

Desarrollo y comprobación de materiales de manufactura aditiva para simulador tridimensional oftalmológico para valoración biofarmacéutica

Development and Testing of Additive Manufacturing Materials for a Three-Dimensional Ophthalmological Simulator for BioPharmaceutical Assessment

Presentación: 08/10/2024

Doctorando:

Juan Ignacio SIPOWICZ

Unidad de investigación y desarrollo en tecnología farmacéutica (UNITEFA) – CONICET – Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba – Argentina
juanignaciosipo@gmail.com

Director:

Juan Pablo REAL

Codirectores:

Candelaria LEAL MARCHENA

Luis Ignacio TÁRTARA

Resumen

En este trabajo se presentará un resumen del plan de tesis doctoral que consiste en desarrollar materiales para un simulador oftalmológico tridimensional destinado a la evaluación biofarmacéutica. Este simulador se creará utilizando tecnología de impresión 3D y tiene como objetivo simular de manera precisa el entorno ocular humano para evaluar la eficacia de sistemas portadores de fármacos.

El uso de modelos biomiméticos generados a través de impresión 3D permite realizar pruebas in vitro de liberación y permeación de principios activos en condiciones fisiológicas similares a las del ojo humano. El proyecto también incluye la evaluación de diferentes tecnologías de manufactura aditiva y materiales poliméricos para garantizar que cumplan con los requisitos necesarios. El objetivo final es mejorar la efectividad y seguridad de los tratamientos oftalmológicos, reduciendo la dependencia de pruebas en animales y optimizando el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos para afecciones oculares.

Palabras clave: simulador, oftalmológico, evaluación biofarmacéutica, impresión 3D

Abstract

Develop materials for a three-dimensional ophthalmological simulator aimed at bio-pharmaceutical evaluation. This simulator will be created using 3D printing technology and aims to accurately simulate the human ocular environment to evaluate the effectiveness of drug delivery systems.

The use of biomimetic models generated through 3D printing allows for in vitro testing of drug release and permeation under physiological conditions similar to those of the human eye. The project also includes the evaluation of different additive manufacturing technologies and polymeric materials to ensure they meet the necessary requirements. The ultimate goal is to improve the effectiveness and safety of ophthalmological treatments, reducing reliance on animal testing and optimizing the development of new pharmaceutical products for ocular conditions.

Keywords: ophthalmological, simulator, bio-pharmaceutical evaluation, 3D printing.

Introducción

La administración tópica de fármacos para tratar afecciones oftalmológicas enfrenta desafíos debido a la eficiencia protectora de los ojos y la limitada penetración de fármacos a través de la córnea. Además, la pérdida rápida de formulación por el drenaje lagrimal y la necesidad de pruebas en animales añaden complejidad y costos al desarrollo de nuevos tratamientos.

En este contexto, la tecnología de impresión 3D emerge como una herramienta potente y versátil para la creación de modelos biomiméticos que simulan el entorno ocular y permiten evaluar la performance de sistemas portadores de fármacos (SPF) de manera precisa y controlada.

La posibilidad de diseñar estructuras tridimensionales personalizadas y la variedad de materiales poliméricos disponibles, abren un abanico de oportunidades para el desarrollo de dispositivos y modelos analíticos avanzados. Es por esto que la elección adecuada de tecnologías de manufactura aditiva y materiales es esencial para garantizar la funcionalidad y confiabilidad del simulador oftalmológico. Por ello, la investigación y evaluación de distintas tecnologías 3D, como estereolitografía (SLA), deposición de material fundido (FDM) y/o sinterización selectiva por láser (SLS), se convierte en un paso crucial para determinar la más adecuada para la reproducción de las características anatómicas y funcionales del ojo humano. De igual modo, el análisis de las propiedades de cada material polimérico, como su resistencia mecánica y estabilidad química, permitirá seleccionar aquellos que cumplan con los requisitos biomiméticos necesarios para realizar pruebas analíticas in vitro de SPF con mayor eficacia y precisión.

