



ORIGINALES

Artículo bilingüe inglés/español

Estabilidad del colirio de insulina para el tratamiento de úlceras corneales refractarias

Stability of insulin eye drops in the treatment of refractory corneal ulcers

Andrea Cuartero-Martínez^{1,2}, Gonzalo Hermelo-Vidal¹, Ana Castro-Balado^{1,2,3}, Ángeles Gómez-García⁴, Miguel González-Barcia^{1,3}, Francisco José Otero-Espinar², Anxo Fernández-Ferreiro^{1,3}, Cristina Mondelo-García^{1,3}

¹Grupo de Farmacología Clínica, Instituto de Investigación Sanitaria Santiago de Compostela (IDIS), Santiago de Compostela. España. ²Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela. España. ³Servicio de Farmacia, Área Sanitaria de Santiago de Compostela e Barbanza (SERGAS), Santiago de Compostela. España. ⁴Servicio de Análisis clínicos, Área Sanitaria de Santiago de Compostela e Barbanza (SERGAS), Santiago de Compostela. España.

Autor para correspondencia

Cristina Mondelo García
Servicio de Farmacia
Hospital Clínico Universitario
Santiago de Compostela
Travesía Choupana, s/n
15706 Santiago de Compostela. España.
Correo electrónico:
cristina.mondelo.garcia@sergas.es

Recibido el 3 de junio de 2022;
aceptado el 12 de julio de 2022.
Early Access date (10/25/2022).
DOI: 10.7399/fh.13293

Cómo citar este trabajo

Cuartero-Martínez A, Hermelo-Vidal G, Castro-Balado A, Gómez-García Á, González-Barcia M, Otero-Espinar FJ, et al. Estabilidad del colirio de insulina para el tratamiento de úlceras corneales refractarias. *Farm Hosp.* 2022;46(6):335-9.

Resumen

Objetivo: Determinar y comparar la estabilidad físico-química y microbiológica de dos colirios de insulina 25 UI/ml elaborados con suero fisiológico o *balanced salt solution* bajo diferentes condiciones de conservación durante 120 días.

Método: Los colirios se elaboraron por triplicado con insulina Actrapid® 100 UI/ml y *balanced salt solution* o suero fisiológico como vehículo, y fueron conservados a temperatura ambiente (25 °C), en nevera (2-8 °C) o congelador (-20 °C) durante 120 días. Se determinó la concentración de insulina mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución, la osmolalidad y el pH a días 0, 3, 7, 15, 30, 60, 90 y 120. Asimismo, se extrajeron muestras para estudios microbiológicos en los días 0, 15, 30, 60, 90 y 120.

Resultados: La formulación elaborada con suero fisiológico mantuvo la concentración de insulina por encima del 90% con respecto a la inicial tras 120 días de estudio en todas las condiciones de temperatura. En el caso del colirio elaborado con *balanced salt solution*, la concentración se mantuvo estable en ambiente y congelador tras 120 días, aunque en nevera descendió por debajo del 90% a día 90 de estudio. Los valores de osmolalidad y pH se mantuvieron constantes en ambas formulaciones y condiciones de conservación. No se observó crecimiento microbiológico en ninguna de las muestras retiradas.

Abstract

Objective: To determine and compare the physicochemical and microbiological stability of two 25 IU/mL insulin eye drop formulations made with normal saline and a balanced salt solution, respectively, stored for 120 days under various conditions.

Method: Eye drops were compounded in triplicate with 100 IU/mL Actrapid® insulin and either normal saline or a balanced salt solution as vehicles, and they were stored alternatively at room temperature (25 °C), in a refrigerator (2-8 °C) or in a freezer (-20 °C) for 120 days. Insulin concentrations were determined by ultra-high resolution liquid chromatography, and osmolality and pH values were measured at days 0, 3, 7, 15, 30, 60, 90 and 120. Likewise, samples were extracted for microbiological studies on days 0, 30, 60, 90 and 120.

Results: The formulation made with normal saline maintained insulin concentrations above 90% of the baseline level after 120 days across all temperature conditions. In the case of the balanced salt solution-based eye drops, insulin concentration when stored at room temperature or in the freezer remained stable after 120 days, although insulin concentration when stored in the refrigerator fell below 90% on day 90 of the study. Osmolality and pH values remained constant in both formulations and across all storage conditions. No microbiological growth was observed in any of the samples.

PALABRAS CLAVE

Insulina; Úlceras corneales; Estabilidad; Formulación magistral; Oftalmología; Soluciones oftálmicas.

