación seguidos de un proceso de extrusión, que permite que el soluto se equilibre entre el medio acuoso y el medio de dispersión, y se puedan realizar tantos ciclos como sean necesarios (3).

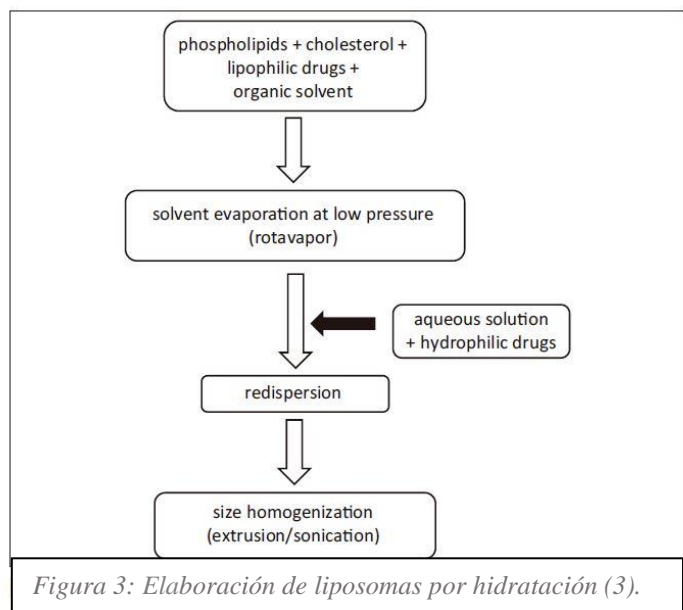


Figura 3: Elaboración de liposomas por hidratación (3).

Para obtener liposomas a gran escala se dispersan masas de lípidos en un medio acuoso y posteriormente se le somete a tratamiento con *ultrasonido* seguido de procesos de *extrusión* consiguiendo tamaños más pequeños (2)(3).

El *método de evaporación en fase reversa (REV)* se emplea para obtener vesículas de gran tamaño (LUV) que permitan encapsular macromoléculas (2). Se parte de una disolución de fosfolípidos en un solvente orgánico que mezclan con una fase acuosa (emulsión), para obtener micelas. Posteriormente se elimina el solvente, que permite al mismo tiempo la agregación de estas para formar una estructura tipo gel. Seguidamente, aplicamos el grado de vacío necesario para eliminar completamente el disolvente y encontrar solo las micelas. Estas, formadas por monocapas lipídicas se sitúan cerca de otras micelas en un gel intermedio que, tras agitación, dará lugar a las bicapas lipídicas que constituyen la pared de los liposomas (13).

A diferencia de los obtenidos por las técnicas anteriores, los de *fase reversa* no son estables para almacenamiento a temperaturas inferiores a la de transición, ya que estos tienden a fusionarse (3) (6). El resto, se deben almacenar a una temperatura entre 4-8°C a pH 7 y su estabilidad por lo general es de una semana (6).

## 2.5. La administración tópica ocular

La administración tópica es la vía más adecuada y de primera elección en el tratamiento de muchas enfermedades oculares y de aquellas en las que la diana farmacológica se encuentra en el segmento anterior del ojo. Cuenta con múltiples ventajas como su comodidad, su falta de invasión a otros tejidos, su simplicidad y la posibilidad de que el paciente pueda aplicárselo por sí mismo. Por otro lado, cuenta con desventajas como es el drenaje lacrimal, el parpadeo y las barreras estáticas y dinámicas (drenaje sanguíneo y linfático), lo que le dota de una baja biodisponibilidad, una escasa penetración de los activos y una alta frecuencia de administración, problemas que los liposomas logran solventar (2) (3) (14).

Los fármacos cuando se administran por vía tópica ocular, penetran a través de la córnea (vía transcorneal) o a través de la conjuntiva y esclera (vía conjuntival). La mayoría de las sustancias aplicadas son absorbidas por vía transcorneal y en un principio, se pensó que la conjuntiva solo actuaba como vía de eliminación, sin embargo, hoy en día se sabe que hay sustancias capaces de atravesar la conjuntiva llegando a alcanzar, en ciertas ocasiones el segmento posterior (7).

La mayoría de los productos oftalmológicos comercializados son de uso tópico y se presentan en gotas oculares, por lo general, estas no alivian enfermedades del segmento posterior del ojo debido a que no logran llegar a él, ya sea por la rápida eliminación del activo o por las barreras anatómicas del ojo y se calcula que solo un 5 % del fármaco aplicado llega a los tejidos intraoculares (15). Por ejemplo, las gotas oculares de ganciclovir comercializadas hasta ahora, son adecuadas solo para el tratamiento de la infección viral del segmento anterior, pero recientemente, se ha publicado un estudio que demuestra que mediante una solución tópica constituida por liposomas de ganciclovir conjugados con transferrina se logra aumentar la posibilidad de penetrar en las células de la retina (15) (16).

Al mismo tiempo, los liposomas son especialmente conocidos como buenos sistemas de transporte y de liberación de fármacos oculares, con capacidad de incrementar el tiempo de residencia y con ello la penetración transcorneal. Con el objetivo de optimizar la utilización de la vía tópica e incluso llegar a zonas más internas mediante esta, han surgido diversos estudios e investigaciones basados en el uso de liposomas.

Los liposomas modificados con un tamaño de partícula inferior a 100 nm son posibles portadores del fármaco si queremos dirigirlo al segmento posterior por vía tópica, pueden penetrar a través de los vasos de la conjuntiva y del cuerpo ciliar, y luego distribuirse a la esclerótica, a la coroides, al epitelio pigmentario de la retina y a la retina (15).

