

Universidad de Sevilla
Facultad de Farmacia

CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO
ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO
SOLUCIÓN



Memoria presentada por Cesáreo José Jiménez de los Santos
para optar al título de Doctor en Farmacia

Sevilla, enero de 2022



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICA**

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -
CICLODEXTRINA. APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO
TIPO SOLUCIÓN**

**TESIS DOCTORAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACIA**

CESÁREO JOSÉ JIMÉNEZ DE LOS SANTOS
Sevilla, enero de 2023



C/ Profesor García González, 2
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 67 26
E-mail: tecnofar@us.es

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Facultad de Farmacia
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Memoria presentada por Cesáreo José Jiménez de los Santos para
optar al título de Doctor en Farmacia

Fdo. Cesáreo José Jiménez de los Santos

V.ºB.º

de los directores de la Tesis Doctoral

Fdo. Juan Manuel Ginés Dorado
Doctor en Farmacia
Departamento de Farmacia y
Tecnología Farmacéutica

Fdo. José Ramón Moyano Méndez
Doctor en Farmacia
Departamento de Farmacia y
Tecnología Farmacéutica

Fdo. José Ignacio Pérez Martínez
Doctor en Farmacia
Departamento de Farmacia y
Tecnología Farmacéutica

JUAN MANUEL GINÉS DORADO, JOSÉ RAMÓN MOYANO MÉNDEZ y JOSÉ IGNACIO PÉREZ MARTÍNEZ, Doctores en Farmacia y Profesores del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICAN: Que la memoria para optar al título de Doctor realizada por Cesáreo José Jiménez de los Santos cuyo título es “Caracterización del complejo acetazolamida/hp- β -ciclodextrina. Aplicación al desarrollo de un colirio tipo solución”, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Para que conste, y a petición del interesado firman el presente en Sevilla a veinte de enero de dos mil veintitrés.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a los miembros de mi grupo de investigación: al **Dr. Juan Manuel Ginés Dorado**, por su inestimable implicación, constancia y exigencia a lo largo de todo el desarrollo de este proyecto. Estar bajo su tutela implica superar diferentes retos a diario o descubrir mil y una ideas para un periodo de aprendizaje continuo, lo que él denomina “espíritu investigador”. Al **Dr. José Ramon Moyano Méndez** por su acertada dirección y por el apoyo en cualquier tipo de circunstancias vividas, por mostrarme la forma más correcta de llevar a cabo un proyecto de investigación y no desistir nunca independientemente de cuál sea el problema que se haya presentado. Al **Dr. José Ignacio Pérez Martínez**, por abrirme las puertas de su grupo de investigación y hacerme parte de esta pequeña familia que hemos formado, contar conmigo para cualquier proyecto que se le presenta, apoyarme en los momentos de flaqueza, por su implicación personal y su paciencia meritoria. Por hacer de tutor, de amigo o incluso de padre dependiendo del contexto, y, muy especialmente, por enseñarme a no perderle la cara a ningún tipo de situación, nunca podre devolverle todo lo que me ha enseñado.

A mis compañeros y amigos del departamento (especialmente a **Gloria, Ana y Vicente**), gracias a ellos siempre tuve un pilar en el que apoyarme para seguir adelante.

A todos y cada uno de los alumnos (**Leli, Pablo, Álvaro, Joaquín, Sergio, Francesco, Roberta, German, Fran, Alba, Lalo y Carlos**) que me han ayudado de alguna forma a poder llevar a cabo el desarrollo de este proyecto de investigación.

A la **Dra. Marta Casas Delgado** y la **Dra. María Luisa González Rodríguez**, por su inestimable colaboración y asesoramiento durante la

realización de la presente memoria, así como por su apoyo en muchos momentos a nivel personal.

Al grupo de investigación **CTS 214**, “Sistemas de Liberación Controlada de Medicamentos” por la posibilidad de incorporarme a su proyecto de investigación para el desarrollo de una formulación oftálmica liposomal de ACZ y TIM. Lo que empezó como una colaboración puntual para la caracterización del complejo ACZ/HP- β -CD ha acabado en una Tesis Doctoral.

Al departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla. Desde el personal administrativo y de limpieza hasta los profesores, doctorandos y alumnos, por haberme hecho sentir en casa, por el ánimo y cariño que he recibido. Asimismo, agradezco a **D. Miguel Ángel Garrido Blanco** del servicio de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad de Sevilla.