KEYWORDS

Insulin; Corneal ulcers; Stability; Pharmaceutical compounding; Ophthalmology; Ophthalmic Solutions.



Los artículos publicados en esta revista se distribuyen con la licencia
Articles published in this journal are licensed with a
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License.
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>
La revista Farmacia no cobra tasas por el envío de trabajos,
ni tampoco por la publicación de sus artículos.

Conclusiones: El colirio de insulina 25 UI/ml elaborado con suero fisiológico es estable 120 días, conservado tanto a temperatura ambiente como en nevera o congelador, protegido de la luz. Con *balanced salt solution* permanece estable 120 días a temperatura ambiente y congelador, reduciéndose el periodo de validez a 90 días en el caso de la conservación en nevera.

Introducción

Las úlceras corneales se originan como consecuencia de la rotura o defecto del epitelio corneal con inflamación subyacente, dando lugar en ocasiones a la necrosis del estroma y constituyendo una causa importante de morbilidad ocular a nivel mundial¹. Entre los síntomas asociados destacan irritación, sensación de cuerpo extraño, edema conjuntival, hiperemia y visión borrosa². Es fundamental un diagnóstico temprano y el inicio precoz de un tratamiento adecuado, ya que pueden provocar pérdida de visión al originar opacidad corneal y defectos epiteliales persistentes³.

Los defectos epiteliales persistentes se definen como alteraciones de la córnea que no mejoran después de 2 semanas de tratamiento convencional. Esta ausencia de epitelización de la superficie corneal se puede producir por múltiples causas, tales como infecciones, medicamentos, alteraciones en la adhesión epitelial o traumatismos^{4,5}.

El tratamiento de este tipo de lesiones comienza con una lubricación intensiva, retirada de tratamientos que ocasionen toxicidad epitelial, antibióticos profilácticos, así como el empleo de vendajes oclusivos o lentes de contacto terapéuticos^{5,7}. En caso de refractariedad, se puede recurrir a la administración oftálmica de suero autólogo o plasma rico en plaquetas⁸.

En los últimos años se ha incrementado la búsqueda de factores de crecimiento para la cicatrización de heridas corneales, dada la presencia de receptores para estas moléculas en células epiteliales de la córnea^{9,10}. Recientemente, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento nervioso y la insulina han mostrado ser útiles en el tratamiento de este tipo de lesiones por sus propiedades promotoras del crecimiento epitelial¹¹.

El empleo de insulina en las úlceras corneales fue propuesto por primera vez por Aynsley en 1945 en la reepitelización de úlceras refractarias al tratamiento habitual¹². Actualmente, el uso tópico de insulina en úlceras corneales se centra fundamentalmente en pacientes diabéticos, tanto en defectos epiteliales corneales postoperatorios como en defectos epiteliales no quirúrgicos^{13,14}. En pacientes no diabéticos, se ha descrito el empleo de insulina en el tratamiento de úlceras corneales neurotróficas refractarias a tratamiento convencional y en defectos epiteliales persistentes tras la resección de un neurinoma^{15,16}. En lo que concierne a la seguridad de la insulina, no se han descrito efectos secundarios ni alteración en los niveles sanguíneos de glucosa, presión intraocular o epitelio corneal como consecuencia de su administración a largo plazo^{17,18}.

En situaciones de vacío terapéutico es frecuente recurrir a la reformulación de medicamentos para su adaptación a una vía de administración diferente a la original. Actualmente, no se dispone de ningún colirio comercial de insulina en nuestro país, por lo que debe recurrirse a la formulación magistral partiendo de una solución inyectable de insulina humana de acción rápida para administración subcutánea o intravenosa.

Hasta la fecha no se ha publicado ningún artículo científico sobre la estabilidad de las formulaciones de insulina oftálmicas empleadas en el tratamiento de los defectos epiteliales persistentes, por lo que este trabajo se postula como el primero en su campo. El objetivo es determinar la estabilidad de dos tipos de colirio de insulina 25 UI/ml elaborados con suero salino fisiológico (SSF) o *balanced salt solution* (BSS®) bajo diferentes condiciones de conservación durante 120 días.

Métodos

Preparación de colirios de insulina

Se procedió a la elaboración del colirio de insulina 25 UI/ml con dos vehículos diferentes. Para ello, se empleó insulina Actrapid® [100 UI/ml] (Novo Nordisk®, Bagsvaerd, Dinamarca), conteniendo entre sus excipientes meta-cresol (m-cresol). Como vehículo se adicionó BSS® (Alcon Laboratories®, Texas, Estados Unidos) o SSF (Grifols®, Barcelona, España).