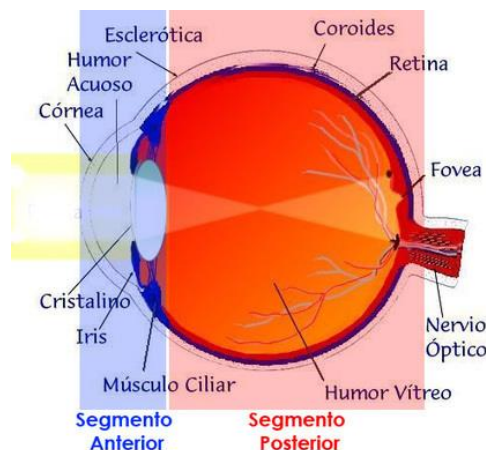
i. Estructura anatómica del ojo

El ojo está formado por 3 capas:

- La **capa externa fibrosa**; formada por (i) la **córnea** (convexa y transparente) con epitelio y estroma de carácter hidrófilo, y endotelio de carácter lipófilo, y (ii) la **esclerótica**, parte blanca del ojo compuesta por tejido conjuntivo.
- La **capa media vascular**; compuesta por (i) el **iris**, es la parte pigmentada con un esfínter muscular que produce miosis y midriasis, (ii) el **cuerpo ciliar** posterior al iris que se conecta con el cristalino y (iii) la **coroides**, muy vascularizada y se encuentra rodeando el interior de la esclerótica.
- La **capa interna nerviosa** que es la **retina** contiene los fotorreceptores. A este nivel se sitúa la barrera hematorretiniana que supone una verdadera barrera física para el paso del fármaco desde circulación sistémica al segmento posterior del ojo.

A su vez, el ojo se divide en 3 partes: la **cámara anterior**, entre la córnea y el iris que contiene humor acuoso, **cámara posterior** entre el iris, el cuerpo ciliar y el cristalino, que también contiene humor acuoso y la **cámara vítrea** entre el cristalino y la retina que contiene el humor vítreo. La cámara anterior y la posterior se incluyen en el segmento anterior y la cámara vítrea en el segmento posterior como bien se muestra en la figura 4 (17) (18).

Figura 4: Representación esquemática de la anatomía ocular (18).





## ii. Enfermedades a tratar por vía tópica ocular

➤ Enfermedad del ojo seco: (EOS) es un conjunto de síntomas que se dan cuando los ojos no producen la cantidad de lágrimas suficientes para mantenerlos húmedos, o cuando las lágrimas no funcionan correctamente (19).

Las lágrimas están formadas por 3 capas: (i) la capa lipídica que evita que las lágrimas se evaporen fácilmente y es secretada por las glándulas de Meibomio, (ii) la capa acuosa que proviene fundamentalmente de la glándula lagrimal en los párpados y es la encargada de limpiar el ojo y, por último, (iii) la capa mucosa que es la capa interior de la película lagrimal que mantiene el ojo húmedo y hace que las lágrimas se adhieran (20).

Lo sufre alrededor de un 11% de la población (21), las personas mayores son más susceptibles a padecerlo, siendo más común en mujeres que hayan pasado la menopausia, o con enfermedades como artritis reumatoide y el síndrome de Sjogren entre otras.

La sintomatología incluye picor, escozor, irritación, sensación de cuerpo extraño, dolor debido a la inflamación, visión borrosa y mayor lagrimeo como respuesta a la irritación. Se trata con lágrimas artificiales de ácido hialurónico o carmelosa o con colirios que contienen inmunosupresores para bajar la inflamación como la ciclosporina A (22).

➤ Glaucoma: es una enfermedad en la que el sistema de drenaje del ojo se tapa y el fluido intraocular no puede drenar por lo que se acumula el humor acuoso y causa un aumento de presión en el interior del segmento anterior. Este aumento de presión se extiende al segmento posterior dañando al nervio óptico, la retina y las zonas cercanas, llevando a la pérdida de la visión.

La etiología no está clara, y el inicio es asintomático, por lo que se diagnostica únicamente con un examen de ojos, o cuando el paciente nota falta de visión. El glaucoma más común es el de ángulo abierto; en este caso, el ángulo en el que el iris coincide con la córnea es más amplio y abierto de cómo debería ser (23).

El glaucoma es irreversible y se trata comúnmente mediante gotas oftálmicas que contienen antihipertensivos. Los inconvenientes de este tratamiento son la continua necesidad de aplicación y las molestias en la superficie ocular después de tratamientos crónicos (24).

➤ Conjuntivitis: es una infección muy común que supone la inflamación de la conjuntiva, la membrana fina y transparente del interior del párpado y la parte blanca del ojo. El primer síntoma es el enrojecimiento, seguido del aumento de lágrimas, secreción ocular, escozor en los ojos...Puede estar causada por virus, bacterias, alérgenos o sustancias irritantes. Dependiendo del tipo de conjuntivitis se tratará de distinta manera (25) (26).

➤ Queratitis herpética: es una inflamación de la córnea provocada, frecuentemente, por el virus del herpes simple, aunque también pueden causarla otros virus como el de la varicela zoster. Los síntomas son sensibilidad lumínica, enrojecimiento y visión borrosa. Suele tratarse con pomadas oftálmicas o con medicación oral antiviral (27) (22).

### 3. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo trata de efectuar una revisión bibliográfica de diversos estudios sobre formulaciones tópicas oculares en las que se incluyen liposomas con el fin de mejorar su eficacia terapéutica.

Para centrar el tema, se explica el concepto de liposoma, así como su definición, clasificación, métodos para elaborarlos, su uso en administración tópica ocular y algunas enfermedades oculares.