A **mi familia**, por ser otro de los pilares donde apoyarme a diario, haciendo todo lo que estuvo en su mano para ayudarme en esta etapa.

A **mis padres**, porque ellos mejor que nadie saben lo duro que ha sido todo esto y, a pesar de todas las dificultades que la vida nos ha puesto, de tener que separarnos durante largos periodos de tiempo o de vivir días y días de continuo estrés, nunca se han dado por vencido y siempre me han animado a que alcanzara todos mis objetivos, incluso cuando ni yo mismo creía en mí. Ellos siempre me enseñaron que no hay camino difícil si vamos los tres de la mano, por lo que gran parte de este logro es también de ellos.

A **Carmen**, por aguantar noches y noches de desvelos, de intensidad y de desesperación, por transmitirme siempre esa alegría diaria tan suya, sus ganas de seguir avanzando, sus “chantajes emocionales” y

especialmente su confianza en que yo podría llegar hasta donde quisiese, este es otro pasito más que damos juntos.

A **Rubén y Juanje**, por todo el apoyo que me han prestado en todos los años de mi vida. Tanto ellos como **Lurdes y Belén** siempre han tenido un momento para ayudarme o para consolarme cuando peor lo he podido estar pasando. Ellos son la familia que he elegido.

A mis amigos, especialmente a **Carmen y Natalia**, por tener una sonrisa siempre en la boca y una cerveza para mí en la mano.

A **Melody, Marina, Victoria y Manolo**, por convertir un trabajo en un hogar donde convivir, apoyar y afrontar miles de retos juntos.

A mi abuelo, va por ti viejo

ÍNDICES

ABREVIATURAS

AC: anhidrasa carbónica

ACN: acetonitrilo

ACZ: acetazolamida

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

AMPc: monofosfato de adenosina cíclico proteinquinasa A

ANOVA: análisis de varianza

Aq: tiempo de adquisición

CB: cloruro de benzalconio

CDs: ciclodextrinas

CIMA: Centro de Información online de Medicamentos Autorizados

CMC: concentración micelar crítica

D1: retraso del pulso

D₂O: agua deuterada

DE: desviación estándar

E_c: eficacia de complejación

EDTA: sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético

E_s: eficacia solubilizante

HA: humor acuoso

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HP-β-CD: hidroxipropil-β-ciclodextrina

IAC: inhibidores de la anhidrasa carbónica

ICH: Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano

J: flujo de permeación

J_{ss}: flujo de estado estacionario

K_{m:n}: constante de estabilidad

NaCl: cloruro de sodio

NS: número de scans

P: coeficiente de permeabilidad

P1: duración del pulso

PGs: prostaglandinas

PIO: presión intraocular

PLW1: potencia del pulso

PM3: parametric model 3

RFE: Real Farmacopea Española

SW: ventana espectral

TD: tamaño de la FID

TIM: timolol maleato

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	1
1.1. Glaucoma	3
1.1.1. Concepto	3
1.1.2. Factores de riesgo	7
1.1.3. Diagnóstico	9
1.1.4. Tratamiento	9
1.1.4.1. Quirúrgico	9
1.1.4.2. Farmacológico	10
1.1.4.2.1. Simpaticomiméticos	11
1.1.4.2.2. Parasimpaticomiméticos	12
1.1.4.2.3. Betabloqueantes	13
1.1.4.2.4. Inhibidores de la anhidrasa carbónica	15
1.1.4.2.5. Análogos de prostaglandinas	16
1.2. Desarrollo de una formulación líquida de administración oftálmica	17
1.2.1. Factores que influyen en la permeación de fármacos a nivel ocular	18
1.2.1.1. Factores derivados de la anatomía y fisiología ocular	18
1.2.1.1.1. Túnica externa	19
1.2.1.1.2. Túnica media	22
1.2.1.1.3. Túnica interna	23
1.2.1.1.4. Otras estructuras	24
1.2.1.2. Factores derivados de la naturaleza del fármaco	27
1.2.1.3. Factores que influyen en la retención del fármaco en la córnea	29
1.2.2. Formulación oftálmica tipo solución	32