Conclusions: 25 IU/ml insulin eye drops made with normal saline remain stable for 120 days whether they are stored at room temperature, in a refrigerator or in a freezer, provided that they are protected from light. When made with a balanced salt solution, they remain stable for 120 days at room temperature and in a freezer, their shelf life being reduced to 90 days in the case of storage in a refrigerator.

Se elaboraron 200 ml de cada formulación, adicionando 50 ml de insulina Actrapid® a 150 ml de BSS® o SSF en un Vacuflasc® de 250 ml. Se elaboraron tres lotes de cada vehículo. Posteriormente, se procedió a la homogeneización de las soluciones durante 30 segundos mediante agitación y a su envasado en viales de 5 ml de vidrio topacio tipo 1. Todo el proceso se realizó en condiciones asépticas bajo flujo laminar horizontal y se consideró el día de elaboración de las formulaciones como el día 0 del estudio.

Condiciones de conservación

Las condiciones de conservación fueron: temperatura ambiente (25 °C), refrigeración (entre 2 y 8 °C) o congelación (-20 °C). Para asegurar que las condiciones de temperatura se mantuvieran constantes durante todo el estudio, los viales conservados a temperatura ambiente se almacenaron en una cámara climática ICH L (Memmert GmbH + Co®, Schwabach, Alemania) que mantiene constantes la temperatura (25 °C) y la humedad (60%), mientras que la nevera y el congelador se encontraban equipados con una sonda de temperatura Siemens®. Todos los viales se conservaron protegidos de la luz.

Caracterización físico-química

Determinación y cuantificación de insulina

La determinación y cuantificación de la insulina se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) utilizando un ACQUITY UPLC H Class Plus® (Waters) en fase reversa con detector de matriz de fotodiodos (PDA) en los días 0, 3, 7, 15, 30, 60, 90 y 120. El método analítico empleado se validó en cuanto a linealidad, exactitud, precisión y límites de detección y cuantificación. Se realizó una recta de calibrado lineal para ambos diluyentes en un rango de concentraciones de 0,3-10,0 UI/ml ($R^2 = 0,999$). Los límites de detección y cuantificación fueron 0,15 UI/ml y 0,30 UI/ml, respectivamente, para ambos diluyentes. Asimismo, se comprobó que el método cumple con los criterios de precisión y exactitud. Todo ello, de acuerdo con los criterios de validación analítica estipulados por la European Medicines Agency¹⁹.

Se empleó una columna ACQUITY UHPLC BEH C18 1,7 µm (2,1 x 50,0 mm), temperatura de la columna de 35 °C, temperatura de la muestra de 8 °C, velocidad de flujo de 0,5 ml/min y volumen de muestra inyectado de 10 µl. Para la fase móvil se empleó ácido fórmico (AF) 0,1% en agua (Milli-Q calidad UHPLC Merck Millipore®, Madrid, España) y AF 0,1% en acetonitrilo (ACN) (VWR Chemicals®, Pensilvania, Estados Unidos). El método cromatográfico empleado fue en gradiente, empezando con una proporción de 80% de AF 0,1% en agua y un 20% de AF 0,1% en ACN, alcanzando en el minuto 6 una composición de 30-70%, respectivamente. Para cuantificar la insulina, fue necesaria una dilución 1:10 de las muestras y su posterior filtrado a través de filtros Acrodisc® de 13 mm de baja adsorción a proteínas (0,2 µm). El procesamiento de los datos obtenidos se realizó a través de Empower® 3 software. Bajo esas condiciones, el tiempo de retención de la insulina se sitúa entre 2,1 minutos a una longitud de onda de 220 nm (Figura 1).