El siguiente trabajo tiene como objetivo crear un modelo ocular que simula el mecanismo de parpadeo y el flujo interno, permitiendo así evaluar in vitro la liberación y permeación de principios activos desde sistemas portadores de fármacos, explorando la capacidad de los materiales de impresión 3D para simular con precisión los comportamientos de los tejidos del ojo, garantizando una representación fidedigna de las condiciones fisiológicas.

Desarrollo

Este trabajo busca evaluar diferentes tecnologías de manufactura aditiva y las diferentes características de materiales poliméricos para comprobar que cumplan con los requisitos necesarios para su uso en las pruebas biofarmacéuticas. Esto contribuirá a mejorar la efectividad y seguridad de los tratamientos oftalmológicos, reduciendo la dependencia de pruebas en animales y optimizando el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos para afecciones oculares.

Para lograr esto, se realizarán pruebas y análisis exhaustivos de diversas tecnologías de impresión 3D, como SLA, FDM y SLS, entre otras. Cada tecnología será evaluada en términos de su capacidad para reproducir con

precisión las características anatómicas del ojo y para crear estructuras que permitan el mecanismo de parpadeo y el flujo interno requerido. Para esto se investigarán y probarán diferentes materiales poliméricos, como polimetilmetacrilato (PMMA), polietilenglicol (PEG), polietilenglicol diacrilato (PEGDA), poliésteres biodegradables y otros materiales compatibles con la biología ocular. El principal desafío contra el desarrollo de una estructura corneal simulada, que permita realizar evaluación de permeación transcorneal de forma in vitro.

Estos materiales deben cumplir con requisitos biomiméticos específicos que garanticen la reproducción de las condiciones fisiológicas pero a su vez posean resistencia mecánica, estabilidad química, y fidelidad para la realización de pruebas analíticas in vitro con SPF.

Para lograr este objetivo, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Diseñar y desarrollar una estructura corneal simulada mediante la generación de estructuras cóncavas cribantes o absorbentes, que permitan simular la permeación transcorneal de forma independiente o mediante la combinación con membranas sintéticas, películas lipídicas o córneas animales. Evaluar las propiedades mecánicas y químicas de los polímeros para la validación del prototipo.
- Diseñar y desarrollar un modelo ocular tridimensional que aloje a la estructura corneal simulada, y que reproduzca las características anatómicas y funcionales del ojo humano. Esto incluye la implementación de un mecanismo de parpadeo conectado a bombas de jeringa microfluídica, que simule el lagrimeo y la circulación del humor acuoso. Evaluar las propiedades mecánicas y químicas de los polímeros para la validación del prototipo.
- Analizar la liberación in vitro del SPF cargado con principios activos en el nuevo modelo de ojo tridimensional mecánico. Se comparará la liberación observada en este modelo con la liberación en un vial de volumen fijo, utilizado tradicionalmente en pruebas de liberación.
- Realizar ensayos ex vivo de liberación y permeación de fármacos utilizando el nuevo modelo tridimensional mecánico de ojo y celdas bicompartimentales. Esto permitirá evaluar cómo los SPF interactúan y se comportan en un entorno que simula de manera más precisa las condiciones oculares.

Actividades y metodologías

Sistemas Portadores de Fármacos

Para analizar y caracterizar el modelo de ojo que será diseñado en el marco de este proyecto, se hará uso de los Films poliméricos (con y sin ciclodextrinas) desarrollados y caracterizados en nuestro grupo con anterioridad (Calles et al., 2018). La Acetazolamida y la Triamcinolona serán los fármacos modelos a utilizar. Mediante el uso del modelo será posible evaluar en qué medida los SPF mejoran la concentración del fármaco en el film lagrimal y en qué medida los diferentes SPF aumenten la permeabilidad del principio activo (enhancers).

Diseño y Desarrollo del Modelo Ocular

El simulador tridimensional mecánico de ojo, compuesto por la estructura corneal simulada y el modelo de globo ocular de soporte, será diseñado y obtenido utilizando software de modelado 3D, programa de diseño asistido por computadora (CAD), imágenes computarizadas de ojos idealizados, equipos de mecanizado mediante control numérico por ordenador (CNC), impresoras 3D FDM, SLA, DLP y SLS, como así también, la Bioimpresora 3Donor.

