



FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID



ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ALFONSO VELASCO MARTIN, Doctor en Medicina Y Cirugía, Catedrático del Area de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid y FRANCISCO J. MARTIN GIL, Doctor en Ciencias y Profesor Asociado de la E.T.S. de Ingenieros Industriales de la Universidad de Valladolid,

CERTIFICAN QUE:

Doña ANA ISABEL DE ANDRÉS SANTOS ha realizado bajo nuestra tutela y dirección el trabajo titulado: "COMPORTAMIENTO TÉRMICO DE BIOMATERIALES EN OFTALMOLOGIA". La calidad y novedad de los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas y sus prometedoras posibilidades en Oftalmología y Farmacología, hacen que consideremos la presente Tesis con méritos suficientes para que su autora pueda aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que así conste, firmamos el presente Certificado en Valladolid, a veintidós de marzo de mil novecientos noventa y cinco.

Fdo.: Alfonso Velasco Martín



Fdo.: F. J. Martín Gil



TESIS DOCTORAL

**COMPORTAMIENTO TÉRMICO DE
BIOMATERIALES EN OFTALMOLOGIA**

Doctoranda: Ana Isabel de Andrés Santos

Directores: Alfonso Velasco Martín y Francisco Javier Martín Gil

Departamento de Biología Celular y Farmacología

Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid. 1995.

Agradecimientos:

Al Prof. Alfonso Velasco Martín, por aceptar la Tutoría de la presente Tesis y dirigir su realización.

Al Dr. Francisco Javier Martín Gil, co-director del trabajo, por su constante asesoramiento en análisis térmico y química de biomateriales.

Al Dr. Emilio Hernández Velasco, promotor de las investigaciones, por su apoyo, orientaciones y consejos.

Al Dr. Francisco Javier Cortejoso Hernández, por su ayuda en la confección técnica del manuscrito.

A mis compañeros del Servicio de Oftalmología del Hospital "Del Río Hortega", por los ánimos recibidos.

Al Laboratorio de Química Inorgánica y Análisis de la E.T.S. de Ingenieros Industriales de Valladolid (Prof. Jesús Martín), por las facilidades dadas para la utilización de sus equipos instrumentales.

Al Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de Valladolid, que ha proporcionado la infraestructura material para la realización del trabajo.

**COMPORTAMIENTO TÉRMICO DE
BIOMATERIALES EN OFTALMOLOGIA**

I N D I C E

I. INTRODUCCION.	1
IA. HIPOTESIS DE TRABAJO, OBJETIVOS E INTERÉS DE LA INVESTIGACION REALIZADA.	2
IB. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS MATERIALES Y LA METODOLOGIA UTILIZADOS.	3
IB1. HETEROGENEIDAD ESTRUCTURAL DEL COLA- GENO EN LOS COMPONENTES DEL OJO. VISCO- ELASTICOS Y HUMORES OCULARES:	3
ORGANIZACION DE LA CORNEA	11
ESTRUCTURA DE LA ESCLERA	13
COMPOSICION DEL CRISTALINO	15
HUMOR VITREO	16
HUMOR ACUOSO	17
LAGRIMAS	17
IB2. DÉBITO DE HUMOR ACUOSO Y FACTORES FARMACOLOGICOS EN LA TENSION OCULAR.	18
IB3. REQUISITOS DE BIOCMPATIBILIDAD PARA BIOMATERIALES Y PREPARADOS FARMACÉUTICOS EN OFTALMOLOGIA.	19
IB4. EL MÉTODO TÉRMICO. LA CALORIMETRIA DE BARRIDO DIFERENCIAL EN SU APLICACION AL ESTUDIO DE MATERIALES HETEROGÉNEOS.	20
II. MATERIAL Y MÉTODOS.	22
IIA. COMPONENTES FISIOLÓGICOS Y QUÍMICO-ESTRUCTURALES DEL OJO.	23

IIB. BIOMATERIALES Y PREPARACIONES FARMACÉUTICAS EN OFTALMOLOGIA.	25
IIB1. VISCOELASTICOS	25
IIB2. ACEITES DE SILICONA	26
IIB3. LENTES DE CONTACTO Y PRODUCTOS PARA SU CUIDADO	27
IIB4. MIDRIATICOS, ANTIINFLAMATORIOS Y ANTIHIPERTENSIVOS	28
IIB5. ANTIBIOTICOS	30
IIC. METODOLOGIA Y CONDICIONES DE REGISTRO.	31
IIC1. METODOLOGIA	31
IIC2. CONDICIONES OPERATIVAS	40
III. RESULTADOS.	41
IIIA. RESULTADOS DE LOS REGISTROS DSC DE COMPONENTES FISIOLÓGICOS DEL OJO Y PREPARADOS FARMACOLÓGICOS	42
IIIA1. RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL EFECTO ENDOTÉRMICO PRINCIPAL	78
IIIA2. RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL EFECTO EXOTÉRMICO A MUY BAJAS TEMPERATURAS	95
IIIB. RESULTADOS DE LOS REGISTROS DSC DE COMPONENTES QUÍMICO-ESTRUCTURALES DEL OJO	97
IIIB1. RESULTADOS PARA COMPONENTES AISLADOS	97
IIIB2. RESULTADOS PARA MEZCLAS BINARIAS DE COMPONENTES QUÍMICO ESTRUCTURALES DEL OJO	100
IV. DISCUSION DE RESULTADOS.	102

IVA. INTERPRETACION DE LOS EFECTOS TÉRMICOS A BAJAS TEMPERATURAS UTILIZADOS EN ESTUDIOS DE CORRESPONDENCIA ENTRE MATERIALES NATURALES Y ARTIFICIALES DE APLICACION EN OFTALMOLOGIA.	103
IVA1. DISCUSION DE RESULTADOS PARA COMPONENTES OCULARES FISIOLÓGICOS	104
IVA2. DISCUSION DE RESULTADOS PARA BIOMATERIALES OFTÁLMICOS.	107
V. CONCLUSIONES.	113
VI. BIBLIOGRAFIA.	117

I. INTRODUCCION.

IA. HIPOTESIS DE TRABAJO, OBJETIVOS E INTERÉS DE LA INVESTIGACION REALIZADA.

La presente Memoria tiene por objeto aportar evidencia experimental a favor de la hipótesis de la utilidad del análisis térmico en Farmacología Oftalmológica, toda vez que la aplicación de la tecnología calorimétrica de barrido diferencial (DSC) a otras áreas de la Farmacología (Remington, 1985; Ford, 1995) ha resultado valiosa.

El objetivo principal del proyecto se concreta en la caracterización de los efectos térmicos comunes a preparaciones farmacológicas específicas y a componentes del ojo humano, con objeto de que puedan servir como criterio de biocompatibilidad. Es decir, se trata de establecer, para cada grupo de preparaciones farmacológicas o de biomateriales con una aplicación común en Oftalmología, la existencia de un marcador de adecuación, idoneidad o correspondencia con el comportamiento natural del ojo, a cuyo tratamiento o ayuda va dirigido.

Un objetivo secundario vinculado al anterior es el conocimiento, al menos parcial, de los mecanismos involucrados en las variaciones de los efectos térmicos seleccionados como marcadores. Para la consecución de este objetivo se analizan tanto los factores químico-físicos que determinan las diferencias de composición y grado de conservación de las preparaciones farmacológicas (presencia de unos u otros principios activos, incorporación de aditivos, ciclos de congelación-descongelación en el curso del almacenamiento y transporte, etc.), como los factores naturales (envejecimiento) que afectan tanto a los componentes del ojo humano como a los fármacos.

El interés de las investigaciones realizadas radica, por una parte, en la disponibilidad de un nuevo criterio farmacológico para discriminar entre preparaciones de un mismo grupo o especialidad de diferente origen, y por otra, en el hallazgo de un nuevo marcador de envejecimiento de biomateriales.

Adicionalmente, las investigaciones llevadas a cabo han servido para integrar experiencias interdisciplinarias (procedentes de la práctica hospitalaria, del contacto con casas comerciales de la industria farmacéutica, y del trabajo en laboratorios de análisis de materiales y farmacología) cara al desarrollo futuro, en un Instituto de I+D de nuestro medio geográfico, de nuevos productos en Oftalmología con alto valor añadido.

IB. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS MATERIALES Y LA METODOLOGIA UTILIZADOS.

IB1. HETEROGENEIDAD ESTRUCTURAL DEL COLAGENO EN LOS COMPONENTES DEL OJO. VISCOELASTICOS Y HUMORES OCULARES.

El colágeno es la proteína corporal más abundante. Las fibras de colágeno están asociadas con los glicosaminoglicanos, o mucopolisacáridos ácidos (Tabla I), que son los polímeros que constituyen la matriz en la que aquéllas se encuentran embutidas. La proporción relativa de colágeno a matriz y la naturaleza exacta de esta composición confieren cualidades características a los tejidos. El colágeno interacciona con los glicosaminoglicanos durante la formación de la fibra (influyendo sobre el eventual número de fibras y espesor) y, probablemente, con la fibra madura (estabilizándola). Obrinck mostró, ya en 1973, que mientras el condroitín sulfato, el dermatán sulfato y los proteínoglicanos aceleran la formación de la fibra, el queratán sulfato puede tener un efecto desacelerante.

El colágeno aparece sintetizado como moléculas sencillas formadas por tres cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales contiene algo más de 1000 aminoácidos. Estos polipéptidos (ó cadenas α) se disponen uno sobre otro en una configuración helicoidal para formar la molécula triple helicoidal de 3000 Å de longitud y 15 Å de diámetro que se muestra en la Fig. 1. La estructura se encuentra estabilizada por enlaces de hidrógeno

Tabla I. Mucopolisacáridos encontrados en el tejido conectivo de los componentes naturales del ojo.

Acido hialurónico/hialuronato
Condroitina
Condroitín-4-sulfato
Condroitín-6-sulfato
Dermatán sulfato
Heparán sulfato
Heparina
Queratán sulfato I
Queratán sulfato II

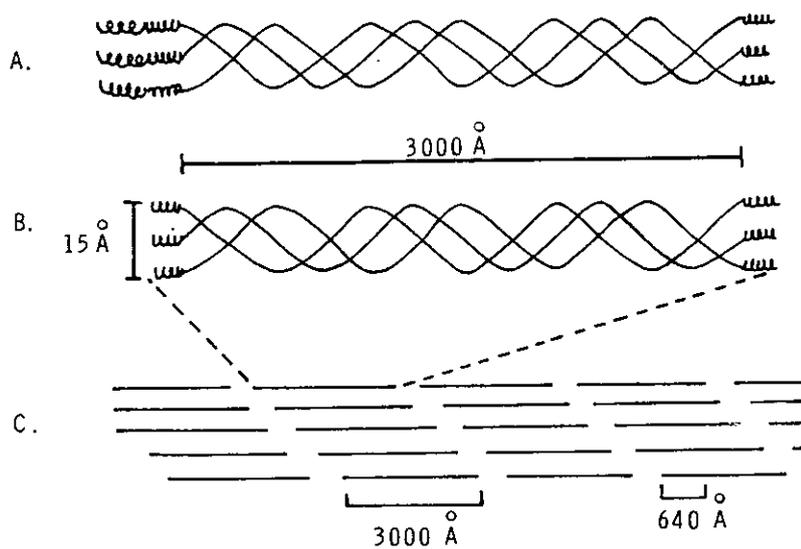


Fig. 1.- Estructura del colágeno. Organización del colágeno en fibrillas. (A) representa el procolágeno con un "péptido de registro" amino-terminal que puede facilitar la formación de la triple hélice dentro de la célula, una vez que cada cadena α ha sido sintetizada. (B) representa el monómero de colágeno después de que el "péptido de registro" ha sido eliminado por colágeno peptidasa. (C) El diagrama en escalones permite observar la aparición de bandas de periodicidad de 640 Å que se hace visible cuando las fibrillas son teñidas y vistas al microscopio electrónico.

intramoleculares. Durante los años 1969 a 1974 se identificaron varios tipos genéticamente diferentes de colágeno: en el ojo, Trelstad y Kang (1974) han encontrado colágeno tipo I en la córnea y en la porción fibrosa de la esclera; tipo II también en esclera, y tipo IV en el cristalino y en el vítreo.

Aunque el colágeno es el principal componente estructural de los tejidos oculares, en ellos se encuentra íntimamente combinado con polisacáridos que actúan como matriz (Fig. 2). Las propiedades de estos polisacáridos son de importancia básica en la comprensión tanto de la economía del metabolismo ocular como de la cohesión de los tejidos.

El más simple es el *ácido hialurónico* (HA), aislado en 1934 por Karl Meyer. El hialuronato sódico se encuentra en forma prácticamente pura en la matriz extracelular de tejidos conectivos de animales y humanos. Está presente principalmente en el humor vítreo y humor acuoso del ojo, pero también en el líquido sinovial, en la piel y en la gelatina de Wharton, principal componente del cordón umbilical. Su papel es, en general, más lubricante que estructural. El HA es un heteropolímero formado alternativamente por N-acetilglucosamina y ácido D-glucurónico. Estructuralmente, la molécula es un polímero a base de disacáridos enlazados β -(1-4) con la unidad intersacáridica enlazada β -(1-3) (Fig. 3). Tiene un peso molecular relativamente alto (probablemente superior de 12×10^6) y parece comportarse en solución como un filamento enrollado aleatoriamente. Se cree que 1 gramo de polímero ocupa en solución un volumen de 12 litros. Por otra parte, el HA posee una viscosidad anómala; ésta se altera según la velocidad de corte al que sea sometido (Fig. 4). El HA ofrece una viscosidad sumamente alta a muy baja velocidad de corte, puesto que las cadenas poliméricas permanecen enmarañadas de modo irreductible. A altas velocidades de corte, la viscosidad colapsa y el polímero se alinea con las líneas de flujo. Es conocido que, aparte de la estructura "quitinosa" determinada por los residuos N-acetilglucosamina enlazados β -(1-4), la inserción de los residuos enlazados

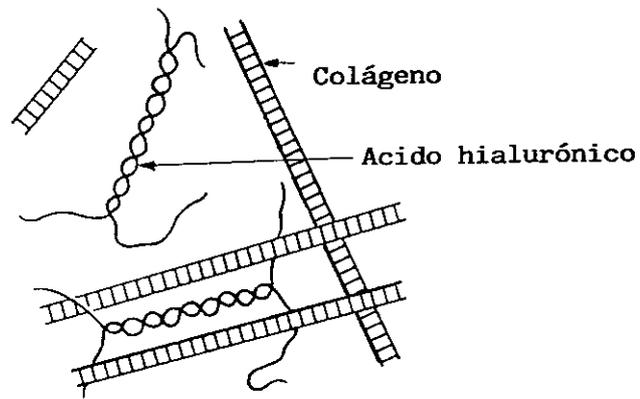


Fig. 2.- Los tejidos oculares como materiales compuestos de colágeno y polisacáridos (Esquema de la trama vítrea, según Roughley, 1975).

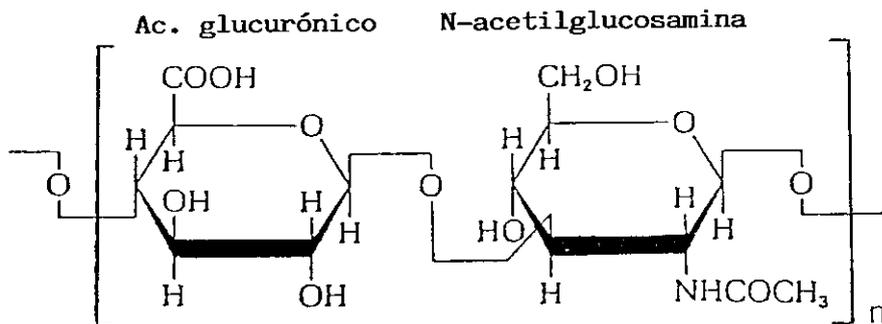


Fig. 3.- Estructura del ácido hialurónico.

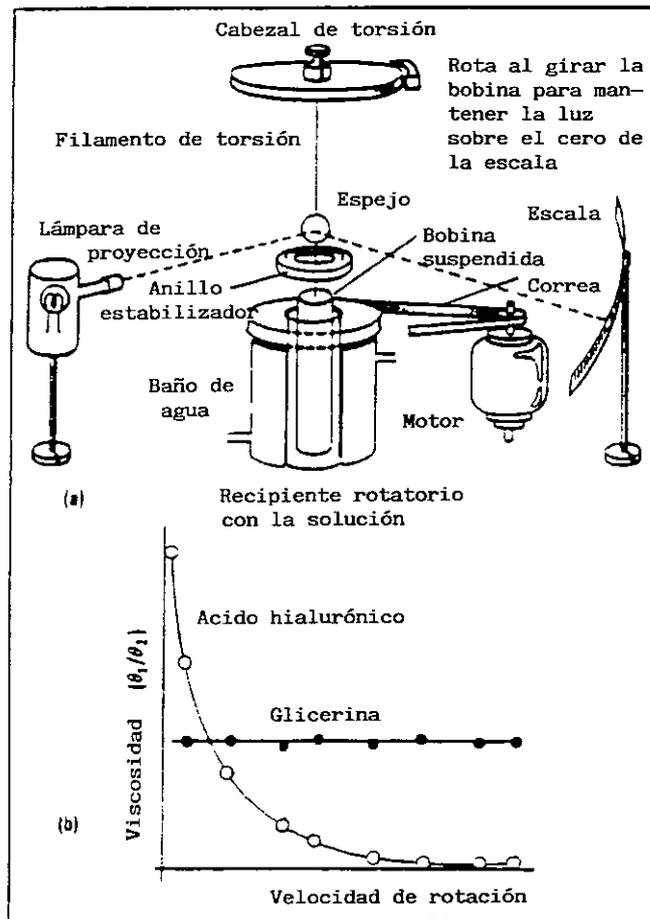


Fig. 4.- (a) Viscosímetro de Couette. La viscosidad se determina simplemente midiendo los ángulos de rotación obtenidos con la disolución objeto de estudio (θ_1) y el registrado con el disolvente solo (θ_2). (b) Variación de la viscosidad con la velocidad de rotación para glicerina y ácido hialurónico.

β -(1-3) conduce a que la molécula de HA posea un marcado comportamiento polielectrolítico, en virtud de los grupos incorporados cargados al polímero. Esto significa que puede formar enlaces con cationes, comportándose en el medio extracelular como una resina de cambio iónico. Este carácter polielectrolítico, unido a su alta capacidad de ocupación en solución y a su enorme longitud molecular, contribuyen a la función de este lubricante tan especial.

Condroitín sulfatos. Una clase de polímeros que combina todas las modificaciones posibles sobre una estructura de glucano β -enlazado son los sulfatos de condroitina cuyas cadenas polisacarídicas tienen residuos N-acetilglucosamina sulfatados alternando con mitades de ácido urónico y que están covalentemente enlazados a un núcleo proteínico como las patas de un centípedo a su cuerpo (Fig. 5). La función de los condroitín sulfatos combinados a colágeno (presentes en la piel, cartílago y vasos sanguíneos, aparte de en los tejidos oculares) es un misterio (Phelps, 1972).

Dermatán sulfato y Queratán sulfato. Son geles polisacarídicos de fórmula general $[-A \rightarrow B \rightarrow A \rightarrow B-]_n$, como el HA o los condroitín sulfatos, pero ahora A es ácido α -L-idurónico y B es β -D-N-acetilgalactosamina-4-sulfato, en el dermatán sulfato; y A es β -D-N-acetilglucosamina-6-sulfato y B es β -D-galactosa, en el queratán sulfato.

Desde el punto de vista de los tipos de enlace presentes en estos polisacáridos, tanto el HA, como la condroitina o los condroitín sulfatos, presentan enlaces β -(1-3) y β -(1-4), mientras el dermatán sulfato tiene enlaces α -(1-3) y β -(1-4). Puesto que el anticoagulante sanguíneo heparina (ácido 2-glucurónico 2-sulfato; D-galactosamina-N; C-6-disulfato) presenta enlaces α -(1-4) y α -(1-4), el enlace en el dermatán sulfato puede considerarse de tipo intermedio. El orden de fuerza para los distintos tipos de unión, tan importante para explicar la estabilidad térmica de estos materiales, ha sido establecido (Ramos-Sánchez, 1990) como: β -(1-3) > α -(1-3) > α -(1-4) > β -(1-4).

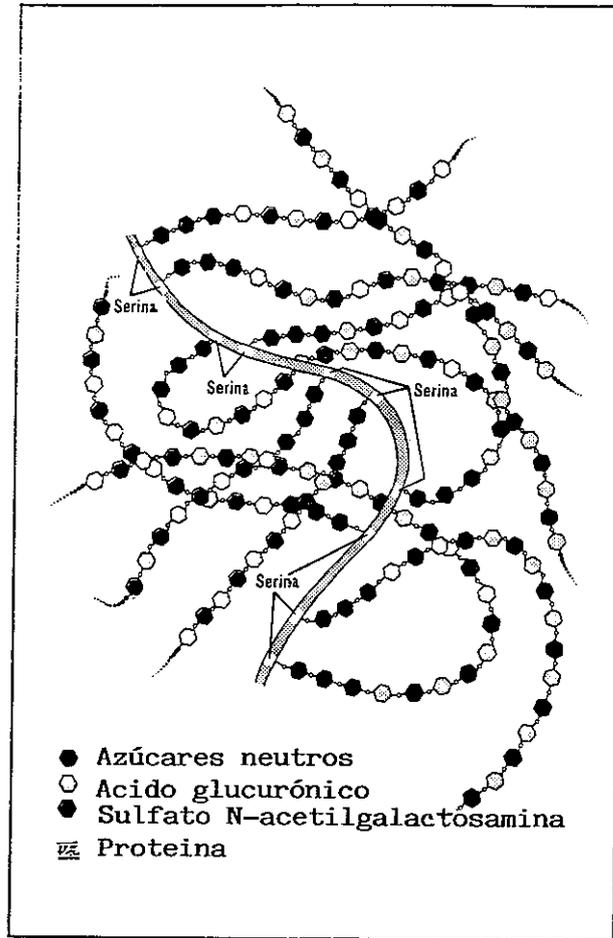


Fig. 5.- Estructura del condroitín sulfato (Phelps, 1972).

ORGANIZACION DE LA CORNEA.

La organización del colágeno en la córnea es particularmente interesante porque sólo en este tejido el colágeno tipo I es transparente. Esta propiedad depende de la disposición regular en capas de hojas paralelas de las fibras de colágeno, con la particularidad de que cada capa se encuentra girada un ángulo de 90° con respecto a la inferior (Fig. 6).

En las primeras etapas del desarrollo embrionario, las fibras de colágeno de córnea y esclera son iguales en diámetro y ambas estructuras son igualmente traslúcidas. Posteriormente, los diámetros de las fibras esclerales aumentan de tamaño, contribuyendo a la opacidad de la esclera, si bien ésto es parcialmente una función del alto contenido en agua de la esclera.

Aparte de su disposición regular en haces, las fibrillas corneales se encuentran embebidas en una sustancia cementante delgada, como es el queratán sulfato I, que es de índice de refracción similar al de las fibrillas de colágeno, lo que contribuye, adicionalmente, a la transparencia de la córnea. Entre estas sustancias, el queratoglicosaminoglicano, de gran afinidad por el agua, se encuentra en la proporción adecuada (65%) para asegurar la deturgencia e impedir una imbibición de agua no deseada. Ha sido sugerido que el mecanismo protector frente a la imbibición puede ser el siguiente: los queratán sulfatos superhidratados darían lugar a la creación de lagunas desprovistas de fibrillas que inducirían una presión estromal de hinchamiento, igual y de signo contrario a la presión de imbibición.

En caso de patología corneal (distrofias, quemaduras, etc.), la cantidad de los queratán sulfatos se reduce drásticamente respecto a la de condroitín sulfatos y la córnea aumenta su contenido en agua (Rigal-Verneil, 1990). En estas condiciones, el colágeno tipo I de la córnea se hace menos soluble,

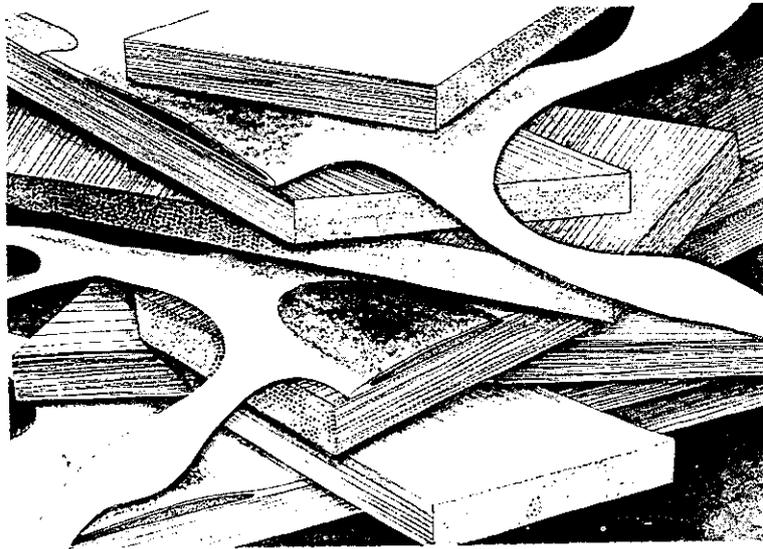


Fig. 6.- Esquema (según Hogan y cols., 1971) de la disposición de las láminas de colágeno en la córnea. Las células planas y estrelladas intercaladas entre las láminas de colágeno corresponden a los queratocitos, responsables de la biosíntesis de colágeno y mucopolisacáridos.

menos glicosilado, y en cuanto a las fibrillas, éstas se hacen más anchas y más irregulares, dando lugar a una córnea opaca.

La córnea se hidrata cuando la temperatura desciende y la actividad metabólica disminuye. Sin embargo, si existe suficiente glucosa, cuando la córnea es llevada a temperatura ambiente, se deshidrata nuevamente. Agentes de deshidratación en el edema de córnea son la glicerina y la glucosa, cuyas soluciones hipertónicas clarificarían los leucomas por imbibición; agentes de hidratación son el yodoacetato (un veneno metabólico que inhibe el metabolismo exudativo de la córnea) y la ouabaína.

Dentro de los signos clínicos de la patología corneal el más importante es el "leucoma". Se han referido cómo causas próximas los depósitos de colesterol y/o mucopolisacáridos (Balazs, 1968).

ESTRUCTURA DE LA ESCLERA.

La estructura de la esclera confiere protección mediante la densa agregación de las fibras de las que está compuesta y del efecto amortiguador de la sustancia matriz. La esclera es viscoelástica y cuando la presión intraocular se eleva (por ejemplo, artificialmente), se produce un alargamiento de las fibras, seguido de un ligero deslizamiento de las mismas, una sobre otra.

El hecho de que el colágeno de la esclera y el de la córnea difieran en el contenido de mucopolisacáridos al que se encuentran asociados, puede justificar sus diferentes propiedades. De hecho, resulta escasa (y poco densa) la cobertura mucopolisacarídica de las fibras de colágeno escleral cuando se comparan con la cantidad de recubrimiento presente en el caso de la córnea, y este hecho bastaría para explicar la pérdida de transparencia de la esclera (Fredrickson, 1975). Si la esclera se encuentra deshidratada, entonces se hace más transparente, lo que Maurice considera se debe a una concentración de los mu-

copolisacáridos próxima a la alcanzada por la córnea (Maurice, 1969). Cuando el contenido en agua de la esclera se eleva por encima del 90% o disminuye por debajo del 40%, la esclera se hace más transparente y la doble refractividad disminuye (Pau, 1955).

La esclera gana transparencia tanto por imbibición como por desecación. Esto se explica por la menor cantidad de queratoglicosaminoglicano o mucoide de la esclera con respecto a la córnea. Cuando la córnea se sumerge en agua, la proporción elevada de mucoide hace que se hinche dos veces su peso, mientras que la esclera no lo hace.

La esclera deshidratada es tan transparente como la córnea, de tal modo que resulta difícil diferenciarlas, sobre todo en el joven. En el anciano la esclera se calcifica. Rehidratada, recupera su blancura en tres minutos y en un cuarto de hora su espesor y flexibilidad.

Estas posibilidades de deshidratación de la esclera permiten su conservación post-mortem en el globo enucleado, sea por liofilización (s.c., por congelación desecación) o por silico-desecación (s.c., desecación en presencia de sílice microporosa) y rehidratación en el momento del empleo.

Por otra parte, la no transparencia de la esclera se opone a la transparencia de la córnea, en razón, fundamentalmente, de la orientación y de la talla de las microfibrillas.

Si la comparación del colágeno de la esclera se realiza con el colágeno vítreo, podemos afirmar que en la esclera el colágeno se encuentra en su forma estable y altamente polimerizado, mientras que en el vítreo se encuentra en su forma más soluble. En su forma estable (o sea, en la esclera), el colágeno tiene resistencia a la tensión alta pero, sin embargo, es fácilmente desnaturizable por el calor, los ácidos y los álcalis. El calentamiento convierte al colágeno en gelatina.

COMPOSICION DEL CRISTALINO.

Es una lente biconvexa situada entre el humor acuoso y el humor vítreo rodeada de una cápsula transparente.

El cristalino puede ser considerado como un tejido compuesto por células epiteliales (cápsula lenticular), células fibrosas y un espacio intracelular. A nivel macromolecular, puede ser descrito como constituido de sustancias de alto peso molecular y una membrana. Estas sustancias de alto peso molecular son fundamentalmente proteínas (α , β y γ cristalinos).

Su composición química es un 67% de agua y un 33% de sustancias no volátiles, de las que un 95% son proteínas estructurales (α , β y γ cristalinos, ya mencionados anteriormente). No obstante, la organización estructural es poco conocida. Se han encontrado variaciones en la composición de los cristalinos α , β y γ y de las proteínas insolubles (albuminoides) en las diferentes capas del cristalino (núcleo y córtex) y según la edad.

En 1961, Dische y Zelmenis mostraron que la cápsula está compuesta de proteínas tipo colágeno y que las relaciones de transparencia a elasticidad se deben a variaciones en las composiciones de glicoproteínas y mucopolisacáridos con la edad. De hecho, el cristalino ha sido considerado un órgano idóneo para investigar procesos de envejecimiento: con el paso del tiempo el cristalino se hace más esférico, se producen acumulaciones de fibras de colágeno bajo el epitelio dejando suponer anomalías de secreción y la cápsula pierde elasticidad debido a un aumento de puentes entre las moléculas de colágeno tipo IV. Sigue la ruptura de membranas celulares; después la pérdida de proteínas de bajo peso molecular; más tarde la hiperhidratación intracelular y, finalmente, la opacificación del cristalino (catarata).

HUMOR VITREO.

El humor vítreo es un verdadero gel que resulta de la interacción de una suspensión de fibrillas de colágeno con el ácido hialurónico en solución (Roughley, 1975)(Fig. 2).

La plasticidad y resistencia a la tensión del vítreo son debidas al colágeno; las propiedades viscoelásticas y la resistencia a la compresión son debidas al ácido hialurónico.

La estabilidad de la red colágeno-hialurónica constitutiva del humor vítreo es dependiente del peso molecular del hialuronato. La molécula del ácido hialurónico representa su principal constituyente.

El hecho de que el vítreo se comporte como un gel es debido a la interacción de las moléculas del ácido hialurónico y a las fibras de colágeno. La trama comporta mallas con un espacio interfibrilar ocupado por moléculas del ácido hialurónico esféricas (descritas por Balazs, 1979) o en forma de doble hélice (interpretación de Roughley, 1975). La morfología del ácido hialurónico depende de la ionización de los agrupamientos ácidos intramoleculares, que conduce a una tirantez de la cadena, la cual se alarga considerablemente y a la hidratación que rodea su molécula, lo que determina un enrollamiento sobre ella misma (Troussaint, 1977). La trama de finas fibras de colágeno llena la casi totalidad del espacio intravítreo con variaciones solamente de densidad. Esto es igualmente cierto para las zonas más marginales (membrana hialoidea anterior y posterior) que, a pesar del aspecto membranoso descrito en microscopía óptica y en biomicroscopía, son actualmente consideradas como densificaciones de la trama vítrea (Einsner, 1975).

Con la edad, el humor vítreo se licúa progresivamente (Teng y Chi, 1957). Este efecto puede conducir a la contracción del gel vítreo (Fine y Yanof, 1972) y subsiguientemente al desprendimiento vítreo. Berman y Mickaelson (1964) encontraron que las concentraciones de colágeno y ácido hialurónico aumentaban

con las sucesivas décadas de la vida, y, muy significativamente, en la población de la tercera edad.

No existe una enfermedad que afecte al humor vítreo de forma aislada, pero existen diversas entidades clínicas diferenciadas en las cuales los cambios morfológicos son evidentes. Una de estas son los desprendimientos vítreos (ya referidos anteriormente) y otra la uveítis periférica, que cursa con opacidad vítrea atribuida a formación de fibrillas gruesas de colágeno.

HUMOR ACUOSO.

Es el fluido que ocupa las cámaras anterior y posterior del ojo. Su existencia es necesaria para mantener en el ojo un cierto tono que hace posible las funciones visuales.

Sus componentes principales son el ácido hialurónico, el ácido ascórbico, el ácido láctico y la glucosa.

Se ha referido la gran similitud del humor acuoso con el fluido cerebro espinal, al menos por la presencia de fructosa en ambos. La fructosa en el humor acuoso procede del cristalino como tejido excretor (Kuck y Crosswell, 1974).

LAGRIMAS.

La película lagrimal corneal consta de tres capas: (1) la interna o mucosa, que permanece junto al epitelio corneal como una hoja delgada, contiene mucinas o proteínas de alto peso molecular y actúa como un agente humectante para el ojo; (2) la capa media o acuosa, la más ancha, que es un fluido acuoso segregado por las glándulas lagrimales; y (3) la capa externa o lipídica segregada por las glándulas de Meibomio y de Zeiss.

La caracterización química de los diversos componentes de las lágrimas aún no ha sido conseguida. Globalmente, el único dato obtenido de interés es que las lágrimas humanas son más

ricas en nitrógeno no proteico que el plasma (51 mg/dl frente a 15-42 mg/dl, respectivamente).

IB2. DÉBITO DEL HUMOR ACUOSO Y FACTORES FARMACOLOGICOS EN LA TENSION OCULAR.

Los agentes parasimpático-miméticos del tipo de la poliacarpina actúan sobre la tensión ocular facilitando el flujo de salida del humor acuoso. Su mecanismo de acción probablemente es sólo mecánico, mediante una contracción del músculo ciliar que tira del espolón escleral y de la malla trabecular. Un mecanismo de acción similar puede ser asignado al carbacol, droga actualmente en desuso, al igual que los fármacos inhibidores de la acetil-colinesterasa (ioduro de ecotiofato y bromuro de demecario), y cuyos efectos secundarios y contraindicaciones son susceptibles de atención.

Los agentes simpático-miméticos, como la adrenalina, reducen la presión intraocular por disminución en la producción de humor acuoso y por aumento del flujo de salida del mismo debido a la acción β -adrenérgica, probablemente por mediación del AMP cíclico. Los agentes α -adrenérgicos, como la fenilefrina, no tienen prácticamente efecto sobre la presión ocular. Los agentes β -adrenérgicos, como el isoproterenol, producen bajas presiones pero tienen un gran toxicidad sistémica.

Los agentes β -bloqueantes, como el timolol, reducen la presión ocular disminuyendo el débito del humor acuoso sin tener efecto sobre la circulación coroidea.

Los inhibidores de la anhidrasa carbónica o sulfonamidas, reducen la producción del humor acuoso muy probablemente a través de una modificación en la secreción activa de bicarbonato.

Los corticoides locales pueden dar lugar a una elevación de la presión ocular en los sujetos predispuestos. Por vía general pueden también elevar la presión ocular, pero es neces-

ria una administración más prolongada en razón de la menor penetración en el humor acuoso en comparación con la administración local. El aumento de presión ocasionada por los corticoides es debido a una disminución de la facilidad de drenaje posiblemente en relación con los depósitos de mucopolisacáridos en el trabeculum.

Los glucósidos cardíacos, como la ouabaína, pueden disminuir la presión ocular disminuyendo la secreción de humor acuoso por acción inhibitoria sobre la ATPasa (Na^+ , K^+) del cuerpo ciliar.