1.2.2.1. Principios activos	33
1.2.2.1.1. Acetazolamida	34
1.2.2.1.2. Timolol maleato	36
1.2.2.2. Vehículo	38
1.2.2.3. Regulación del pH	38
1.2.2.4. Viscosizante	39
1.2.2.5. Conservante	40
1.2.2.6. Isotonizante	40
1.2.2.7. Antioxidante	41
1.2.2.8. Solubilizante	42
1.2.2.8.1. Ciclodextrinas	42
1.2.2.8.2. Complejos de inclusión	46
1.3. Estudios de estabilidad	49
1.3.1. Estudios acelerados	50
1.4. Estudios de permeación “ <i>in vitro</i> ”	51
2. Objetivos	55
3. Materiales y métodos	59
3.1. Materiales	61
3.1.1. Principio activo y excipientes de la formulación propuesta	61
3.1.2. Excipientes usados en otras formulaciones	62
3.1.3. Materiales para la cromatografía líquida de alta resolución	63
3.1.4. Materiales para los estudios de permeación	64
3.2. Metodología	64
3.2.1. Elaboración de la formulación propuesta	64
3.2.2. Valoración de los principios activos	66

3.2.3. Estudio de complejación de ACZ en medio líquido	67
3.2.3.1. Diagramas de solubilidad	67
3.2.3.2. Resonancia magnética nuclear de protones	71
3.2.3.2.1. Determinación de la geometría de complejo en solución mediante espectro ROESY	72
3.2.3.2.2. Determinación espectrofotométrica de la constante de complejación: Método de Benesi Hildebrand	73
3.2.3.3. Estudio de complejación <i>in silico</i> (modelización molecular)	75
3.2.4. Otros estudios	78
3.2.4.1. Viscosidad	78
3.2.4.2. Estabilidad	79
3.2.4.3. Permeación	83
3.2.4.4. Análisis estadístico	87
4. Resultados y discusión	91
4.1. Elección de los componentes de la formulación	93
4.1.1. HP- β -CD	93
4.1.1.1. Determinación de la constante de complejación	93
4.1.1.1.1. Estudios de solubilidad	93
4.1.1.1.2. Método de Benesi-Hildebrand	95
4.1.1.2. Caracterización estructural del complejo ACZ/HP- β -CD	97
4.1.1.2.1. Resonancia Magnética Nuclear	98
4.1.1.2.2. Modelización molecular	102

4.1.2. Reguladores del pH	107
4.1.3. Otros solubilizantes	109
4.1.4. Antioxidantes	110
4.1.5. Conservantes	112
4.1.6. Isotonizantes	114
4.1.7. Viscosizantes	114
4.1.8. Formulaci3n propuesta	117
4.2. Estabilidad	118
4.2.1. Influencia de TIM sobre el proceso de degradaci3n de ACZ a pH 7,2	122
4.2.2. Influencia de TIM y HP- β -CD sobre el proceso de degradaci3n de ACZ a pH 7,2	124
4.2.3. Influencia del pH y el TIM sobre el proceso de degradaci3n de ACZ	127
4.2.4. Influencia conjunta de TIM y HP- β -CD sobre el proceso de degradaci3n de ACZ a pH 5,3	129
4.2.5. Estudio de solubilidad a pH 5,3	131
4.2.6. Estudio de viscosidad a pH 5,3	132
4.3. Permeaci3n	133
4.3.1. Influencia de la CD y el pH sobre la cantidad de ACZ permeada	136
4.3.2. Influencia de la presencia de TIM en la permeaci3n del complejo ACZ/HP- β -CD	142
4.3.3. Influencia del pH sobre el proceso de permeaci3n de TIM	144
4.3.4. Otros par3metros del proceso de permeaci3n	145

5. Conclusiones	149
6. Bibliografía	155

FIGURAS

- Figura 1.-** Efectos en la presión intraocular por glaucoma. Imagen disponible en <https://www.vissum.com/enfermedades-de-los-ojos/glaucoma/> [consultado el 20-5-2019]. 5
- Figura 2.-** Tipos de glaucoma. Imagen disponible <https://pt.slideshare.net/DrVictorMLD/glaucoma-8451025> [consultado el 20-5-2019]. 6
- Figura 3.-** Reacción catalizada por la enzima AC. 15
- Figura 4.-** Morfología estructurada del ojo. Imagen disponible en <https://dianapachon.com/slide-item/anatomia/> [Consultado el 20-5-2019]. 18
- Figura 5.-** Estrato córneo. Imagen disponible en https://www.researchgate.net/figure/Anatomy-of-the-cornea-a-Section-of-the-anterior-part-of-the-eye-β-Section-of-the_fig1_282040072 [Consultado el 20-5-2019]. 21
- Figura 6.-** Estructura del ojo. Adaptado de Fisiología 4ª Ed (p. 80), por L.S. Costanzo, 2011. Barcelona: Elsevier [Consultado el 2-6-2019]. 26
- Figura 7.-** Sistema lagrimal y estratos de la película lagrimal. Imágenes disponibles en <https://www.aao.org/salud-ocular/anatomia/conducto-lagrimal> y <https://www.aao.org/salud-ocular/anatomia/pelicula-lagrimal> [Consultado el 20-5-2019]. 27
- Figura 8.-** Esquema del proceso de permeación de un fármaco. 29
- Figura 9.-** Porcentaje de medicamentos comercializados en España frente al glaucoma en función de la vía de administración. 33
- Figura 10.-** (a) Estructura molecular de α -D-glucopiranos, (b) Disposición toroidal de la CD, (c) Estructura química de las CDs naturales. Imagen disponible en https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-76159-6_1 [Consultado el 24-5-2019]. 44
- Figura 11.-** Estructura química de HP- β -CD. Imagen disponible en <https://www.fishersci.ca/shop/products/hydroxypropyl-cyclodextrin-97-acros-organics-3/p-3736700> [Consultado el 24-11-2020]. 46