Además, se describen las estrategias diseñadas en exitosos estudios respaldando las ventajas que supone incorporar este sistema.

#### **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

Para la elaboración y redacción de este trabajo se ha llevado a cabo una revisión de la información contenida en artículos científicos de revistas indexadas en las bases de datos Pub Med, Science Direct y la colección de bases Web of Science.

#### **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

##### **5.1. Formulaciones liposomales en preparados tópicos oculares.**

El desarrollo de liposomas para administración tópica ocular no ha recibido tanta atención como en otros campos, es por ello que en el mercado farmacéutico solo consta de una fórmula tópica liposomal (19). No obstante, si se han llevado a cabo estudios preliminares con resultados prometedores, pero no se han llegado a comercializar por falta de recursos u otras causas. Nuevos preparados continúan en fase de investigación para poder ser comercializados en un futuro próximo y tratar diferentes enfermedades obteniendo mejores resultados.

##### **5.2. Preparados tópicos comercializados**

###### **❖ Aquoral Lipo:**

Es el único preparado comercializado con composición liposomal para administración tópica ocular. Indicado en el tratamiento sintomático del ojo seco, (ya sea por insuficiencia lacrimal, hipolacrimia, o excesiva evaporación, dislacrimia) y para la protección corneal después de intervenciones quirúrgicas, traumatismos oculares o estrés visual y ambiental.

Es una solución oftálmica lubricante y antioxidante sin conservantes a base de sal sódica de ácido hialurónico cross-linkado, liposomas y crocina (25).

Lo especial de esta formulación es la combinación del ácido hialurónico entrecruzado con liposomas lo que da una mayor viscoelasticidad y estabilidad de la molécula, garantizando mayor tiempo de residencia en menos dosis y mejor hidratación del ojo. A su vez, los liposomas regeneran la capa lipídica de la película lacrimal y la estabilizan (25).

##### **5.3. Estrategias en el uso de liposomas en preparados tópicos**

Como se ha argumentado anteriormente, los liposomas son buenos portadores de fármacos oculares con muchas características favorables para ello: (10) (28).

- Atraviesan fácilmente la córnea
- Poseen buena histocompatibilidad
- No son tóxicos
- No tienen inmunogenicidad

Existen muchas investigaciones que optan por la utilización de liposomas como sistema para mejorar la formulación y solventar problemas físico-químicos que poseen muchos fármacos en solución como:

- Tiempo corto de contacto por la baja viscosidad de la solución y por ello es necesario la constante aplicación (10) (29).
- Baja permeabilidad corneal y baja biodisponibilidad de fármacos solubles en agua.
- Baja hidrosolubilidad y dificultad para preparar colirios.

En la Tabla siguiente se resumen algunas de las estrategias utilizadas que se van a detallar a continuación.

### Estrategias en el uso de liposomas para preparados tópicos en diferentes estudios

FÁRMACO	ENFERMEDAD	ESTRATEGIA DISEÑADA, FORMULACIÓN LIPOSOMAL	CONCLUSIONES
<b>Acetazolamida (30)</b>	Glaucoma	ACZ-LP ACZ-LP-P (sistema híbrido)	El <b>sistema híbrido</b> demostró ser totalmente adecuado además de <b>proporcionar un efecto hipotensor más potente y prolongado</b> con mayor tiempo de residencia que las formulaciones convencionales.
<b>Ganciclovir (15)</b>	Retinitis por citomegalovirus	GCV-LP GCV-LP-Tf	Al <b>conjugarse la transferrina</b> a la superficie liposomal se aumentaban las posibilidades de conseguir que parte del fármaco actuase en el interior de las <b>células retinianas</b> .
<b>Aciclovir (31)</b>	Queratitis herpética	Se comparó liposomas catiónicos, aniónicos y neutros.	Los <b>liposomas catiónicos</b> forman una capa que recubre la superficie corneal que incrementa <b>el tiempo de residencia y mejora la absorción</b> del Aciclovir.
<b>Lagrimas artificiales de Nano-liposomas (20)</b>	Ojo seco	Dispersión de nanoliposomas con hialuronato sódico y trehalosa	Los nanoliposomas con hialuronato sódico y trehalosa supusieron <b>una mayor humectabilidad</b> disminuyendo la desecación y aumentando el tiempo de residencia.
<b>Timolol maleato (10)</b>	Glaucoma	Gotas oculares TM Gel TM L-ISG	El gel liposomal sensible a iones <b>mejora el transporte corneal, prolonga el tiempo de residencia</b> y aumenta la biodisponibilidad.

### ❖ Planteamiento de un nuevo Sistema Híbrido Acetazolamida-liposoma/HPMC/Osmoprotectores.

La Acetazolamida (ACZ) es un inhibidor de la anhidrasa carbónica que disminuye la producción de humor acuoso y, por consiguiente, la presión intraocular. Sin embargo, es un fármaco de clase IV, es decir, de baja solubilidad y baja permeabilidad, lo que impide su utilización terapéutica por vía tópica ocular (24) (31).

En este estudio, se diseñó una estrategia que combinaba liposomas cargados de Acetazolamida y polímeros protectores de la superficie ocular creando un sistema híbrido para aumentar la biodisponibilidad de la ACZ y, por tanto, su actividad hipotensiva, al mismo tiempo, proteger la superficie ocular y la funcionalidad de la película precorneal. Además, al incluir agentes protectores de la superficie corneal como osmoprotectores, antioxidantes y fosfolípidos se solventaron algunos problemas con respecto a los colirios convencionales (21).