IB3. REQUISITOS DE BIOCOMPATIBILIDAD PARA BIOMATERIALES Y PREPARADOS FARMACEUTICOS EN OFTALMOLOGIA.

La mayor parte de los preparados oftálmicos son productos estériles, prácticamente libres de partículas extrañas, debidamente compuestos y envasados para instilar en el ojo. En su preparación se vienen considerando varios requisitos, entre ellos esterilidad, claridad, tamponado y pH, tonicidad, viscosidad, estabilidad, comodidad, aditivos, envasado y conservadores. Parte de estos requisitos, los relativos a propiedades físicas, se encuentran relacionados entre sí y la adecuación de sus valores a los fisiológicos se tiene siempre en cuenta en la preparación de un producto. Así, para constituyentes activos, el sistema buffer o tampón se debe considerar pensando en la estabilidad de la droga y la comodidad para el ojo, porque el bienestar del paciente suele ser óptimo al pH del líquido lagrimal ($7,4 \pm 0,1$), mientras muchas veces el pH para la estabilidad óptima de la droga es más bajo (incluso 5).

Mayor requerimiento de adecuación a la fisiología requieren las soluciones de utilización intraocular, que van a estar en contacto con las delicadas estructuras internas del ojo en el curso de diversas operaciones y por periodos que se miden en horas: no se deben usar conservadores, se deben evitar los buffer en la medida de lo posible, la composición química ha de

estar balanceada para reducir el daño a estructuras como el endotelio corneal, etc..

Otros productos farmacéuticos, como son los líquidos de conservación de componentes del ojo para transplantes y las soluciones para el cuidado de lentes, también están diseñados para mimetizar las condiciones fisiológicas al máximo.

El desafío de formulación que plantean los preparados oftálmicos, al tener como referencia los medios fisiológicos, es, pues, considerable. En este contexto, sería muy deseable la disponibilidad de una técnica que permitiera valorar globalmente, tanto en un producto farmacológico como en uno o más componentes del ojo con los que aquel muestra similitud, varias de las propiedades referidas u otras. Pretendemos que la calorimetría de barrido diferencial proporcione, al menos parcialmente, esta utilidad.

IB4. EL MÉTODO TÉRMICO. LA CALORIMETRIA DE BARRIDO DIFERENCIAL EN SU APLICACION AL ESTUDIO DE MATERIALES HETEROGÉNEOS.

Es sabido que el formulador farmacéutico debe recurrir a áreas especializadas del conocimiento para adquirir información científica sobre la sustancia farmacéutica que hay que convertir en una forma posológica óptima. Debe, en consecuencia, estar atento a las nuevas posibilidades metodológicas en la elucidación estructural y de propiedades de las sustancias que la investigación físico-química le está proporcionando. Una de ellas es la metodología térmica por calorimetría de barrido diferencial a bajas temperaturas, hoy insuficientemente conocida. Sin embargo, operando a temperaturas medias y altas, la calorimetría de barrido diferencial ya ha mostrado su utilidad en farmacología en la caracterización de polimorfos (Remington, 1985; Ford, 1995).

La calorimetría de barrido diferencial, en cuanto proporciona el registro de los efectos térmicos tras enfriamiento de la muestra a bajas temperaturas, no sólo permite tener información de la existencia de transiciones de fase de la sustancia, droga o material estudiado a esas temperaturas, sino que, adicionalmente, permite que esas transiciones sirvan como marcadores de propiedades deseables en Oftalmología: tipos de agua de la muestra, grado de polimerización, extensión de entrecruzamiento, etc..

Conocedores de estas novedosas posibilidades de la calorimetría de barrido diferencial y presumiendo su utilidad para el estudio de los preparados farmacológicos de aplicación en Oftalmología (preparados oftálmicos), hemos adoptado la utilización metodológica de aquella a la búsqueda de los mejores resultados.

La calorimetría de barrido diferencial es un método que permite estudiar cambios energéticos asociados a los cambios físicos o químicos que ocurren en una muestra, registrados en función de la temperatura, al calentar la sustancia a un ritmo uniforme.

Las transiciones de fase producen cambios entálpicos endotérmicos o exotérmicos. Por ejemplo, la fusión, sublimación, transición sólido-sólido y la pérdida de agua suelen producir efectos endotérmicos, en tanto que la cristalización produce efectos exotérmicos. El análisis térmico permite calcular los parámetros termodinámicos para los sistemas que se evalúan.

II. MATERIAL Y MÉTODOS.

IIA. COMPONENTES FISIOLÓGICOS Y QUÍMICO-ESTRUCTURALES DEL OJO.

CORNEA HUMANA.

Las muestras de córnea que se han utilizado en el presente estudio corresponden a las porciones periféricas resultantes del recorte de la córnea en la operación de trasplante de córnea del donante al receptor. Su encapsulado se realizó a las 35 horas del trasplante y los registros DSC, a las 36, 40 y 108 horas del mismo.

ESCLERA PORCINA.

A falta de esclera de ojo humano, las muestras de esclera estudiadas han sido de origen porcino. Sus curvas DSC se han registrado a diferentes períodos de tiempo hasta el cese de observación de efectos (6 horas de la muerte del animal). A título comparativo, se han registrado las curvas DSC de colágeno fabricado a partir de tejido escleral porcino y destinado a ser utilizado como protector corneal en humanos.

CRISTALINOS HUMANOS Y PORCINOS.

Hemos dispuesto de una cápsula de cristalino de ojo humano para análisis térmico. La muestra fué conservada en medio acuoso y registrada varios días después de la extracción. Sin embargo, la cantidad fué insuficiente para registros con el tiempo, haciéndose precisa la extracción de cristalino porcino de animales sacrificados. El encapsulado de estas últimas muestras tuvo lugar a las 2 horas de la extracción y los registros se realizaron a las 5, 6 y 29 horas de la muerte del animal.

HUMOR VITREO PORCINO.

Las muestras de humor vítreo procesadas térmicamente se han obtenido por extracción a partir de globos oculares enu-

cleados de animales recién sacrificados. El encapsulado de las muestras se realizó a las 2 horas de la extracción y las curvas DSC se registraron a diferentes períodos de tiempo, desde las 4 h. 15 min. de la extracción hasta la anulación de los efectos térmicos (a las 26 horas de la extracción).

HUMOR ACUOSO HUMANO.

Se ha extraído humor acuoso de pacientes con cataratas y glaucoma. Los registros de los termogramas correspondientes se han realizado a las 24, 48 y 144 horas de las extracciones.

LAGRIMAS HUMANAS.

Se han recogido de voluntarios sin patología ocular, con ocasión de estados emocionales positivos o situaciones de hilaridad, y de niños de corta edad en múltiples ocasiones, siempre evitando la estimulación química o mecánica ocular. Los registros DSC se han realizado a los 2 días y 17 días después de la recogida.

COLAGENO Y MUCOPOLISACARIDOS.

Se han estudiado colágenos de diversos orígenes. Un grupo de ellos, clasificados de tipo I (según la nomenclatura de Bornstein y Traü, 1979), subdivididos en fracciones solubles e insolubles, y obtenidos por variantes metodológicas distintas, han sido conseguidos comercialmente de Sigma (C9879, C4387, C3511, C8897 y C7774). Otro, es el colágeno extraído de músculos bovinos (Bonnet y cols., 1990).

Los mucopolisacáridos registrados por DSC han sido el sulfato de condroitina C (sal sódica), 90%, de cartílago de tiburón, comercializado por Sigma (C4384); el sulfato de dermatán mezclado con sulfato de heparina, conocido con el nombre de sulodexida y comercializado con el nombre de "Aterina" por los laboratorios Tedec Zambelletti; y un sulfato de queratán, aislado de córnea bovina, comercializado por BioChemika.

IIB. BIOMATERIALES Y PREPARACIONES FARMACEUTICAS EN OFTALMOLOGIA.

Se entiende por biomateriales aquellas sustancias, aparte de los alimentos y fármacos, contenidas en los sistemas diagnósticos o terapéuticos, que están en contacto con tejidos o fluidos biológicos. Biomateriales de aplicación en Oftalmología son los viscoelásticos, los aceites de silicona, las lentes de contacto y los productos para su cuidado, y las lentes intraoculares.

Preparados farmacéuticos de aplicación específica en Oftalmología son los midriáticos, antihipertensivos oculares y antiinflamatorios oculares. Otras preparaciones farmacéuticas objeto de estudio han sido los antibióticos más utilizados en Oftalmología.

IIB1. VISCOELASTICOS.

Como su nombre indica, son productos de soporte destinados a actuar como lubricantes tisulares y para mantener separación entre los tejidos. Son de dos tipos, dependiendo de si el producto activo de las soluciones es el hialuronato sódico o la hidroxipropilmetilcelulosa.

Ambos son inocuos para los tejidos oculares y resultan de gran utilidad en todas aquellas intervenciones quirúrgicas oculares en las que existe riesgo de dañar o alterar el endotelio corneal. Pueden ser retirados con facilidad después de que hayan cumplido su misión, minimizando así el riesgo de obstrucción trabecular que agravaría el incremento de presión intraocular subsiguiente al traumatismo quirúrgico.

Dos clases de viscoelásticos basados en el hialuronato sódico han sido utilizados en el presente estudio: los extraídos

de tejidos aviares (en concreto, de las dermis de las crestas de gallo), y los extraídos de células bacterianas. Entre los primeros se encuentran "Healon G.V." (Farmacia AB), "Amvisc" (MedChen Products Inc), "Healon" (Kabi Farmacia AB), "Vitrax" (Allergan, S.A.E.) y "Viscoat" (Alcon Surgical, Inc.). Los segundos están representados por "Provisc" (Alcon Laboratorios Inc.), "Biolon" (Biotechnology General, Israel) y "Eurovisc" SL-1010 (Europhtal). Todas estas soluciones se encuentran contenidas en jeringas de vidrio; están tamponadas (cloruro-fosfato) a pH 7,0-7,5 y su osmolaridad es de 320 ± 40 mOsm. La viscosidad oscila en el rango 40.000 ± 20.000 cps. (a una velocidad de corte de 2 seg^{-1}), siendo "Provisc" y "Healon GV" los productos más viscosos y "Vitrax" y "Viscoat" los menos viscosos. Respecto a las concentraciones, la cantidad de hialuronato sódico por ml. de disolución es de 16 mg en "Amvisc Plus", 14 mg en "Healon G V", 12 mg en "Amvisc", 10 mg en "Healon" y "Biolon" y 30 mg en "Vitrax" y "Viscoat". En "Viscoat" cada ml de disolución también contiene 40 mg de condroitín sulfato sódico.

IIB2. ACEITES DE SILICONA.

El aceite de silicona (polidimetilsiloxano) se utiliza en Oftalmología como sustituto del vítreo para tratar casos difíciles de desprendimiento de retina, tales como los complicados con vitreoretinopatía proliferativa, roturas retinianas gigantes y traumatismo ocular penetrante (Federman y Schubert, 1988; Skorpik y cols., 1989).

Los aceites de silicona son polímeros sintéticos polidispersados que constan de mezclas de especies lineales con diferentes tamaños de cadena y pueden contener especies cíclicas y lineales de pesos moleculares más bajos. Las especies cíclicas son subproductos de la polimerización de los aceites. Se piensa que estos componentes de bajo peso molecular (Nakamura y cols., 1990) están involucrados en la toxicidad de los aceites.

Los aceites de silicona estudiados han sido los conseguidos de las firmas comerciales Ioba-Domilens (muestras de 5000, 2000 y 1000 cs), Cusí ("Oxane" de 5700 y 1300 cs) y Adatomed ("Adato sil-ol" de 5000 cps (5139 cs) y 1000 cps (1028 cs)).

IIB3. LENTES DE CONTACTO Y PRODUCTOS PARA SU CUIDADO.

PROTECTORES CORNEALES.

Las lentes de contacto son unos dispositivos oftálmicos, ópticos y/o terapéuticos que se pueden dividir en cuatro categorías generales: lentes hidrófobas rígidas, llamadas lentes de contacto duras, en particular de polimetilmetacrilato (PMMA), que son de humectabilidad mediana; lentes flexibles hidrófilas llamadas blandas, en particular de hidroxietilmetilmetacrilato (HEMA), de buena humectabilidad; lentes hidrófobas flexibles, bien de goma siliconada (con mala humectabilidad) o de vinilpirrolidona siliconada (con buena humectabilidad); y lentes hidrófilas rígidas, de acetatobutirato de celulosa (CAB), de buena humectabilidad. Las lentes requieren para su cuidado preparados destinados a formar una cubierta hidrófila. Estos preparados conocidos como soluciones humectantes, contienen un agente a la vez tensioactivo y comunicador de viscosidad, y un conservador. Entre los agentes de uso común figuran derivados de celulosa, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico y derivados de polietilenglicol. Las soluciones destinadas a volver a mojar las lentes in situ se conocen como soluciones "rehumectantes" o lágrimas artificiales.

Las lentes de contacto estudiadas han sido tres productos de la firma Bausch & Lomb consistentes en lentillas fabricadas a partir de tejido escleral porcino y solubles a las 12, 24 o 72 horas ("Bio-Cor 12HR", "Bio-Cor 24HR" y "Bio-Cor 72HR").

En lo referente a medios de conservación de córneas, se ha procedido al registro de los termogramas de las soluciones co-

ercializadas con las denominaciones "Licorol" (de Opsia Pharma) y "Optisol" (de Chiron Ophthalmics), esta última compuesta de condroitina y dextrano.

La composición de las lágrimas artificiales "Tears Humectante Solucion" de Alcon Iberhis y "Liquifilm Lágrimas" de Allergan, también incluidas en este estudio, es: dextrano 70 (1 mg/ml) e hidroxipropilmetilcelulosa (3 mg/ml) para las primeras, y alcohol polivinílico (14 mg/ml) y clorobutanol (5 mg/ml), para las segundas.

Las lentes intraoculares que han sido objeto de estudio termoanalítico en este trabajo han sido de PMMA, procedentes de las casas comerciales AJL (US Iol Inc.) y Kabi Farmacia, y las de silicona de Iovisión Inc. ("Pliolens").

IIB4. MIDRIATICOS, ANTIINFLAMATORIOS Y ANTIHIPERTENSIVOS.

MIDRIATICOS Y CICLOPLÉJICOS.

Dentro de este grupo de preparados, se han estudiado tres con acción parasimpaticolítica, dos con acción simpaticomimética y uno de propiedades combinadas. Los colirios de acción parasimpaticolítica han sido tres productos de la casa Cusí con sendos principios activos: atropina.SO₄ 10 mg/ml ("Colircusí Atropina"); tropicamida 10 mg/ml ("Colircusí Tropicamida") y ciclopentolato HCl, 10 mg/ml ("Colircusí Ciclopléjico"). Los simpaticomiméticos estudiados han sido "Colirio Oculos Fenilefrina" de Frumtost-Zyma y un preparado de Allergan comercializado con el nombre de "Diopine", cuyo principio activo es dipinefrina.HCl (1 mg/ml) asociada a cloruro de benzalconio y manitol. También se ha estudiado un colirio de composición mixta a base de atropina (2 mg/ml), fenilefrina.HCl (4 mg/ml) y escopolamina.HBr (0.5 mg/ml) comercializado por la casa Llorens con el nombre de "Midriático".

ANTIINFLAMATORIOS.

Los antiinflamatorios objeto de estudio en el presente trabajo han sido agrupados dentro de sendas clasificaciones como esteroideos y no esteroideos. Los esteroideos se han subclasificado en tres grupos: derivados de dexametasona, derivados de fluorometolona y derivados de prednisona.

Los dexametasona derivados analizados térmicamente han sido cuatro preparaciones de la casa comercial Cusí y uno de la firma Alcon Iberhis. De los cuatro preparados Cusí, uno corresponde a dexametasona fosfato sódico en un vehículo acuoso viscosizado, isotónico y tamponado ("Colircusí dexametasona"), y las otras tres, a asociaciones de dexametasona con antibióticos: cloranfenicol ("Colircusí de Icol"), gentamicina SO₄ ("Colircusí Gentadexa") y trimetropín ("Oftalmotrin-Dexa"). El preparado de Alcon corresponde a dexametasona no fosfatada asociada a neomicina y a sulfato de polimixina B ("Maxitrol").

Respecto a los fluorometolona derivados, se han registrado por DSC sendas preparaciones de fluorometolona de las casas Alcon y Allergan con las denominaciones de "Isopto-Flucon" y "FML", respectivamente. En la primera, la fluorometolona (1 mg/ml) se encuentra micronizada en suspensión acuosa; en la segunda, se encuentra asociada a alcohol polivinílico, cloruro de polivinilo y tampones EDTA y fosfato.

Sólo se ha registrado un preparado comercial de prednisona. Corresponde a la firma Allergan y en su composición intervienen además de acetato de prednisona (5 mg/ml), sulfato de neomicina, sulfato de polimixina B, alcohol polivinílico y otros excipientes, siendo "Poly-Pred" su nombre comercial.

De entre los colirios con función antiinflamatoria no esteroidea, se han estudiado los comercializados por las casas Ciba Geigy ("Voltarén"), Chibret ("Indoftol") y Allergan

("Ocuflur"). La composición de "Voltaren" corresponde a diclorofenaco sódico, 1 mg/ml; la de Indoftol, a indometacina, alcoholes bencílico y feniletílico y cloruro de benzalconio; y la de "Ocuflur" a flurbiprofeno sódico (0.3 mg/ml) con alcohol polivinílico (14 mg /ml) y otros excipientes.

ANTIHIPERTENSIVOS.

Pertenecientes a este grupo de fármacos, hemos estudiado dos beta-bloqueantes no selectivos con actividad simpaticomimética intrínseca ("Elebloc" de Laboratorios Cusí y "Mikelan" de Laboratorios Miquel, S.A., ambos a base de carteolol HCl a 20 mg/ml) y dos beta-bloqueantes sin acción simpaticomimética intrínseca ("Betoptic" de Alcon Iberhis y "Betagan" de Allergan). El principio activo de "Betoptic" es betaxolol.HCl (5,6 mg/ml) y el de "Betagan" levovunolol HCl (5 mg/ml) con alcohol polivinílico (14 mg/ml), cloruro de benzalconio y otros componentes.

Además hemos registrado tres antihipertensivos no selectivos ("Timoftol" de Laboratorios Chibret, "Nyolol" de Laboratorios Frumstost-Zyma y "Cusimolol" de Laboratorios Cusí), cuyo principio activo es maleato de timolol. Dado que estos preparados vienen siendo desplazados en la clínica por los antihipertensivos anteriores y, por otra parte, los registros obtenidos son muy pobres, hemos ignorado su inclusión en el capítulo de discusión de resultados.

IIB5. ANTIBIOTICOS.

Toda vez que en los grupos farmacéuticos anteriores se han incluido asociaciones de antibióticos con otros productos activos, e interesa conocer el comportamiento térmico específico de unos y otros componentes, hemos registrado las curvas DSC de antibióticos sencillos como cloranfenicol (en forma de succinato, de Colircusí o como colirio, de Frumstost-Zyma), norfloxacino ("Chibroxin"), gentamicina.SO₄ (de Colircusí) y tobramicina ("Tobrex" de Alcon Iberhis).

IIC. METODOLOGIA Y CONDICIONES DE REGISTRO.

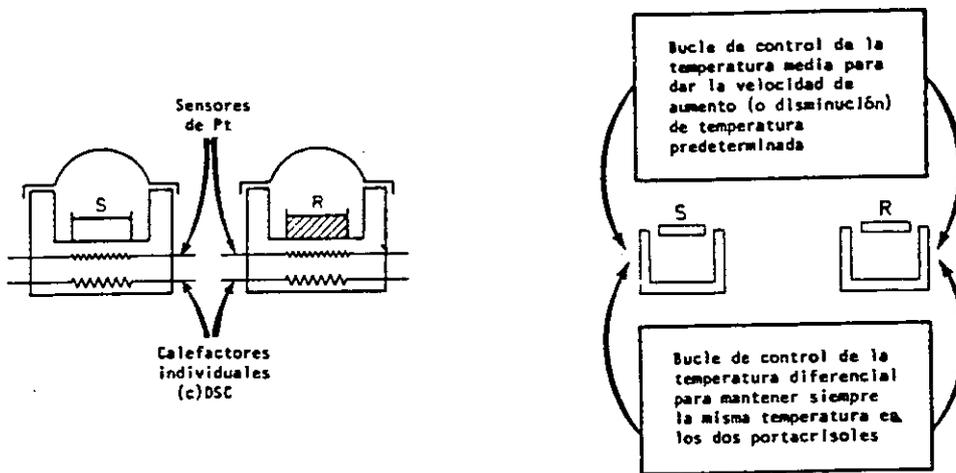
IIC1. METODOLOGIA.

El DSC es la técnica más simple y más ampliamente utilizada en análisis térmico. Con esta técnica se registra la diferencia de temperatura, ΔT , entre la muestra y un material de referencia, mientras ambas están bajo un mismo programa controlado de temperatura, por ejemplo, un calentamiento a $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

A diferencia de otros sistemas clásicos diferenciales, como el DTA clásico y el DTA "Boersma", donde muestra y referencia son calentadas por un mismo horno, el sistema DSC utiliza fuentes caloríficas individuales para la muestra y la referencia (Fig. 7). Esto hace posible que el DSC emplee el principio de "Balance nulo de temperatura", por el cual la muestra y la referencia son mantenidas a la misma temperatura durante el análisis ($\Delta T = T_S - T_R = 0 \Rightarrow T_R = T_S$).

Como se esquematiza en la Fig. 8, el sistema está dividido en dos bucles distintos de control de temperatura: un bucle general que se encarga de mantener la temperatura de calefacción a una velocidad determinada (es la temperatura que se registra en el eje de abscisas), y un bucle diferencial encargado de mantener el recipiente de la muestra y el de la referencia siempre a la misma temperatura.

El DSC actúa de la siguiente forma: cuando el calorímetro percibe una diferencia de temperatura entre muestra y referencia (debido a un proceso endotérmico o exotérmico sufrido por la muestra), actúa modificando inmediatamente la potencia de entrada a la muestra con el fin de anular esta diferencia. En esto consiste el principio de "balance nulo" de temperatura. La señal producida, proporcional a la diferencia del calor de entrada a la muestra y a la referencia, dq/dt ($=dh/dt$, pues se trabaja a $p=\text{cte}$) es registrada en el eje de ordenadas. La Fig. 9 representa un endotermo de DSC. Por convenio, se adopta el criterio inverso de los picos ENDO > y EXO > respecto al DTA.



Figs. 7 (izqda.) y 8 (derecha).- Representación esquemática del sistema térmico DSC y de sus bucles de control.

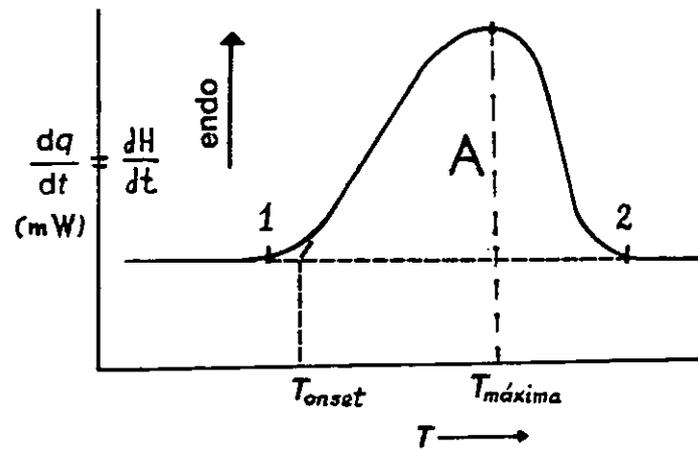


Fig. 9.- Termograma ideal de DSC.

El área bajo el pico, A (Fig. 9) es directamente proporcional a la entalpía (calor a presión constante) puesta en juego en ese proceso o transformación térmica:

$$A = \int_1^2 \frac{dH}{dT} dT$$

Haciendo el cambio de variable $dT = \phi dt$, siendo ϕ la velocidad o grado de calentamiento, tendremos que:

$$A = \int \frac{dH}{dT} \phi dt = \phi \int_1^2 dH \quad \Rightarrow \quad A = \phi \Delta H$$

Esto quiere decir que en un calorímetro DSC se obtiene una conversión directa del área del pico a unidades de energía, y por tanto es capaz de medir la variación de entalpía asociada a cualquier transformación térmica (física o química) de la muestra en el rango de temperatura de operación del análisis.

Considerando la endoterma de DSC de la Fig. 9, habría dos criterios para determinar la temperatura de la transformación térmica. El primero sería la T_{\max} o temperatura de pico y el segundo, más exacto, tomar la T_{onset} , o temperatura del cambio de pendiente (obtenido como intersección de la tangente de la línea de base y la tangente al primer cambio de pendiente).

El rango de temperatura en que trabaja un calorímetro DSC depende de la casa comercial que lo fabrique y es, generalmente, menor que la de un analizador térmico diferencial, DTA (aproximadamente 700 °C para los DSC frente a > 1000 °C para los DTA). El modelo DSC-7 de Perkin-Elmer permite un rango de operación entre -175 °C (con un dispositivo de N₂ líquido) y 730 °C.

Los calorímetros DSC se calibran en base a los endotermos de fusión de patrones bien conocidos. La Tabla II ofrece los materiales estándar de calibración más frecuentemente utiliza-

Tabla II.- Materiales estándar recomendados para calibración.

(a) Calibración de temperatura			
Material	Temperatura de transición (°C)	Material	Temperatura de transición (°C)
KNO ₃	127.7	K ₂ SO ₄	583
KClO ₄	299.5	K ₂ CrO ₄	665
Ag ₂ SO ₄	412.0	BaCO ₃	810
SiO ₂ (cuarzo)	573.0	SrCO ₃	925

(b) Calibración de entalpía (y temperatura)				
Material	p.f. (°C)	p.f. (°K)	ΔH_f (cal g ⁻¹)	ΔH_f (cal g ⁻¹)
Indio	156.4	429.6	6.80	28.5
Estaño	231.9	505.1	14.40 ± 0.01	60.25 ± 0.04
Plomo	327.4	600.6	5.45 ± 0.01	22.80 ± 0.04
Cinc	419.5	629.7	25.9 ± 0.1	108.4 ± 0.4
Aluminio	660.4	933.6	94.9 ± 0.3	397 ± 1

dos, según sea el rango de temperaturas de operación. También se pueden utilizar patrones orgánicos como el ácido benzoico. En la zona de bajas temperaturas (en las que hemos trabajado preferentemente) se puede utilizar el agua pura o el ciclohexano. Existen normas ASTM sobre patrones orgánicos.

Principios del DSC.

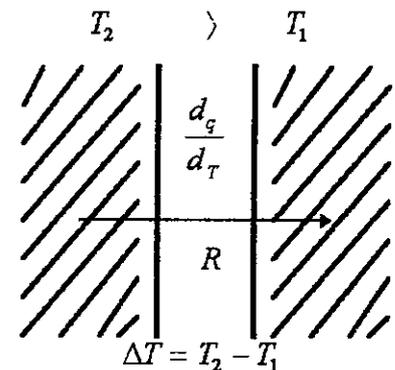
La Fig. 10 representa de forma esquemática un calorímetro térmico diferencial, junto con las definiciones de los pares térmicos necesarios para la comparación del DTA clásico, DTA Boersma y DSC.

- | | |
|---|--|
| $T_s = t^a$. real de la muestra | $T_r = t^a$. real de referencia |
| $T_{sm} = t^a$. medida de la muestra | $T_{rm} = t^a$. medida de referencia |
| $C_s =$ capacidad calorífica de muestra + pocillo | $C_r =$ capacidad de referencia de muestra + pocillo |
| $C_{sm} =$ capacidad calorífica del regulador | $C_{rm} =$ capacidad calorífica del regulador |

$R_s, R'_s, R'_r,$ y R_r son resistencias térmicas
 Los términos dq / dt son flujos de calor

Para un instrumento ideal, las capacidades caloríficas y las resistencias térmicas deberían ser iguales por parejas: $C_{sm}=C_{rm}$; $R_s=R_r=R$ y $R'_s=R'_r=R'$. No tienen porqué ser iguales $C_s \neq C_r$ y $R \neq R'$. Se asume que $C_s > C_r$ y que el flujo de calor está gobernado por la ley de Newton:

$$\frac{dq}{dt} = \left(\frac{1}{R} \right) \Delta T$$



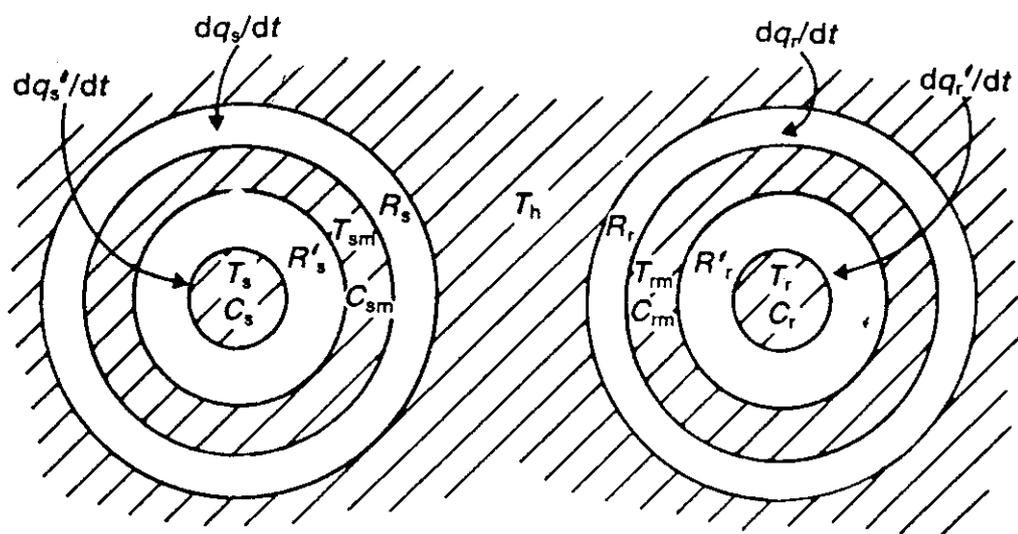


Fig. 10.- Esquema de calorímetro térmico diferencial

El calor suministrado (o cedido) por el lado de la muestra, dq_s , se emplea en : (1) variar la energía del regulador (termopar o resistencia), $C_{sm} dT_{sm}$, y (2) variar la energía de la muestra (muestra + pocillo), $C_s dT_s$. Por lo tanto:

$$dq_s = C_{sm} dT_{sm} + C_s dT_s$$

dividiendo por dt tendremos términos de potencia calorífica,

$$dq_s/dt = C_{sm}(dT_{sm}/dt) + C_s(dT_s/dt)$$

llamando $dq'_s/dt = C_s(dT_s/dt)$ nos queda:

$$dq_s/dt = C_{sm}(dT_{sm}/dt) + dq'_s/dt$$

y aplicando la ley de Newton,

$$dq_s/dt = (1/R) (T_h - T_{sm})$$

$$dq'_s/dt = (1/R') (T_{sm} - T_s)$$

En el lado de la referencia se obtendrían expresiones totalmente análogas, sin más que sustituir los subíndices s por subíndices r .

En DSC, muestra y referencia son calentadas por fuentes caloríficas independientes, y en todo momento se mantienen a la misma temperatura. Por lo tanto, $T_s = T_{sm} = T_r = T_{rm} = T_h$ y $R = R' \cong 0$; es decir, apenas hay resistencia térmica. La señal que se registra es la diferencia de potencia suministrada a la muestra y a la referencia:

$$\Delta \left(\frac{dq}{dt} \right) = \left[\frac{dq_s}{dt} - \frac{dq_r}{dt} \right] = \frac{dT}{dt} (C_s - C_r) = \phi (C_s - C_r)$$

En consecuencia, la variación de flujo de calor entre muestra y referencia es directamente proporcional a la diferencia de capacidades caloríficas, mediante la constante ϕ (velocidad de calentamiento o enfriamiento).

Contenedores de muestra y muestreo.

Las muestras son encapsuladas en contenedores de aluminio. Estos contenedores se cierran con tapaderas del mismo material y el conjunto se lleva a una prensa para su sellado. Con estas cápsulas de aluminio no se debe sobrepasar la temperatura de 600 °C, pues el aluminio tiene un punto de fusión de 660 °C y se correría el grave riesgo de que el Al se alée con los pocillos de Pt-Ir del calorímetro. En los calorímetros modernos de DSC, el programa de software advierte de dicho peligro en el caso de que se introduzca una temperatura mayor de 600 °C. Existen en el mercado contenedores de oro o grafito con los cuales se podría rebasar la temperatura de 600 °C y/o utilizar muestras que reaccionan con el Al; igualmente se han descrito contenedores de vidrio que aún no están disponibles en el mercado.

El material de referencia, en la mayoría de análisis rutinario de DSC, es simplemente un contenedor sellado y vacío, si bien, en situaciones excepcionales que requieren gran precisión, puede utilizarse alúmina. El conjunto muestra + referencia es purgado con un gas inerte o reactivo (la alta conductividad térmica del He lo hace indeseable para medidas térmicas, aunque presenta ventajas para el análisis de gases emitidos). Para rangos de bajas temperaturas, como los utilizados en el presente trabajo, el DSC puede acoplar un equipo de refrigeración con nitrógeno líquido que permite bajar hasta -175 °C (loc. cit.).

Las muestras ideales para el DSC deben estar en forma de polvos densos o como discos del espesor de una película. En el caso de muestras líquidas se debe emplear una jeringa. Ante la posibilidad de que se formen productos volátiles durante el calentamiento de la muestra, se deberán utilizar cápsulas agujereadas, o bien cápsulas de alta presión. Las cápsulas perforadas son muy aconsejables cuando se desee estudiar la reacción de la muestra con el gas de purga. Es muy recomendable que el

total de la masa (muestra + tapadera + contenedor) sea anotada antes y después del ensayo, a fin de saber si ha habido pérdida de masa durante el análisis; además, el programa de software del DSC pedirá el peso de la muestra como un dato necesario para poder poder calcular la entalpía específica de un pico (J/g).

Interpretación de las curvas DSC.

La Termodinámica clasifica a las transiciones de fase en dos grupos bien diferenciados:

a) Transiciones de primer orden: Se caracterizan principalmente porque la temperatura permanece constante durante la transición, y además, tanto el volumen como la entropía presentan una discontinuidad durante a la temperatura, llevando asociada por tanto una variación de energía. En DSC estas transiciones producen un pico. Son la fusión, sublimación, cambio de estructura cristalina, solidificación, etc..

b) Transiciones de segundo orden. Se realizan sin discontinuidades en el volumen y en la entropía (sólo una inflexión) y, por tanto, no se producen manifestaciones energéticas. En cambio, otras propiedades, como los coeficientes de dilatación y los calores específicos a presión constante, experimentan cambios discontinuos con la temperatura al pasar de una a otra fase. En DSC estas transiciones aparecen como un salto en la línea de base (cambio en la capacidad calorífica). Como ejemplos de transiciones de segundo orden podemos citar: el cambio de una sustancia ferromagnética en paramagnética en el punto de Curie, la transición del estado superconductor al estado conductor en ausencia de un campo magnético, y la transición vítrea de polímeros.

Un procedimiento usual para comprobar si un determinado proceso es reversible o irreversible, es realizar el correspondiente enfriamiento: si en el mismo sale un pico de la misma energía en sentido contrario, el proceso es reversible; si por

el contrario, el pico desaparece, el proceso es irreversible. En general, los procesos exotérmicos no suelen ser fácilmente reversibles; en contrapartida, sí lo son todas las fusiones y las transiciones sólido-sólido. La atmósfera circundante puede influir, a veces, en la reversibilidad o no de algunos procesos; así, una deshidratación puede ser encontrada reversible en un enfriamiento con atmósfera húmeda, y la descomposición de los carbonatos es también reversible en enfriamientos donde está presente una atmósfera de dióxido de carbono.

Las sustancias puras presentan picos endotérmicos de fusión mucho más puntiagudos y estrechos que las mismas sustancias conteniendo impurezas. Cuanto mayor es el porcentaje de impurezas, mayor es la anchura del pico y menos puntiagudo es éste.

IIC2. CONDICIONES OPERATIVAS.