Figura 12.- Esquema del proceso de absorción de un fármaco administrado vía ocular en forma de complejo de inclusión con CDs.	49
Figura 13.- Esquema de una celda de Franz utilizada para los ensayos de permeación, imagen disponible en https://permegear.com/franz-cells/ [Consultado el 24-6-2019].	52
Figura 14.- Esquema secuencial seguido en la realización de los ensayos de solubilidad.	71
Figura 15.- Orientación tipo A del complejo ACZ-CD 1:1. En la minimización, el huésped (CD) se desplaza por el eje Z en pasos de 1 Å.	77
Figura 16.- Curvas de flujo de los principales fluidos. Imagen modificada disponible https://www.agitador.es/blog/wp-content/uploads/2011/07/visosidad-y-tipo-fluidos.png [Consultado el 20-9-2022].	79
Figura 17.- Diagrama de solubilidad de ACZ en presencia de HP-β-CD.	94
Figura 18.- Espectros UV-VIS de ACZ frente a concentraciones crecientes de HP-β-CD.	96
Figura 19.- Representación de la gráfica de Benesi-Hildebrand para el sistema ACZ/HP-β-CD (1:1).	97
Figura 20.- Estructura y asignación de protones para ACZ y HP-β-CD.	98
Figura 21.- Espectros ¹ H RMN a 300 MHz: a) HP-β-CD; b) sistema binario ACZ/HP-β-CD (1:1) y c) ACZ.	100
Figura 22.- Espectro 2D-ROESY correspondiente al sistema ACZ/HP-β-CD (1:1). Dentro del círculo resaltado aparece la señal cruzada entre H ₃ y los protones del grupo acetamida de ACZ.	102
Figura 23.- Resultado de la minimización energética por MM+ para el complejo 1:1 en orientación A.	104
Figura 24.- Resultado de la minimización energética por MM+ para el complejo 1:1 en orientación B.	104
Figura 25.- Conformaciones del complejo en orientación A (izquierda) y orientación B (derecha).	106

Figura 26.- Diagrama de solubilidad de ACZ/HP- β -CD en los diferentes tampones utilizados: (●) Cítrico/fosfato 7,2 (●) Sørensen (●) Hepes (●) Tris.	108
Figura 27.- Diagrama de solubilidad de ACZ en presencia de HP- β -CD y EDTA como antioxidante.	111
Figura 28.- Diagrama de solubilidad de ACZ/HP- β -CD en los diferentes conservantes utilizados: (●) Nipagin [®] sódico (●) Cloruro de benzalconio (●) Benzoato sódico.	113
Figura 29.- Variación del esfuerzo (τ) en función de la velocidad de deformación (Θ) para la formulación propuesta a pH 7,2.	116
Figura 30.- Diagrama de solubilidad de nuestra formulación propuesta a pH 7,2 (●) y de la formulación solamente con cítrico/fosfato a igual pH (●).	117
Figura 31.- Representación del \ln [TIM] frente al tiempo para la formulación 3 a 40 °C.	119
Figura 32.- Reacción de hidrólisis de ACZ (de Pilar-Corena, 2006).	119
Figura 33.- Representación del \ln [ACZ] frente al tiempo para la formulación 1 a las tres temperaturas ensayadas: (-) 30 °C, (-) 40 °C, (-) 50 °C.	120
Figura 34.- Representación de la ecuación de Arrhenius para la formulación 1.	121
Figura 35.- Representación del \ln [ACZ] frente al tiempo para las formulaciones 1 y 3 a 40 °C.	123
Figura 36.- Representación del \ln [ACZ] frente al tiempo para las formulaciones 1 y 4 a 40 °C.	125
Figura 37.- Representación del \ln [ACZ] frente al tiempo para las formulaciones 5 y 7 a 40 °C.	127
Figura 38.- Representación del \ln [ACZ] frente al tiempo para las formulaciones 5 y 8 a 40 °C.	129
Figura 39.- Diagrama de solubilidad de la formulación 4 a pH 7,2 (●) y 8 a pH 5,3 (●).	131
Figura 40.- Variación del esfuerzo (τ) en función de la velocidad de deformación (Θ) para la formulación propuesta a pH 5,3.	133