En un primer paso, se prepararon liposomas de ACZ con fosfatidilcolina, tratando de imitar la película precorneal con una buena tolerancia ocular. Se incluyó vitamina E como antioxidante y como osmoprotectores: trehalosa y eritriol, que mostraron además tener actividad antiinflamatoria. Los liposomas se elaboraron con etanol en vez de con cloroformo, lo que permitió la solubilidad de mayor cantidad de ACZ, puesto que era prácticamente insoluble en cloroformo, pero ligeramente soluble en etanol, así, se atrapó más cantidad en el liposoma. Posteriormente, a esta solución se añadió el HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa), que había demostrado tener una buena tolerancia en otros estudios, contribuyó a formar una capa continua y viscosa en la superficie ocular protegiendo al fármaco del drenaje extendiendo el tiempo de residencia.

Para garantizar la actividad de este sistema híbrido, se realizaron estudios de eficacia y tolerancia *in vivo* en 2 fases. En la primera etapa, se observó como la dispersión liposomal de ACZ proporcionó una biodisponibilidad doble que la correspondiente a la solución de ACZ con vehículo base, además de un inicio del efecto hipotensor una hora antes y con una duración del efecto más prolongada (31).

En una segunda etapa se comparó la dispersión liposomal de ACZ anterior con el sistema híbrido que contenía HPMC (ACZ-LP-P). El sistema híbrido mostró un incremento de la biodisponibilidad ocular 30 veces mayor que la que proporcionaba la solución en el vehículo base, además de un efecto aún más potente y más prolongado. En el ensayo de tolerancia *in vivo* en conejos, ninguna produjo molestias ni signos clínicos anormales durante las seis horas de estudio, la córnea permaneció transparente y la conjuntiva con coloración normal, lo que supuso una tolerancia óptima.

De acuerdo con los resultados obtenidos, los autores respaldaron la idea de que el polímero HPMC actuaba como potenciador de la viscosidad capaz de prologar el efecto hipotensivo en los conejos con glaucoma y aumentar el tiempo de retención en la superficie ocular. Se llegó a la conclusión de que existía un contacto íntimo entre los liposomas y las células de la córnea debido al polímero, mejorando la difusión pasiva del fármaco a través de la barrera corneal y se demostró que la formulación híbrida promovía un efecto hipotensor de

mayor duración reduciendo el número de administraciones diarias, lo que facilitaría la adherencia al tratamiento por parte de los pacientes (6).

❖ **Desarrollo de una formulación a base de transferrina conjugada con liposomas cargados de Ganciclovir.**

El Ganciclovir (GCV) es un antiviral utilizado para el tratamiento de la Retinitis causada por citomegalovirus, existen solo administraciones sistémicas de este antiviral en el mercado. El problema de este antiviral es su baja biodisponibilidad ocular tras administración tópica, lo que obliga a la administración por vía intravenosa con la posibilidad de ocasionar reacciones adversas severas como neutropenia y trombocitopenia (15).

El objetivo de este estudio es el desarrollo de una formulación liposomal de ganciclovir conjugada con transferrina (Tf-GCV-LP) que pudiera llegar al segmento posterior mediante administración por vía tópica o por inyección intravitrea. La transferrina (Tf) es una glicoproteína transportadora de hierro que actúa después de unirse al receptor de Tf en la superficie de las células de la retina. Una vez optimizada la formulación Tf-GCV-LP se determinó su toxicidad en las células de la retina, así como se evaluó su absorción.

Se basa en la idea de conjugar transferrina a los liposomas con la finalidad de que una vez se encuentren los liposomas conjugados en la retina, esta transferrina se una con los receptores de la superficie de las células retinianas posibilitando una mayor entrada del fármaco en ellas. Los autores supusieron que podría transportarse así el fármaco aplicándolo por vía tópica a través de la conjuntiva y la esclera llegando a la coroides y a la retina, donde allí, la transferrina se uniría con sus receptores específicos permitiendo mayor concentración del fármaco en el tejido diana.

Para empezar, se tuvo que comparar las características fisicoquímicas de las dispersiones liposomales de ganciclovir y de ganciclovir conjugado con transferrina para comprobar que las formulaciones conjugadas conservaban aspectos fundamentales. La dispersión liposomal conjugada con transferrina tenía un tamaño de partícula obviamente más grande, pero respecto a la eficacia de encapsulación (EE: porcentaje de GCV encapsulado en el liposoma/ total GCV) y a la capacidad de carga del fármaco (LC: porcentaje de GCV encapsulado en el liposoma/ total de fosfolípidos y colesterol) no dieron diferencias significativas teniendo una EE alrededor de 34 % y una LC de 14 % (15).

Por otra parte, se varió el contenido de fosfolípidos pegilados para investigar sus efectos en los liposomas. Se utilizó un fosfolípido pegilado ligante que contenía un grupo de maleimida el cual facilitaba la conjugación de la transferrina (DSPE-PEG-Mal). Sin embargo, al añadir estos fosfolípidos pegilados de maleimida tanto la eficacia de encapsulación como la capacidad de carga disminuyeron a causa del pequeño volumen de fase acuosa y la hidrófila del Ganciclovir, aunque continuaban dentro de los rangos aceptables.

Haciendo referencia a la conjugación de la transferrina, una solución con mayor contenido de DSPE-PEG-Mal proporcionaba más maleimida para acoplar la transferrina tiolada, pero suponía al mismo tiempo un mayor tamaño de partícula. Es entonces por lo que se seleccionó como formulación más adecuada la correspondiente a una concentración de 0,2 M de fosfolípido pegilado de maleimida (GCV-LP-Mal0.2-Tf) ya que presentaba un

tamaño de partícula inferior a 100 nm incrementándose la posibilidad de alcanzar el segmento posterior, además de presentar una eficacia de encapsulación adecuada.