Las curvas calorimétricas han sido obtenidas con un aparato DSC 7 de la casa Perkin-Elmer en N₂ dinámico (20 cm³ min⁻¹), a una velocidad de calentamiento de 10 °C min⁻¹ y con cápsulas de aluminio como contenedores de muestra. Las cantidades de muestra pesadas oscilaron entre 2,5 y 36 mg y por un proceso automático se llevaron a normalización.

III. RESULTADOS.

IIIA. RESULTADOS DE LOS REGISTROS DSC DE COMPONENTES FISIOLÓGICOS DEL OJO Y PREPARADOS FARMACOLÓGICOS.

Los datos experimentales resultantes del registro de las curvas DSC a bajas temperaturas de los componentes naturales del ojo (Figs. 11 a 24) y de los preparados farmacológicos más utilizados en Oftalmología (Figs. 25 a 68) se encuentran sumariados en las Tablas III a XV.

Todos los registros muestran en común al menos un efecto endotérmico de interés en el rango de temperaturas -47 a -12 °C, que puede estar acompañado de uno o más efectos exotérmicos a temperaturas por debajo de -45 °C.

En la región de aparición del efecto endotérmico se pueden distinguir dos subregiones: una, en torno a -25 °C y otra alrededor de -40 °C. Es preciso hacer constar que de estos dos endotérmicos, el que aparece en torno a -25 °C suele ser de gran intensidad (el valor de ΔH hasta 8.1 Jg^{-1}), mientras que el que se presenta a -40 °C es de escaso desarrollo ($\Delta H = 0.2 \pm 0.1 \text{ Jg}^{-1}$) e interés. Una excepción es la que presentan los registros DSC de los aceites de silicona, con dos endotérmicos consecutivos y de área significativa con picos a -47 y -36 °C.

La región correspondiente a la aparición de los efectos exotérmicos se extiende desde -61 °C hasta el límite inferior de la región de los endotérmicos.

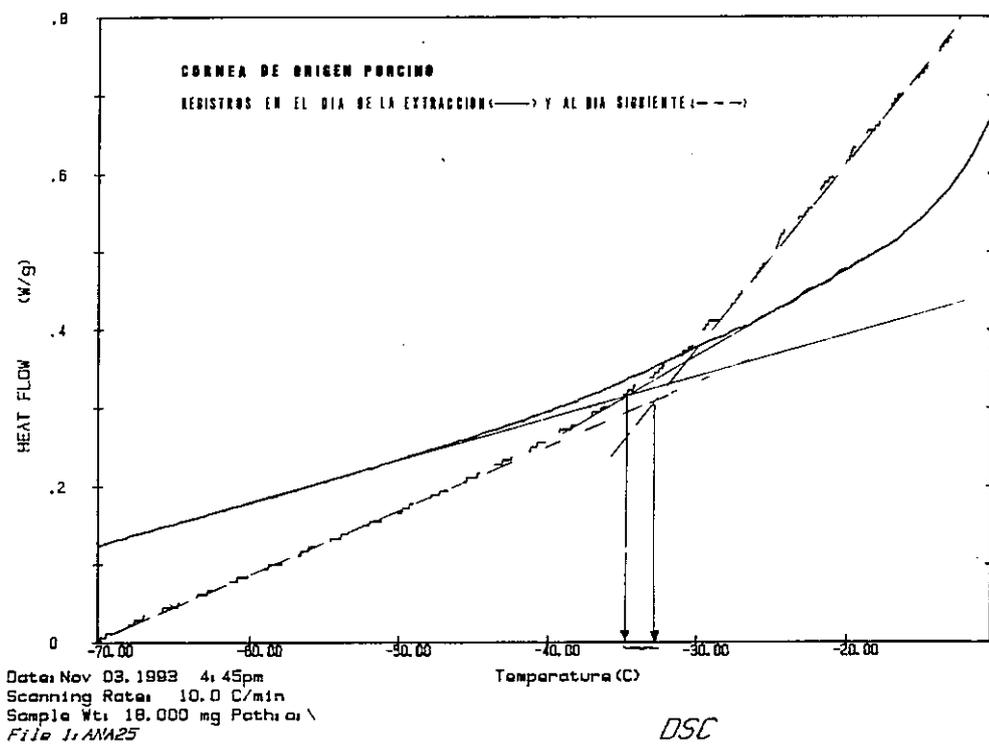
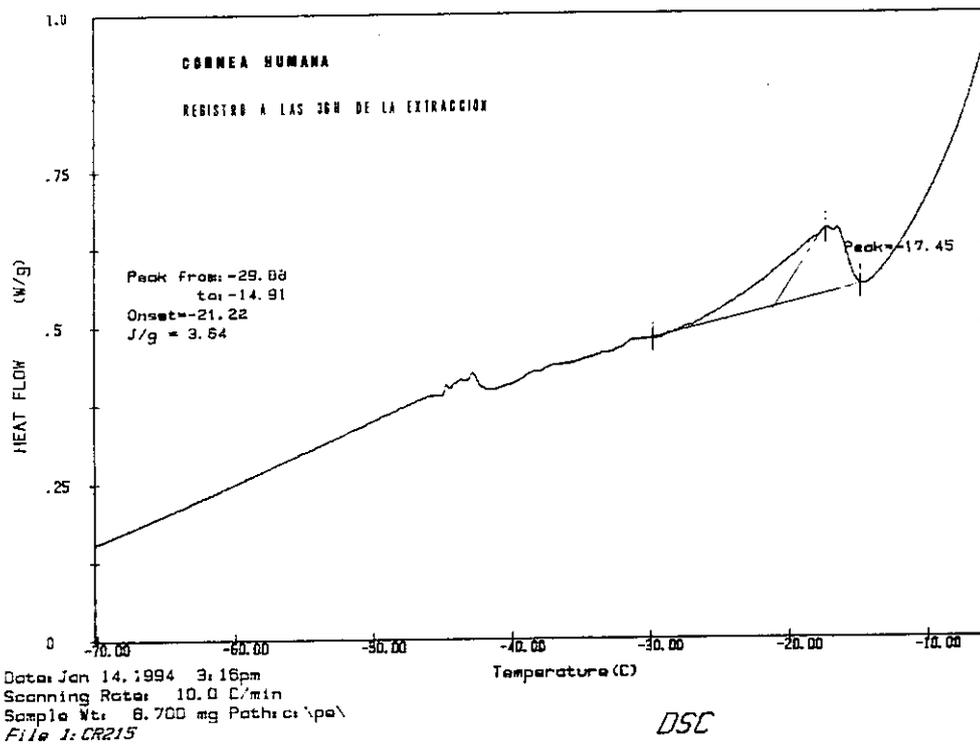


Fig. 11.- Curva DSC de córnea humana
Fig. 12.- Curva DSC de córnea de origen porcino

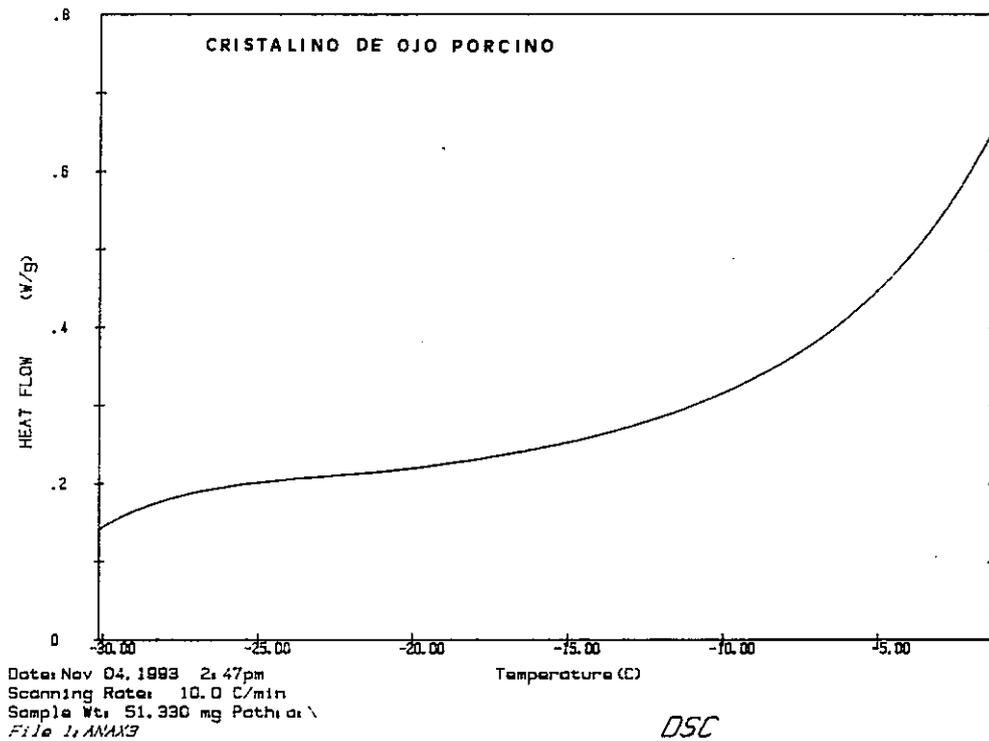
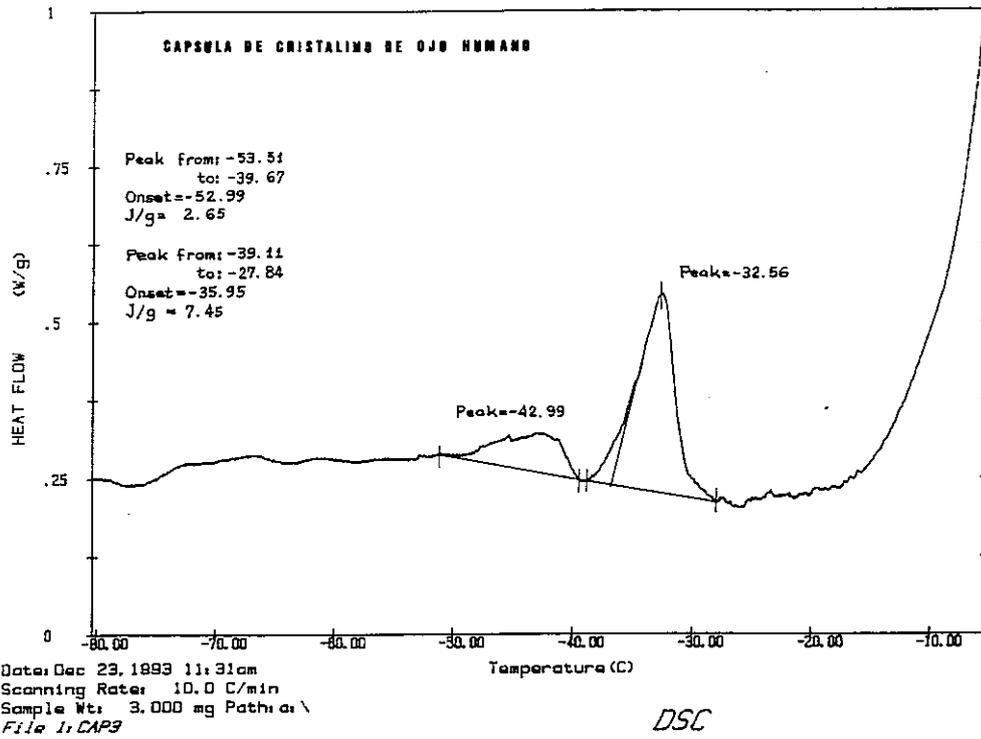


Fig. 13.- Curva DSC de cápsula de cristalino de ojo humano

Fig. 14.- Curva DSC de cristalino de ojo porcino

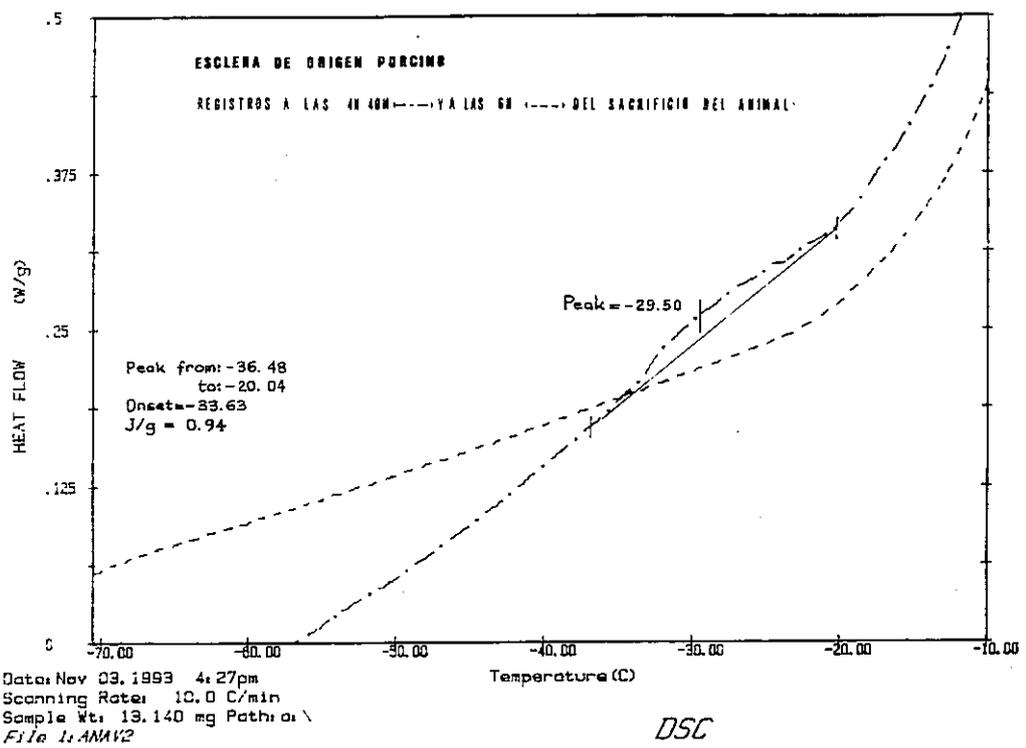


Fig. 15.- Curva DSC de esclera porcina

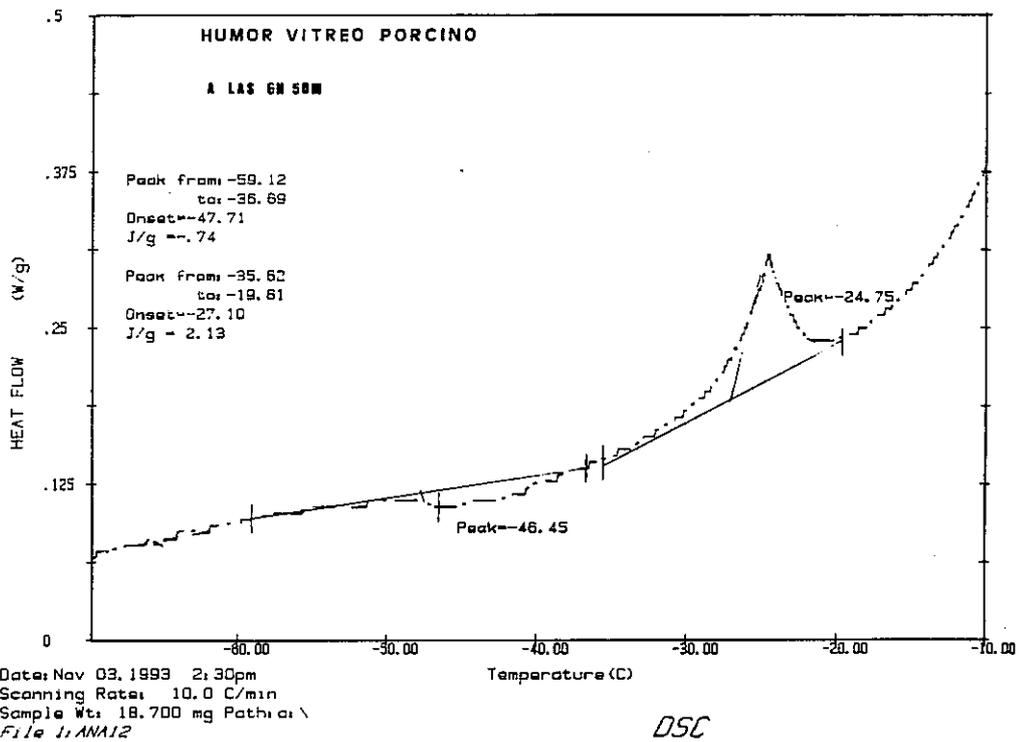
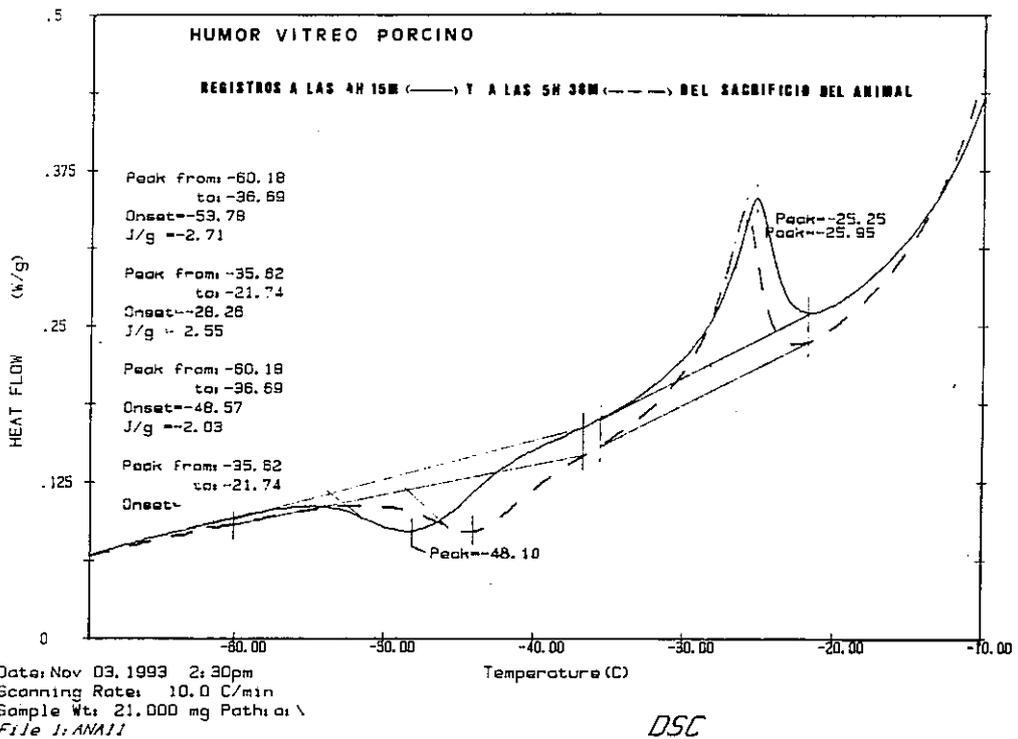


Fig. 16.- Curva DSC de humor vítreo porcino (primeros registros)
Fig. 17.- Curva DSC de humor vítreo porcino (registro a las 7 h. de la enucleación)

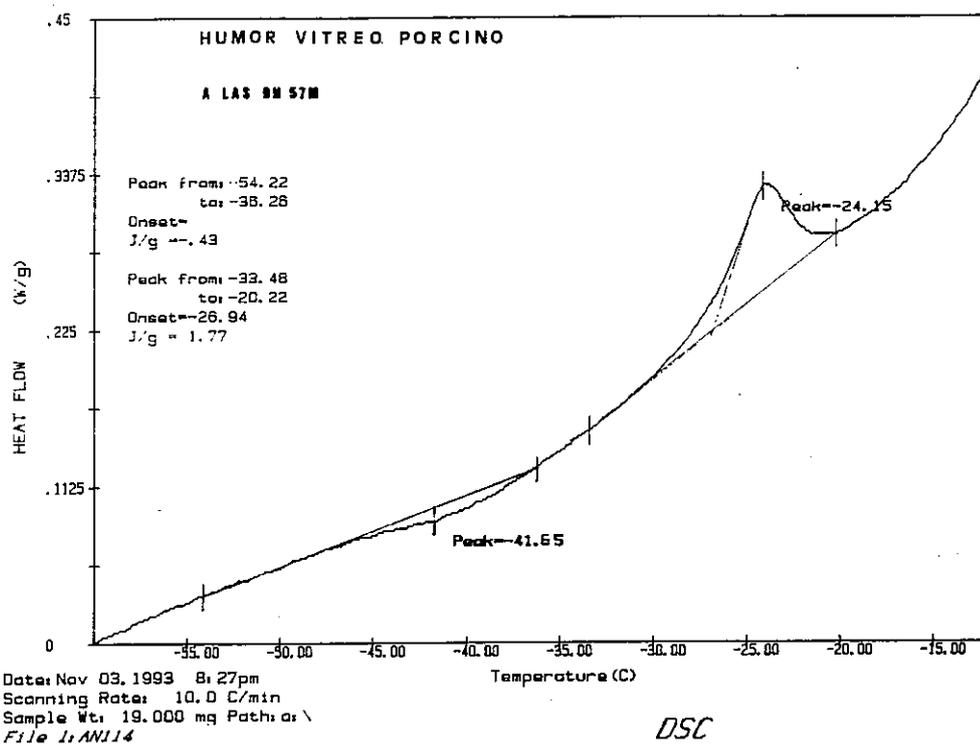


Fig. 18.- Curva DSC de humor vítreo porcino (registro a las 10 h. de la enucleación)

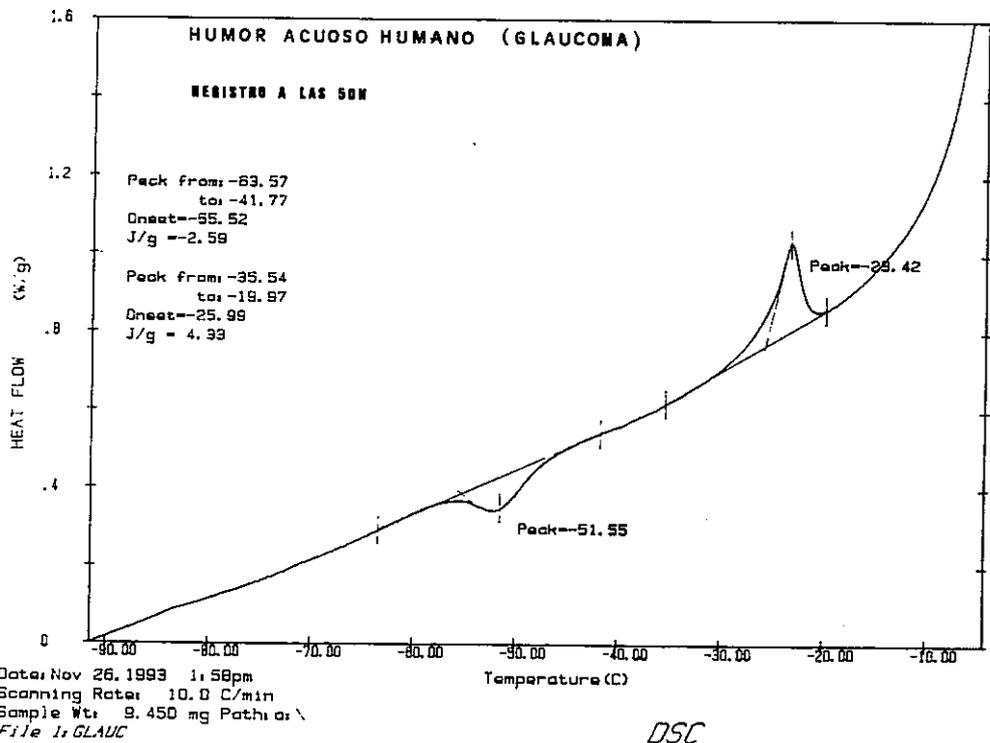
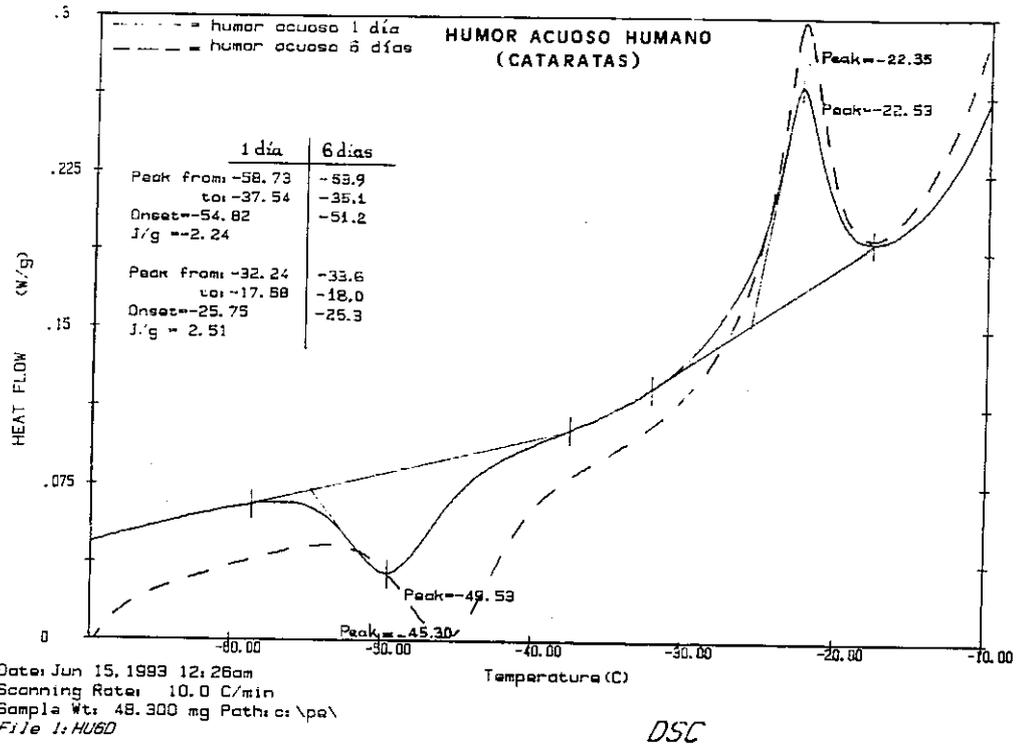


Fig. 19.- Curva DSC de humor acuoso humano (cataratas)

Fig. 20.- Curva DSC de humor acuoso humano (glaucoma)

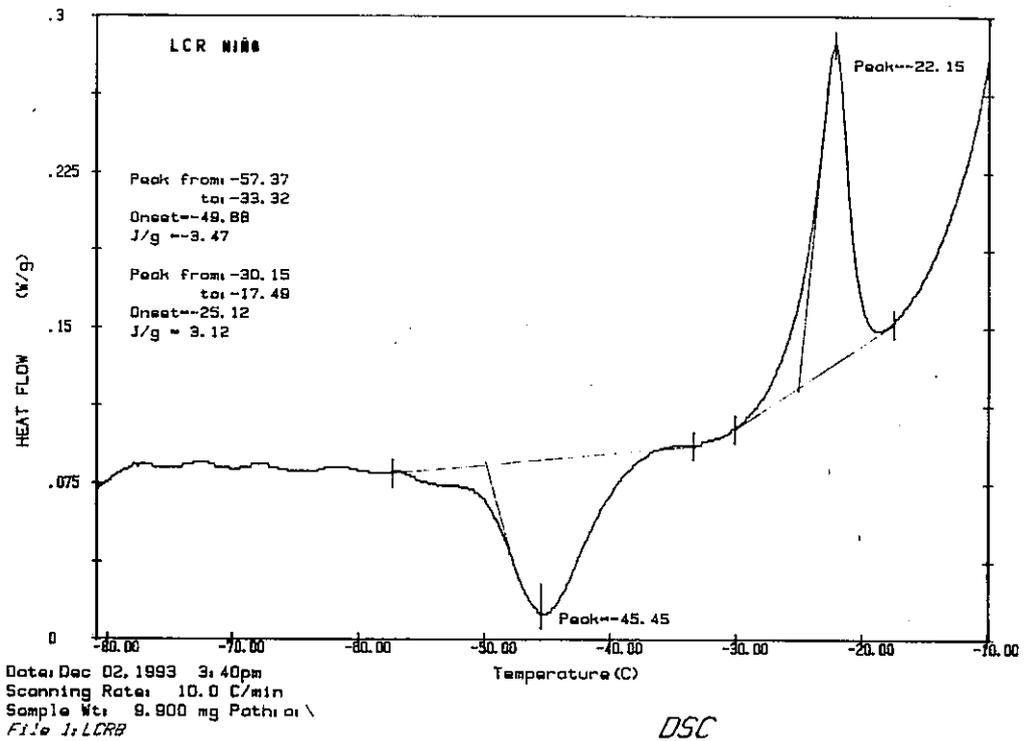
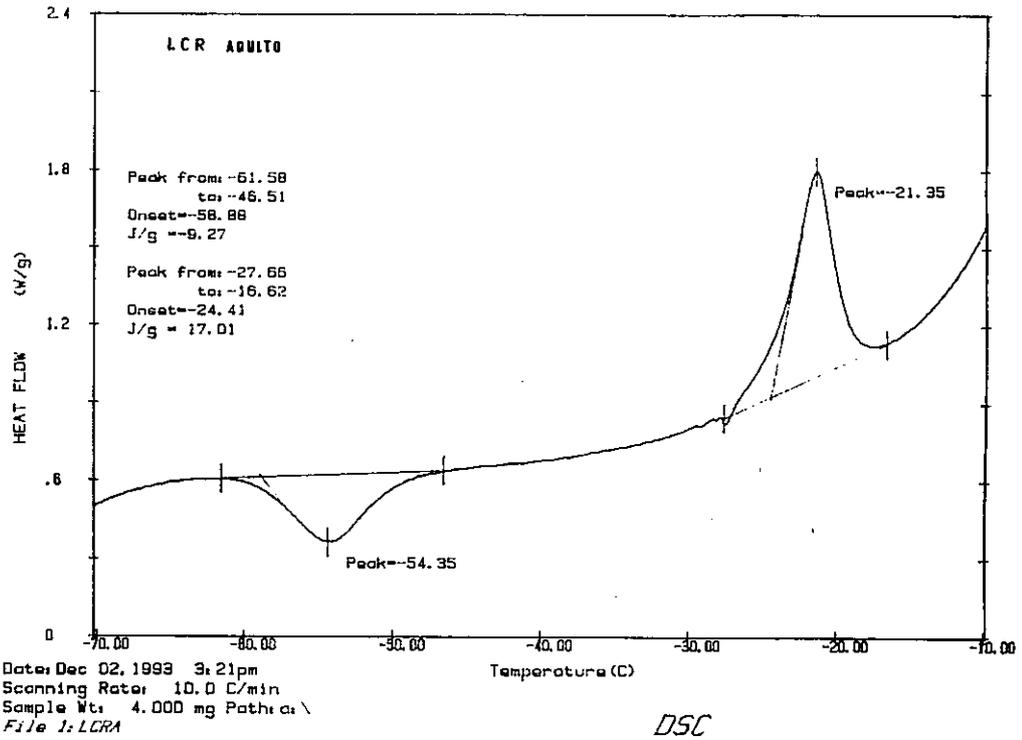


Fig. 21.- Curva DSC de LCR de niño
Fig. 22.- Curva DSC de LCR de adulto

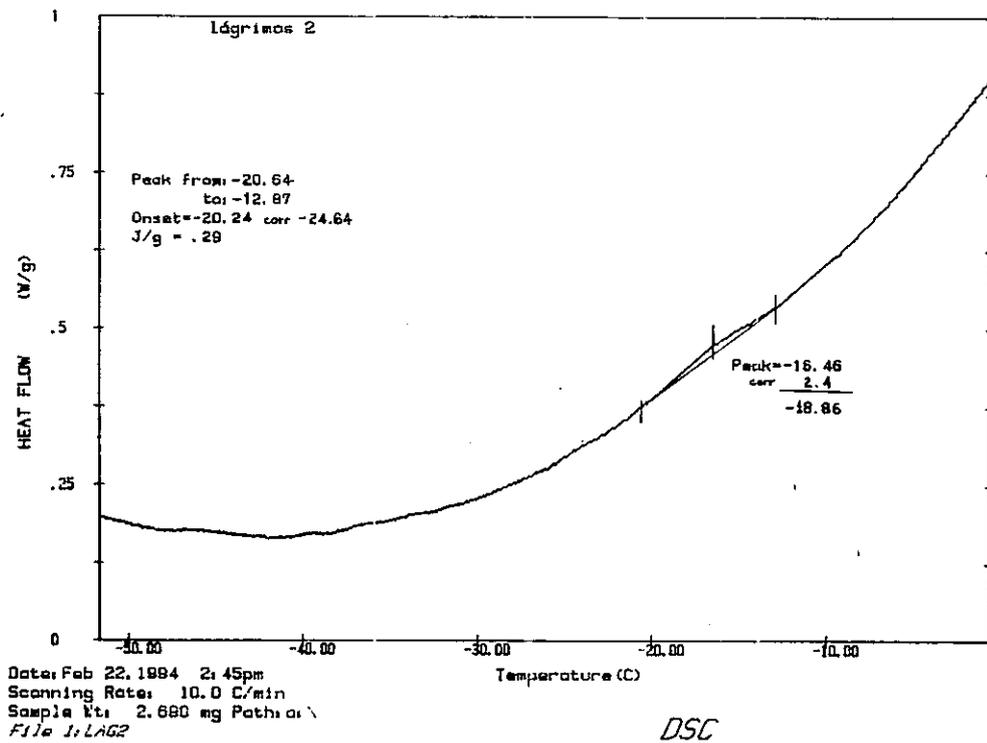
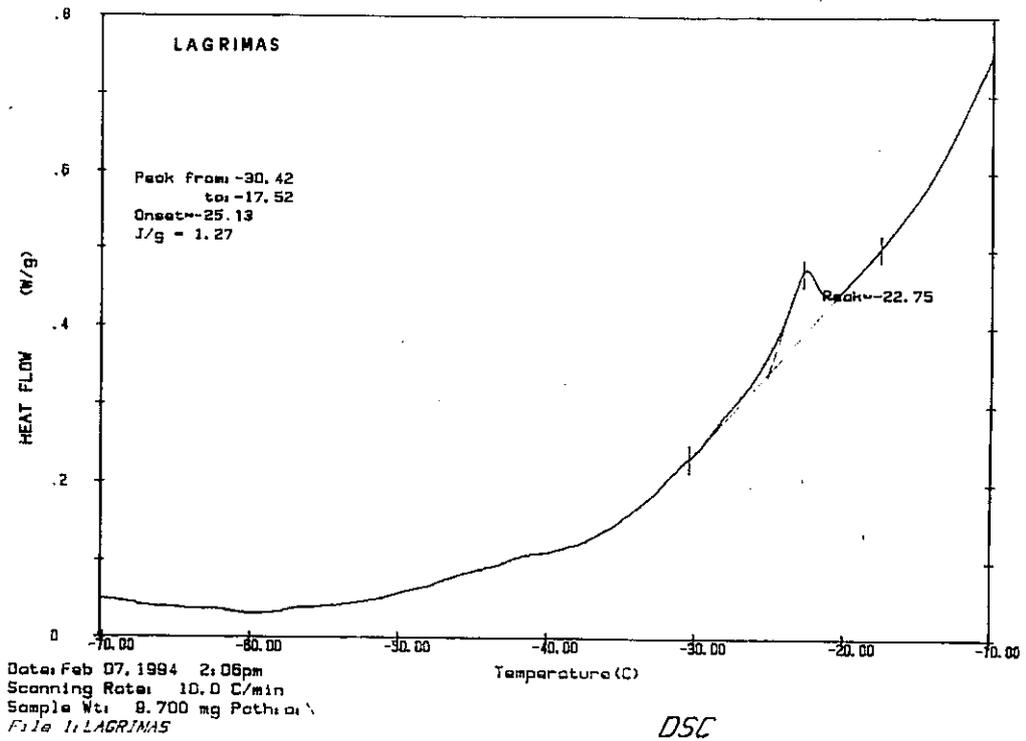


Fig. 23.- Curva DSC de lágrimas (a los 2 días de la recogida)
Fig. 24.- Curva DSC de lágrimas (a los 17 días de la recogida)