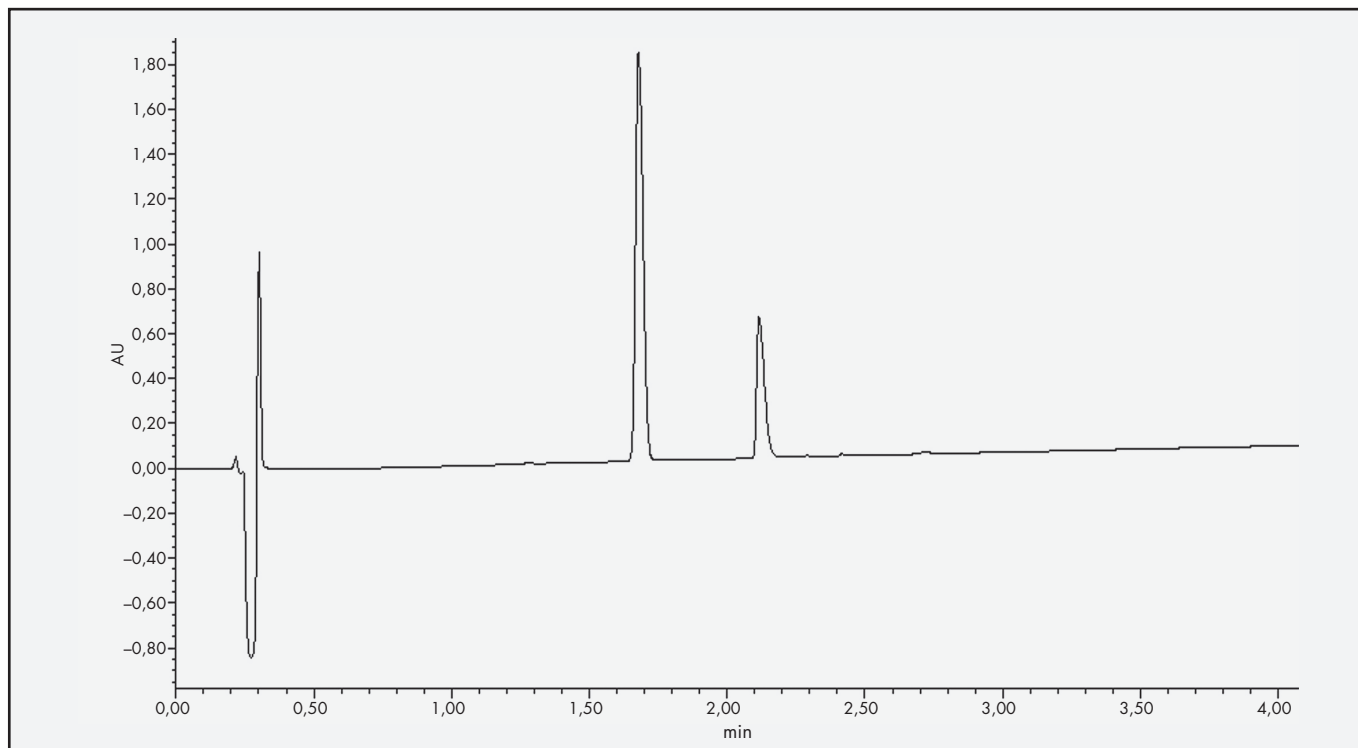
Determinación de osmolalidad y pH

La determinación de la osmolalidad se llevó a cabo con un osmómetro crioscópico (OsmoSpecial 1, Astori Tecnica®, Poncarale, Italia), depositando en un tubo eppendorf® una alícuota de 150 µl de cada muestra. Las medidas de pH se realizaron con un pHmeter Basic 20 (Crison®, Barcelona, España). Ambas variables se determinaron en los días 0, 3, 7, 15, 30, 60, 90 y 120.

Estabilidad microbiológica

Se retiraron 3 ml de cada una de las formulaciones y condiciones de conservación a tiempos 0, 15, 30, 60, 90 y 120. Los medios de cul-

Figura 1. Cromatograma de insulina en suero salino fisiológico obtenido con el método de cromatografía líquida de ultra alta resolución. Tras el frente de disolvente (minuto 0,3), se observa un primer pico correspondiente con meta-cresol (minuto 1,6). El segundo pico corresponde a la insulina (minuto 2,1).



tivo empleados para evaluar la esterilidad de las formulaciones fueron caldo tioglicolato (Merck®, Darmstadt, Alemania), agar sangre Columbia (Merck®, Darmstadt, Alemania) y agar Sabouraud (Merck®, Darmstadt, Alemania). Se incubaron en una estufa a 37 °C en condiciones anaerobias. El tiempo empleado en la incubación del tioglicolato fue de 10 días, y del agar sangre y agar Sabouraud de 48 horas. Una vez completado el tiempo de incubación en estufa, las placas con agar Sabouraud se volvieron a incubar durante 13 días en condiciones de aerobiosis.

Rango de variación y análisis estadístico

La caducidad de las formulaciones se ha establecido de acuerdo con las normas dictadas por el Codex Farmacéutico²⁰, estableciendo el periodo de validez cuando el porcentaje de principio activo del mismo está comprendido entre el 90 y el 110% con respecto a la concentración inicial^{21,23}. Para los valores de osmolalidad y pH, cambios fuera de los límites aceptados en las formulaciones oftálmicas se consideraron inaceptables, así como la existencia de crecimiento microbiano en las muestras evaluadas^{21,24}.