Figura 41.- Fotografía al SEM de una membrana de polietersulfona, imagen disponible en https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/mm/gpwp04700 [Consultado el 23-6-2019].	134
Figura 42.- Cantidad de ACZ permeada en la formulación 1 (●) y de TIM en la formulación 4 (●).	135
Figura 43.- Cantidad de ACZ permeada en la formulación 1 (●) sin CD y la formulación 2 (●) con CD a pH 7,2.	137
Figura 44.- Cantidad de ACZ permeada en la formulación 5 (●) sin CD y la formulación 6 (●) con CD a pH 5,3.	137
Figura 45.- Cantidad de ACZ permeada en la formulación 1 (●) y la formulación 5 (●).	138
Figura 46.- Cantidad de ACZ permeada en la formulación 2 (●) y la formulación 6 (●).	140
Figura 47.- Cantidad de ACZ permeada en la formulación 4 (●) y la formulación 8 (●).	141
Figura 48.- Cantidad de ACZ permeada en la formulación 6 (●) y la formulación 8 (●).	143
Figura 49.- Cantidad TIM permeada en la formulación 4 (●) y la formulación 8 (●).	144

TABLAS

Tabla 1.- Grupos terapéuticos, mecanismo de acción y % de reducción de la PIO (Díaz, 2010).	11
Tabla 2.- Medicamentos formulados con simpaticomiméticos comercializados en España.	12
Tabla 3.- Medicamentos formulados con parasimpaticomiméticos comercializados en España.	13
Tabla 4.- Medicamentos formulados con betabloqueantes comercializados en España.	14
Tabla 5.- Medicamentos formulados con IAC comercializados en España.	16
Tabla 6.- Medicamentos formulados con análogos de prostaglandinas comercializados en España.	17
Tabla 7.- Características fisicoquímicas de ACZ (Drugbank Database; Kaur et al., 2002; Remko y von der Lieth, 2004; Machatha y Yalkowsky, 2005).	35
Tabla 8.- Características fisicoquímicas de TIM (Drugbank Database; Mohamed et al., 2014; Wermuth, 2008).	37
Tabla 9.- Composición final de 100 ml de colirio.	65
Tabla 10.- Resumen de las condiciones cromatográficas en gradiente diseñadas para la valoración de ACZ y TIM.	67
Tabla 11.- Características del ensayo de RMN.	72
Tabla 12.- Condiciones del ensayo de Benesi-Hildebrand.	74
Tabla 13.- Formulaciones ensayadas a diferentes pH en % p/v.	80
Tabla 14.- Formulaciones ensayadas a diferentes pH en % p/v.	85
Tabla 15.- Tipo de complejo, constante de estabilidad, eficacia solubilizante y eficacia de complejación para diferentes autores en agua.	95
Tabla 16.- Desplazamientos químicos (en ppm) de las señales de ACZ y HP- β -CD libres y para el complejo 1:1.	99