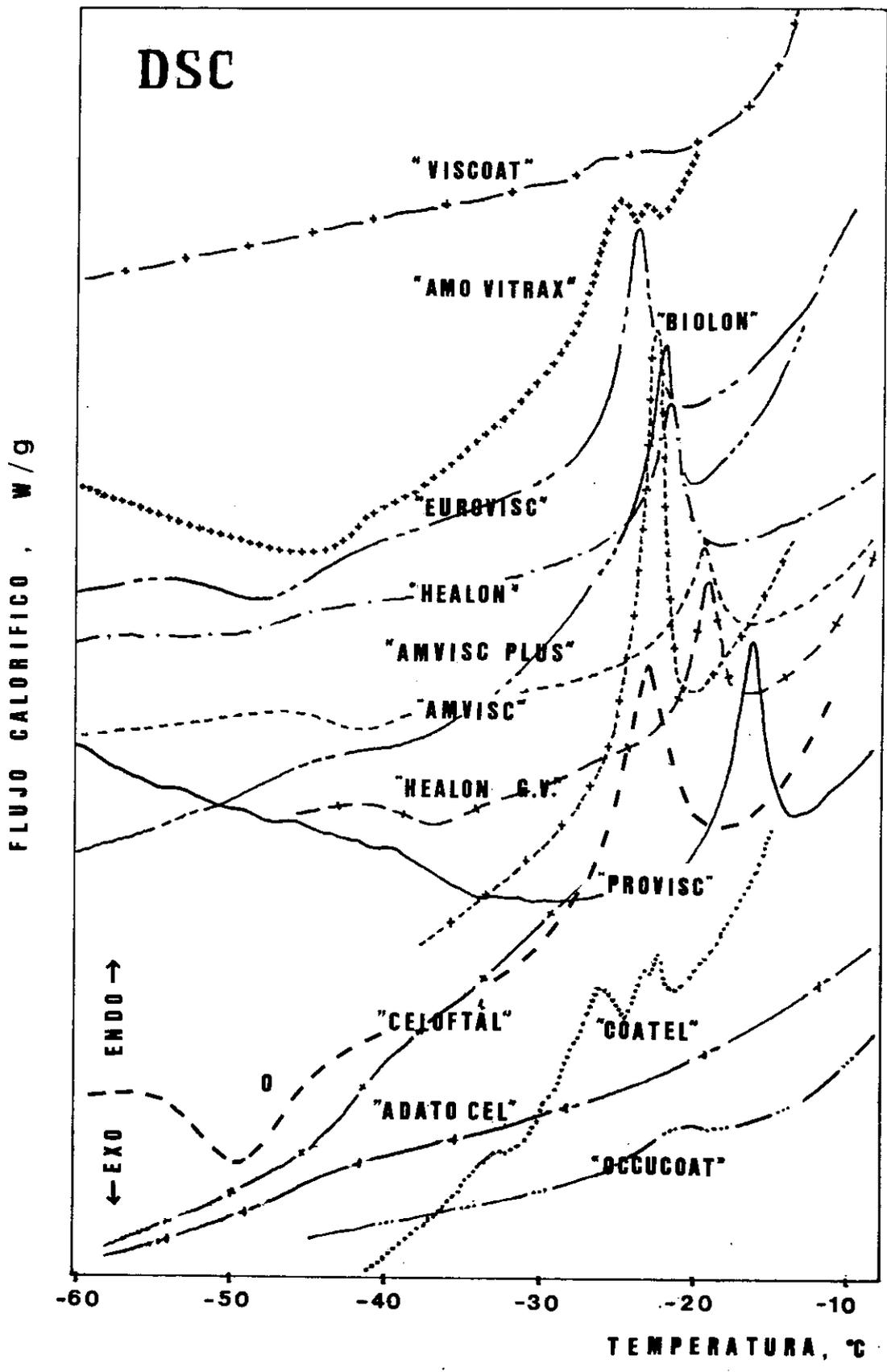


Fig. 25.- Curvas DSC de viscoelásticos comerciales

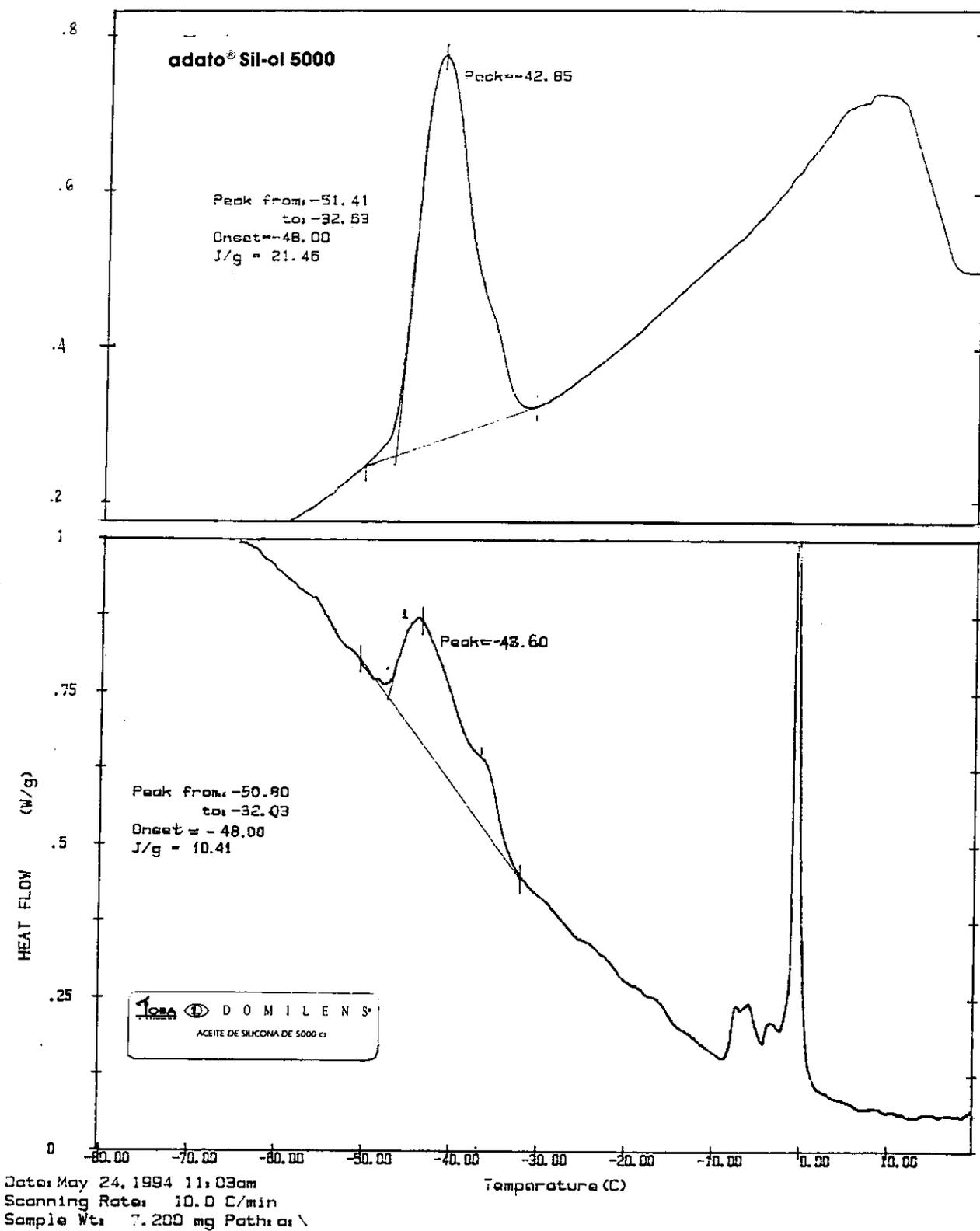


Fig. 26.- Curvas DSC de aceites de silicona de alta viscosidad

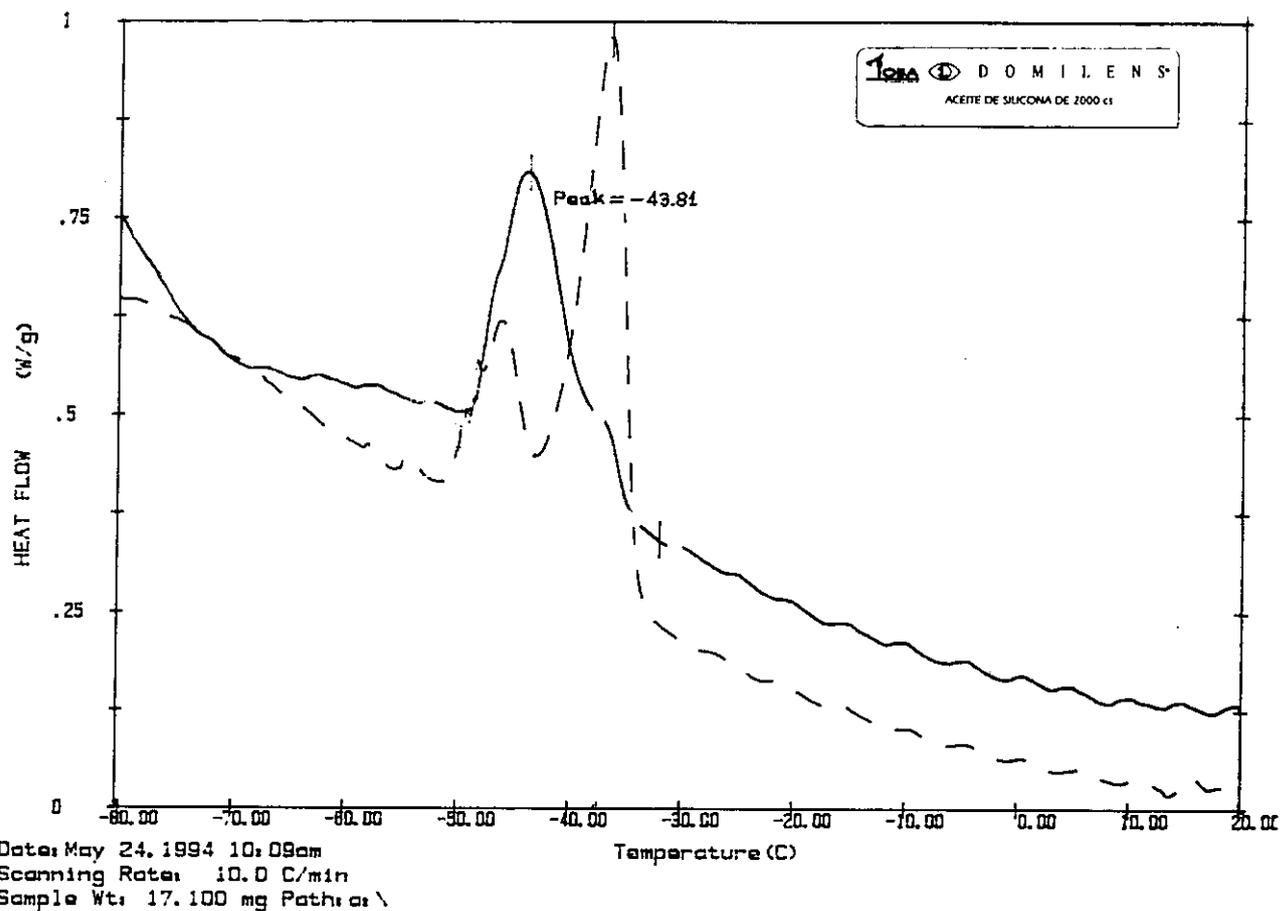


Fig. 27.- Curvas DSC de un aceite de silicona de viscosidad media, sin reenfriamiento y tras reenfriamiento

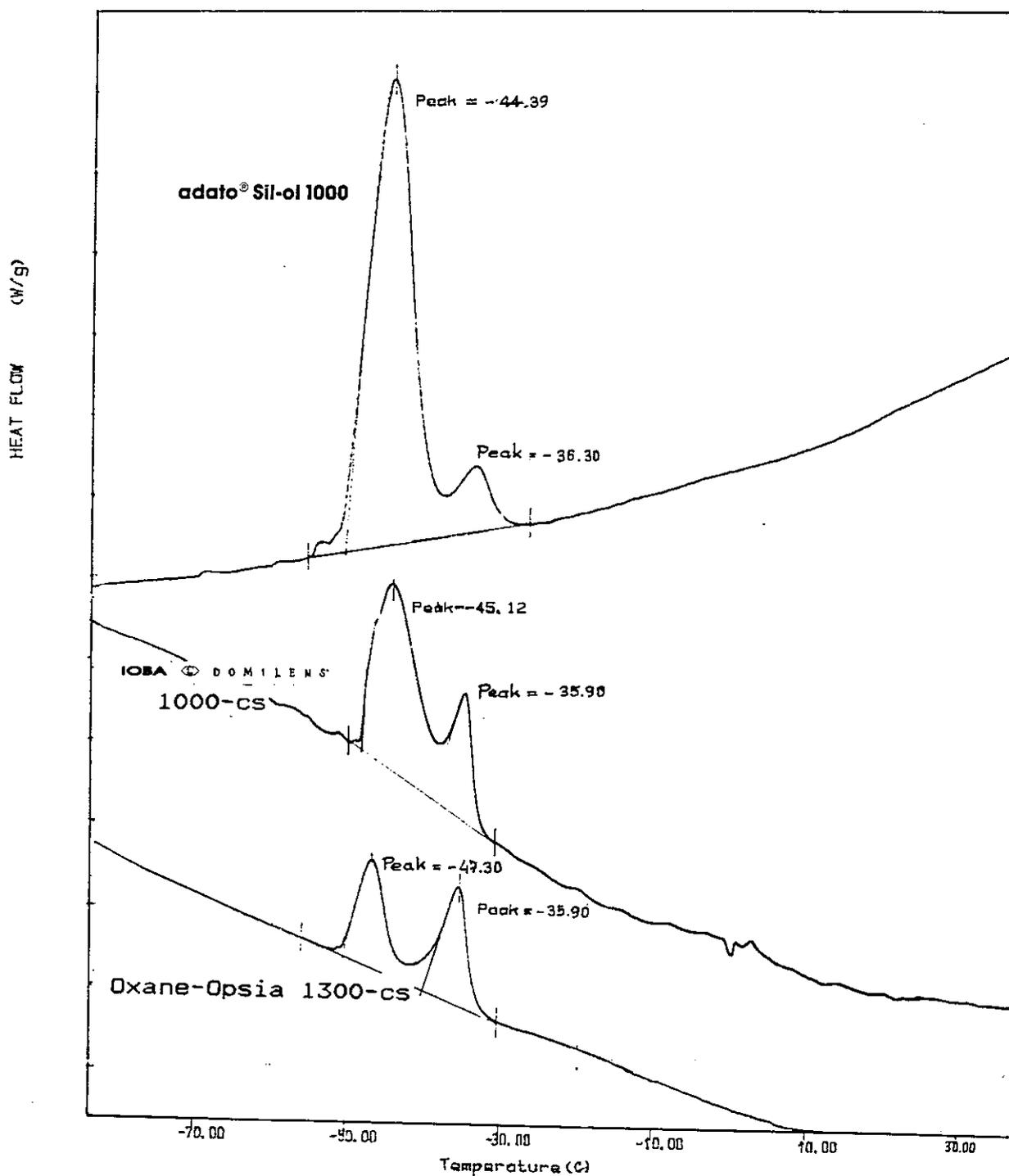


Fig. 28.- Curvas DSC de aceites de silicona de baja viscosidad

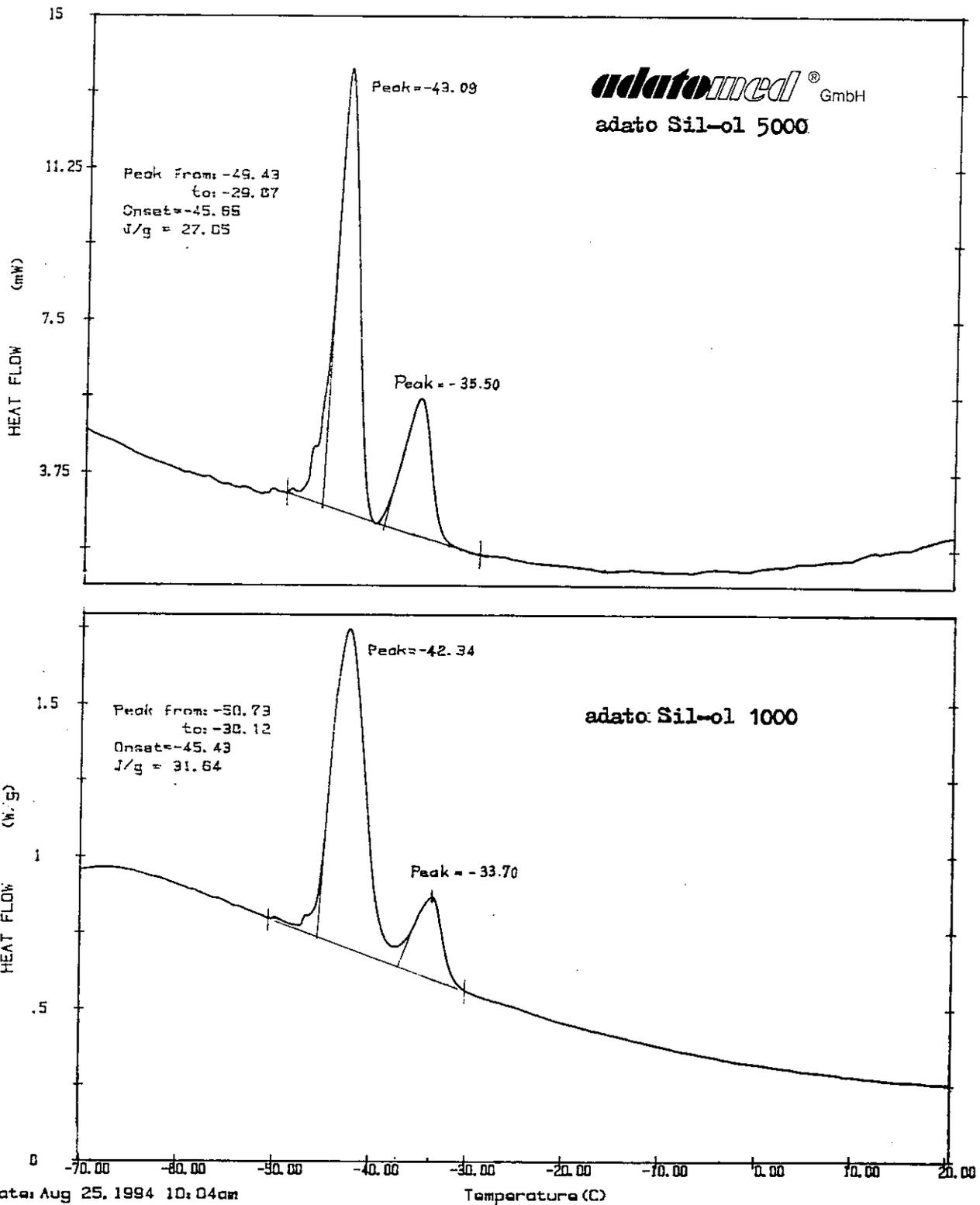


Fig. 29.- Curva DSC de una silicona de alta viscosidad envejecida

Fig. 30.- Curva DSC de una silicona de baja viscosidad envejecida

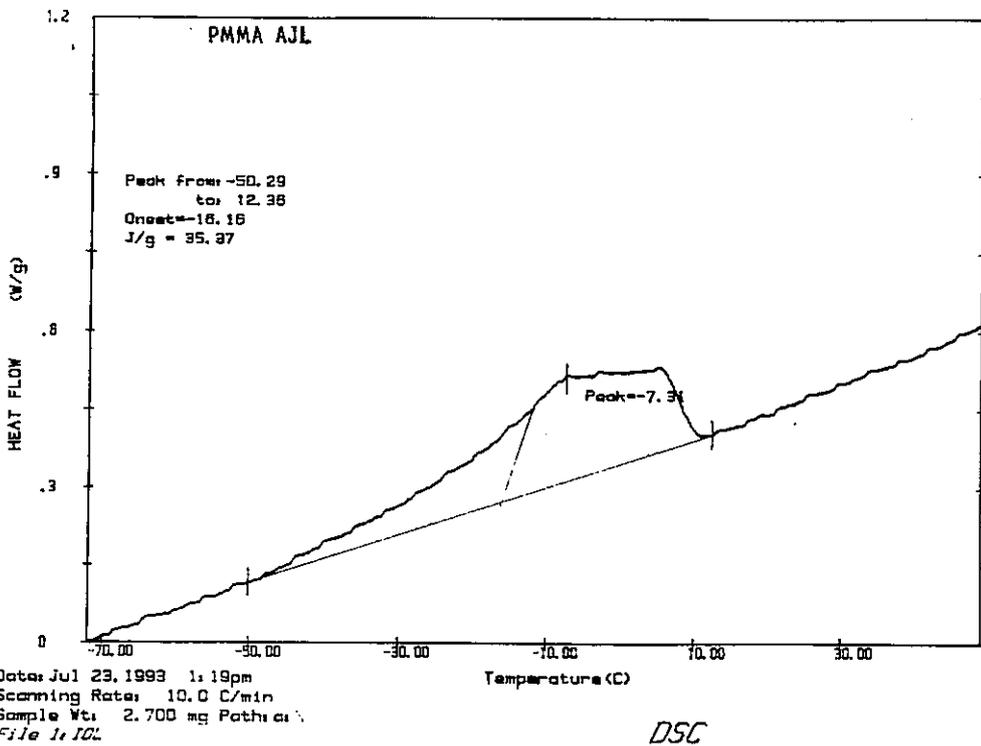
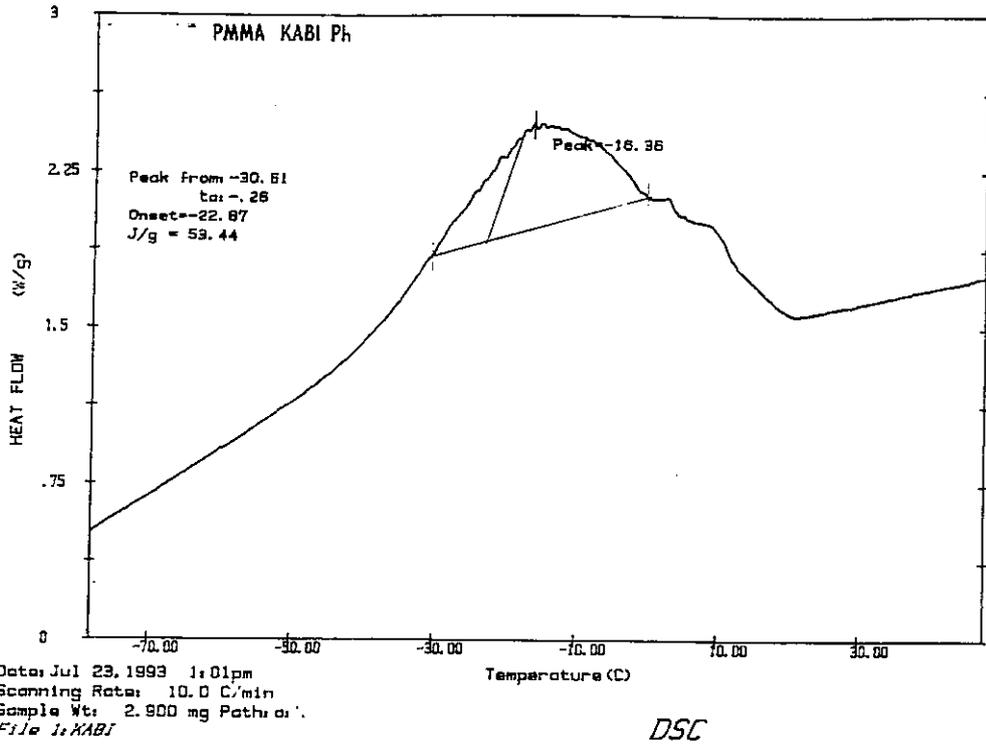


Fig. 31.- Curva DSC de la lente intraocular PMMA Kabi®

Fig. 32.- Curva DSC de la lente intraocular PMMA AJL®

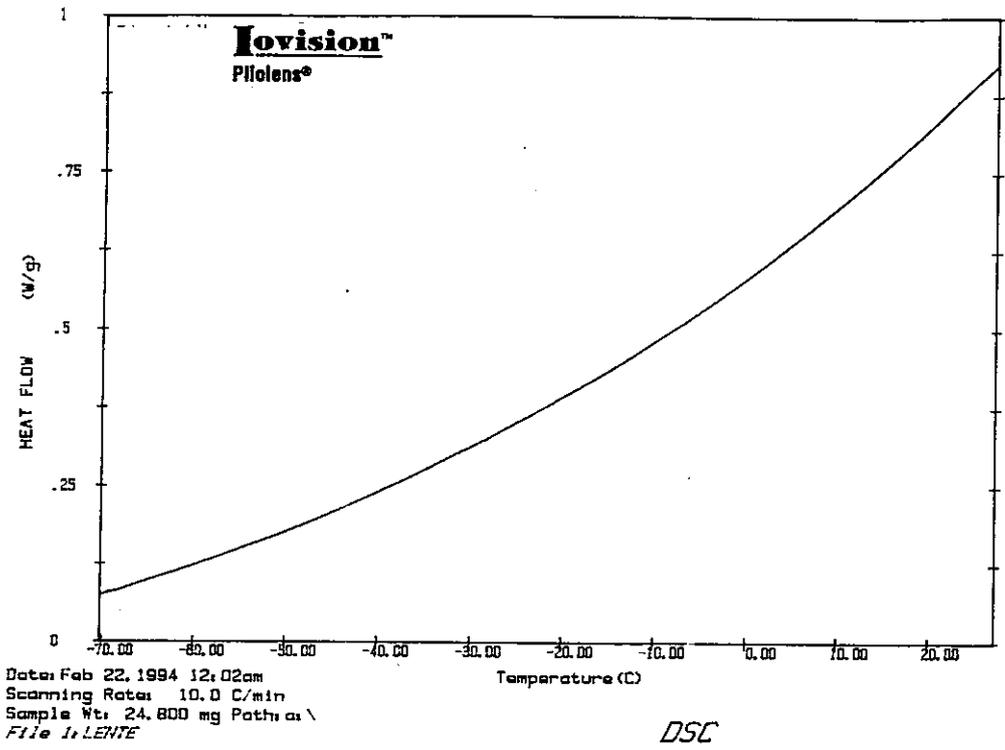


Fig. 33.- Curva DSC de la lente intraocular Iovision-Pliolens®

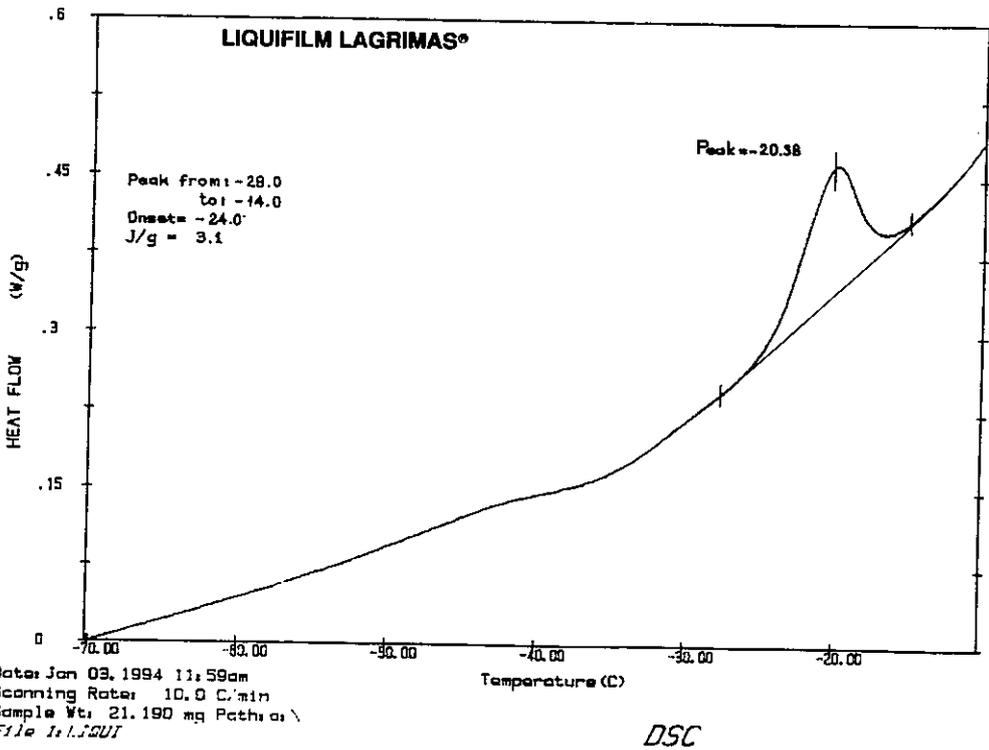
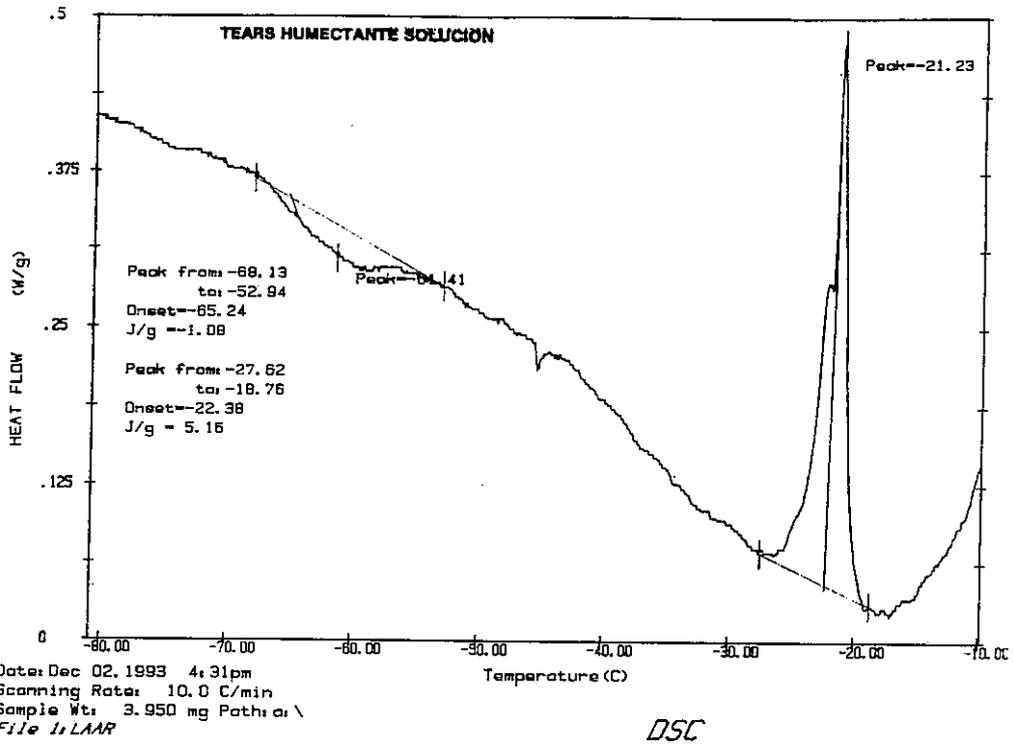


Fig. 34.- Curva DSC de una solución humectante lacrimal (Tears®)

Fig. 35.- Curva DSC de lágrimas artificiales Liquifilm®

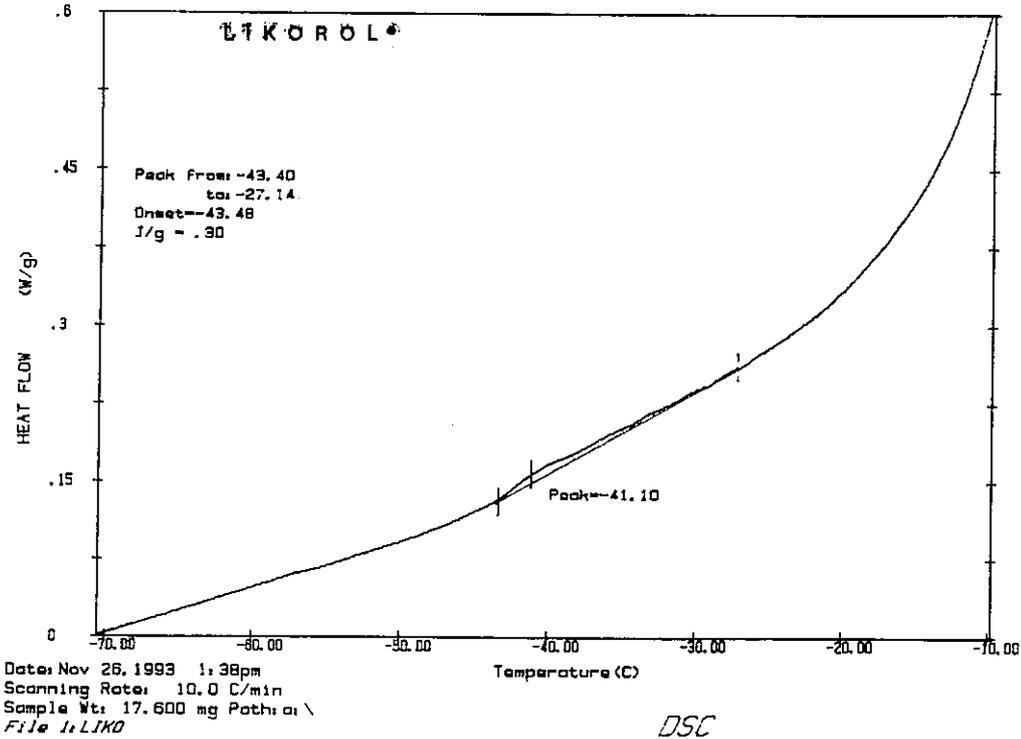
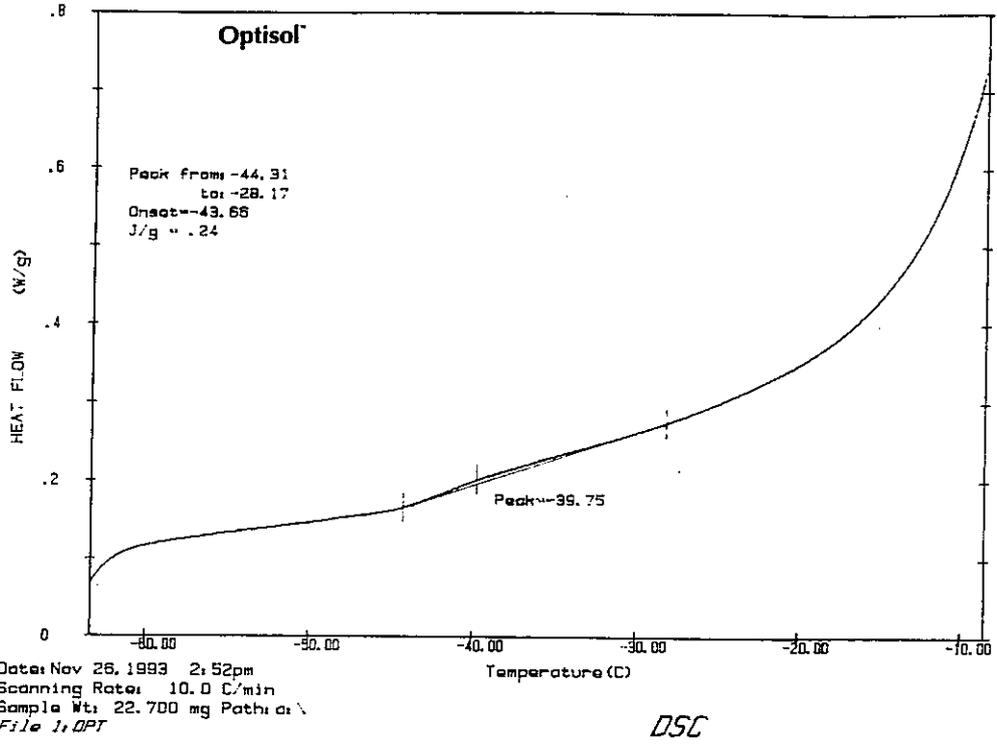


Fig. 36.- Curva DSC de un medio de conservación de córneas (Optisol®)
 Fig. 37.- Curva DSC de otro medio de conservación de córneas (Likorol®)