Las fotografías de la TEM (Microscopia Electrónica de Transmisión) que se muestran en la figura 5 confirmaban que la transferrina se presentaba en pequeñas estructuras alrededor la superficie liposomal y en los espacios entre ellos, y ausentes, como era de esperar, en la formulación GCV-LP puesto que no tenía transferrina. Por otro lado, en la prueba de citotoxicidad in vitro de ambas sugirieron que eran seguras para las células humanas de la retina con una viabilidad celular del 80-100 %.

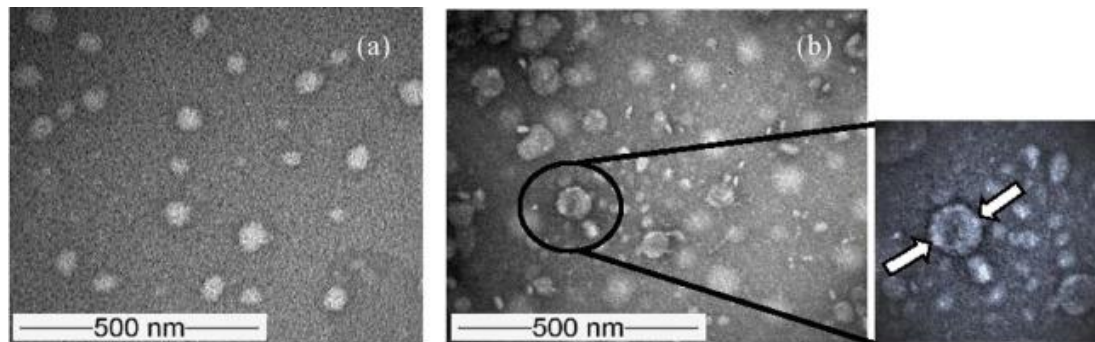


Figura 5: fotografías de la TEM: (a) GCV-LPs-3.4-Mal0.2 y (b) GCV-LPs-3.4-Mal0.2-Tf (15).

En cuanto a la captación intracelular en las células ARPE-19 (células de la retina humana) se descubrió que la unión de la transferrina a los receptores facilitaba la internalización celular del GCV por endocitosis del liposoma, pero que la transferrina libre, es decir, la no conjugada, la dificultaba por su unión competitiva al ocupar también estos receptores.

Al comparar las concentraciones de GCV extraídas de las células de la retina incubadas con la dispersión GCV-LP-Mal0.2-Tf por un lado y con la dispersión de GCV-LP simple por otro, eran muy similares. En el caso de la segunda, la absorción celular era por difusión y no necesitaba del complicado proceso de liberación con el que si contaba la formulación liposomal conjugada (32). No obstante, la dispersión de GCV-LP no es apropiada para la administración en gotas debido a su rápida eliminación.

Por consiguiente, este estudio, incluye la idea del liposoma para posibilitar la conjunción de la transferrina y usar esta como una técnica de vectorización activa. Defendió que la formulación GCV-LP-Mal0,2-Tf era capaz de administrar el ganciclovir a las células de la retina por endocitosis mediada por receptores Tf (TfRs) una vez habían sido transportados a la retina mediante instilación tópica, y demostró, en los estudios in vitro, poseer una potente actividad inhibitoria en la expresión viral de la glicoproteína B del citomegalovirus (15) (25).

## ❖ Formulación de liposomas de Aciclovir

El Aciclovir (ACV) es un agente antiviral que no se puede administrar por vía tópica debido a que su baja lipófila da lugar a una baja biodisponibilidad ocular. Para solucionar este problema, se desarrolló la estrategia de incluir liposomas dotados de diferentes cargas eléctricas con el fin de adherirse mejor a la superficie ocular y que pudiera así el fármaco actuar sobre la inflamación corneal durante más tiempo (31).

Se examinó el rendimiento de formulaciones liposomales de diferentes cargas por penetración corneal *in vitro* y por absorción corneal *in vivo* a fin de evaluar que carga liposomal era la más adecuada para la administración de ACV. La lecitina puede proporcionar a los liposomas una superficie neutra, la estearilamina una carga superficial positiva y el ácido fosfatídico una carga negativa (11) (19).

El ensayo *in vitro* demostró que el ACV libre atravesaba la córnea de forma más rápida, los ACV-liposomas negativos eran dos veces más lentos y los ACV-liposomas positivos los más lentos. Este ensayo confirmó que los liposomas tenían un tiempo de penetración más lento, pero al mismo tiempo era más prolongado que el ACV libre y eran los catiónicos los que poseían una penetración más pronunciada, aun así, más lenta. Este concepto se argumentó al compararse unas microfotografías de la superficie corneal donde se veía como la córnea aportaba carga negativa que interactuaba con los liposomas positivos uniéndose íntimamente, formando una capa que cubría la totalidad de la superficie corneal y así, los liposomas conseguían incrementar el tiempo de residencia, aunque la velocidad de penetración fuera menor (14) (31).

Cuanto mayor es el tiempo de residencia de los liposomas, más Aciclovir se libera a lo largo del tiempo y penetra a través de la córnea. Por otro lado, los negativos al estar sueltos en la superficie eran fácilmente drenados después de la instilación, por lo que no eran tan útiles.

La figura adyacente muestra los resultados del ensayo *in vivo*, extrayéndose el Aciclovir presente en el humor acuoso. A la hora y media se ve como aumenta exponencialmente la concentración de ACV por parte de los liposomas catiónicos, seguidos de los liposomas aniónicos, mientras que la concentración ACV de la solución ACV baja a partir de la hora.