El diseño del globo ocular de soporte, inspirado en trabajos descriptos por otros otros autores (Repetto et al., 2015), estará compuesto de dos mitades, una anterior para formar la parte frontal del ojo y otra segunda que represente la posterior, montadas en una cámara de soporte que permitirá añadir un párpado artificial (impresos en 3D) accionado con motores paso a paso, un sistema de bombas de jeringas para emular la secreción del flujo lagrimal y un sistema circulación de fluido entre las cámaras, que permita tomar muestras a diferentes tiempos. Para efectuar los ensayos de permeación de fármacos, el globo ocular deberá permitir la incorporación en su estructura de córneas aisladas, membrana semipermeable sintéticas comerciales o bien las estructuras corneales simuladas creadas en este proyecto.

En la ejecución del desarrollo se evaluarán diferentes materiales poliméricos, como el polietileno tereftalato glicol (PETG), el ácido poliláctico (PLA), el acrilonitrilo butadieno estireno (ABS), el polietilenglicol diacrilato (PEGDA), el PVA, TPU flexible y la resina acetal, así como polietilenglicol de diferentes pesos moleculares. Cada material será sometido a pruebas rigurosas para evaluar sus propiedades físicas, químicas y mecánicas. La evaluación de los materiales se centrará en su resistencia mecánica, estabilidad química y capacidad de replicar las características anatómicas del ojo. Se buscará utilizar materiales que sean seguros, que mantengan su integridad estructural bajo condiciones de estrés y que permitan la reproducción precisa de las distintas partes del ojo en el simulador.

Además, se considerarán propiedades específicas de los materiales en relación con la absorción, adsorción y permeación de los principios activos de los SPF. Se evaluará la capacidad de los materiales para proporcionar una barrera adecuada, controlar la liberación del fármaco y mantener la estabilidad de los SPF a lo largo del proceso de evaluación.

La evaluación de los materiales no se limitará únicamente a sus propiedades individuales, sino que también se tendrá en cuenta la interacción entre los materiales y los componentes mecánicos del simulador, como los motores, las bombas y los sistemas de flujo interno. Se buscará garantizar la compatibilidad y el rendimiento óptimo de los materiales en el contexto del diseño del simulador oftalmológico.

Ensayos Mecánicos

Se llevarán a cabo una serie de ensayos mecánicos para evaluar las propiedades de los materiales utilizados en la impresión 3D. Entre los ensayos a realizar se incluyen:

- **Ensayo de tracción:** Se realizará mediante una máquina de ensayos universal que aplicará fuerzas de tracción gradualmente al material en forma de probetas estandarizadas. La deformación resultante será registrada y utilizada para calcular la resistencia a la tracción, la tensión máxima y la elongación en el punto de ruptura.
- **Ensayo de compresión:** Se llevará a cabo utilizando una máquina de ensayos universal que aplicará fuerzas de compresión gradualmente sobre el material en forma de muestras cilíndricas o cuboides. Se medirá la resistencia a la compresión, la rigidez y la capacidad de recuperación después de la compresión.
- **Ensayo de flexión:** Se realizará mediante una máquina de ensayos universal que aplicará fuerzas de flexión sobre probetas con forma de viga o lámina. Se registran las deflexiones bajo carga y se calcula la resistencia a la flexión, el módulo de flexión y otros parámetros relevantes.
- **Ensayo de dureza:** Se medirá la dureza del material utilizando métodos como el ensayo de dureza Shore o el ensayo de dureza Brinell. Estos métodos implican la aplicación controlada de una fuerza sobre la superficie del material y la medición de la penetración o indentación resultante.
- **Ensayo de impacto:** Se realizará mediante una máquina de impacto que aplicará fuerzas de impacto controladas sobre el material en forma de muestras especiales. Se medirá la energía absorbida por el material antes de la fractura.