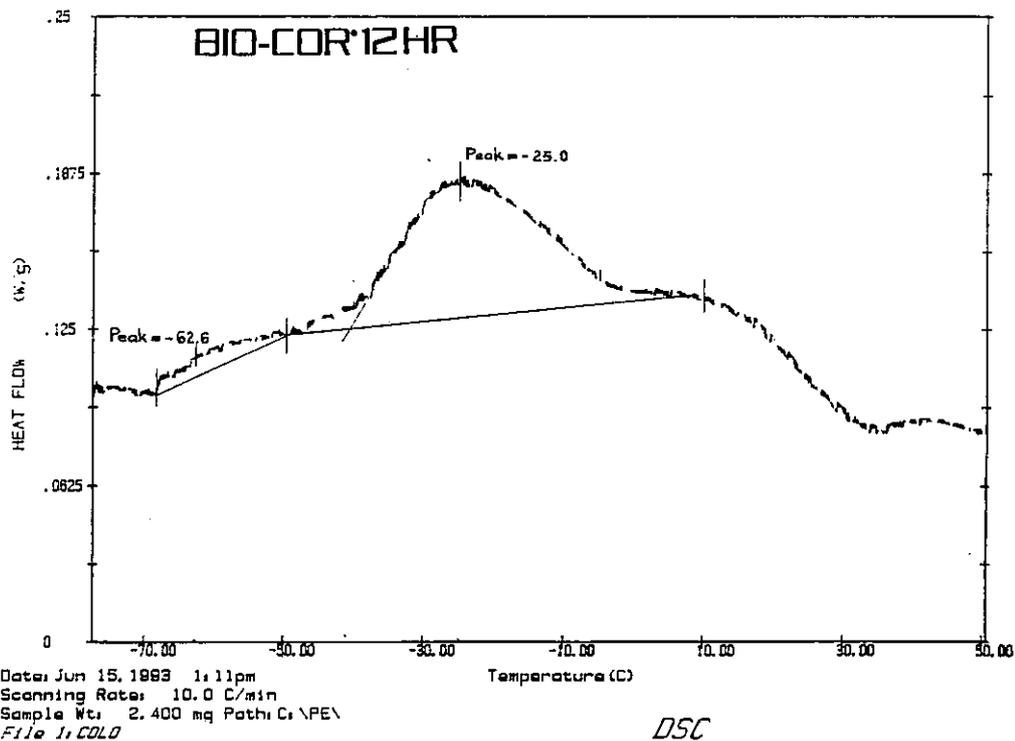
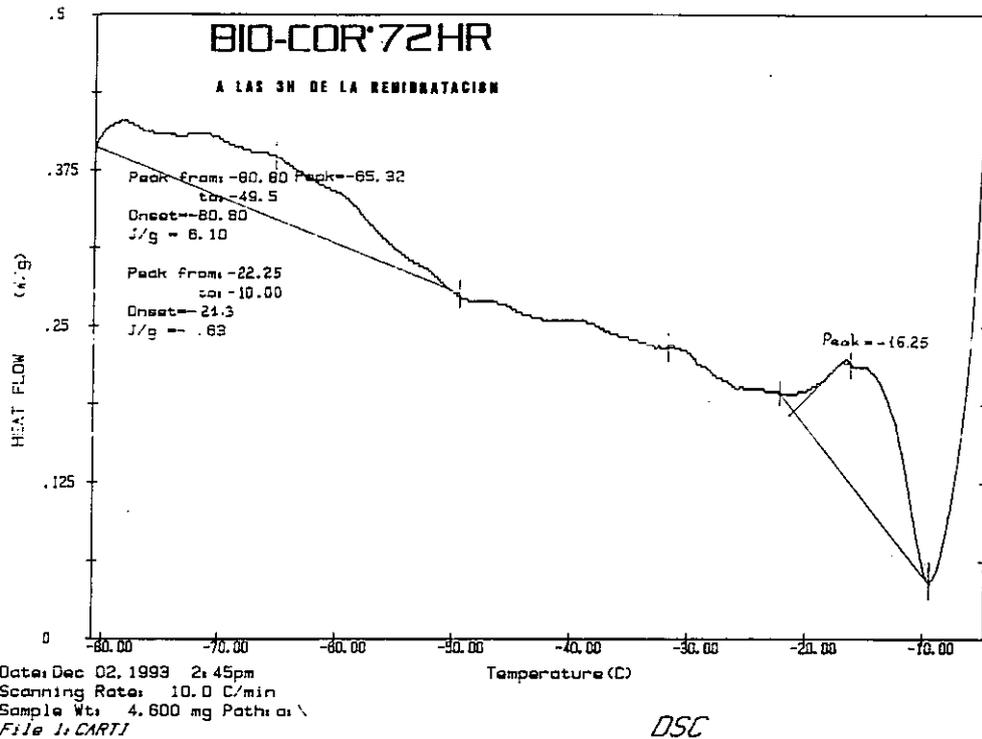


Fig. 38.- Curva DSC del protector corneal Biocorn 72®
Fig. 39.- Curva DSC del protector corneal Biocorn 12®

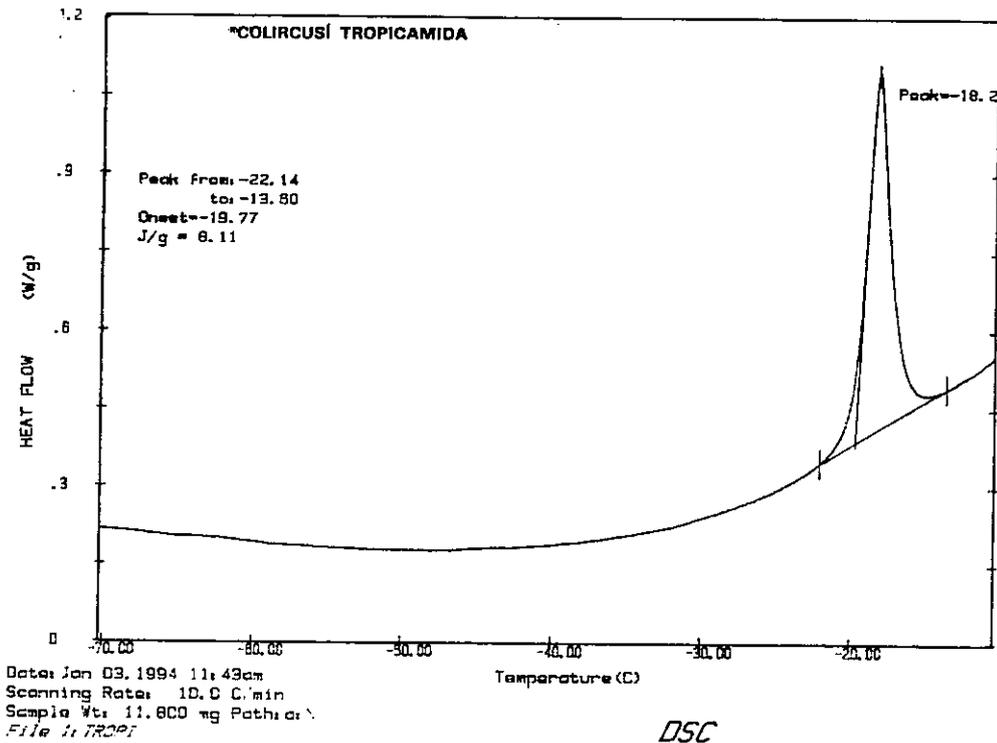
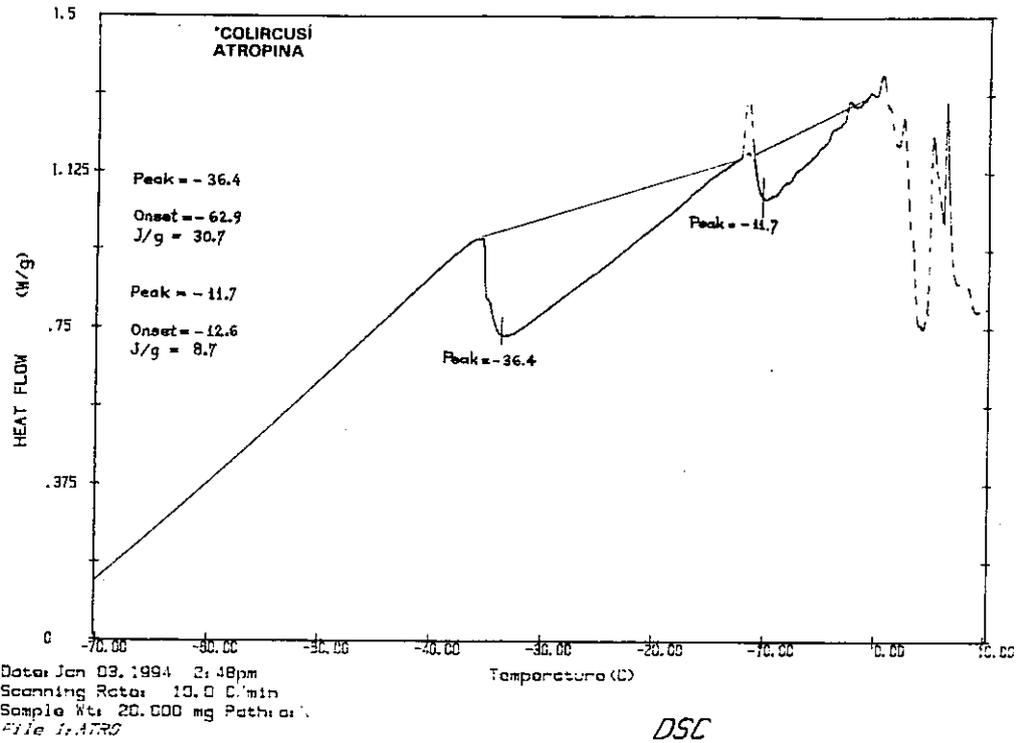


Fig. 40.- Curva DSC de Colircusi atropina®
Fig. 41.- Curva DSC de Colircusi tropicamida®

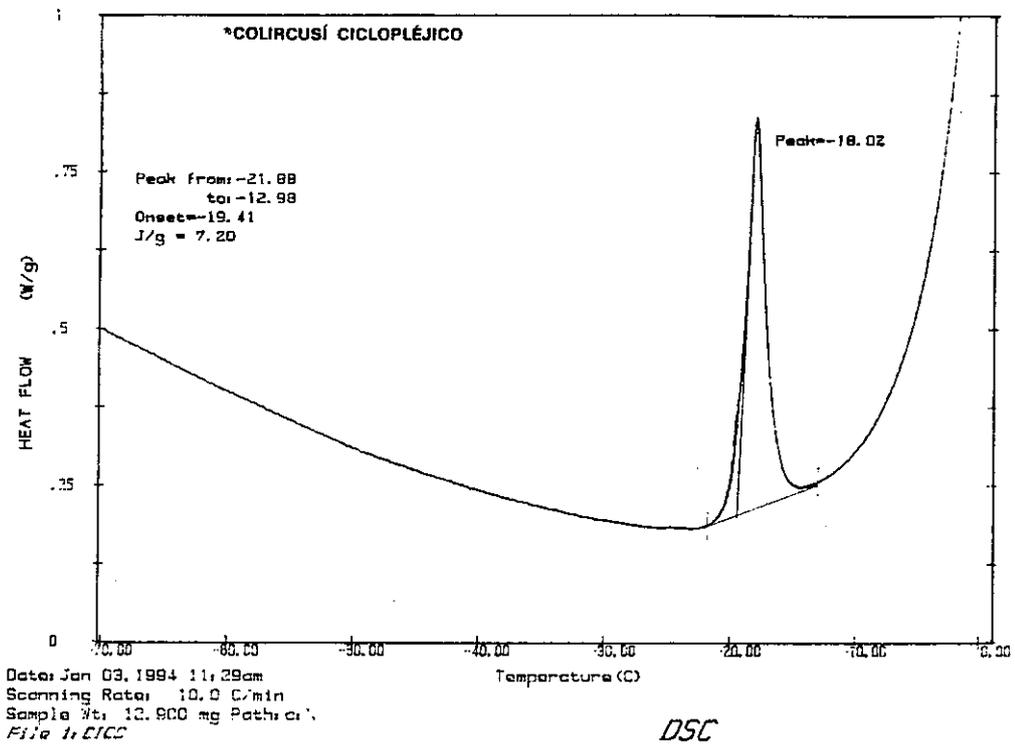


Fig. 42.- Curva DSC de Colircusí ciclopléjico®

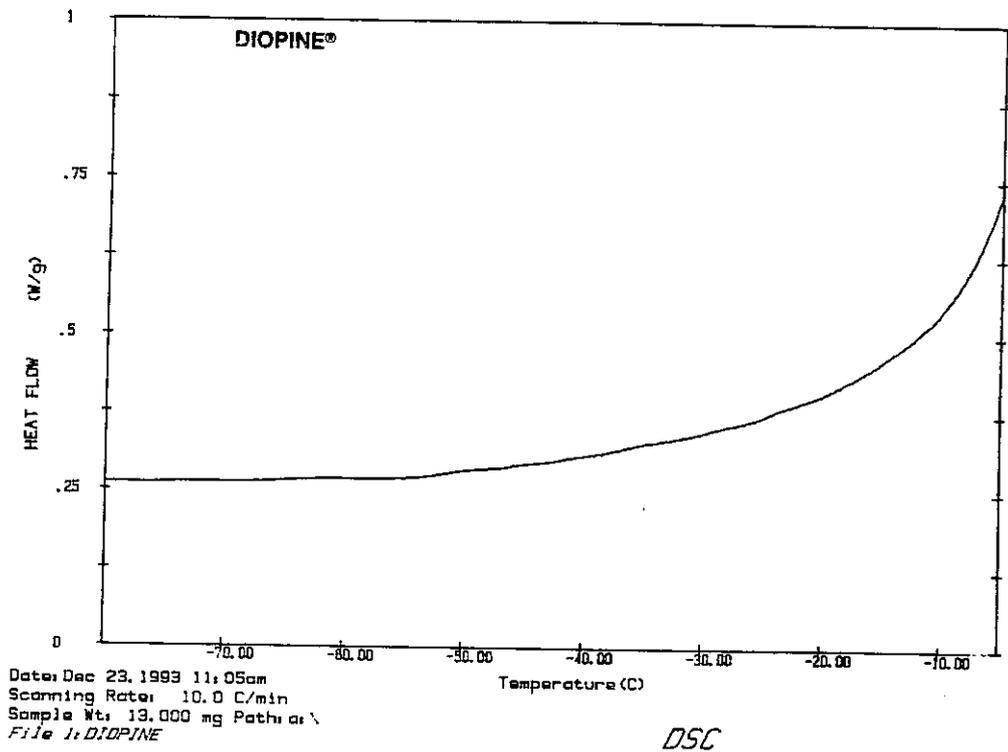
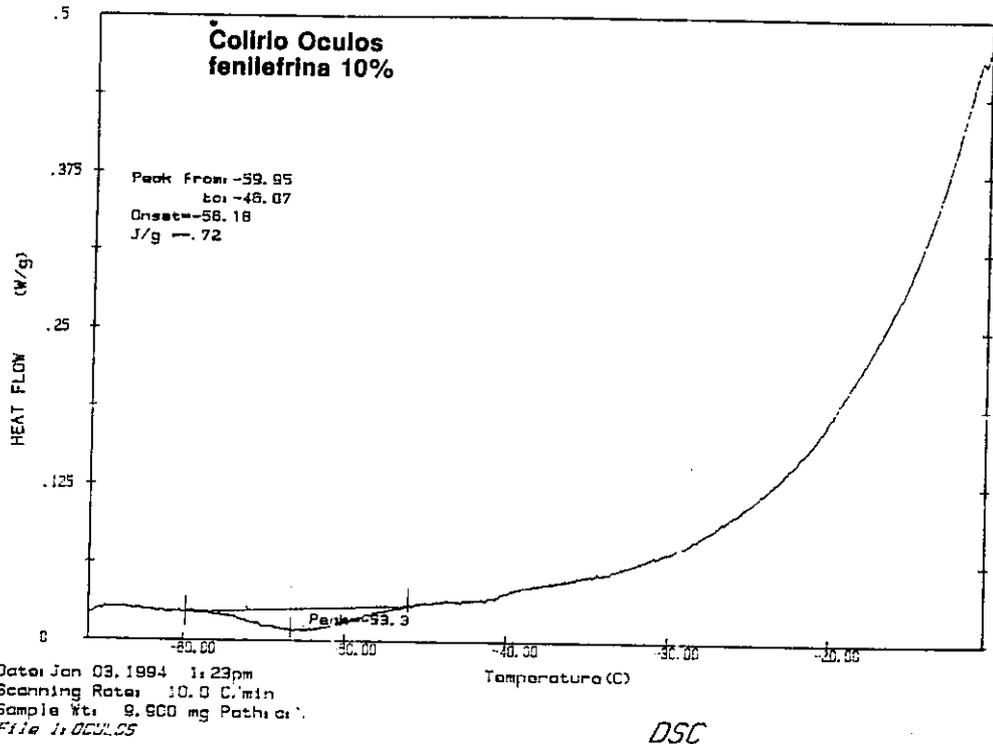


Fig. 43.- Curva DSC de Colirio Oculos®

Fig. 44.- Curva DSC de Diopine®

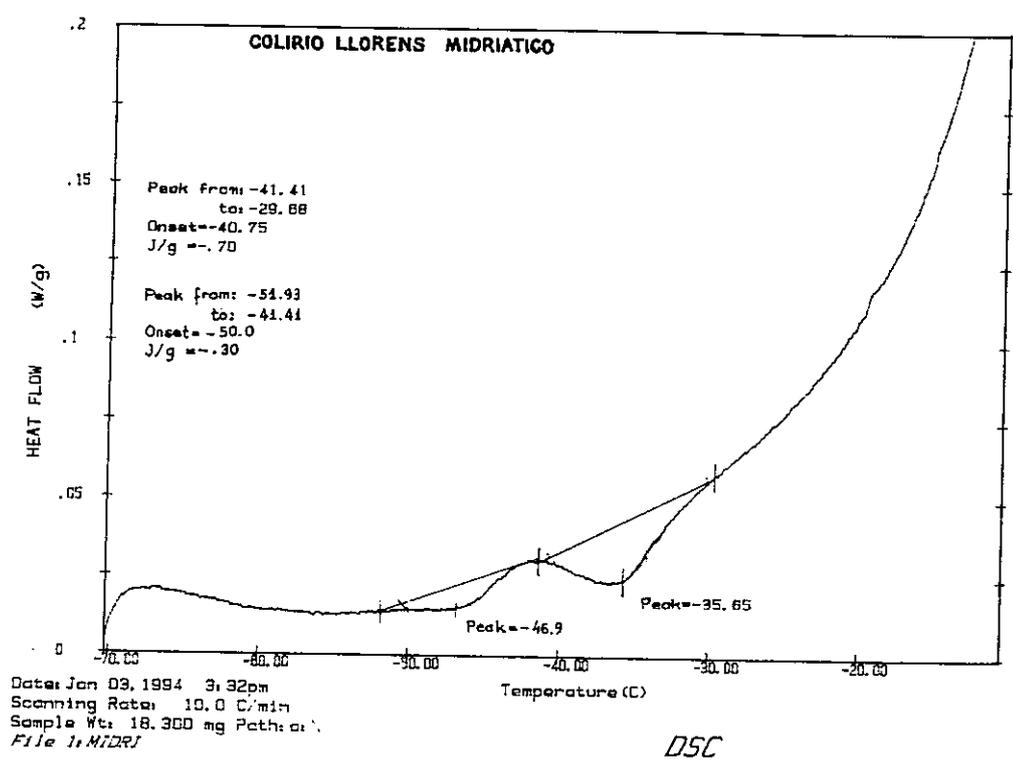


Fig. 45.- Curva DSC de Colirio Llorens midriático®

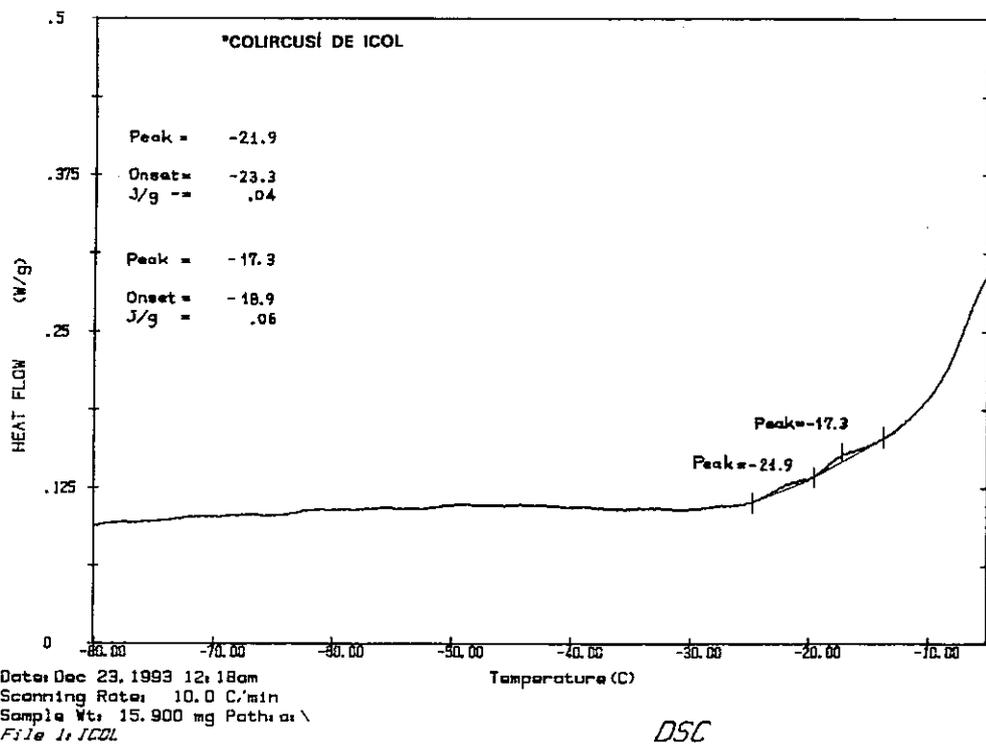
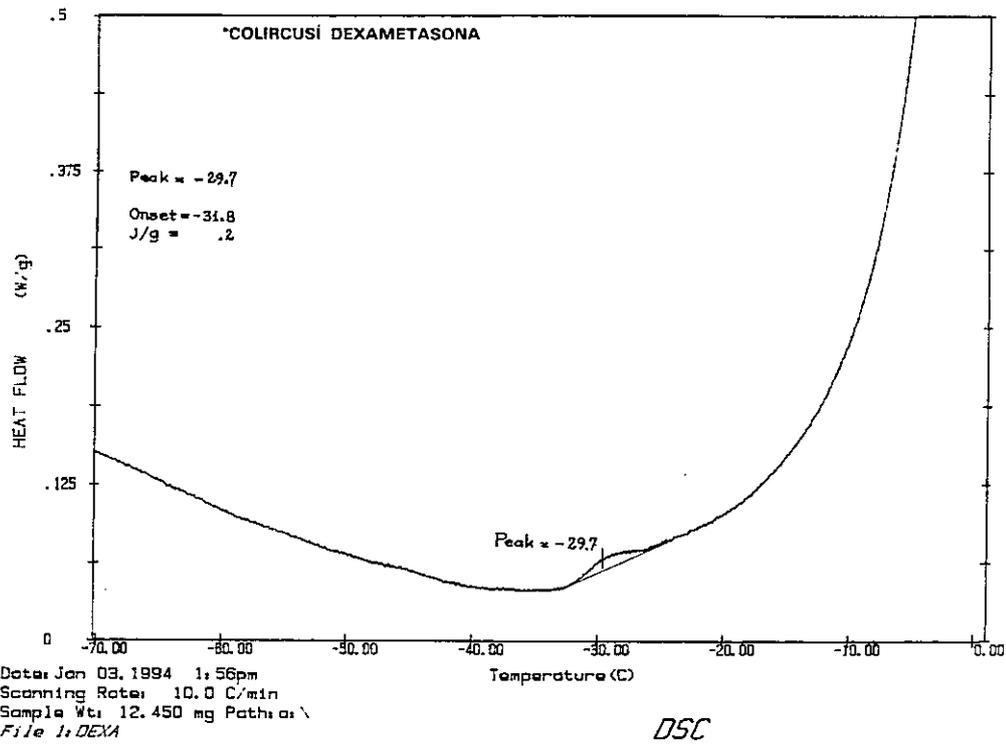


Fig. 46.- Curva DSC de Colircusi dexametasona®

Fig. 47.- Curva DSC de Colircusi de Icol®

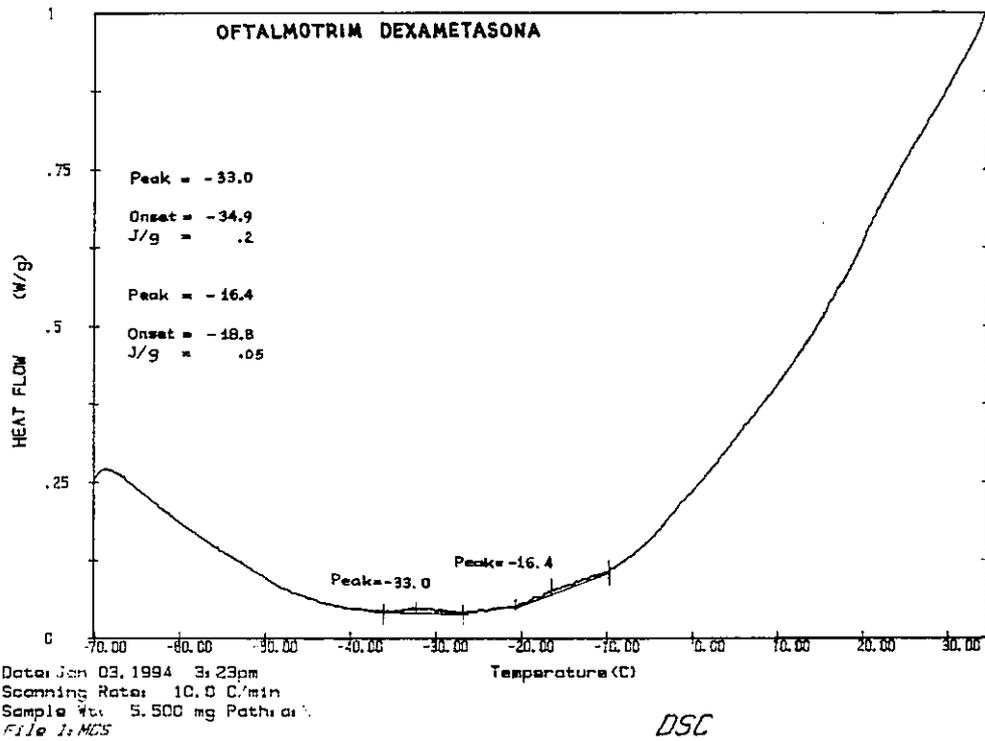
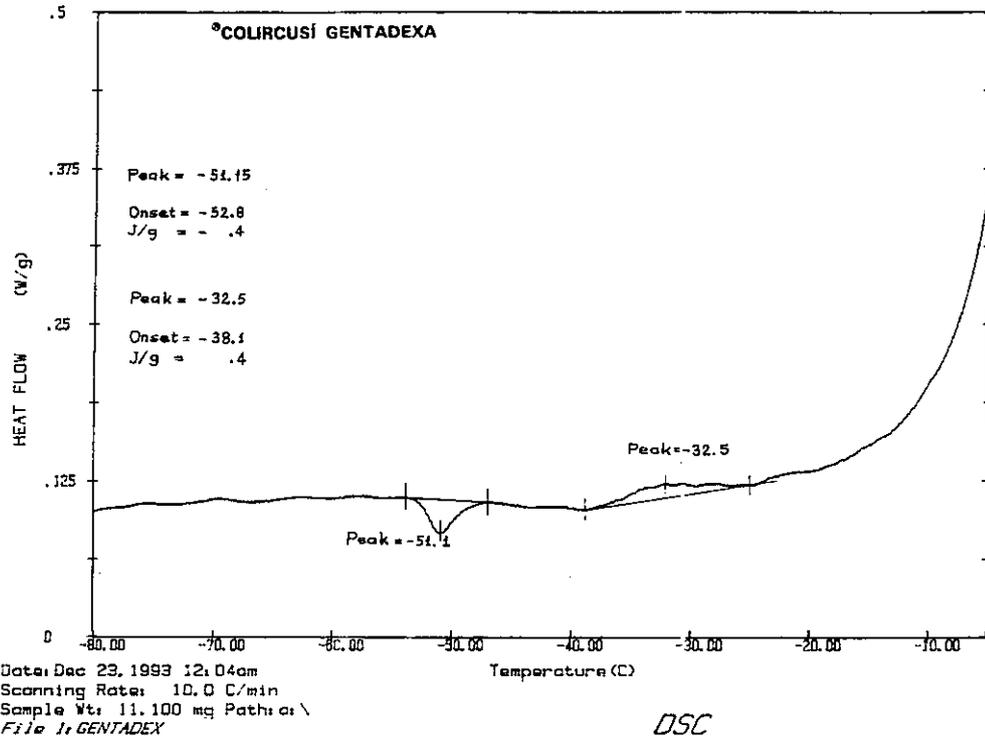


Fig. 48.- Curva DSC de Colircusi gentadexa®

Fig. 49.- Curva DSC de Oftalmotrim dexa®

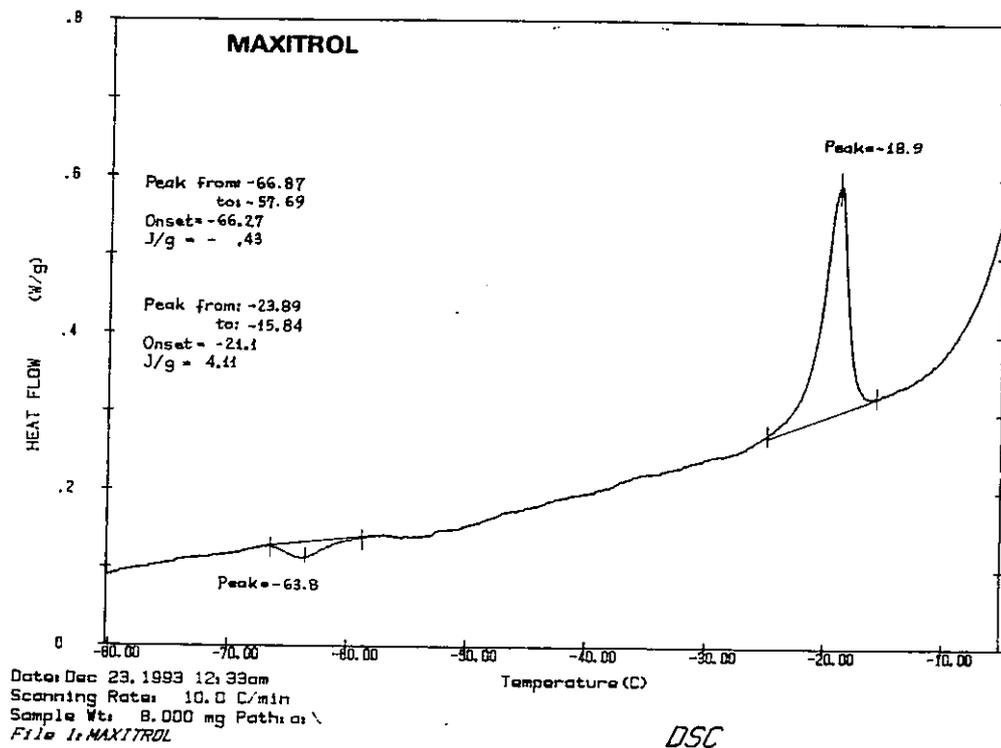


Fig. 50.- Curva DSC de Maxitrol®

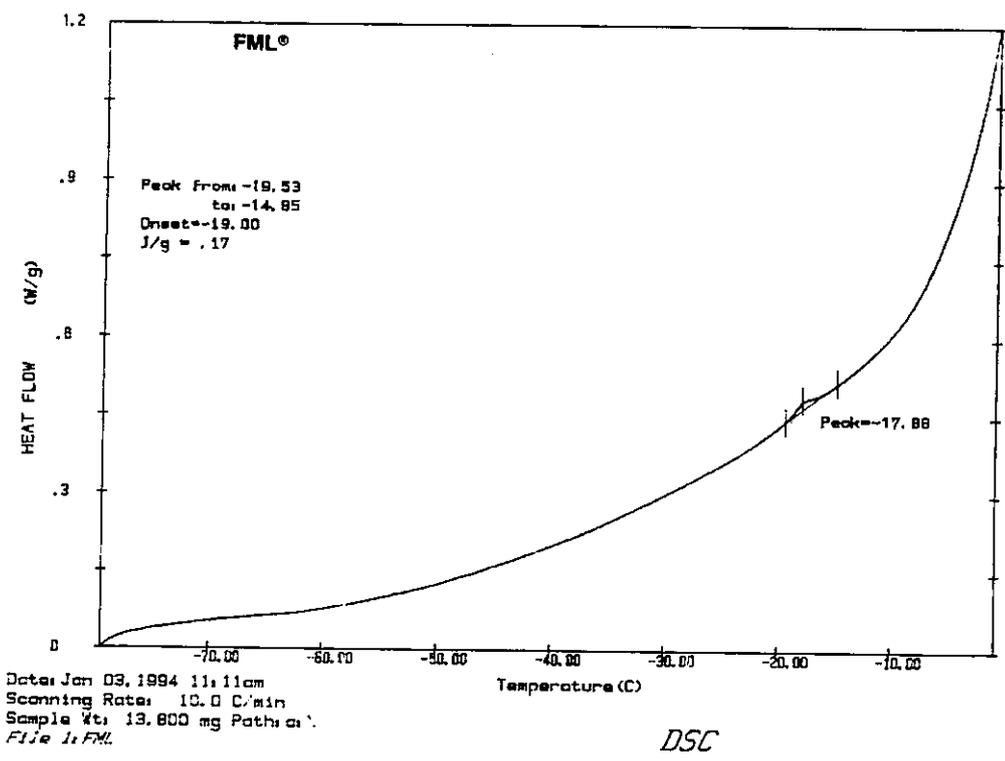
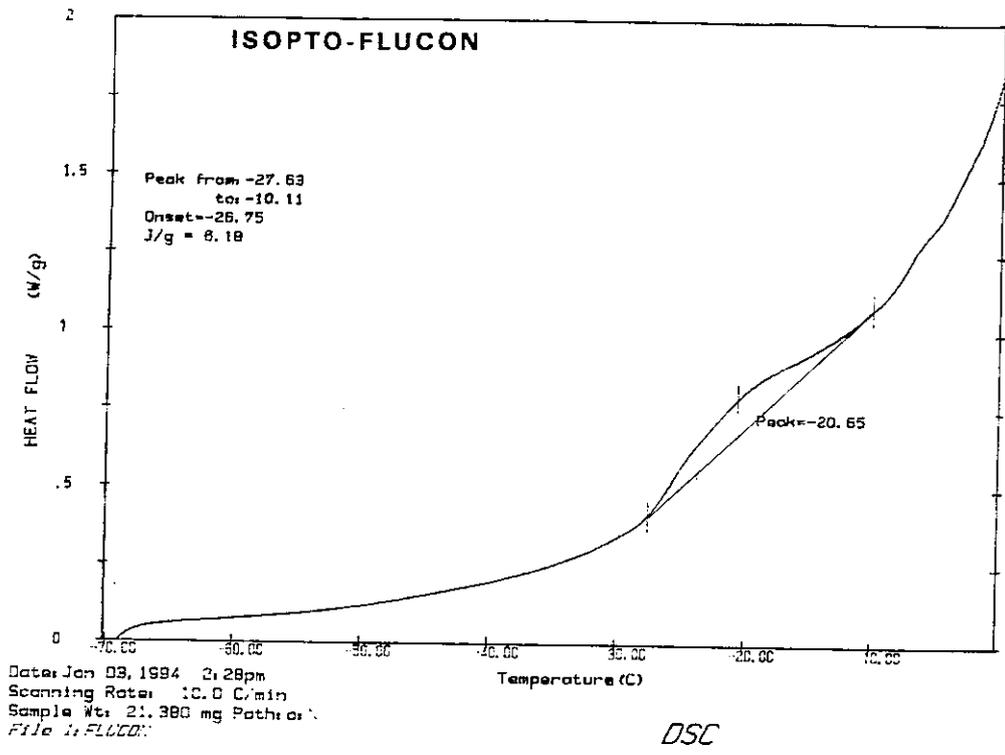