Gracias a la inclusión de esta tecnología fue factible dispensar el Aciclovir en gotas oftálmicas para el tratamiento de la queratitis herpética, mejorando la absorción de este fármaco que resultaba ser un gran problema en un principio y, además, permitía reducir el número de instilaciones necesarias ya que aumentaba la biodisponibilidad del fármaco durante más tiempo (2) (31).

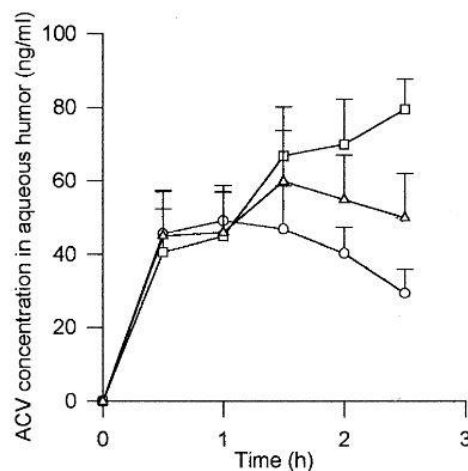


Figura 7: Concentraciones de ACV en el humor acuoso después de instilación tópica. (15)

- Cuadrado: liposomas ACV catiónicos
- Círculos: solución ACV
- Triángulos: liposomas ACV aniónicos

### ❖ Nano-liposomas con componentes similares a la película lagrimal para el tratamiento de la enfermedad del ojo seco:

Este estudio abordó la problemática que supone el desarrollo de lágrimas artificiales debido a la compleja composición de las lágrimas naturales. Ninguna de las lágrimas comercializadas tiene una composición suficientemente similar a las lágrimas naturales. Cada componente de la lágrima natural tiene una propiedad fisicoquímica única que juega un papel crucial en la homeostasis de la superficie ocular. Las lágrimas artificiales son el tratamiento inicial en la enfermedad del ojo seco, descrito anteriormente.

Se investigó las propiedades *in vitro* e *in vivo* de una nueva formulación liposomal con hialuronato sódico (SH), un componente similar a la mucina de la película lacrimal que aumenta la adhesión a la superficie. Los liposomas se fabricaron con fosfolípidos similares a los de la película lipídica lacrimal y una vez preparados, se dispersaban en una solución acuosa hipotónica de SH y trehalosa (20).

En cuanto a las propiedades tecnológicas de los nano-liposomas se comprobó que el tamaño permaneció estable hasta 8 semanas posiblemente gracias al polímero bioadhesivo SH y su efecto protector. El pH, la osmolaridad, la viscosidad y la tensión superficial fueron adecuadas y se aproximaban a las lágrimas naturales.

En los ensayos de citotoxicidad *in vitro* se usaron células de la córnea humana inmortalizadas y células de la conjuntiva humana normales y para valorar los datos se usó como control positivo una solución isotónica de cloruro de benzalconio (BAK). Las viabilidades fueron superiores al 80 % para un periodo de 4h de exposición siendo un poco más sensibles las células de la conjuntiva para nano-liposomas que habían sido almacenados durante más tiempo. En los ensayos de tolerancia *in vivo* realizados en conejos no aparecieron signos clínicos de toxicidad, a un ojo del conejo se le administraba la formulación liposomal final y al otro, solución control. Por tanto, se confirmó que la formulación fue bien tolerada tanto *in vitro* como *in vivo* (20).

La acción protectora de la formulación liposomal se estudió en un modelo de desecación en células de conjuntiva. En los resultados se observó un aumento de viabilidad en las células tratadas con la formulación liposomal desarrollada frente a las células sin tratamiento (75 % frente al 60 %) demostrando tener una mayor resistencia a la desecación.

Por tanto, los nano-liposomas desarrollados combinan los efectos beneficiosos de la fosfatidilcolina, del colesterol, de la vitamina E, del hialuronato sódico (SH) y de la trehalosa en un único colirio diseñado como sustitutivo muy similar a las lágrimas naturales y se comprobó que proporcionaban efectos beneficiosos en la conjuntiva frente a desecación a la vez que aumentaban el tiempo de residencia en la superficie ocular (20).



### ❖ Estudio comparativo sobre modelos liposomales cargados de Timolol maleato.

El Timolol maleato (TM) es un beta-bloqueante no selectivo usado como agente anti-glaucomatoso. La eficacia de los productos tópicos comercializados con este fármaco (poco lipófilo) está limitada por la baja biodisponibilidad, la frecuente instilación y el bajo cumplimiento por parte del paciente.

En este ensayo *in vitro* se comparó la penetración corneal de liposomas de TM y colirios comercializados de TM. La dispersión liposomal daba un incremento significativo de la absorción. Esto podría deberse a la biocompatibilidad de las vesículas lipídicas con las células epiteliales y como resultado, un transporte fácil a través de la córnea y una mayor solubilidad del fármaco en su interior (10).

Se quiso optimizar los liposomas de TM y para ello se dispersaron en un gel *in situ* sensible a iones con la finalidad de reducir al mínimo la dilución causada por la solución lacrimal, aumentar la viscosidad y así lograr mayor tiempo de retención. En el gel se incorporó goma gellan desacetilada (DGG) que en presencia de cationes sufre una rápida transición solución-gel formando un gel fuerte para un tiempo de contacto óptimo y con estabilidad térmica.