Ensayos químicos

En el marco de este proyecto, también se realizarán ensayos químicos para evaluar la compatibilidad y estabilidad de los materiales utilizados en la impresión 3D:

- **Ensayo de compatibilidad con fármacos:** Se sumergirán las muestras de material en soluciones que contengan principios activos oftalmológicos para evaluar si hay interacciones químicas o deterioro del material debido a la exposición a los fármacos. Se analizará si el material libera o absorbe los principios activos y cómo afecta esto a su estructura y propiedades mecánicas.
- **Ensayo de degradación química:** Se someterán las muestras de material a condiciones extremas de temperatura, humedad o pH para simular posibles condiciones ambientales a las que puedan estar expuestos. Se evaluará si el material sufre cambios significativos en su estructura química y propiedades mecánicas debido a la degradación química.

- Ensayo de estabilidad a la luz: Se expondrán las muestras de material a luz ultravioleta para evaluar su resistencia a la fotodegradación. Se analizará si la exposición a la luz afecta la estabilidad química del material y si se producen cambios en su estructura.
- Ensayo de solubilidad: Se sumergirán las muestras de material en diferentes disolventes para evaluar su solubilidad y resistencia a la disolución. Esto es relevante para asegurar que el material no se disuelva o degrade cuando está en contacto con ciertos fluidos o soluciones.
- Ensayo de toxicidad: Se evaluará la toxicidad potencial de los materiales mediante pruebas en cultivos celulares u organismos modelo. Esto es fundamental para garantizar que los materiales utilizados en el simulador oftalmológico sean seguros y no presenten efectos nocivos en la salud ocular.

Ensayos de liberación in vitro:

Los diferentes SPF serán cargados en la superficie del simulador tridimensional mecánico de ojo, el cual recibirá un bombeo de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una velocidad de 200 $\mu\text{L}/\text{h}$. que será depositado en la parte superior de este dispositivo para luego fluir por gravedad a través de la membrana sintética montada emulando el tejido corneal o córnea aislada de conejo. Finalmente, el mismo puede ser recogido en un pocillo de recolección. A intervalos de tiempo específicos (ejemplo $t = 0, 5, 15$ y 30 minutos, y $1, 2, 4, 6$ y 8 horas), se extraerán 200 μL de esta solución para su posterior cuantificación. Paralelamente, los SPF serán sumergidos en viales de volumen fijo conteniendo 4,8 ml de solución de PBS, a pH 7,4. A intervalos de tiempo específicos (mismos tiempos que en el simulador de ojo), se extraerán 200 μL de esta solución para su posterior cuantificación. La liberación de fármaco a cada tiempo, será determinada mediante técnicas analíticas de cromatografía de alta eficacia (HPLC) o mediante espectroscopia UV-Vis.

Ensayos de liberación/permeación ex vivo:

Para este ensayo, se utilizarán córneas aisladas de conejos las cuales serán montadas en el simulador mecánico y en celdas bicompartimentales (celda de difusión de Franz). Las celdas de difusión de Franz se han usado con frecuencia en la determinación de la cinética de absorción percutánea de numerosos fármacos. Como se mencionó anteriormente, en nuestro grupo se ha diseñado una celda adaptada para córnea que se ha puesto a punto en instancias previas. En este punto, se pretende mediante el aislamiento de córnea como membrana biológica determinar los parámetros de permeación específicos (flujo y coeficiente de permeación) para cada sistema bajo estudio y en cada modelo en particular y poder realizar una comparación con las diferentes estructuras corneales simuladas obtenidas.

Conclusiones

En conclusión, el proyecto de desarrollo de un simulador oftalmológico tridimensional mediante impresión 3D no solo marca un avance importante en la evaluación biofarmacéutica, sino que también abre nuevas posibilidades para la investigación y desarrollo de tratamientos oftalmológicos. Al reproducir de manera precisa las condiciones fisiológicas del ojo humano, este simulador permitirá una evaluación más efectiva y segura de los sistemas portadores de fármacos, disminuyendo la necesidad de pruebas en animales. Este enfoque innovador promete optimizar el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos, mejorando la efectividad de los tratamientos y beneficiando a pacientes con afecciones oculares.