Fig. 51.- Curva DSC de Isopto-Flucón®

Fig. 52.- Curva DSC de FML®

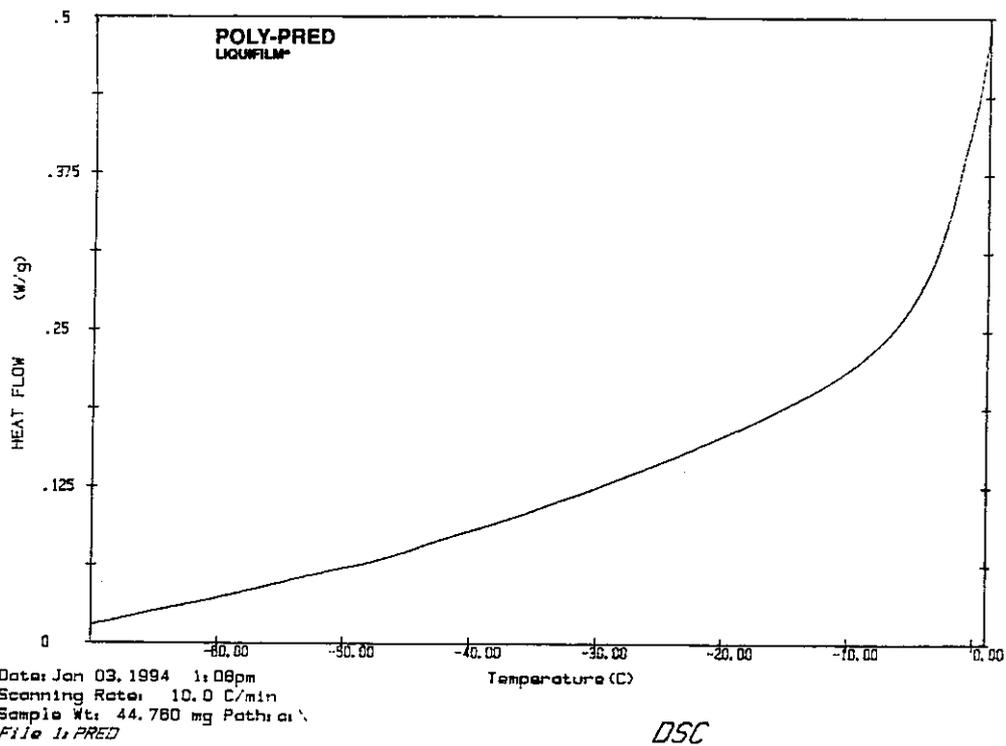


Fig. 53.- Curva DSC de Polipred®

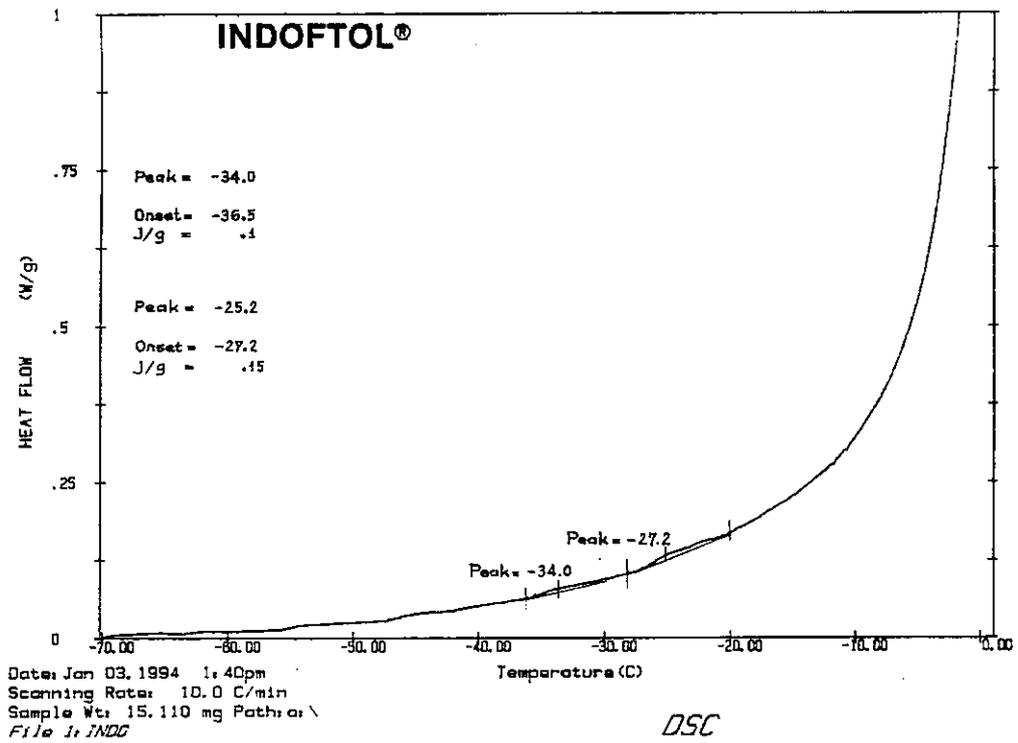
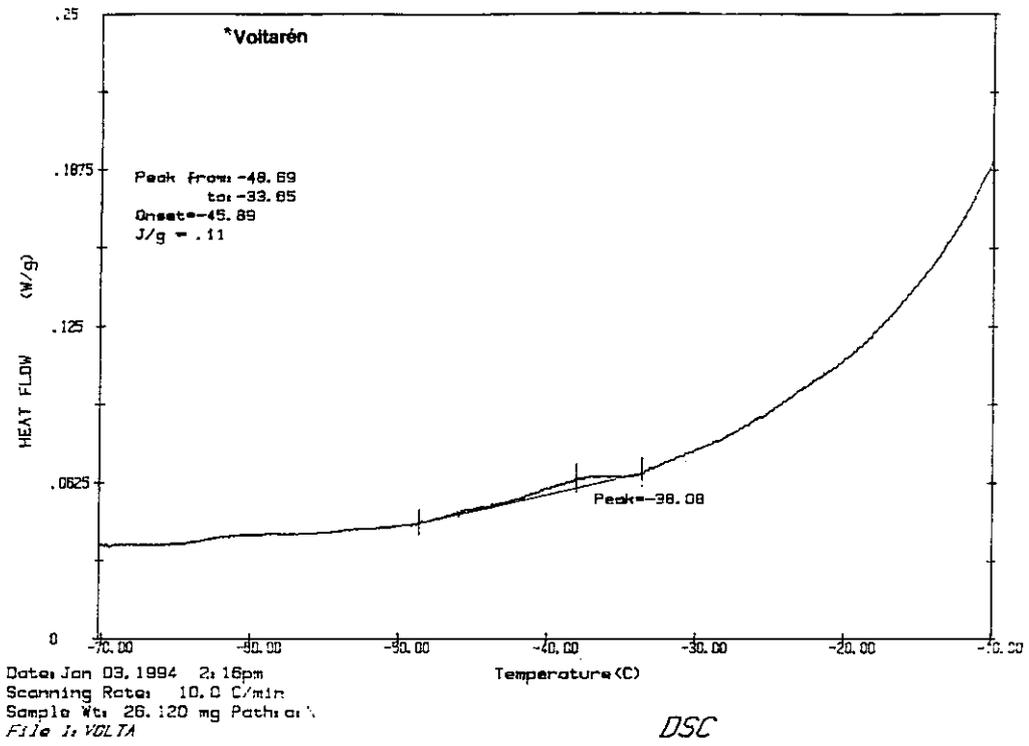


Fig. 54.- Curva DSC de Voltaren®

Fig. 55.- Curva DSC de Indoftol®

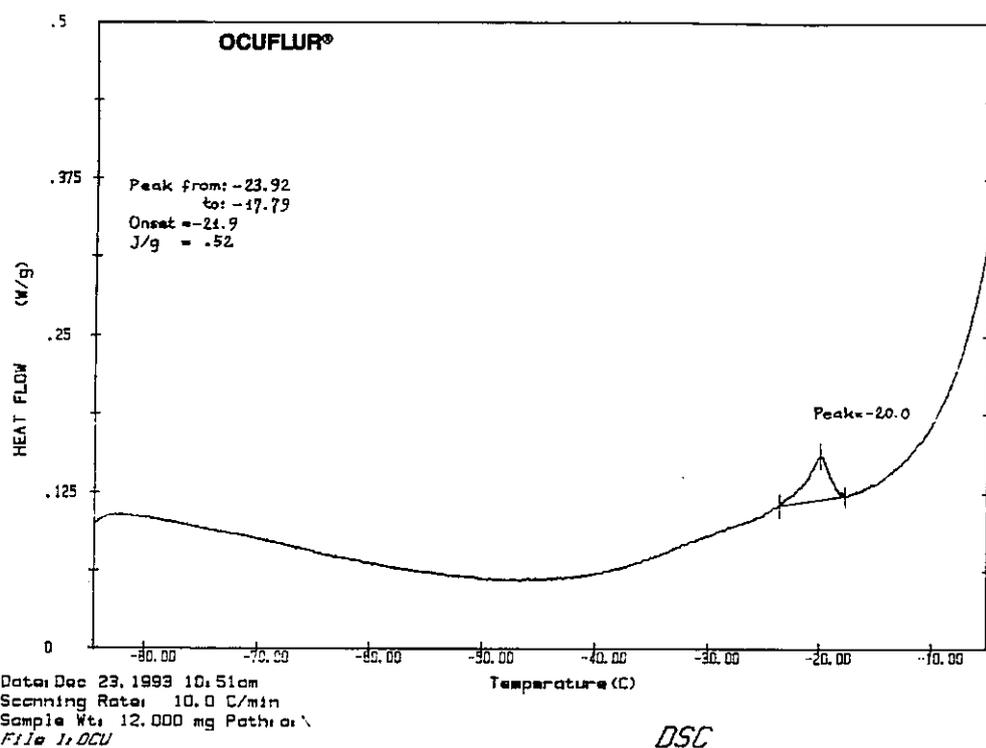
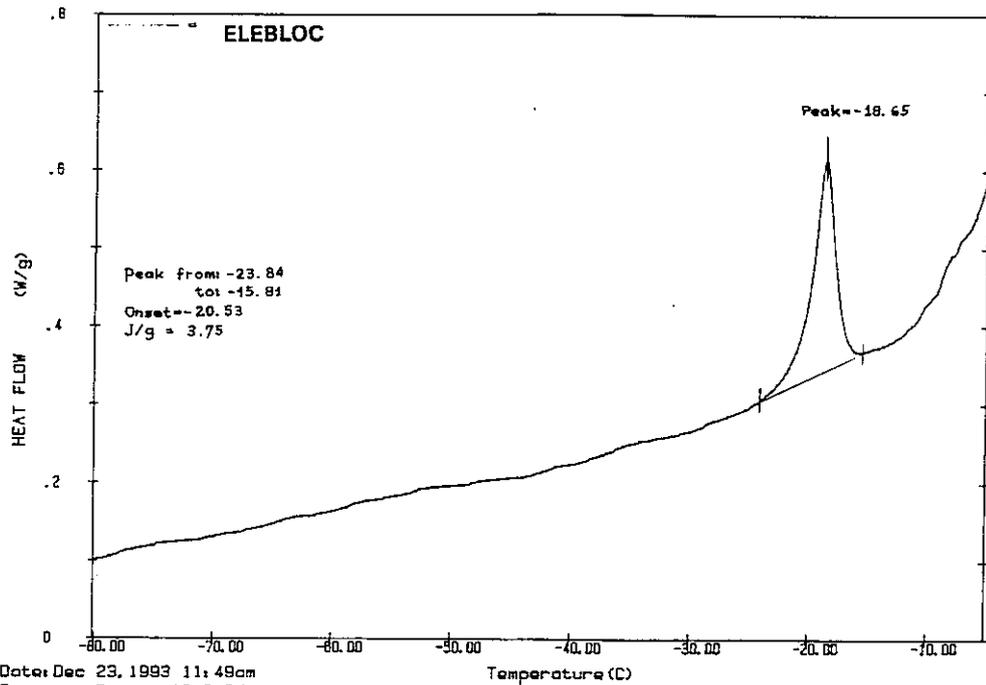
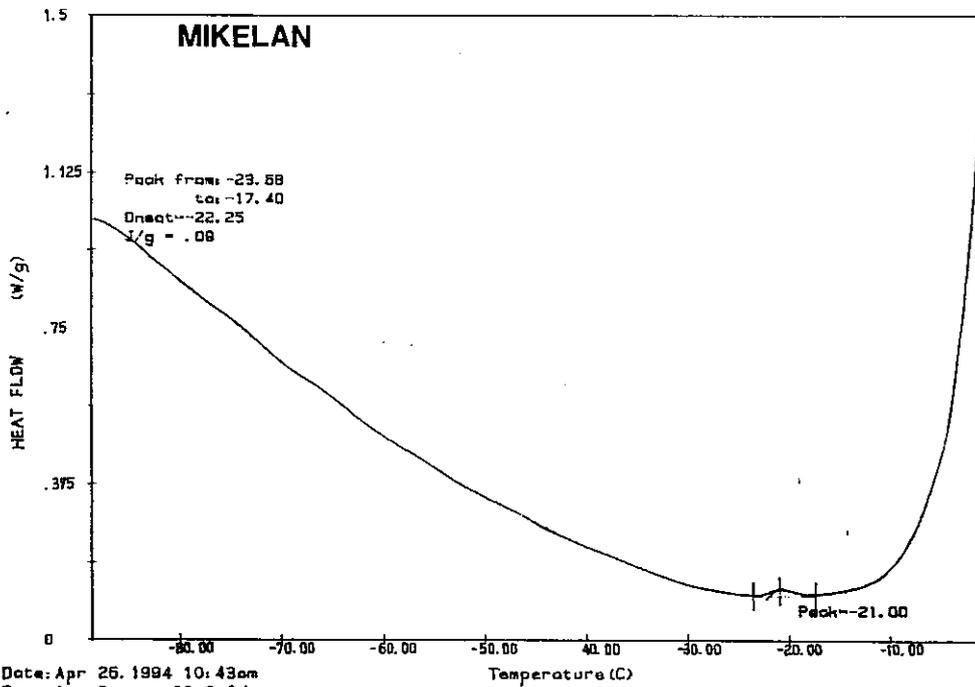


Fig. 56.- Curva DSC de Ocuflur®



Date: Dec 23, 1993 11:49am
Scanning Rate: 10.0 C/min
Sample Wt: 9.290 mg Path: a:\
File 1: ELEBLOC

DSC



Date: Apr 26, 1994 10:43am
Scanning Rate: 20.0 C/min
Sample Wt: 13.300 mg Path: a:\
File 1: MIKELAN

DSC

Fig. 57.- Curva DSC de Elebloc®

Fig. 58.- Curva DSC de Mikelan®

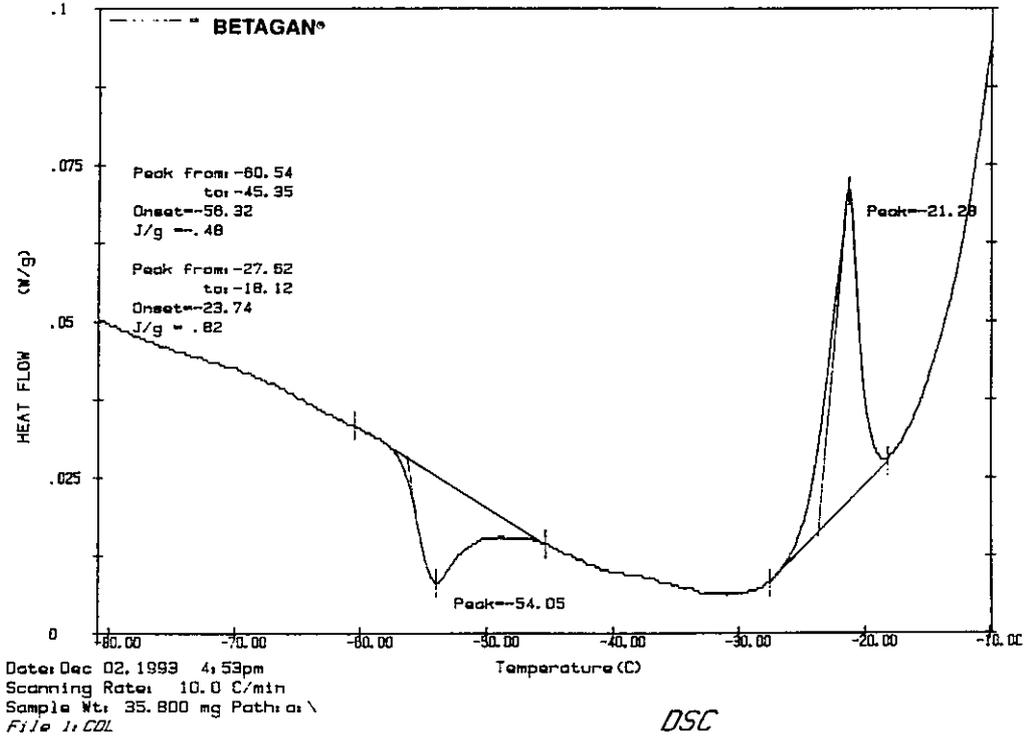
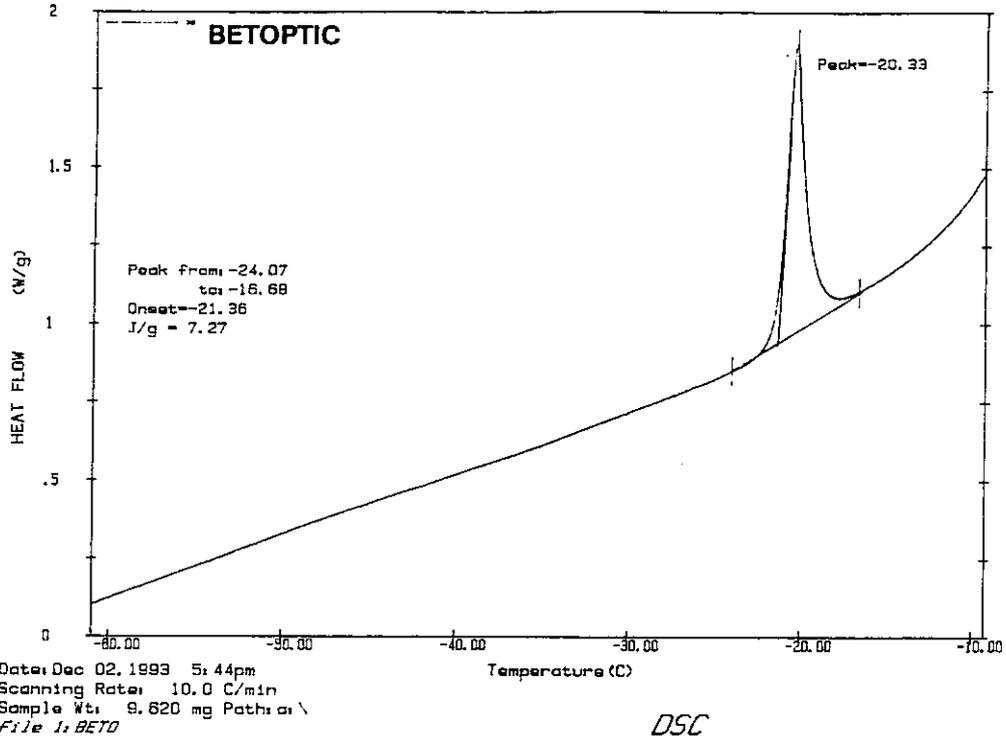
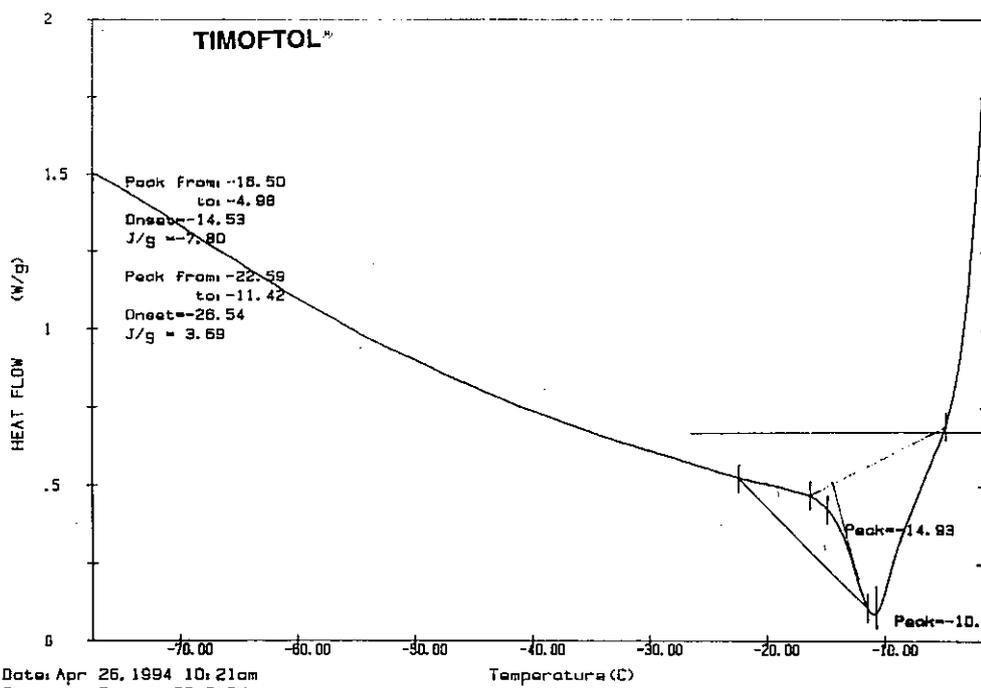
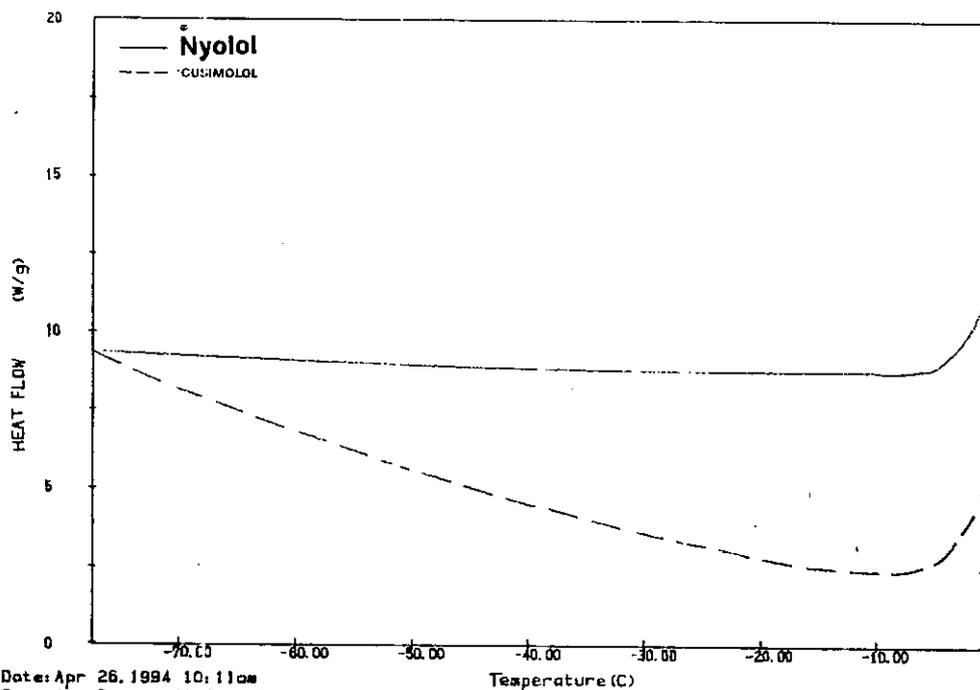


Fig. 59.- Curva DSC de Betoptic®
Fig. 60.- Curva DSC de Betagan®



Date: Apr 26, 1994 10:21am
 Scanning Rate: 20.0 C/min
 Sample Wt: 8.950 mg Path: a:\

DSC



Date: Apr 26, 1994 10:11am
 Scanning Rate: 20.0 C/min
 Sample Wt: 11.590 mg Path: a:\

DSC

Fig. 61.- Curva DSC de Timoftol[®]
 Fig. 62.- Curvas DSC de Nyolol[®] y Cusimolol[®]

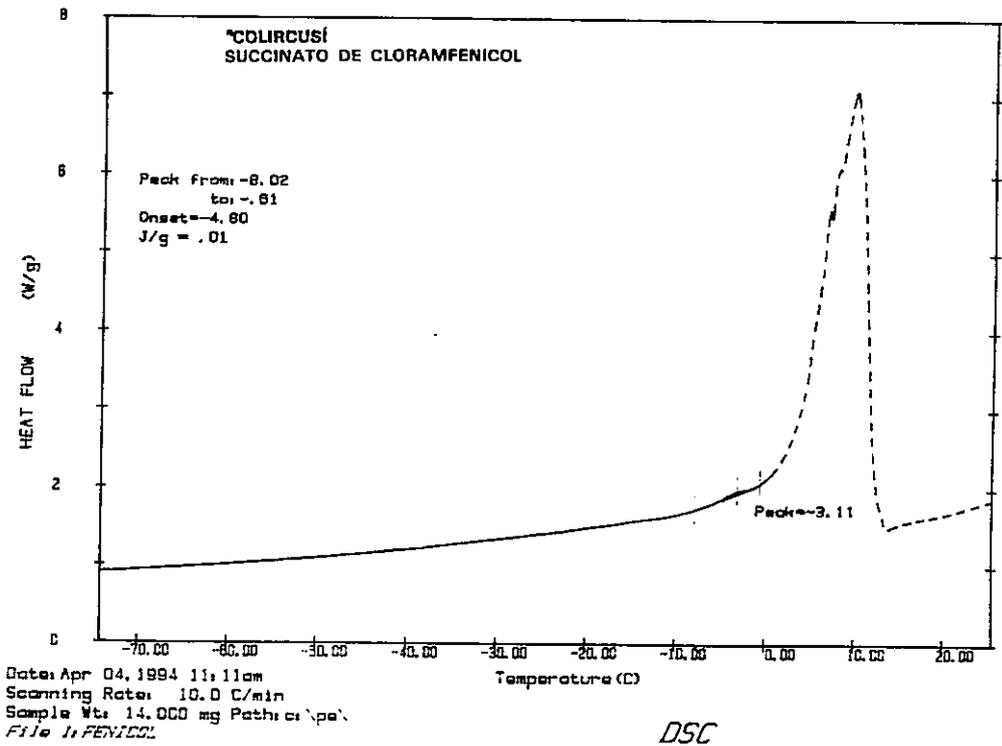
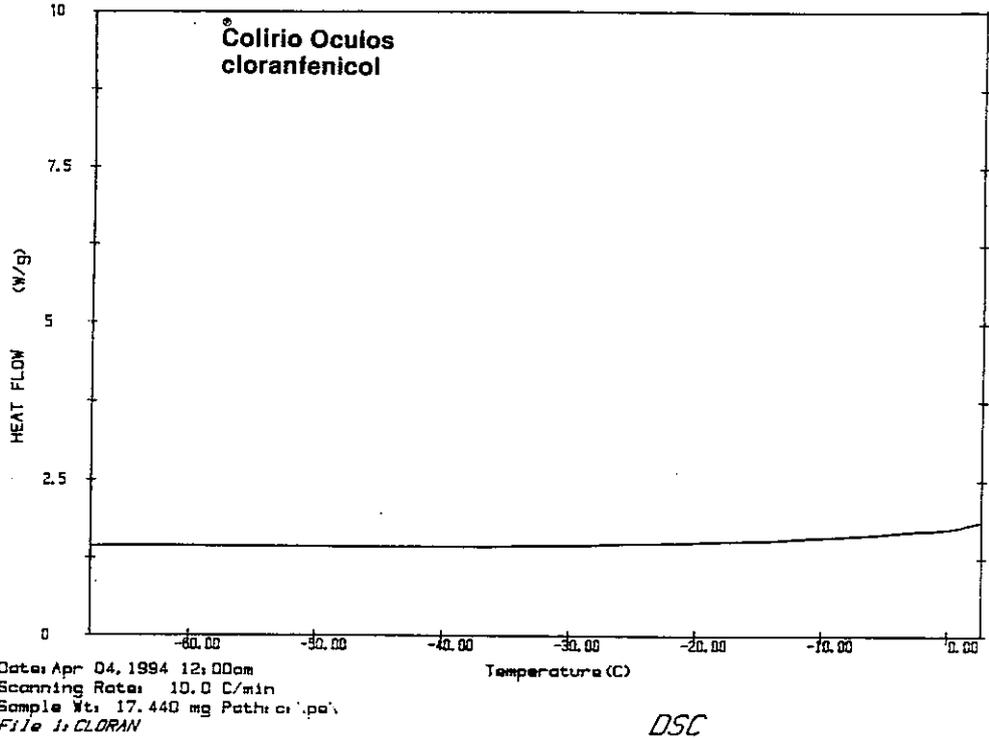
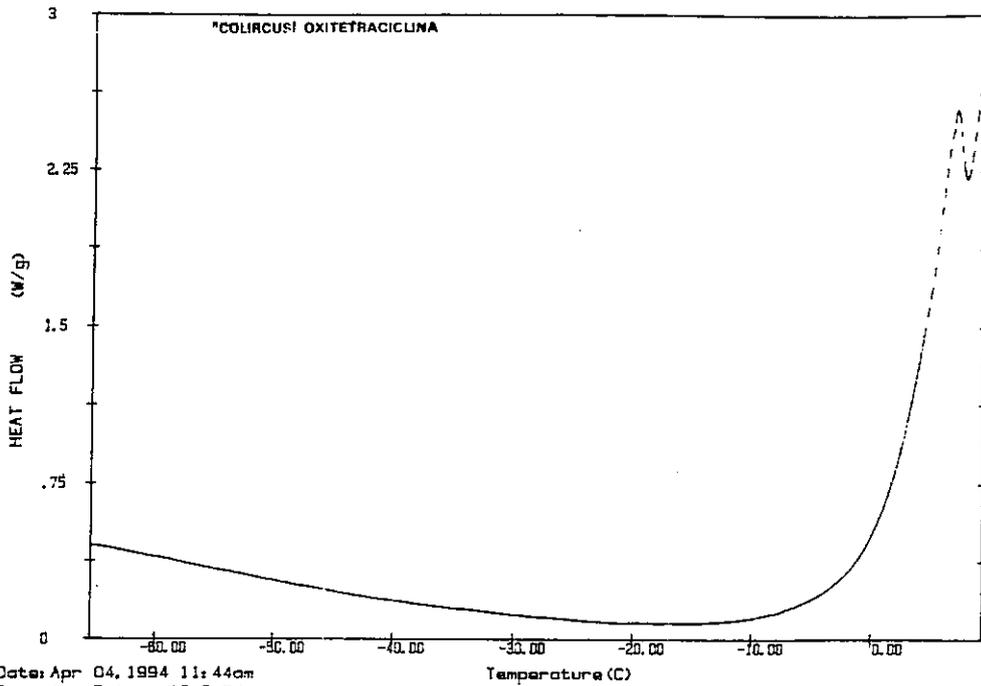
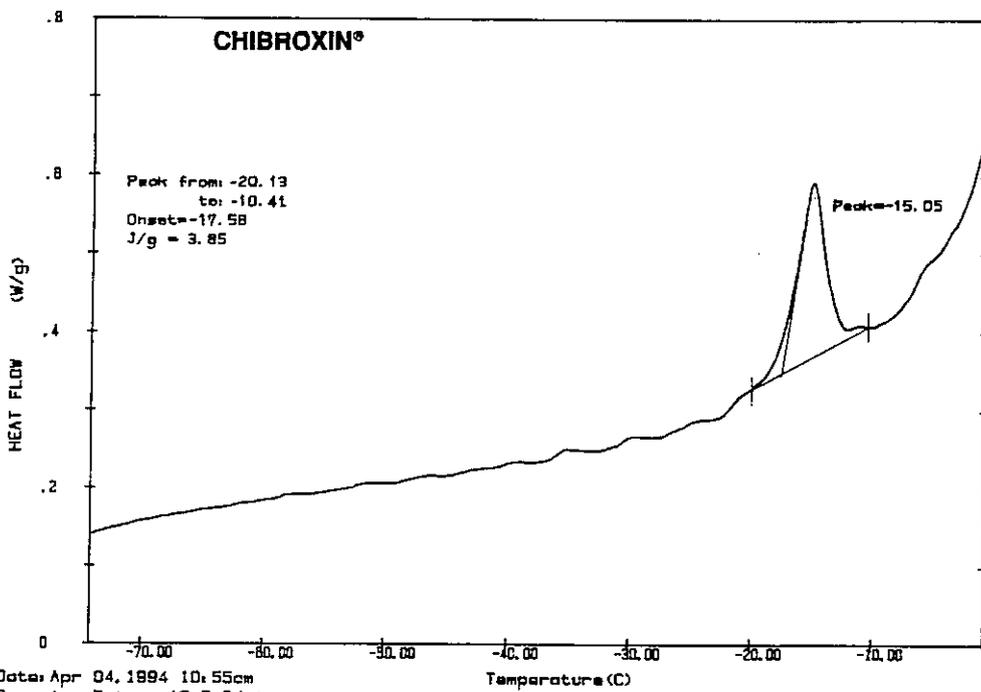


Fig. 63.- Curva DSC de Colirio Oculos cloranfenicol®

Fig. 64.- Curva DSC de Succinato de cloranfenicol®



DSC



DSC

Fig. 65.- Curva DSC de Colircusí oxitetraciclina®

Fig. 66.- Curva DSC de Chibroxin®

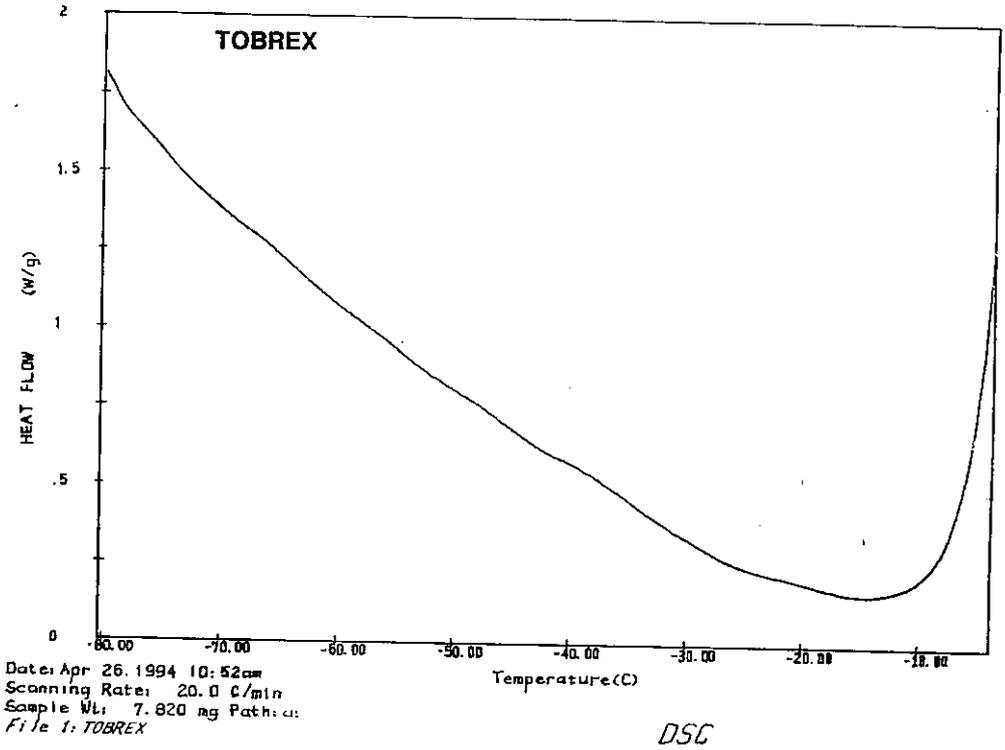
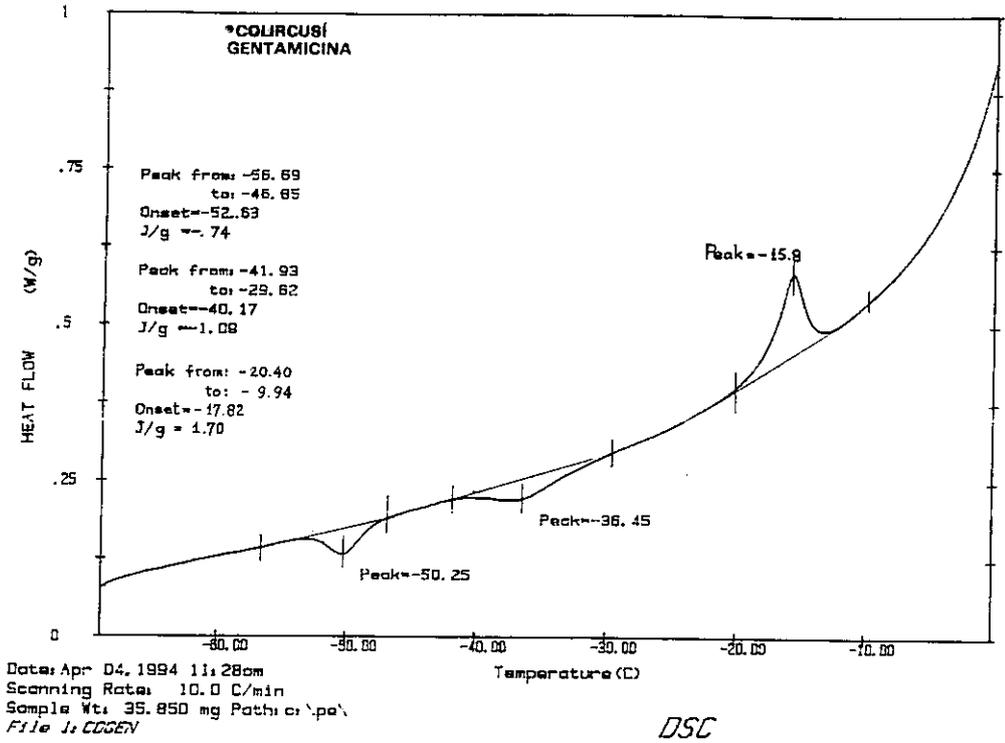


Fig. 67.- Curva DSC de Colircusí gentamicina®

Fig. 68.- Curva DSC de Tobrex®

IIIA1. RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL EFECTO ENDOTÉRMICO PRINCIPAL.