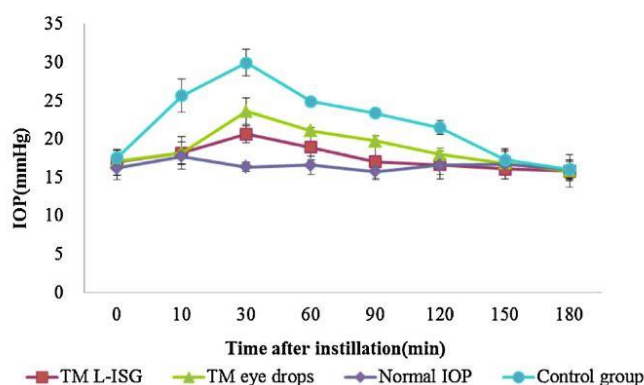
Analizando la viscosidad, esta se vio aumentada con la creciente concentración de DGG y respecto a la liberación del fármaco; los liposomas TM en DGG presentaban una liberación más larga, pero más lenta que los liposomas TM. Considerando todos los aspectos, se optó por usar el gel de 0,4 % de DGG (10).

Las imágenes de fluorescencia *in vivo* demostraron que los liposomas de TM cargados con geles *in situ* sensibles a iones (TM L-ISG) a los 10 minutos continuaban presentes en la superficie corneal, sin embargo, las otras 3 formulaciones no; en colirios comercializados, el TM al ser hidrosoluble tenía dificultad en atravesar la córnea y se drenaba rápidamente con las lágrimas. La formulación de liposomas de TM podía penetrar más fácilmente en la córnea que los colirios, pero su carácter fluido provocaba una rápida eliminación.

En cuanto a los estudios de irritabilidad, el gel TM L-ISG no mostró diferencias significativas respecto al resto, en el análisis histológico no presentó infiltración de células inflamatorias, ni hemorragia ni necrosis y las pruebas de Draize mostraron que no era irritante.

Los estudios farmacodinámicos revelaron que el gel tenía un efecto hipotensor mayor que las lágrimas de TM comercializadas a los 30 minutos como bien se muestra en la figura 8. El gel TM-L-ISG proporcionaba una disminución de la presión intraocular (IOP) que continuaba disminuyendo en el tiempo hasta alcanzar una presión normal demostrando así, la eficaz acción que suponen los liposomas en el gel (10).

Figura 8: Descenso de la presión intraocular en conejos con glaucoma. (10)



Todos los resultados de este estudio, demostraron que el gel liposomal de timolol maleato (TM L-ISG) mejoraba el transporte del fármaco a través de la córnea, prolongaba el tiempo de retención y mejoraba la biodisponibilidad, dando mejoras significativas en cuanto a los efectos que producían las gotas oftálmicas de timolol maleato ya comercializadas (10).

## **6. CONCLUSIONES**

Los estudios descritos en este trabajo demuestran las ventajas de las formulaciones liposomales respecto a las formulaciones convencionales, es por ello, que paulatinamente será mayor el número de estos preparados en el mercado farmacéutico. No obstante, tienen como limitaciones la preparación a nivel industrial bajo condiciones de esterilidad y el elevado coste frente a las formulaciones convencionales.

Dentro de las ventajas que aportan los liposomas optimizados se encuentran el aumento de la biodisponibilidad del fármaco y del tiempo de residencia en la córnea, y la posibilidad de llegar a zonas más internas del ojo. Además, los componentes de los liposomas son totalmente compatibles con los tejidos oculares.