Resultados

Cuantificación de insulina

La concentración de insulina determinada a cada uno de los tiempos para las formulaciones con SSF y con BSS® se encuentran detalladas en la figura 2, expresadas en forma de porcentaje con respecto a la concentración inicial (25 UI/ml).

En la formulación elaborada con BSS® la concentración de insulina detectada descendió por debajo del 90% a los 120 días en el caso de la conservación en refrigeración. Sin embargo, se mantuvieron dentro del rango aceptado hasta los 120 días a temperatura ambiente y en congelación. Por el contrario, la formulación elaborada con SSF presentó concentraciones de insulina dentro del rango aceptado hasta los 120 días en las tres condiciones de temperatura estudiadas (ambiente, refrigeración y congelación), asegurando su estabilidad físico-química durante todo el periodo de estudio.

Determinación de osmolalidad y pH

El pH se ha mantenido constante sin variaciones significativas durante todo el estudio (Figura 3). Con respecto a la formulación en BSS®, el valor de pH promedio considerando todas las condiciones de temperatura fue de $7,21 \pm 0,21$, mientras que el valor de pH obtenido para la formulación de insulina en SSF fue de $7,05 \pm 0,20$.

Con respecto a la osmolalidad, no se han detectado variaciones relevantes durante el periodo de estudio (Figura 4). En el caso de la formulación de insulina en BSS®, la osmolalidad obtenida fue de $296,01 \pm 9,04$ mOsm/kg, considerando las tres condiciones de conservación. En la formulación en SSF se observó una tendencia similar, pero

Figura 2. Porcentaje de insulina (media y desviación estándar) en las formulaciones a las diferentes temperaturas de conservación frente al tiempo.

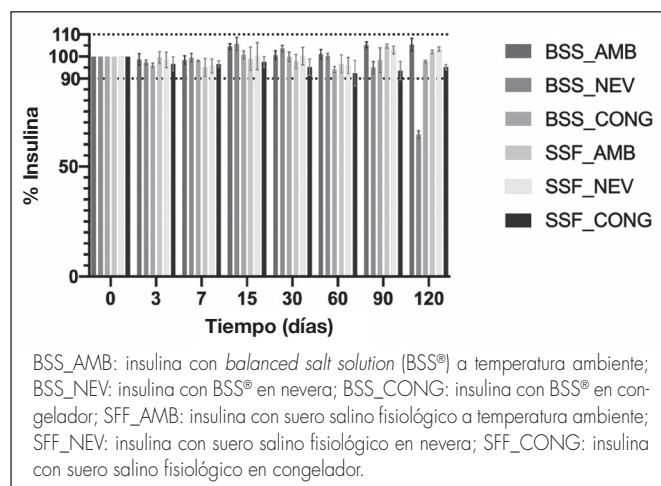
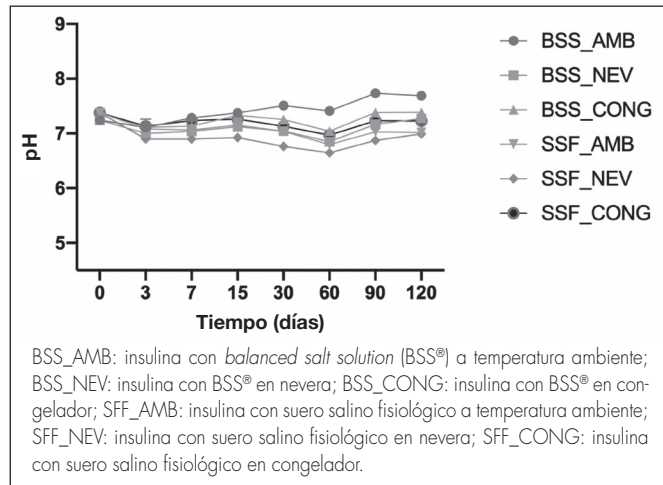


Figura 3. Medidas de pH (media y desviación estándar) en las formulaciones de insulina a las diferentes temperaturas de conservación frente al tiempo.



en este caso los valores de osmolalidad fueron relativamente más bajos, con un valor de $288,46 \pm 9,02$ mOsm/kg.

Estabilidad microbiológica

No se ha observado crecimiento microbiológico en ninguna de las muestras analizadas en las distintas condiciones y tiempos evaluados. De este modo, se puede confirmar que no hubo contaminaciones en el proceso de elaboración y conservación de las formulaciones.