El primero de los resultados de interés se refiere a la observación de que la temperatura de pico del endotérmico permite una ordenación de los fluidos y componentes del ojo de acuerdo con la siguiente secuencia (Tablas III a VII):

h. acuoso > lágrimas > h. vítreo > esclera > cristalino.

Adicionalmente, el humor acuoso ha mostrado una gran similitud en efectos térmicos con el líquido amniótico (Tabla VIb).

Respecto a las preparaciones comerciales de interés en Oftalmología, los viscoelásticos tipo hialuronato (Tabla VIII) exhiben un endotérmico a temperaturas entre -27 y -19 °C, del orden, pues, de las que presentan los humores acuoso y vítreo. En cambio, los aceites de silicona (Tabla IX) presentan temperaturas de endotérmicos muy apartadas de los componentes fisiológicos oculares, en especial del vítreo, al que deben sustituir.

En lo referente a las lágrimas artificiales y protectores corneales (Tabla X), es preciso observar que los registros DSC de ambas muestran endotérmicos a temperaturas más altas que las de los componentes naturales del ojo, si bien con diferencias poco significativas.

Un resultado importante, obtenido del estudio de familias de biomateriales con distinto peso molecular (viscoelásticos tipo hialuronato y siliconas), es que el efecto endotérmico principal está asociado con el peso molecular de las fracciones constitutivas del biomaterial: cuanto más alto es el peso molecular de las fracciones de hialuronato sódico o de un aceite de silicona, más alta es la temperatura del endotermo. O lo que es lo mismo, las temperaturas onset y de pico disminuyen a medida que el peso molecular y la viscosidad decrecen (Tablas VIII y IX).

También es de reseñar que, dentro de un mismo grupo comercial de biomateriales (por ejemplo, para los viscoelásticos Healon GV y Healon (Tabla VIII) o para los aceites de silicona de Ioba-Domilens, Tabla IX), los cambios de entalpía del proceso endotérmico principal crecen a medida que la viscosidad y el peso molecular decrecen. Este resultado se traduce, si consideramos que los cambios de entalpía son un marcador del estado de polidispersidad, en la constatación de que a más baja viscosidad, más alta polidispersidad. El aceite de silicona Ioba-Domilens 5000 cs resulta, así, un producto optimizado en cuanto a polidispersidad.

El examen de los datos térmicos para componentes naturales del ojo recién extraídos y tras horas o días desde la extracción (Tablas V y VIa) y entre biomateriales recientemente fabricados con otros caducados (Tabla IXa), revela que el paso del tiempo determina un desplazamiento de la temperatura del endotérmico principal a temperaturas más elevadas. Para siliconas se observa, adicionalmente, una diferenciación/incremento del pico alrededor de $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El efecto del reenfriamiento de estos materiales desde la temperatura ambiente se traduce en la desaparición o reducción drástica del efecto endotérmico característico. Así, para viscoelásticos, una partida de Biolon (lote 410552) que había mostrado problemas en su utilización y cuyo deterioro fue debido a un reenfriamiento accidental en su transporte, exhibió el endotérmico característico de las soluciones de hialuronato a las temperaturas onset y de pico esperadas ($-21.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) pero con un cambio de entalpía de 0.31 Jg^{-1} , que resulta ser un 86% más bajo que el registrado con otras muestras (lotes 33042 y anteriores), cuando no inferior. Resultados similares se han observado también con siliconas (Tabla IXb), advirtiéndose, adicionalmente, que la disminución de ΔH afecta en mayor grado a los productos de mayor viscosidad y peso molecular. En algún caso (Fig. 27), el cambio de entalpía del efecto térmico con pico a $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$ decrece en favor del efecto que le sigue a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabla III. Efectos térmicos DSC de córnea y cápsula de cristalino de origen humano.

Componente del ojo	Endotérmicos principales		
	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)
Córnea*	-21.2	-43.0 -17.5	3.6
Cristalino (cápsula ant.)**	-53.0 -35.9	-43.0 -32.5	2.6 7.4

* Registro a las 36 horas del transplante

** Registro después de varios días de la extracción y tras conservación de la muestra en medio acuoso

Tabla IV. Efectos térmicos DSC de cristalino y esclera de origen porcino.

Componente del ojo	Endotérmico principal		ΔH (Jg ⁻¹)
	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	
Cristalino (completo)*	-	-	-
Esclera**	-33.6	-29.5	-

*No se observaron efectos térmicos en ninguno de los registros

** Registro a las 4 horas y 40 minutos de la extracción

Tabla V. Variación con el tiempo de los efectos térmicos DSC de humor vítreo porcino.

Tiempo desde la extracción	Efecto exotérmico			Efecto endotérmico		
	T_{onset}	T_{pico}	ΔH	T_{onset}	T_{pico}	ΔH
	(°C)	(°C)	(Jg ⁻¹)	(°C)	(°C)	(Jg ⁻¹)
4 h. 15 min.	-53.8	-48.1	-2.7	-28.3	-26.0	2.6
5 h. 38 min.	-48.6	-	-2.0	-	-25.2	-
6 h. 50 min.	-47.7	-46.4	-0.7	-27.1	-24.8	2.1
9 h. 57 min.	-	-41.6	-0.4	-26.9	-24.1	1.8
26 h.	-	-	-	-	-	-

Tabla VIa. Variación con el tiempo de los efectos térmicos DSC de humor acuoso humano.

Patología	Tiempo desde la extracción (días)	Efecto exotérmico			Efecto endotérmico		
		T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)
Cataratas	1	-54.8	-49.5	-2.2	-25.8	-22.5	2.5
	6	-51.2	-45.3	-	-25.3	-22.3	-
Glaucoma	2	-55.5	-51.6	-2.6	-26.0	-23.4	4.3

Tabla VIb. Efectos térmicos del humor acuoso humano en comparación con los del líquido amniótico humano.

Fluido biológico	Efecto exotérmico			Efecto endotérmico		
	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)
Humor acuoso*	-54.8	-49.5	2.2	-25.7	-22.5	2.5
Líquido amniótico**	-58.9	-54.3	-9.3	-24.4	-21.4	17.0
	-49.9	-45.5	-3.5	-25.1	-22.1	3.1

* Registro a las 24 horas de la extracción

** Registro a las 4 horas de la extracción

Tabla VII. Variación con el tiempo de los efectos térmicos DSC de lágrimas humanas.

Tiempo desde la recogida (días)	Tonset (°C)	Efecto endotérmico	
		Tpico (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)
2	-25.1	-22.7	1.3
17	-24.6	-18.9	0.3

Tabla VIII. Efectos térmicos DSC a bajas temperaturas de preparaciones comerciales de viscoelásticos para Oftalmología.

Viscoelástico	Efecto exotérmico			Efectos endotérmicos					
	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)
<i>Tipo NaHA:</i>									
"Provisc"	-	-	-	-	-	-	-18.2	-16.2	2.3
"Healon GV"*	-42.8	-37.8	-1.8	-	-	-	-21.5	-19.3	3.7
"Amvisc"	-46.4	-42.1	-1.6	-	-	-	-21.9	-19.5	4.4
"Healon"	-	-49.4	-1.4	-	-	-	-24.0	-22.1	5.5
"BioIon"	-55.0	-49.5	-2.0	-	-	-	-24.3	-22.5	5.1
"Amvisc Plus"**	-48.0	-40.5	-1.0	(-47.4	-39.9	1.0)	-24.6	-22.1	4.4
"Eurovisc, SL-1010"	-53.6	-48.2	-2.6	-	-	-	-25.8	-23.7	4.1
"Vitrax"	(-53.9	-44.3	-1.4)	-41.2	-39.3	0.1	-28.6 -24.3	-26.2 -23.2	1.3 -
"Viscoat"	-	-30.9	-0.5	-	-	-	-30.3	-26.7	1.3
<i>Tipo HPMC:</i>									
"Adato-cel"	-	-	-	-51.0	-40.7	0.1	-	-	-
"Celoftal"	-	-	-	-42.1	-39.2	0.1	-	-	-
"Coatol"	-	-	-	-35.1	-33.8	0.1	-28.5 -23.7	-26.4 -22.7	1.1 0.2
"Occucoat"	-	-	-	-	-	-	-21.8	-20.8	0.5
"Cellugel"	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* El derivado "Healon yellow" presenta un exotérmico a T_{onset} = -39.3 °C, T_{pico} = -37.4 °C e ΔH = -4.8 Jg⁻¹; y un endotérmico a T_{onset} = -30.8 °C y T_{pico} = -29.2 °C.

** Después de 42 días, "Amvisc Plus" presenta un endotérmico a T_{onset} = -18.1 °C, T_{pico} = -15.6 °C e ΔH = 4.2 Jg⁻¹.

Tabla IXa. Efectos térmicos DSC para aceites de silicona de uso intraocular y para otras siliconas de uso médico.

Origen de los productos	Endotermo a baja temperatura		
	Onset (°C)	Pico (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)
<i>Aceites de silicona:</i>			
Adato Sil-01 5000 cps (5139 cs) PM 66000	-48.0	-42.8	21.5
Ioba Domilens 5000 cs PM 63000	-48.0	-43.6	10.4
Ioba Domilens 2000 cs PM 49000	-48.8	-43.8	17.4
Adato Sil-01 1000 cps (1040 cs) PM 45000	-48.5 -40.1	-44.4 -36.3	32.5
Ioba Domilens 1000 cs PM 44500	-49.1 -40.0	-45.1 -35.9	26.1
Oxane Opsia 1300 cs PM 44000	-50.7 -39.7	-47.3 -35.9	10.7 11.8
Adato Sil-01* 5000 cps	-45.7 -39.0	-43.1 -35.5	21.5
Adato Sil-01* 1000 cps	-45.4 -36.9	-42.3 -33.7	31.6
<i>Otras siliconas:</i>			
Topigel Cui Co. (apósito) PM 100000	-45.7	-40.9	25.4
Xilastic PM 70000	-47.8	-42.8	30.4

* un año después de la fecha de caducidad

Tabla IXb. Efectos térmicos comparativos para aceites de silicona tras dos ciclos de enfriamiento.

Características del aceite	Datos de los endotermos a bajas temperaturas					
	Después del 1 ^{er} enfriamiento			Después del 2 ^o enfriamiento		
	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)
Ioba Domilens 5000 cs	-48.0	-43.6	10.4	-46.7	-44.8	1.7
Ioba Domilens 1000 cs	-49.1	-45.1	26.1	-47.8	-43.2	15.6
Adato Sil-ol 5000 cps	-48.0	-42.9	21.5	-42.9	-40.9	0.9
Adato Sil-ol 1000 cps	-48.5	-44.4	27.1	-43.9	-42.6	10.3

Tabla X. Efectos DSC a bajas temperaturas de lentes de contacto, productos para su cuidado y protectores corneales.

Material	Efecto exotérmico			Efecto endotérmico		
	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)
<i>Lentes intraoculares:</i>						
"PMMA - Iol U.S."				-16.6	-7.3	35.4
"PMMA - Kabi-Ph"				-22.9	-16.4	53.4
"Silicona - Iovision"	Ausencia comprobada de efectos					
<i>Lágrimas artificiales:</i>						
"Tears humectante solución"	-65.2	-61.4	-1.1	-22.4	-21.2	5.2
"Liquifila lágrimas"	-65.2	-61.4	-1.1	-24.0	-20.3	3.1
	-	-35.3	-1.1			
<i>Medios de conservación de córneas:</i>						
"Optisol"	-	-	-	-43.6	-39.7	0.25
"Likorol"	-	-	-	-43.4	-41.1	0.3
<i>Protectores corneales:</i>						
"Biocorn 72H"				-21.3	-16.2	0.8
"Biocorn 24H"						
"Biocorn 12H"				(-41.3)	-25.0	

Siguiendo con el apartado de las preparaciones farmacológicas conocidas como midriáticos y ciclopléjicos, resalta el hecho de que los parasimpaticolíticos comerciales exhiben el endotérmico esperado a temperaturas en torno a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que los simpaticomiméticos y mixtos no presentan efecto endotérmico alguno (Tabla XI).

Respecto a los antiinflamatorios oculares (Tabla XII) y comenzando con los esteroideos, se observa que los derivados de dexametasona muestran dos efectos térmicos a diferencia de un efecto único para la dexametasona pura. Este hecho permite diferenciar los efectos térmicos correspondientes a los componentes combinados con la dexametasona: -21.9 y $-17.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el cloranfenicol en el Colircusí de Icol; -32.5 y $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la gentamicina en Colircusí Gentadexa; y -33.0 y $-16.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la trimetoprima en Colircusí Oftalmotrim Dexa. El resultado de la asociación sobre la temperatura de pico del endotermo de la dexametasona sólo está claro en el caso del cloranfenicol: se produce un corrimiento a temperaturas superiores.

De los derivados de fluorometolona, sólo Isopto-Flucón muestra el endotérmico esperado ($T_{\text{pico}} = -20.6\text{ }^{\circ}\text{C}$).

El preparado prednisona derivado no exhibe efecto térmico alguno en la región de temperatura esperada.

Los antiinflamatorios no esteroideos que han sido objeto de estudio muestran una amplia variación en las temperaturas del endotérmico, tal como cabe esperar por las grandes diferencias de composición de los fármacos comparados: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para Ocuflur; -24 y $-34\text{ }^{\circ}\text{C}$ para Indoftol y $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ para Voltaren. Las temperaturas de pico de Ocuflur e Indoftol se encuentran en el rango general observado y próximas a las temperaturas de los componentes fisiológicos.

El efecto endotérmico DSC para los antihipertensivos oculares (Tabla XIII) se produce a mayores temperaturas para los

β -bloqueantes con efecto simpaticomimético intrínseco (-18.6 y -21 °C), que para los β -bloqueantes sin efecto simpaticomimético intrínseco (-20.3 y -21.3 °C), si bien la diferencia no es muy marcada. Es de observar el efecto drásticamente reductor que produce el excipiente cloruro de benzalconio sobre los cambios de entalpía.

El último grupo de fármacos estudiados, los antibióticos oculares (Tabla XIV), muestran como característica común -al menos en el caso de Oftalmotrim, Colircusí gentamicina y Chibroxin (norfloxacino)- un endotermo en torno a -15.8 °C. La no visualización de este efecto en el caso del cloramfenicol, de la oxitetraciclina y de la tobramicina es desconocido.

Tabla XI. Efectos térmicos DSC de midriáticos y ciclopéjicos comerciales.

Clase/Tipo	Nombre comercial/ Principio activo	Efecto exotérmico			Efecto endotérmico		
		T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)
<i>PSifíticos:</i>							
	"Colircusí atropina"	-	-	-	-62.9 -12.6	-36.4 -11.7	30.7 8.7
	"Colircusí tropicamida"	-	-	-	-19.8	-18.2	8.1
	"Colircusí ciclopéjico"	-	-	-	-19.4	-18.0	7.2
<i>Smiéticos:</i>							
	"Colirio Oculos fenilefrina"	-56.2	-53.4	-0.7	-	-	-
	"Diopine" dipinefrina	-	-	-	-	-	-
<i>Mixtos:</i>							
	"Colirio Llorens midriático" (FE + A)	-50.3 -40.8	-46.9 -35.6	-0.3 -0.7	-	-	-

Tabla XII. Efectos térmicos DSC de antiinflamatorios oculares.

Clase/Tipo	Nombre comercial/ Principio activo	Efecto endotérmico principal		
		T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)
Antiinflamatorios esteroideos:				
Derivados dexametasona:	"Colircusi Dexametasona"	-31.8	-29.7	0.2
	"Colircusi de Icol"	-23.3	-21.9	0.05
		-18.8	-17.3	0.1
	"Colircusi Gentadexa"*	-38.1	-32.5	0.4
		-	-22.0	0.05
"Colircusi Oftalmotrim Dexa"	-34.9 -18.8	-33.0 -16.4	0.12 0.05	
"Maxitrol"**	-21.1	-18.9	4.1	
Derivados fluorometolona:	"Isopto-Flucon"	-26.7	-20.6	6.2
	"FLM"	-19.0	-17.9	0.2
Prenisolona:	"Poly-pred"	-	-	-
Antiinflamatorios no esteroideos:				
	"Voltaren"	-45.9	-38.0	0.1
	"Indoftol"	-36.4	-34.0	0.1
		-27.2	-25.2	0.15
	"Ocuflur"	-21.9	-20.0	0.5

* Colircusi Gentadexa exhibe un efecto exotérmico a -52°C (Inicial: T_{onset} = -54.1 °C; T_{pico} = -52.5 °C; ΔH = -0.3 Jg⁻¹. A los 10 días: T_{onset} = -52.8 °C; T_{pico} = -51.1 °C; ΔH = -0.43 Jg⁻¹)

** Maxitrol exhibe un efecto exotérmico a -64 °C (T_{onset} = -66.3 °C; T_{pico} = -63.8 °C; ΔH = -0.43 Jg⁻¹)

"Voltaren": diclofenaco sódico

"Indoftol": indometacina + alcoholes bencílico y feniletílico + cloruro de benzalconio

"Ocuflur": flurbiprofeno + alcohol polivinílico

Tabla XIII. Efectos térmicos DSC de antihipertensivos oculares.

Clase/Tipo	Nombre comercial/ Principio activo	Efecto exotérmico			Efecto endotérmico		
		T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)
<i>β</i> -bloqueantes Simétricos intrínsecos:							
	"Elevloc"	-	-	-	-20.5	-18.6	3.7
	"Mikelan"	-	-	-	-22.2	-21.0	0.1
<i>β</i> -bloqueantes no Simétricos intrínsecos:							
	"Betoptic"	-	-	-	-21.4	-20.3	7.3
	"Betagan"	-56.3	-54.0	-0.5	-23.7	-21.3	0.8

"Elevloc": carteolol.HCl

"Mikelan": carteolol.HCl + cloruro de benzalconio

"Betoptic": betaxolol.HCl

"Betagan": Levunolol.HCl + alcohol polivinílico + cloruro de benzalconio

Tabla XIV. Efectos térmicos DSC de antibióticos oculares.

Nombre comercial/ Antibiótico	Efecto exotérmico			Efecto endotérmico		
	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)
"Colirio Oculos Cloranfenicol"	-	-	-	-	-	-
"Colircusi Succinato de Cloranfenicol"	-	-	-	(-4.8)	(-3.1)	(0.01)
"Oftalmotrim" Trimetropim-sulfametoxazol	-	-	-	-34.9 -18.8	-33.0 -16.4	0.12 0.05
"Colircusi oxitetraciclina"	-	-	-	-	-	-
"Colircusi oxitetraciclina HCL"	-	-	-	-	-	-
"Chibroxin" Norfloxacino	-	-	-	-17.6	-15.0	3.8
"Colircusi Gentamicina" Gentamicina SO ₄	-52.6 -40.2	-50.2 -36.4	-0.7 -1.1	-17.8	-15.8	1.7
"Tobrex" Tobramicina	-	-	-	-	-	-

IIIA2. RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL EFECTO EXOTÉRMICO A MUY BAJAS TEMPERATURAS.

La principal característica del efecto exotérmico observado en componentes naturales del ojo y en fármacos oftálmicos a temperaturas por debajo de $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ es su variabilidad con el tiempo: a medida que este transcurre, las temperaturas onset y de pico se hacen más elevadas y los cambios de entalpía disminuyen. Esta característica no es exhibida del mismo modo por el efecto endotérmico descrito anteriormente y sólo es apreciable, muy levemente, en el envejecimiento del vítreo.

La velocidad de variación de la temperatura con el tiempo del efecto exotérmico bajo consideración es mayor para componentes naturales del ojo que para preparados oftálmicos. Dentro de los componentes naturales del ojo, la máxima velocidad de cambio corresponde al vítreo (porcino): aproximadamente $0.02\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ según el tiempo transcurrido desde su extirpación. Para fármacos, tras apertura de su envase, la velocidad máxima ha sido registrada para "Colircusí Gentadexa": $0.13\text{ }^{\circ}\text{C día}^{-1}$.

Una observación adicional, común a componentes naturales del ojo y a fármacos, es la desaparición del efecto para productos envejecidos. En el caso del vítreo (porcino) esta desaparición del efecto se registra a las 26 horas de la extracción.

Aunque la variabilidad con el tiempo del efecto exotérmico no permite la caracterización rigurosa de componente o producto alguno (y sólo parece útil a efectos de envejecimiento), es posible deducir, en base a las temperaturas iniciales del efecto, que la temperatura del humor acuoso es mayor que la del vítreo (resultado en buen acuerdo con el obtenido en base a las temperaturas de los correspondientes endotérmicos).

En lo que se refiere a los fármacos oftálmicos estudiados, es de destacar la presencia o ausencia relativamente arbitraria, del efecto exotérmico considerado. Sólo en el apartado de

los viscoelásticos se aprecia un comportamiento homogéneo diferencial inter-grupo y entre grupos: todos los viscoelásticos tipo NaHA exhiben el efecto exotérmico esperado, mientras que todos los viscoelásticos tipo HPMC muestran ausencia de dicho efecto.

En preparados simpaticomiméticos, "Colircusí fenilefrina" presenta el exotérmico a $-53\text{ }^{\circ}\text{C}$ mientras "Diopine" que no muestra efecto alguno.

Entre los antiinflamatorios oculares, sólo el grupo de los derivados de dexametasona muestran diferencias inter-variantes: "Colircusí Gentadexa" y "Maxitrol" exhiben el exotermo a $-54\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-64\text{ }^{\circ}\text{C}$ respectivamente, mientras que "Colircusí Dexametasona" y "Colircusí de Icol" no lo manifiestan.

También entre los antihipertensivos oculares β -bloqueantes no simpaticomiméticos intrínsecos, resulta diferente el registro DSC de "Betoptic" y "Betagan" a estas temperaturas: en "Betagan" el efecto exotérmico es reconocible en torno a $-54\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que en "Betoptic" no es apreciable.

Volviendo a los viscoelásticos comerciales, y examinando intra grupos los valores de sus temperaturas onset y de pico, se observa que los valores más bajos corresponden a los productos "Eurovisc SL-1010", "Biolon" y "Healon".

IIIB. RESULTADOS DE LOS REGISTROS DSC DE COMPONENTES QUIMICO-ESTRUCTURALES DEL OJO.

IIIB1. RESULTADOS PARA COMPONENTES AISLADOS.

Colágeno.

Ninguna de las curvas DSC de todas las fracciones de colágeno Tipo I estudiadas (subtipos Sigma I a VIII) ha proporcionado efectos térmicos por debajo de $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los registros DSC, llevados a cabo hasta temperatura ambiente, sólo muestran tres débiles endotermos en los rangos -4 a $2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $22-27\text{ }^{\circ}\text{C}$, útiles sólo a propósitos de caracterización (Figs. 69 y 70).

Condroitín sulfato C.

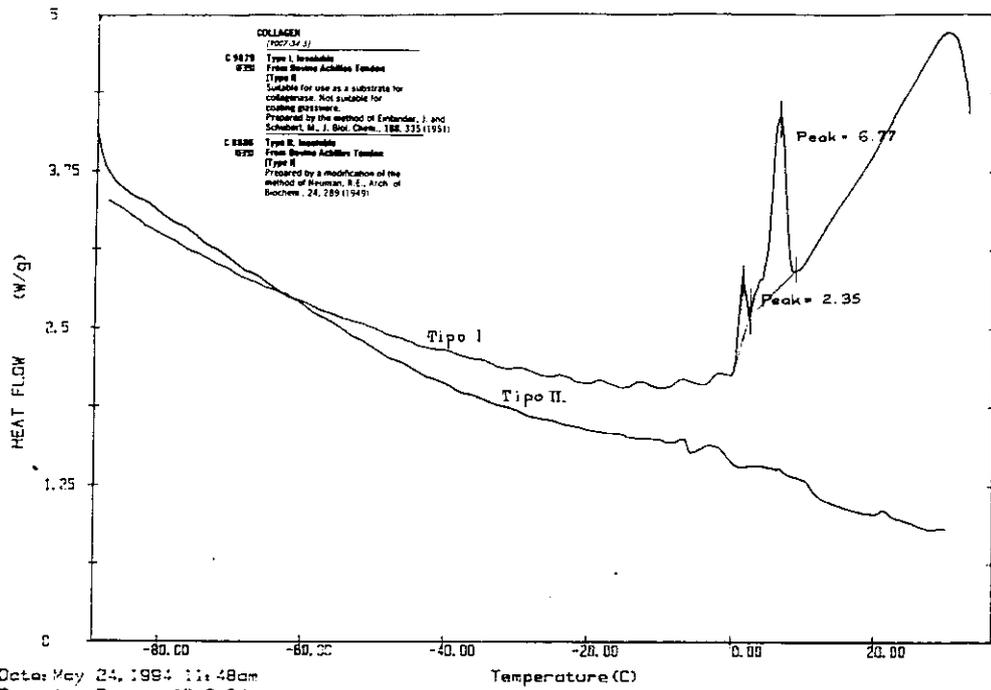
Su registro DSC no presenta efecto térmico alguno por debajo de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pero a partir de esta temperatura exhibe picos endotérmicos de intensidad progresivamente creciente. Destacan los endotermos a 5 , 11 y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 71).

Queratán sulfato.

Al igual que el colágeno y el condroitín sulfato C, las curvas DSC de queratán sulfato a bajas temperaturas no presentan efectos térmicos por debajo de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 72).

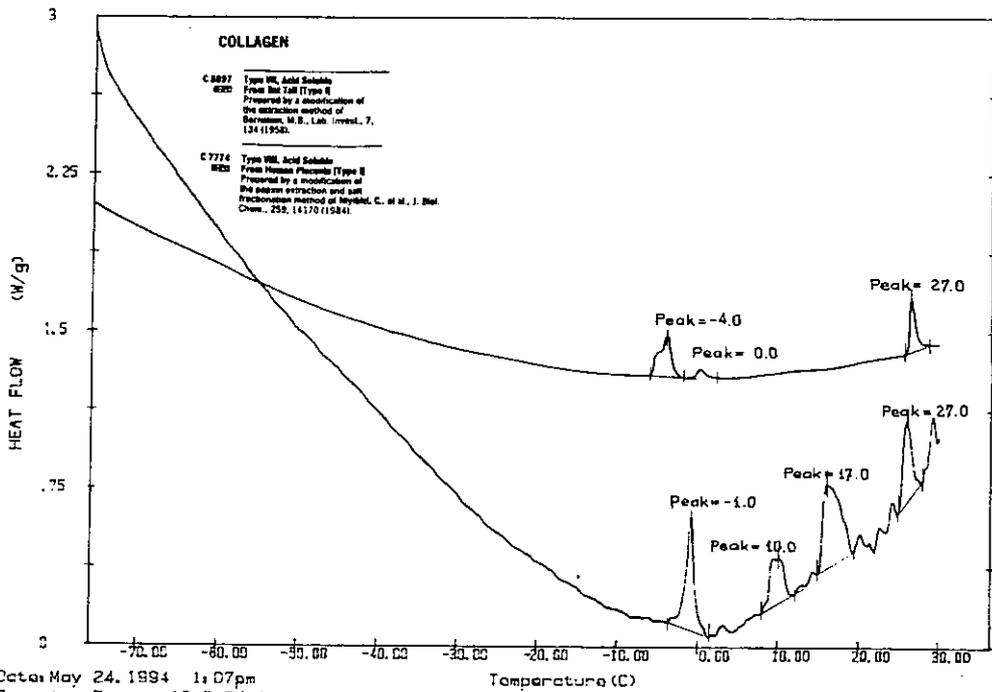
Dermatán sulfato.

Parece ser que dermatán sulfato tampoco exhibe efectos térmicos característicos por debajo de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Date: May 24, 1994 11:48am
 Scanning Rate: 10.0 C/min
 Sample Wt: 5.100 mg Pathria\
 File 1: C2

DSC7



Date: May 24, 1994 1:07pm
 Scanning Rate: 10.0 C/min
 Sample Wt: 1.800 mg Pathria\
 File 1: C3C

DSC7

Fig. 69.- Curva DSC de colágenos tipo I y II Sigma®
 Fig. 70.- Curva DSC de colágenos tipo VII y VIII Sigma®

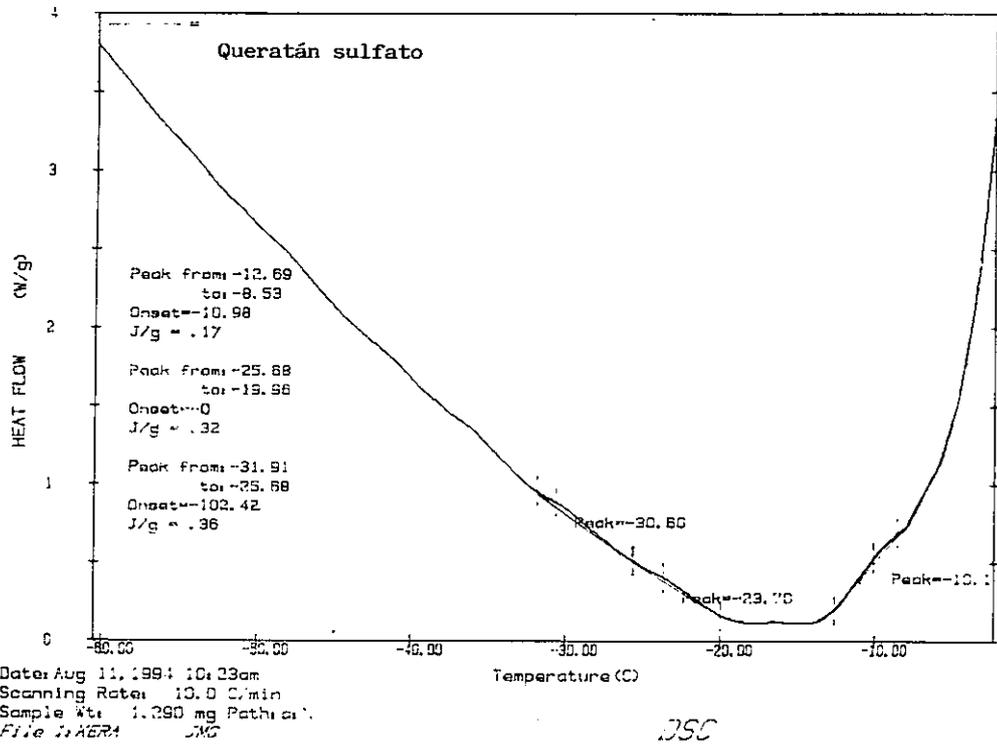
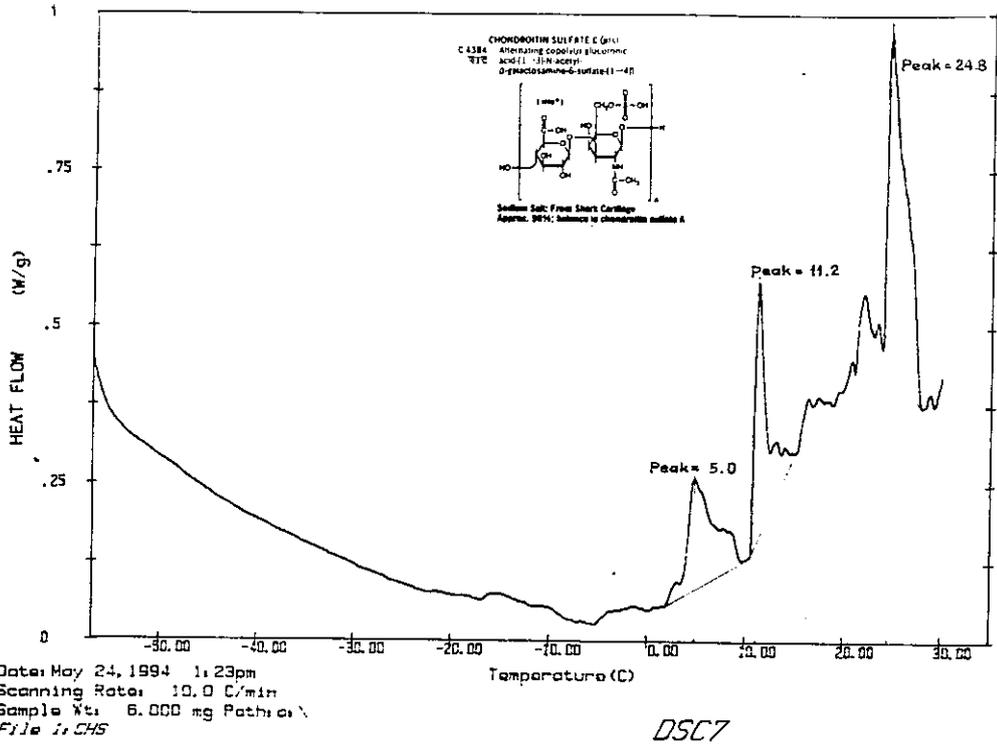


Fig. 71.- Curva DSC de condroitín sulfato C

Fig. 72.- Curva DSC de queratán sulfato

Heparinas.

Las heparinas no fraccionadas (ambas, cálcicas y sódicas) de alto peso molecular medio (12000-15000 D) exhiben un endotermo en el rango entre -11 y -15 °C, mientras que las heparinas de más bajo peso molecular (4000-6000 D) presentan ese mismo efecto entre -15 y -23 °C (Ramos-Sánchez, 1995).

IIIB2. RESULTADOS PARA MEZCLAS BINARIAS DE COMPONENTES QUIMICO-ESTRUCTURALES DEL OJO.

Las curvas DSC de mezclas hialuronato-colágeno, hialuronato-condroitina, hialuronato-dermatán, hialuronato-queratán y heparina-dermatán sulfatos han permitido evidenciar que colágeno, condroitín, dermatán y queratán no sólo no exhiben efectos térmicos a bajas temperaturas, sino que rebajan las temperaturas y los cambios de entalpía de los endotermos característicos de hialuronato y heparina.

Así, una mezcla de 30% de dermatán sulfato y 70% de heparín sulfato (Fig. 73) presenta el efecto endotérmico característico de las heparinas, esperado a -15 °C, a temperaturas onset de -20 °C y de pico a -18 °C.