Los resultados tan favorables que se están obteniendo con las formulaciones liposomales van a permitir el desarrollo de nuevas terapias de administración oftálmicas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. María Torelló, Anna Viscasillas, Alfonso del Pozoa. Liposomas (I). Conceptos generales y relación con las estructuras cutáneas. revista Offarm Vol. 21. Núm. 9. Páginas 188-190, 2002
2. Herrero-Vanrell R, Vicario de la Torre M, Andrés-Guerrero V, Barbosa-Alfaro D, Molina-Martínez IT, Bravo-Osuna I. Nano and microtechnologies for ophthalmic administration, an overview. J Drug Del Sci Tech. 2013; 23(2): p. 75-102.
3. Irene T. Molina Martínez. Nano- y micro-sistemas farmacéuticos en la administración ocular de medicamentos. Pharmaceutical nano- and microsystems for ocular drug administration. Anales de la Real Academia de Doctores. Vol. 3, N° 3, 2018,394-412
5. Agarwal R, Iezhita I, Agarwal P, Abdul Nasir NA, Razali N, Alyautdin R, et al. Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update. Jour Drug Delivery. 2014; 943336: p. 1075-1091.
6. Fajardo Robles Dayanne; Vincent Hanson Jendry; PhD. Arguedas Chaverri Eduardo. Síntesis de Liposomas para la Encapsulación de Aloe vera como Principio Activo. Universidad de Iberoamérica. Facultad De Farmacia 2017 <https://unibe.ac.cr/revistafarmacia/1101-sintesis-de-liposomas-para-la-encapsulacion-de-aloe-vera-como-principio-activo/>
7. Andrés-Guerrero V, Herrero-Vanrell R. Absorción de fármacos por vía tópica. Papel de la conjuntiva. Ocular drug absorption by topical route. Role of conjunctiva. Arch Soc Esp Oftalmol vol.83 no.12 dic. 2008
8. Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. Nanoscale Res Lett 8, 102 (2013).
9. Clares Naveros B. Sistemas de transporte y liberación de fármacos de aplicación tópica: liposomas multilaminares portadores de acetono de triamcinolona. 2003. 230 p.
10. Shihui Yu, Qi-Ming Wang, Xin Wang, Dandan Liu, Wenji Zhang, TiantianYe, Xinggang Yang. Liposome incorporated ion sensitive in situ gels for ophthalmic delivery of timolol maleate. International Journal of Pharmaceutics Volume 480, 1–2, 2015, Pages 128-136.
11. Okoro Uchechi, John D. N. Ogbonna and Anthony A. Attama. Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery. 2014 Vedanti R.Salvi, Pravin Pawar Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier Journal of Drug Delivery Volume 51, 2019, Pages 255-267
12. Jorge Humberto Perez. Estudio comparativo de dos metodod sde produccion de liposomas para el encapsulamiento de proteina hidrolizada de leche como modelo de componente funcional de aplicacion cosmetica.
13. María Eugenia Ramírez Ortizh. Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos. [https://books.google.es/books?id=LBpOCwAAQBAJ&pg=PA229&dq=metodo+de+evaporacion+en+fase+reversa&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjD99beme\\_oAhVz8uAKHZNBQYQ6AEIKDAA#v=onepage&q=metodo%20de%20evaporacion%20en%20fase%20reversa&f=false](https://books.google.es/books?id=LBpOCwAAQBAJ&pg=PA229&dq=metodo+de+evaporacion+en+fase+reversa&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjD99beme_oAhVz8uAKHZNBQYQ6AEIKDAA#v=onepage&q=metodo%20de%20evaporacion%20en%20fase%20reversa&f=false)
14. Reshal Suri, Sarwar Beg, Kanchan Kohli Target strategies for drug delivery bypassing ocular barriers Journal of Drug Delivery Science and Technology Volume 55, February 2020, 101389
15. Rathapon Asasutjarit, Chittima Managit, Teva Phanaksri, WorapaparTreesuppharat, Asira Fuongfuchat. Formulation development and in vitro evaluation of transferrin-conjugated liposomes as a carrier of ganciclovir targeting the retina. International Journal of Pharmaceutics Volume 577, 15, 2020, 119084
16. Modulo de "Terminología Clínica y Patológica" y "Extracción de Diagnósticos" de primer curso de Grado Superior en Documentación y Administración Sanitaria. Anatomía y Fisiología del Ojo. 2019
17. Ebrahim, S.; Peyman, G.A.; Lee, P.J. Applications of liposomes in ophthalmology. Surv. Ophthalmol. 2005, 50(2): 167–182
18. Area oftalmología avanzada <https://areaoftalmologica.com/blog/operacion-de-cataratas/lentes-intraoculares-multifocales/>
19. Dale Meisner, Michael Mezei. Liposome ocular delivery systems. Advanced Drug Delivery Reviews Volume 16, Issue 1, 1995, Pages 75-93
20. Marta Vicario-de-la-Torre, María Caballo-González, Eva Vico, Laura Morales-Fernández, Pedro Arriola-Villalobos, Beatriz de las Heras, José Manuel Benítez-del-Castillo, Manuel Guzmán, Thomas Millar, Rocío Herrero-Vanrell, Irene T. Molina-Martínez. Nano-Liposome Formulation for Dry Eyes with Components Similar to the Preocular Tear Film. Polymers (Basel) 2018 Apr; 10(4): 425. Published online 2018 Apr 11. doi: 10.3390/polym10040425
21. OPTOM 2018. <https://www.geriaticarea.com/2018/05/14/el-sindrome-de-ojo-seco-es-la-enfermedad-ocular-mas-frecuente-en-edades-avanzadas/>

22. Sociedad española de oftalmología  
<https://www.oftalmoseo.com/>
23. <https://www.nei.nih.gov/learn-about-eye-health/eye-conditions-and-diseases/glaucoma>
24. Kaur, I.P.; Smitha, R.; Aggarwal, D.; Kapil, M. Acetazolamide: Future perspective in topical glaucoma therapeutics. *Int. J. Pharm.* 2002, 248, 1–14.
25. Aquoral Lipo prospecto - Web  
[www.estevefarma.com](http://www.estevefarma.com) > GetFichero PDF
26. Centers for disease control or prevention  
[https://www.cdc.gov/conjunctivitis/about/treatment.html?CDC\\_AA\\_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Ffeatures%2Fconjunctivitis%2Findex.html](https://www.cdc.gov/conjunctivitis/about/treatment.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Ffeatures%2Fconjunctivitis%2Findex.html)
27. American academy of ophthalmology: queratitis herpetica  
<https://www.aao.org/saludocular/enfermedades/queratitis-herpetica>
28. Jean-Sébastien Garrigue, Mourad Amrane, Marie-Odile Faure, Juha M. Holopainen, Louis Tong  
Relevance of Lipid-Based Products in the Management of Dry Eye Disease *J Ocul Pharmacol Ther.* 2017 Nov 1; 33(9): 647–661. Published online 2017 Nov 1. doi: 10.1089/jop.2017.0052
29. Sabri, K.; Levin, A.V. The Additive Effect of Topical Dorzolamide and Systemic Acetazolamide in Pediatric Glaucoma. *J. Am. Assoc. Pediatric Ophthalmol. Strabismus* 2006, 10, 464–468.
30. Miguel Gómez-Ballesteros, José Javier López-Cano, Irene Bravo-Osuna, Rocío Herrero-Vanrell, and Irene Teresa Molina-Martínez. Osmoprotectants in Hybrid Liposome/HPMC Systems as Potential Glaucoma Treatment. *Polymers* 2019, 11(6), 929  
<https://doi.org/10.3390/polym11060929>
31. S.L. Lawa, K.J. huanga, C.H. chiang. Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery: Corneal penetration and absorption. *Journal of Controlled Release.* Volume 63, 1–2, 3, 2000, Pages 135-140
32. Perrottet, N., Decosterd, L.A., Meylan, P. et al. Valganciclovir in Adult Solid Organ Transplant Recipients. *Clin Pharmacokinet* 48, 399–418 (2009).  
<https://doi.org/10.2165/00003088-200948060-00006>