Discusión

En ocasiones, el arsenal terapéutico convencional empleado para el abordaje de defectos epiteliales persistentes resulta insuficiente, por lo que es necesario recurrir a alternativas terapéuticas con propiedades promotoras del crecimiento epitelial, como es el caso de la insulina. La ausencia de una presentación comercial de colirio de insulina hace necesaria su elaboración como fórmula magistral. Hasta la fecha, diversos estudios han mostrado su eficacia²⁵, aunque no se acompañan de datos de estabilidad físico-química ni microbiológica.

En lo que respecta a la concentración del colirio de insulina, la literatura científica reporta concentraciones muy variables que oscilan desde 1 UI/ml

hasta 50 UI/ml^{15,25}. En este sentido, se ha seleccionado la concentración de 25 UI/ml en base al artículo publicado en 2017 por Fai S et al.¹³. Debido a que la insulina no está incluida como principio activo en el Registro Unificado de Empresas de Sustancias Activas²⁶, se debe partir de una solución inyectable de insulina humana de acción rápida diseñada para ser administrada por vía subcutánea o intravenosa. Los requerimientos que deben cumplir las preparaciones inyectables de insulina están descritos en las diferentes Farmacopeas^{21,23}. Estas preparaciones deben contener entre el 90 y el 110% de la cantidad de insulina inicial, ser lo más isotónicas posibles y presentar un pH comprendido entre 6,9 y 7,8. Teniendo esto en cuenta, los criterios de isotonicidad, esterilidad y pH que requieren las formulaciones oftálmicas ya se solventan empleando esta preparación inyectable como base²⁴.

En lo que concierne a la osmolalidad de las preparaciones oftálmicas, a pesar de que el fluido lacrimal presenta valores alrededor de $300,5 \pm 7,2$ mOsm/kg, el ojo permite un amplio rango de valores de presión osmótica²⁴, existiendo colirios comercializados con amplias variaciones de osmolalidad que van desde 260 a 330 mOsm/kg²⁷. Con respecto al pH, el fluido lacrimal se encuentra entre los valores de 7,4 y 7,7. Sin embargo, el ojo neutraliza con relativa rapidez soluciones con un amplio margen de pH (3,5-10,5); no obstante, cuanto más se aleje el pH de la solución administrada del valor fisiológico de las lágrimas, más tardará en alcanzarse la neutralización²⁴.

En el caso de nuestras formulaciones, el pH y la osmolalidad se encuentran dentro de los rangos establecidos y apenas sufren variaciones a lo largo del periodo de estudio. No obstante, en la osmolalidad se observa una ligera tendencia ascendente que podría estar vinculada con la degradación de insulina, hecho que podría ser objeto de futuros estudios.

Otro importante aspecto que considerar es la presencia de determinados excipientes. Concretamente, la insulina Actrapid® 100 UI/ml contiene como excipiente m-cresol, el cual se ha asociado a reacciones de hipersensibilidad e irritación, lo que podría suponer un problema a nivel ocular²⁷. Este excipiente actúa como estabilizante de la molécula de insulina en su forma hexamérica, impidiendo su agregación^{28,29}. Se ha descrito que el m-cresol en una concentración del 5% produjo toxicidad ocular grave en animales, mientras que al 1% no se observaron daños a nivel ocular³⁰. No obstante, el m-cresol se emplea como conservante antimicrobiano a concentraciones más bajas, entre 0,15-0,30%. Concretamente, en Actrapid® 100 UI/ml, el m-cresol supone un 0,3%, por lo que no supondría un problema de seguridad el empleo de esta presentación para la elaboración de la formulación magistral²⁹.

En lo que respecta a las limitaciones de este trabajo, cabe resaltar que el estudio de estabilidad se limita a la concentración de 25 UI/ml, la cual representa solo una de las diferentes concentraciones recogidas en la literatura. Asimismo, la máxima temperatura ambiente evaluada son 25 °C, la cual se puede ver fácilmente superada en determinadas áreas geográficas. Por otro lado, el mecanismo de degradación que hace que la insulina en BSS® sea menos estable en nevera que a temperatura ambiente debería ser objeto de futuros estudios.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran por primera vez la estabilidad de dos formulaciones oftálmicas de colirio de insulina 25 UI/ml en SSF y BSS®. Ambos colirios son estables durante 120 días en todas las condiciones de conservación, a excepción del elaborado con BSS® y conservado en nevera, cuya estabilidad es de 90 días.