Referencias

1. Awde, H. G., Formica, M. L., Paredes, A. J., Tartara, L. I., & Palma, S. D. (2021, November). Development of Triamcinolone acetone nanocrystals for ocular administration. In Annual Meeting of Bioscience Societies 2021. Conference Proceeding. Mención Premio Carlos Taira-AAFE 2021.
2. Barberis, E., Palma, S., Gonzo, E., Bermudez, J., Lorier, M., Ibarra, M., & Real, J. P. (2022). Mathematical and Pharmacokinetic Approaches for the Design of New 3D Printing Inks Using Ricobendazole. *Pharmaceutical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03320-z>
3. Calles, J., et al. (2013). *International Journal of Pharmaceutics*, 455, 48–56.

4. Calles, J. A., Mora, M. J., Onnainty, R., Tartara, L. I., Granero, G. E., Longhi, M. R., Diebold, Y., Vallés, E. M., & Palma, S. D. (2018). Cross-linked Hyaluronan Films Loaded with Acetazolamide–Cyclodextrin–Triethanolamine Complexes Intended for Glaucoma Treatment. *Therapeutic Delivery*, 9(3), 205–220.
5. Falcone, G., Real, J. P., Palma, S. D., Aquino, R. P., Del Gaudio, P., Garofalo, E., & Russo, P. (2022). Floating Ricobendazole Delivery Systems: A 3D Printing Method by Co-Extrusion of Sodium Alginate and Calcium Chloride. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1280. <https://doi.org/10.3390/ijms23031280>
6. Formica, M. L., Ullio Gamboa, G. V., Tartara, L. I., Luna, J. D., Benoit, J. P., & Palma, S. D. (2020). Triamcinolone acetonide-loaded lipid nanocapsules for ophthalmic applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 573, 118795. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118795>
7. Gallo, L., Peña, J. F., Palma, S. D., Real, J. P., & Cotabarren, I. (2021, November). Design of 3D printed veterinary capsule devices for supplement administration. In International Meeting of Pharmaceutical Sciences (RICiFa 2021), Córdoba, 10, 11, and 12 November 2021.
8. López Vidal, L., Real, J. P., Real, D., et al. (2022). Nanocrystal-based 3D-printed tablets: Semi-solid extrusion using melting solidification printing process (MESO-PP) for oral administration of poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 611, 121311.
9. Palma, S. D., Tartara, L. I., Quinteros, D., et al. (2009). An efficient ternary complex of acetazolamide with HP- β -CD and TEA for topical ocular administration. *Journal of Controlled Release*, 138(1), 24-31.
10. Real, D., Real, J. P., Palma, S. D., & Kogan, M. (2021). Rational Design of 3D printed gastroretentive systems for nanocarriers administration with potential applications in gastric cancer. In Controlled Release Society 2021 Virtual Annual Meeting (Poster).
11. Real, J. P., Barberis, M. E., & Palma, S. D. (2020). Proceso de impresión 3D de medicamentos a baja temperatura, presión y sin uso de solventes-(MESO-PP). Solicitud INPI - ACTA 20200101256 – 04/05/2020.
12. Real, J. P., Barberis, M. E., Camacho, N. M., Sánchez Bruni, S., & Palma, S. D. (2020). Design of novel oral ricobendazole formulation applying melting solidification printing process (MESO-PP): An innovative solvent-free alternative method for 3D printing using a simplified concept and low temperature. *International Journal of Pharmaceutics*, 587, 119653.
13. Repetto, R., Pralits, J. O., Siggers, J. H., & Soleri, P. (2015). Phakic iris-fixated intraocular lens placement in the anterior chamber: effects on aqueous flow phakic iris-fixated intraocular lens placement. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56(5), 3061–3068. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-16118>
14. Tártara, L., et al. (2014). *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 8(3), 224-232.