En el caso de una mezcla de 73.6% de hialuronato sódico y 15.3% de colágeno tipo I, subtipo V Sigma (Fig. 74), la reducción de la temperatura del endotermo del hialuronato no es significativa, pero sí los cambios de entalpía, que descienden un 70%.

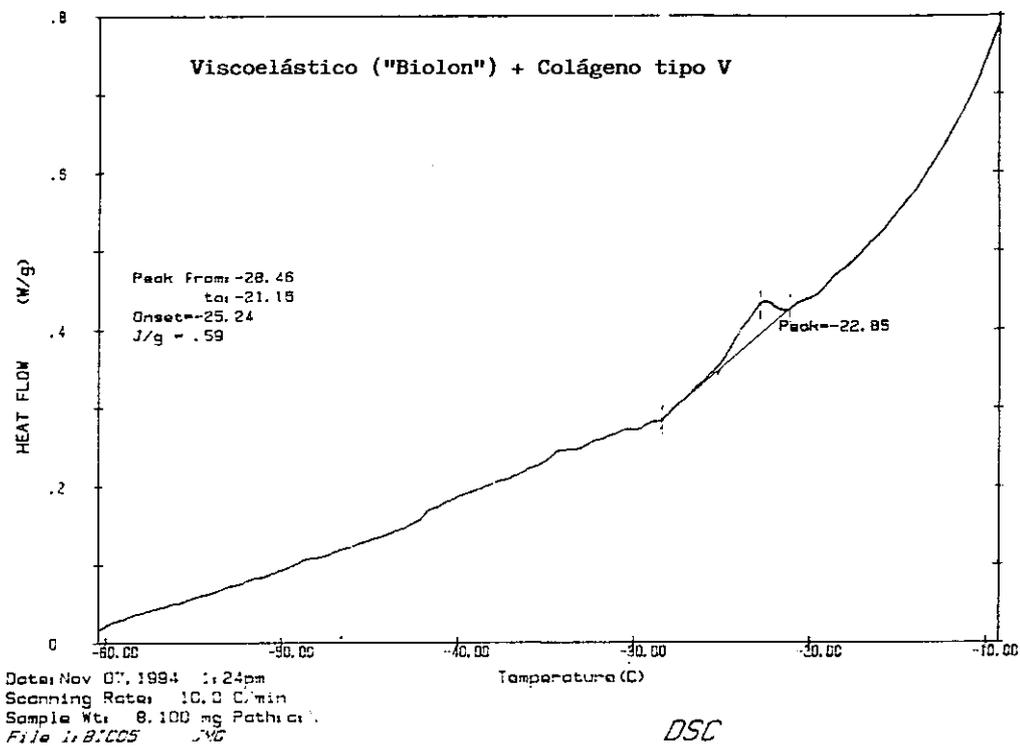
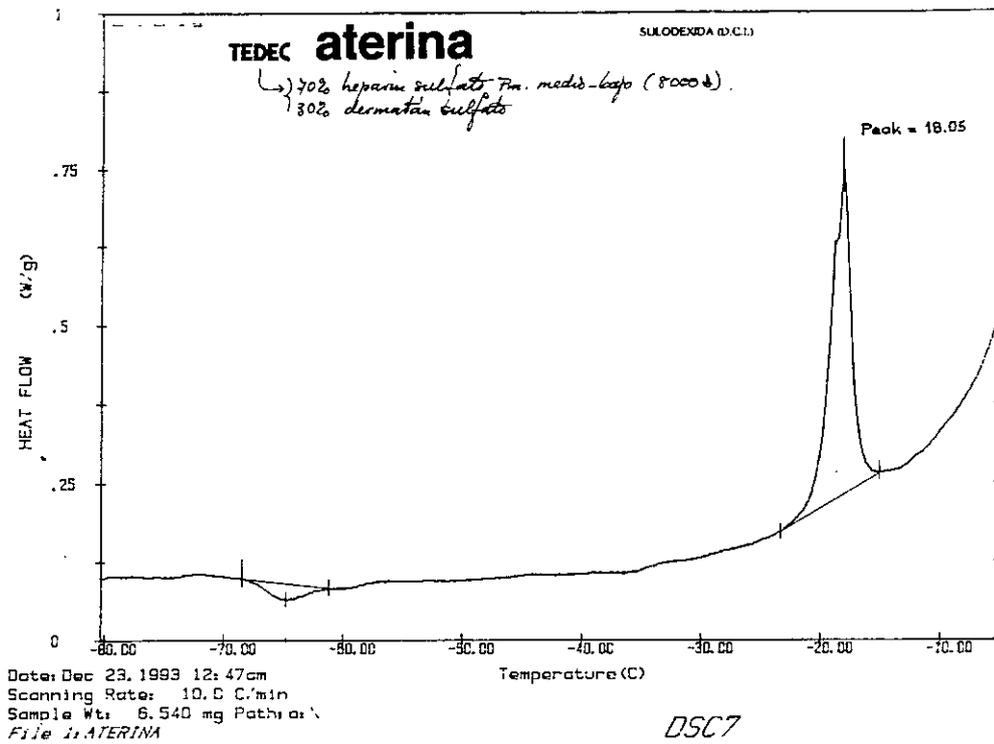


Fig. 73.- Curva DSC de una mezcla de heparín sulfato y dermatán sulfato

Fig. 74.- Curva DSC de una mezcla de hialuronato sódico y colágeno

IV. DISCUSION DE RESULTADOS.

IVA. INTERPRETACION DE LOS EFECTOS TÉRMICOS A BAJAS TEMPERATURAS, UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DE CORRESPONDENCIA ENTRE MATERIALES NATURALES Y ARTIFICIALES DE APLICACION EN OFTALMOLOGIA.

En el capítulo de Introducción, la consideración de las diversas estructuras de los componentes oculares nos ha llevado a una interpretación de las mismas como materiales compuestos a base de moléculas de mucopolisacáridos relleno una red de colágeno (o como fibras de colágeno embutidas en una matriz mucopolisacarídica). Información deseable de tales biomateriales es la plasticidad y resistencia a la tensión, derivadas de los distintos tipos de colágeno; y las propiedades viscoelásticas y de resistencia a la compresión derivadas del mucopolisacárido o mucopolisacáridos presentes.

En el capítulo de Resultados hemos mostrado como la metodología DSC a bajas temperaturas es útil al proporcionar efectos térmicos relacionados con la viscosidad, que son comunes a los diversos componentes oculares y a los viscoelásticos comerciales de diverso origen, pero cuyas características (temperaturas onset y de pico, y cambios de entalpía) permiten su diferenciación.

La interpretación de esta pluralidad de resultados para los efectos térmicos comunes ha sido buscada por nosotros en cinco frentes:

- En la heterogeneidad de los diversos mucopolisacáridos
- En la incidencia de los porcentajes relativos colágeno y mucopolisacáridos en cada material.
- En los efectos de envejecimiento del material.
- En los efectos del peso molecular del mucopolisacárido.
- En la histéresis térmica de los materiales.

Estas causas de pluralidad conciernen tanto a los componentes oculares como a los preparados viscoelásticos comerciales de composición y origen conocido. Sin embargo, las analizaremos y discutiremos por separado.

IVA1. DISCUSION DE RESULTADOS PARA COMPONENTES OCULARES FISIOLÓGICOS.

En principio, las grandes diferencias de las temperaturas con que se registra el efecto endotérmico común DSC a bajas temperaturas para componentes oculares como cristalino y córnea ($\Delta T=15\text{ }^{\circ}\text{C}$) pueden ser atribuidas a distintos porcentajes colágeno/mucopolisacárido, que determinan grados de hidratación muy diferentes, y a la susceptibilidad de la córnea a hidratarse cuando la temperatura desciende (pág.13). En cambio, las pequeñas diferencias de temperatura que separan la ubicación del endotermo para la esclera y el vítreo ($\Delta T=3.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) pueden explicarse por el carácter viscoelástico que comparten y a pesar de las diferencias de forma en que se encuentra el colágeno en ambas (pág. 14).

La interpretación de las curvas DSC de los materiales biológicos en soluciones acuosas a bajas temperaturas es un asunto espinoso: el estado del agua congelable y no congelable y las interacciones agua-biomateriales son fenómenos complejos cuyo conocimiento está lleno de incertidumbre. Mientras el agua congelable ha sido asociada con el agua libre, el agua no congelable ha sido identificada con el contenido de agua inmovilizada, completa o parcialmente enlazada, en soluciones y geles. Se cree que el envejecimiento dé lugar a que el agua sea liberada del estado de gel (vítrea) y se acumule como agua libre. (Bettelheim y Popdimitrova, 1992; Ramos-Sánchez y cols.,1995).

La existencia de una fase vítrea puede ser evidenciada en nuestras curvas DSC por una inflexión alrededor de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, que resulta de un cambio del calor específico de la muestra. Según Simatos y cols. (1990), este cambio está ligado a una transición de segundo orden, consistente en la transformación de un tipo de vidrio a otro. Una fracción del agua vítrea puede cristalizar en el recalentamiento, un hecho indicado por el efecto exotérmico que se presenta alrededor de $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$ (D en la Fig. 25). Tales hechos han sido descritos para varias soluciones

acuosas sencillas como glicerol (Luyet y Rasmussen, 1968; Bohon y Conway, 1972), polivinilpirrolidona (Luyet y Rasmussen, 1967), etilenglicol y azúcares (Luyet y Rasmussen, 1968) así como para sistemas complejos, tales como plasma (Simatos y Turc, 1973).

Es de resaltar que el efecto exotérmico descrito se produce sin discontinuidad tras un defecto endotérmico poco apreciable en los materiales estudiados, pero de buena resolución en otros sistemas tales como soluciones de heparina, espermatozoides, eritrocitos en suspensión acuosa, etc. (Ramos Sánchez y cols.). Tanto este endotérmico como el exotérmico evidenciado en los DSC de biomateriales y fármacos oftalmológicos poseen la característica de experimentar con el tiempo, desplazamientos (o corrimientos) a temperaturas superiores. Pueden ser considerados consiguientemente, buenos marcadores de los procesos de envejecimiento.

Los efectos endotérmicos presentes en nuestros registros alrededor de $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en torno a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ corresponden a una transición de fase no totalmente elucidada y a la fusión del hielo, respectivamente. El primero de estos endotérmicos ha sido observado por nuestro grupo de trabajo en las curvas DSC de quitina, quitina-glucano y celulosa (Martín Gil y cols., 1992) y para lipopolisacáridos de bacterias gram-negativas (Ramos Sánchez y cols., 1993). Asimismo, hemos observado este efecto en registros DSC de músculo vacuno y clara de huevo publicados por otros autores (Simatos y cols., 1990). Para quitinas y glucano-quitinas, hemos mostrado que este efecto corresponde a una transición de fase entre una estructura distorsionada pobre en enlaces de hidrógeno entre cadenas y una estructura no distorsionada rica en enlaces de hidrógeno entre cadenas (en quitina, parece que la transición de fase tiene lugar desde la forma β a la α). Para lipopolisacáridos, hemos postulado una transición de fase entre estructuras con diferentes entramados por enlace de hidrógeno para explicar el efecto térmico observado pero, adicionalmente, hemos asociado (según una relación inversa) es-

te efecto con el de despolimerización a temperaturas por encima de 120 °C (Ramos Sánchez y cols., 1993).

Hoy creemos que el fenómeno que se produce alrededor de -22 °C puede estar mediado por la reordenación de ambas, agua y moléculas de soluto, en el medio agua polisacárido, y que la temperatura del endotérmico puede ser útil para evidenciar el estado actual de envejecimiento. Es decir: cuánto más baja es la temperatura de este endotérmico, más alto es el número de moléculas de agua y soluto que permanecen enlazadas. Inversamente, cuanto más alta es la temperatura de este endotérmico, más alto es el entrecruzamiento entre las moléculas de soluto (agregación por enlace de hidrógeno) y más alta es la movilidad del agua.

IVA2. DISCUSION DE RESULTADOS PARA BIOMATERIALES OFTALMICOS.

La discusión de resultados obtenidos para los diversos preparados oftálmicos ha sido conducida según una clasificación por grupos de índole farmacológica, y siempre referida a los componentes oftálmicos naturales a los que va dirigida su utilidad:

Viscoelásticos tipo NaHA.

A la vista de la Tabla VIII puede ser observado que las temperaturas onset y de pico y los cambios de entalpía del efecto endotérmico a $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (común a todos los viscoelásticos tipo NaHA), son característicos para cada solución. También puede ser observado que tales datos térmicos varían considerablemente: las temperaturas de pico de las soluciones "Provisc", "Healon GV" y "Amvisc" son aproximadamente iguales y más altas que las de las soluciones de "Healon", "Biolon", "Amvisc Plus" y "Eurovisc" (a su vez bastante aproximadas entre sí) y mucho más altas que las de "Vitrax" y "Viscoat".

Estos resultados pueden ser asociados con el peso molecular (PM) de las fracciones de hialuronato en solución acuosa. Mientras "Healon GV" y "Amvisc" contienen fracciones de muy alto PM y "Healon" y "Biolon" han sido preparados con fracciones de alto PM, "Vitrax" y "Viscoat" parecen contener fracciones de PM medio.

El hecho de que las preparaciones con las fracciones de PM más alto ("Healon GV" y "Amvisc") hayan mostrado las temperaturas más altas del endotermo, indica un número aumentado de zonas de unión (viscosidad alta) y un contenido muy alto de agua congelable. Si en vez de una gran viscosidad (propiedad deseable cuando se requiere una matriz casi sólida en las cavidades oculares, como en cierta cirugía de polo anterior), lo que necesitamos es menos viscosidad y condiciones de flujo más

favorables (para salvaguardar células endoteliales durante cirugía de cataratas), entonces "Biolon", "Healon" y "Eurovisc" son los preparados más aconsejables.

Podemos hacer hincapié que en las curvas DSC de "Biolon" y "Healon" las temperaturas onset y de pico del endotermo bajo consideración son casi las mismas que la del endotermo correspondiente al humor acuoso del ojo (Tablas VIa y VIb).

En una discusión de los resultados del efecto exotérmico en torno a $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$ hemos de hacer notar que, si prestamos validez al criterio de asociar las temperaturas de pico más bajas con el estado menos envejecido del producto, entonces "Biolon" y "Healon" son los productos más deseables.

Viscoelásticos tipo no-NaHA.

Con los criterios que nos han servido de guía anteriormente, es decir aparición de efectos endotérmicos y proximidad a las temperaturas de pico de algunos de los componentes fisiológicos del ojo, podemos establecer que de los viscoelásticos tipo no-NaHA, los derivados más optimizados son "Coatel" y "Occucoat". Las temperaturas de su endotermo principal son próximas a las del humor vítreo (Tabla V) y acuoso (Tablas VI y VII).

De cualquier modo, la ausencia de efecto exotérmico a bajas temperaturas para todos los viscoelásticos tipo no-NaHA (que sí muestran los componentes fisiológicos del ojo) es una diferencia a tener en consideración.

Aceites de silicona.

En las curvas DSC de aceites de silicona, la presencia de endotermos a temperaturas bajas podría explicarse como debida a transiciones orden-desorden a niveles supramolecular y molecular. Creemos que el efecto con pico a $-43\text{ }^{\circ}\text{C}$ debería ser atribuido tentativamente a un cambio en la extensión de las regio-

nes cristalinas desde las condiciones de enfriamiento brusco previas al registro a las de calentamiento programado durante el registro. Este fenómeno de cambio de orden a nivel supramolecular no debería ser afectado por contenidos bajos de componentes de bajo peso molecular en el material. Se piensa que tales componentes son la causa de la toxicidad de los aceites de silicona cuando se aplican intraocularmente (Gabel y cols., 1987; Johnson y cols., 1989). Más clara parece la asignación del efecto con pico a $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una transición conformacional de las cadenas de polimetilsiloxano entre las formas curvada y lineal y que afectaría tanto a los componentes de alto peso molecular (mayoritarios) como a los componentes de bajo peso molecular.

De los resultados sobre ciclos de enfriamiento de los aceites de silicona, el relativo al incremento del área de pico del endotermino a $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 27) nos lleva a considerar que sucesivos enfriamientos no sólo modifican la estructura conformacional de estos materiales catenarios, sino que también producen ruptura de los enlaces de las cadenas, con el subsiguiente incremento del contenido en componentes de bajo peso molecular.

Para los aceites de silicona de más baja molecularidad/viscosidad (1000 cs), después de una etapa de enfriamiento (la previa al primer registro DSC), la aparición en sus curvas DSC del endotermino a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ como efecto independiente del endotermino a $-43\text{ }^{\circ}\text{C}$ puede ser interpretada postulando: (i) una presencia significativa de componentes de bajo peso molecular en los aceites ligeros, o (ii) una gran susceptibilidad de estos aceites ligeros a dar componentes de bajo peso molecular por enfriamiento. La primera conclusión es acorde con resultados comunicados por otros autores (Nakamura y cols., 1990) y parece contradecir las consecuencias proclamadas por las casas comerciales sobre la eliminación de los componentes de bajo peso molecular de los aceites de silicona ligeros.

Con la anterior información es posible interpretar también los resultados para aceites de silicona envejecidos, que mues-

tran en algunos casos un aumento significativo del área del segundo pico ($-36\text{ }^{\circ}\text{C}$) a costa del primero ($-47\text{ }^{\circ}\text{C}$): el paso del tiempo produce aceites ricos en componentes de bajo peso molecular a costa de la degradación/ruptura de los componentes de alto peso molecular mayoritarios.

Lentes intraoculares.

Los registros DSC han mostrado que las temperaturas onset y de pico de las lentes PMMA de Kabi son más próximas a las de los componentes fisiológicos del ojo que las de PMMA de US AJL (Iol Inc.), y sus cambios de entalpía son más elevados en aquellas que en éstas. Las lentes de silicona (al menos las de "Piolens" de Iovisióm Inc.) no muestran, en cambio, efecto térmico alguno en curvas calorimétricas a bajas temperaturas.

Lágrimas artificiales y medios de conservación de córneas.

Aunque las soluciones de ambos tipos de preparados, lágrimas artificiales y medios de conservación de córneas comparten en algún caso la composición, su comportamiento térmico es notablemente diferente. Las primeras exhiben con gran intensidad el efecto endotérmico a $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H=4\pm 1\text{ Jg}^{-1}$), mientras en los segundos tal efecto está ausente. La carencia de este endotermo en el registro DSC de "Optisol", un conservante corneal con una composición a base de condroitín sulfato y dextrano, es difícil de explicar, a no ser que se presuma la inclusión en el producto de edetato sódico y cloruro de benzalconio (de hecho no especificada en las indicaciones comerciales).

La comparación del efecto endotérmico a bajas temperaturas de ambos productos en consideración respecto al mostrado por las lágrimas naturales, pone de manifiesto una mayor similitud para las lágrimas artificiales, en detrimento de los medios de conservación de córneas.

Midriáticos y Ciclopléjicos.

Dentro de este grupo farmacológico destaca la similitud de los registros DSC de "Colircusí tropicamida" y "Colircusí ciclopléjico" y su diferencia con los de "Colircusí atropina": la tropicamida y el ciclopléjico en solución presentan registros sencillos, con temperaturas de pico de sus endotérmicos muy próximas (alrededor de -18°C) y cercanas a las de los humores oculares, mientras la curva DSC de la atropina exhibe efectos múltiples a temperaturas alejadas de los endotérmicos que presentan los componentes fisiológicos del ojo.

Estos resultados permiten prever una menor interacción de las soluciones de los antimuscarínicos sintéticos con los componentes del ojo que la prevista para atropina. De hecho, aunque la existencia de una función amina terciaria es compartida por los tres activos y justifica para todos ellos su gran capacidad para atravesar membranas celulares, se ha observado que la cinética es muy distinta. Según Jordano (1985), la cinética está condicionada por la unión específica de la droga a los granos de melanina de la úvea anterior, lo que modula las respuestas esperadas en función del tiempo: la respuesta ciclopléjica de la atropina es lenta y lentamente reversible en consonancia con el color del iris.

Respecto a los dos simpaticomiméticos en solución estudiados (reunidos en un solo grupo pese a su diferente utilización) ninguno parece reunir las propiedades físicas (estimadas térmicamente de los registros DSC) que serían de desear, si bien consideramos más aceptable el modo en que se vehicula comercialmente la fenilefrina que el dipivalil epinefrina: el registro de la primera exhibe, al menos, el efecto fisiológico a -53°C del que carece la segunda.

Sería, pues, deseable la investigación y el desarrollo de fármacos alternativos a "Diopine" para vehiculizar la epinefrina.

La comparación de los datos térmicos del colirio "Llorens midriático" en relación con los preparados anteriores permite advertir una mayor similitud con "Colirio Oculos fenilefrina" que con "Colircusí atropina": el exotermo de fenilefrina se encuentra presente, aunque desplazado a temperaturas más altas ($-35.6\text{ }^{\circ}\text{C}$) a causa de la presencia cuantitativa del producto. Este hecho se corresponde con la composición del preparado oftálmico: 4 mg/ml de fenilefrina y 2 mg/ml de atropina.

Antiinflamatorios Oculares.

Consideramos que la comparación y discusión de resultados para el amplio número de preparados de este grupo debe ser conducida a través de una clasificación global en antiinflamatorios esteroideos y antiinflamatorios no esteroideos (AINES), y su subsiguiente clasificación según principios activos.

Dentro de los esteroideos es preciso señalar, en primer lugar, que el examen de los datos de temperaturas de pico del endotermo común a los derivados de dexametasona en solución ha mostrado la filiación térmica de las combinaciones dexametasona-antibiótico ("Colircusí de Icol", "Colircusí Gentadexa", "Oftalmotrín Dexa" y "Maxitrol") con la dexametasona pura ("Colircusí Dexametasona"). En efecto, el endotermo que para la dexametasona pura aparece a $-29\text{ }^{\circ}\text{C}$ se mantiene en sus asociaciones con antibióticos, si bien a temperaturas más altas (como era de esperar: a $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (o $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$) en su asociación con cloranfenicol; a $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ con gentamicina; a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ con trimetropín; y a $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$ con neomicina). En base a estas temperaturas, e independientemente de la efectividad específica que poseen unas u otras combinaciones, nosotros consideramos que los preparados comercializados más biocompatibles según propiedades físicas, son "Colircusí Gentadexa" (preferente por exhibir adicionalmente el exotermo a $-51\text{ }^{\circ}\text{C}$) y "Colircusí de Icol". Los efectos endotérmicos que aparecen a $-33\text{ }^{\circ}\text{C}$ en los registros de las combinaciones dexametasona-antibióticos son atribuibles al antibiótico.

Respecto a los derivados de fluorometolona resulta evidente la idoneidad del producto "Isopto-Flucon" si consideramos que las características térmicas de su endotermino (temperatura de pico $-20.6\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\Delta H=6.18\text{ Jg}^{-1}$) son más próximas a las de los componentes naturales que el de "FML". Sin embargo, su comparación con el producto en competencia "FML" no ha podido ser establecida debido a que la presencia en éste producto de edetato sódico como conservante minimiza el cambio de energía del endotermino bajo consideración.

Los pobres resultados obtenidos del estudio de los AINES (únicamente "Ocuflur" e "Indoftol" pueden ser biocompatibles) no se prestan a la obtención de conclusiones.

Antihipertensivos oculares.

La biocompatibilidad de los cuatro antihipertensivos oculares estudiados está asegurada, en base a nuestro criterio, por la presencia en los registros DSC de las soluciones de todos ellos del endotérmico en torno a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La mayor correspondencia con las temperaturas de los componentes oculares se produce para "Betagan" (con un exotermino adicional a $-54\text{ }^{\circ}\text{C}$) y, sucesivamente en menor grado, para "Mikelan", "Betoptic" y "Elebloc".

Antibióticos.

Cloranfenicol y oxitetraciclina no presentan efectos DSC a bajas temperaturas. Sí los presentan las disoluciones de norfloxacinó ("Chibroxín") y gentamicina SO_4 de Colircusí: la de éste último exhibe un endotermino en torno a $-15.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y dos exoterminos alrededor de $-36.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-50.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ mientras la de norfloxacinó muestra únicamente un endotermino a $-15.0\text{ }^{\circ}\text{C}$. En la asociación de gentamicina con dexametasona (gentadexa de Colircusí), el endotermino de gentamicina se desplaza a la izquierda (a más bajas temperaturas), como es usual en el componente térmico de los polisacáridos cuando están combinados con otras especies químicas minoritarias.

V. CONCLUSIONES.

1a. Las curvas DSC a bajas temperaturas de los tejidos de los diversos componentes naturales del ojo exhiben efectos térmicos comunes cuyas variaciones están determinadas por su composición específica (e interacciones con el agua) y por el proceso de envejecimiento.

2a. Las curvas DSC a bajas temperaturas de gran parte de los viscoelásticos y de otros fármacos de uso oftálmico que la experiencia clínica ha validado como biocompatibles, también muestran los efectos térmicos observados para los componentes naturales.

3a. Para los viscoelásticos tipo hialuronato (uno de los grupos de preparados farmacéuticos mejor estudiados) se ha demostrado que la temperatura de pico del endotermino presente en sus curvas DSC, alrededor de $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$, puede ser asociada directamente con el peso molecular de la fracción hialuronato en solución acuosa.

4a. Las características térmicas (temperaturas onset y de pico, y cambio de entalpía) de los endotermos de los registros DSC de "Biolon", "Healon" y "Eurovisc" han resultado ser sorprendentemente análogas a las del humor acuoso del ojo humano.

5a. Para los aceites de silicona de uso oftálmico, se ha demostrado que las temperaturas de sus endotermos DSC en el rango entre -43 y $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$ pueden ser asociadas directamente con su peso molecular y viscosidad.

6a. El reenfriamiento y el envejecimiento de los aceites de silicona de uso oftálmico dan lugar a cambios en sus curvas DSC, que pueden ser interpretados involucrando un enriquecimiento en componentes de bajo peso molecular.

7a. Dentro de un mismo grupo comercial de biomateriales, los cambios de entalpía del proceso endotérmico principal cre-

cen a medida que el peso molecular y la viscosidad decrecen. Este resultado se traduce, si consideramos que los cambios de entalpía son un marcador del grado de polidispersidad, en la constatación de que a más baja viscosidad, más alta polidispersidad.

8a. Las lágrimas artificiales aunque, aparentemente, comparten composiciones similares con los productos conservadores de córneas, en realidad muestran comportamientos térmicos diferentes. Los efectos térmicos de las lágrimas artificiales son más próximos a los de las lágrimas naturales que los de los medios conservadores de córneas.

9a. La heterogeneidad intragrupo de los midriáticos y ciclopléjicos y la especificidad de cada uno de ellos en su aplicación, no permiten seleccionar entre preparados alternativos en base a las características térmicas. Solamente es posible asegurar la compatibilidad de "Colircusí Tropicamida" y "Colircusí Ciclopléjico" con los componentes oculares atendiendo a la similitud de sus registros térmicos.

10a. El examen de los registros DSC de los antiinflamatorios esteroideos oculares también ha mostrado una correspondencia prácticamente general de sus efectos térmicos con los componentes fisiológicos del ojo. Consideramos, en base a este criterio, que los productos más optimizados resultan ser "Colircusí Gentadexa", "Colircusí de Icol" e "Isopto-Flucon". De los antiinflamatorios no esteroideos, los productos más biocompatibles desde el punto de vista térmico son "Ocuflur", en primer lugar, e "Indoftol" en segundo.

11a. De los antihipertensivos oculares estudiados, "Betagan" es el que mayor correspondencia muestra con los componentes naturales del ojo, en cuanto a efectos térmicos se refiere. Le siguen en este tipo de biocompatibilidad "Mikelan", "Betoptic" y "Elebloc".

12a. Los antibióticos más utilizados en Oftalmología muestran un comportamiento térmico polarizado bien en la no aparición de endotermos a bajas temperaturas o en la aparición de un endotermo a $-15.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (para "Oftalmotrim", "Chibroxin" y "Colircusí gentamicina"). En base a los registros DSC de combinaciones antiinflamatorios-antibiótico, se han podido establecer relaciones de filiación térmica entre las asociaciones dexametasona-antibióticos con la dexametasona pura.

13a. El efecto exotérmico que se registra hacia $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$ para los diversos biomateriales estudiados sufre desplazamiento a temperaturas más altas a medida que pasa el tiempo. Este fenómeno es considerablemente más rápido para los componentes naturales del ojo que para los fármacos en solución. El humor vítreo del ojo es el componente natural que más rápidamente envejece.

14a. Se ha evidenciado la dificultad de explorar la correspondencia del comportamiento térmico de mezclas de constituyentes químicos del ojo con el comportamiento observado sobre los componentes naturales. Se sugiere, en consecuencia, que el éxito de cualquier estudio sucesivo en este campo estará condicionado a la valoración de los efectos térmicos de las subfracciones fisiológico-estructurales de los componentes naturales.

VI. BIBLIOGRAFIA.

Balazs, E., Miller, D. y Stegmann, R.: Viscosurgery and the use of Na-hyaluronate in intraocular lens implantation. Presented at the International Congress and First film Festival on Intraocular lens implantation. Cannes. Francia, Mayo, 1979.

Balazs, E.A. y Sweeney, D.R.: The injection of hyaluronic acid and reconstituted vitreus into de vitreus cavity. New and Controversial aspects of Retinal Detachment, 1961. Harper and Row, Nueva York, 1968.

Balazs, E.A., Freeman, M.I., Kloti, R., Meyer-Schwickerath, G., Regnault, F. y Sweeney, D.H.: Hyaluronic acid and replacement of vitreus and aqueus humor. Mod. Probl. Ophthalmol., 10: 3-6, 1972.

Berman, E.R. y Mickaelson, I.C.: The chemical composition of the human vitreus body as related to age and myopia. Exp. Eye. Res., 3: 9, 1964.

Bettelheim, F.A. y Popdimitrova, N.: Hyaluronic acid - a syneretic glycosaminoglycan. Curr. Eye Res., 11: 411-419, 1992.

Bohon, R.L. y Conway, W.T.: DTA studies of the glycerol-water system. Thermochim. Acta, 5: 493-494, 1973.

Bonnet, M., Kopp, J. y Renore, J.P.: Effect of collagen crosslinking on collagen-water interaction. En: Water and Ions in Biomolecular Systems. Avances in Life Sciences, Birkhäuser Verlag Basel, 1990.

Bornstein, P. y Traub, W., "The Proteins", IV: 412, 1979.

Dische, Z. y Zeemenis, G.: The content and estructural characteristics of the colagenus protein of rabbits lens capsules at diferents ages. Invest. Ophtalm. 4: 174-180, 1965.

Einsner, G.: Zur Anatomie des Glaskörpers, Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 193: 33-56, 1975.

Federman, J.L. y Schubert, H.D.: Complications associated with the use of silicone oil in 150 eyes after retina-vitreous surgery. Ophthalmology, 95: 870-876, 1988.

Fine, B.S. y Yanof, M.: Ocular Histology. A Text and Atlas, Harper and Row, Hagerstown, 1972.

Ford, J.L.: "Pharmaceutical and Thermal Analysis". En: Thermochim. Acta, vol. 248 (Número Monográfico), 1995.

Fredickson, D.S.: "Hereditary systemics diseases of metabolism that affect the eye". En: "The eye and systemics diseases". Mansof, F.A. (Ed.), 1975.

Gabel, V.P., Kampik, A. y Burkhardt, J.: Analysis of intraocularly applied silicone oils of various origins. Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 225: 160-162, 1987.

Hogan, M.J., Alvarado, J.A. y Weddel, J.E.: "Histology of the human eye". W.B. Saunders Co., (Ed.), Philadelphia, 1971.

Jedziniak, J.A.; Kinoshita, J. H.; Yates, E.M.; Hocker, L.O. y Benedeck, G.B.: On the presence and mechanism of formation of heavy molecular weight aggregates in human normal and cataractores lens. Exp. Eye. Res, 15: 185-192, 1973.

Johnson, R.N., Flynn, H.W., Parel, J.M. y Portugal, L.M.: Transient hypopyon with marked anterior chamber fibrin following pars plana vitrectomy and silicone oil injection. Arch. Ophthalmol., 107: 683-686, 1989.

Kuck, J.F.R. y Crosswell, H.H.: Lens and the chief source of fructose in rabbit aqueous humor. Ophthal. Res., 6: 189-196, 1974.

Luyet, B. y Radmunsen, D.: Biodynamica, 10: 137, 1967 (Citado por Simatos y cols., 1990).

Luyet, B. y Radmunsen, D.: Biodynamica, 10: 167, 1968 (Citado por Simatos y cols., 1990).

Martín-Gil, F.J., Leal, J.A., Gómez Miranda, B., Martín-Gil, J., Prieto, A. y Ramos-Sánchez. M.C.: Low temperature thermal behaviour of chitins and chitin-glucans. Termochim. Acta, 211: 241-254, 1992.

Maurice, D.: In Physiology of the eye (Ed.). Davson, H. 2nd edition, p.489. Boston: Little Brown, 1969.

Moutard, M. y Verdeaux, S.: Anatomie du vitré. Structure et ultrastucture: données récents. Encycl. Med. Chir. (París) 21003, 1987.

Nakamura, K., Refojo, M.F., Crabtree, D.V., y Leong, F.L.: Analysis and fractionation of silicone and fluorosilicone oils for intraocular use. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 31: 2059-2069, 1990.

Obrinck, B.: The influence of glycosaminoglycans on the formation of fibres from monomeric tropocollagen in vitro. Eur. J. Biochem., 34: 129-137, 1973.

Offret H. y Baradani, N.: Cristalin et zonule: Anatomie et ultrastructure. Encycl. Med. Chir. (Paris), Ophthalmology, 21003, 1990.

Pau, H. Die Doppelbrechung von Sklera und Cornea. Albrecht Graefe's Archiv. für Ophthalmologie, 156: 415-426, 1955.

Phelps, C.F.: "Polysaccharides". En: "Oxford Biology Readers". Head, J.J. y Lowenstein, O.E., (Ed.). Oxford University Press, 1972.

Pirie, A.: Calor and solubility of the proteins of human cataractes. Invest Ophthalm., 7: 634-650, 1958.

Ramos-Sánchez, M.C.: Utilidad del análisis térmico en Microbiología. Tesis Doctoral, Universidad de Valladolid, 1990.

Ramos-Sánchez, M.C., Orduña Domingo, A., Rodríguez Torres, A., Martín-Gil, F.J. y Martín-Gil, J.: Low temperature thermal behaviour of lipopolysaccharides from Brucella and other Gram-negative bacteria. Termochim. Acta, 215: 227-233, 1993.

Ramos-Sánchez, M.C., de Andrés Santos, A.I., Martín-Gil, F.J. y Martín-Gil, J.: Resultados pendientes de publicación, 1995.

Remington Farmacia, 17 ed.. Ed. Panamericana, 1987 (Traducción de "Pharmaceutical Sciences", 17 ed., Mack Publishing Co., 1985).

Rigal-Verneil, D., Paul-Buclon, C. y Sanpau Ph.: Physiology de la cornée. Encicl. Med. Chir. (Paris) Ophthalmology, 21020, 1990.

Roughley, P.J.: Helix formation. Its involvement in the formation of the gel structures. Trans. Ophtal. Soc. UK, 95: 369-371, 1975.

Schwarz, N.: Electron microscope studies of the structure of the human sclera and cornea. Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie, 38: 26-49, 1953.

Simatos, D., Faure, M., Bonjour, E. y Couach, M.: Differential thermal analysis and differential scanning calorimetry in the study of water in foods. En: Water and ions in Biological Systems. Proceed. 5th Intern. Conf. pp. 193-209, 1990.

Simatos, D. y Turc, J.M.: Vith International Course on Freeze Drying. Lucerne, 1973.

Skorpik, C, Menapace, R., Ghad, H.D. y Paroussis, P.: Silicone oil implantation in penetrating injuries complicated by PVR. Retina, 9: 8-14, 1989.

Teng, C.C. y Chi, H.H.: Vitreous changes and the mechanism of the retinal detachment. Am. J. Ophtal., 44: 335, 1957.

Trelstad, R.L. y Kang, A.H.: Collagen heterogeneity in the avian eye: lens, vitreous body, cornea and sclera. Experimental eye Research, 18: 395-406, 1974.

Troussaint, D.: Le corps vitré. Arch. Ophtal. Paris, 37: 653-663, 1977.