Financiación

Sin financiación.

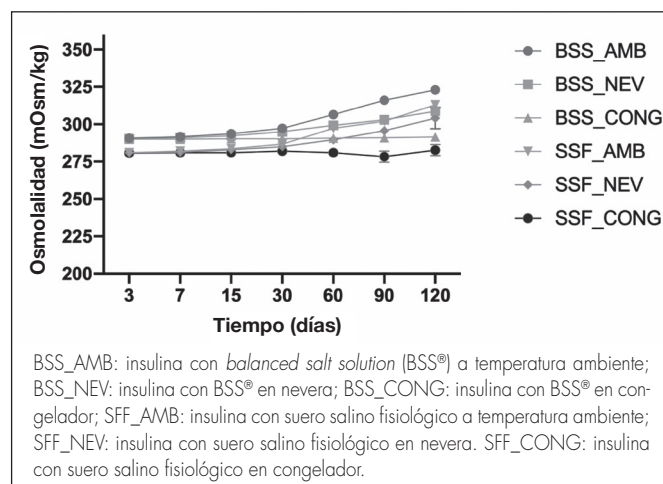
Agradecimientos

Ana Castro Balado, Anxo Fernández-Ferreiro y Cristina Mondelo-García agradecen al Instituto de Salud Carlos III la financiación de sus respectivos contratos: CM21/00114, JR18/00014 y JR20/00026.

Conflicto de intereses

Sin conflicto de intereses.

Figura 4. Osmolalidad (media y desviación estándar) en las formulaciones de insulina a las diferentes temperaturas de conservación frente al tiempo.



Aportación a la literatura científica

Este trabajo constituye el primer estudio en el que se evalúa la estabilidad físico-química y microbiológica de insulina oftálmica elaborada como formulación magistral. Por tanto, se trata de un importante

punto de inflexión para que este colirio pueda ser elaborado por los servicios de farmacia, garantizando su adecuada estabilidad y que, de este modo, su empleo en defectos epiteliales persistentes pueda implementarse en práctica clínica habitual.

Bibliografía

- Kern TJ. Ulcerative keratitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1990;20(3):643-66. DOI: 10.1016/s0195-5616(90)50055-8
- Liu J, Li L, Li X. Effectiveness of Cryopreserved Amniotic Membrane Transplantation in Corneal Ulceration: A Meta-Analysis. *Cornea.* 2019;38(4):454-62. DOI: 10.1097/ICO.0000000000001866
- Farahani M, Patel R, Dwarakanathan S. Infectious corneal ulcers. *Dis-Mon DM.* 2017;63(2):33-7. DOI: 10.1016/j.disamonth.2016.09.003
- Wilson SE, Medeiros CS, Santhiago MR. Pathophysiology of Corneal Scarring in Persistent Epithelial Defects After PRK and Other Corneal Injuries. *J Refract Surg.* 2018;34(1):59-64. DOI: 10.3928/1081597X-20171128-01
- Vaidyanathan U, Hopping GC, Liu HY, Somani AN, Ronquillo YC, Hoopes PC, et al. Persistent Corneal Epithelial Defects: A Review Article. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol J.* 2019;8(3):163-76.
- Ziaei M, Greene C, Green CR. Wound healing in the eye: Therapeutic prospects. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;126:162-76. DOI: 10.1016/j.dir.2018.01.006
- Sacchetti M, Lambiase A. Diagnosis and management of neurotrophic keratitis. *Clin Ophthalmol Auckland NZ.* 2014;8:571-9. DOI: 10.2147/OPHT.S45921
- Wróbel-Dudzińska D, Alio J, Rodriguez A, Suchodola-Ratajczak E, Kosior-Jarecka E, Rymgayłto-Jankowska B, et al. Clinical Efficacy of Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Neurotrophic Corneal Ulcer. *J Ophthalmol.* 2018;2018:3538764. DOI: 10.1155/2018/3538764
- Ding J, Wirosko B, Sullivan DA. Human growth hormone promotes corneal epithelial cell migration in vitro. *Cornea.* 2015;34(6):686-92. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000418
- Rocha EM, Cunha DA, Carneiro EM, Boschero AC, Saad MJA, Velloso LA. Identification of insulin in the tear film and insulin receptor and IGF-1 receptor on the human ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(4):963-7.
- Díaz-Valle D, Burgos-Blasco B, Gegúndez-Fernández JA, García-Caride S, Puebla-García V, Peña-Urbina P, et al. Topical insulin for refractory persistent corneal epithelial defects. *Eur J Ophthalmol.* 2021;31(5):2280-6. DOI: 10.1177/1120672120958307
- Aynsley TR. The use of insulin in the treatment of corneal ulcers. *Br J Ophthalmol.* 1945;29(7):361-3. DOI: 10.1136/bjo.29.7.361
- Fai S, Ahem A, Mustapha M, Mohd Noh UK, Bastion MLC. Randomized Controlled Trial of Topical Insulin for Healing Corneal Epithelial Defects Induced During Vitreoretinal Surgery in Diabetics. *Asia-Pac J Ophthalmol Phila Pa.* 2017;6(5):418-24. DOI: 10.22608/APO.201780
- Bastion MLC, Ling KP. Topical insulin for healing of diabetic epithelial defects?: A retrospective review of corneal debridement during vitreoretinal surgery in Malaysian patients. *Med J Malaysia.* 2013;68(3):208-16.
- Serrano-Giménez R, Contreras-Macías E, García-Bernal A, Fabelo-Lozano MJ. Insulin eye drops for treating corneal ulcer in a non-diabetic patient: regarding a case. *Farm Hosp.* 2020;44(6):297-9. DOI: 10.7399/th.11521
- Galvis V, Niño CA, Tello A, Grice JM, Gómez MA. Topical insulin in neurotrophic keratopathy after resection of acoustic neuroma. *Arch Soc Espanola Oftalmol.* 2019;94(2):100-4. DOI: 10.1016/j.oftal.2018.06.003
- Yang S, Zhang Y, Zhang Z, Dan J, Zhou Q, Wang X, et al. Insulin Promotes Corneal Nerve Repair and Wound Healing in Type 1 Diabetic Mice by Enhancing Wnt/ β -Catenin Signaling. *Am J Pathol.* 2020;190(11):2237-50. DOI: 10.1016/j.ajpath.2020.08.006
- Bartlett JD, Slusser TG, Turner-Henson A, Singh KP, Atchison JA, Pillion DJ. Toxicity of insulin administered chronically to human eye in vivo. *J Ocul Pharmacol.* 1994;10(1):101-7. DOI: 10.1089/jop.1994.10.101
- Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on bioanalytical method validation. [Internet]. European Medicines Agency; 2015 [consultado 31/05/2022]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf
- Lund W. *The Pharmaceutical CODEX: Principles & Practice of Pharmaceutics.* 12.ª ed. New Delhi, India: CBS Publishers & Distributors; 2009.
- Real Farmacopea Española. 3.ª ed. Madrid: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios; 2005. p. 1899-902.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 10.ª ed. Vol. II. México: Publicaciones e Impresiones de Calidad; 2011. p. 2402-6.
- British Pharmacopoeia. Londres: The Stationary Office; 2009. p. 9134-44.
- Castro-Balado A, González-López J, Blanco-Méndez J. Requerimientos básicos para la elaboración de colirios. En: Fernández-Ferreiro, A. *Formulación Magistral Oftálmica Antiinfecciosa.* Madrid: Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria; 2019. p. 63-70.
- Díaz-Valle D, Burgos-Blasco B, Rego-Lorca D, Puebla-García V, Pérez-García P, Benítez-Del-Castillo JM, et al. Comparison of the efficacy of topical insulin with autologous serum eye drops in persistent epithelial defects of the cornea. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 2022;100(4):e912-9. DOI: 10.1111/año.14997
- Registro Unificado de Empresas de Sustancias Activas (RUESA). Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios [internet] [consultado 02/06/2022]. Disponible en: <https://labofar.oemps.es/labofar/registro/ruesa/consulta.do#nav-no>
- Ficha técnica Dorzolamida/Timolol Cifra 20 mg/ml + 5 mg/ml colirio en solución. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios [internet] [consultado 15/07/2022]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/79544/FT_79544.html
- Rowe R, Sheskey P, Quinn M. *Handbook of pharmaceutical excipients.* 6.ª ed. Londres: Pharmaceutical Press; 2009. p. 203-5.
- Modi KD, Gadge PV, Jain P, Pawar S, Shah RD, Ingole SA, et al. Clinical challenges with excipients in insulin formulations and role of concentrated insulin. *Int J Basic Clin Pharmacol.* 2019;8(4):821-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.18203/2319-2003.ijbcp20191125>
- Andersen A. Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-m-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. *Int J Toxicol.* 2006;25 (Suppl 1):29-127. DOI: 10.1080/10915810600716653