Tabla 17.- Energías de los complejos ACZ/HP- β -CD tras simulación MM+. Todas las energías están expresadas en Kcal/mol.	105
Tabla 18.- Parámetros del proceso de complejación ACZ/HP- β -CD en los diferentes tampones ensayados a pH 7,2. $K_{1:1}$ (Constante de estabilidad), E_s (eficacia solubilizante), E_c (eficacia de complejación), S_0 (concentración inicial) y r^2 (coeficiente de determinación).	108
Tabla 19.- Parámetros del proceso de complejación, obtenidos a partir de los diagramas de solubilidad en presencia de varios solubilizantes a diferentes concentraciones.	110
Tabla 20.- Parámetros del proceso de complejación, obtenidos a partir de los diagramas de solubilidad en presencia de EDTA.	112
Tabla 21.- Parámetros del proceso de complejación, obtenidos a partir de los diagramas de solubilidad para los conservantes utilizados.	113
Tabla 22.- Parámetros del proceso de complejación, obtenidos a partir de los diagramas de solubilidad de la formulación sola con tampón y de la formulación propuesta a igual pH.	118
Tabla 23.- Constantes de degradación de ACZ en la formulación 1.	120
Tabla 24.- Parámetros de degradación de ACZ obtenidos mediante la ecuación de Arrhenius.	122
Tabla 25.- Parámetros de degradación de ACZ en las formulaciones 1 y 3.	123
Tabla 26.- Análisis estadístico de ACZ en la comparativa de las formulaciones 1 y 3 (n=3).	124
Tabla 27.- Parámetros de degradación de ACZ en las formulaciones 1 y 4.	126
Tabla 28.- Análisis estadístico de ACZ en la comparativa de las formulaciones 1 y 4 (n=3).	126
Tabla 29.- Parámetros de degradación de ACZ en las formulaciones 5 y 7.	128

Tabla 30.- Análisis estadístico de ACZ en la comparativa de las formulaciones 5 y 7 (n=3).	128
Tabla 31.- Parámetros de degradación de ACZ en las formulaciones 5 y 8.	130
Tabla 32.- Análisis estadístico de ACZ en la comparativa de las formulaciones 5 y 8 (n=3).	130
Tabla 33.- Parámetros del proceso de complejación, obtenidos a partir de los diagramas de solubilidad de las formulaciones 4 y 8.	132
Tabla 34.- Diferentes estudios publicados sobre la cantidad de ACZ permeada a las 2h.	135
Tabla 35.- Diferentes estudios publicados sobre la cantidad de TIM permeada a las 2h.	136
Tabla 36.- Análisis estadístico de ACZ permeada en la comparativa de las formulaciones 1 y 5 (n=3).	139
Tabla 37.- Análisis estadístico de ACZ permeada en la comparativa de las formulaciones 2 y 6 (n=3).	140
Tabla 38.- Análisis estadístico de ACZ permeada en la comparativa de las formulaciones 4 y 8 (n=3).	142
Tabla 39.- Análisis estadístico de ACZ permeada en la comparativa de las formulaciones 6 y 8 (n=3).	143
Tabla 40.- Análisis estadístico de TIM permeada en la comparativa de las formulaciones 4 y 8 (n=3).	145
Tabla 41.- Parámetros de permeación de ACZ en las distintas formulaciones.	146
Tabla 42.- Parámetros de permeación de TIM en las distintas formulaciones.	147

1. INTRODUCCIÓN

A pesar de que los preparados oftálmicos suelen emplear como vía de administración la tópica, la acetazolamida (ACZ), fármaco antiglaucomatoso de contrastada eficacia, sólo se comercializa en nuestro país vía oral, en forma de comprimidos, principalmente como diurético o adyuvante en el tratamiento del glaucoma, no existiendo en el mercado ningún preparado tópico de uso oftálmico con este fármaco. La idea inicial de nuestro trabajo pretende lograr su formulación en forma de colirio, ya que su administración oral como antiglaucomatoso, requiere de dosis elevadas con el riesgo de aparición de diversos efectos secundarios extraoculares (Kaur et al., 2002; Mora et al., 2015), que pueden ir desde los más comunes como diuresis, malestar general, depresión, pérdida de apetito, fatiga o pérdida de peso a algunos más severos como parestesias, formación de cálculos renales y/o trastornos gastrointestinales (Pfeiffer, 1997).

1.1. GLAUCOMA

1.1.1. Concepto

La OMS define esta patología como una enfermedad crónica neurodegenerativa e irreversible, que cursa con cambios estructurales en la cabeza del nervio óptico y posterior muerte celular progresiva. Todo ello conduce a una pérdida de la visión de forma gradual e indolora desde la periferia hasta el centro, lo que se conoce como efecto visión en túnel. En su última actualización de datos sobre el glaucoma de octubre de 2022 (OMS, 2022), el glaucoma se sitúa como una de las principales causas de ceguera a nivel mundial, por detrás de las cataratas. Los estudios epidemiológicos muestran que afecta a más de 60 millones de personas (Braunger et al., 2015) aunque se estima que

este valor seguirá creciendo, con lo que se prevé un aumento del 58 % en la prevalencia de esta patología para el 2030 (Gupta y Chen, 2016; National Eye Institute, 2019).

La presión intraocular (PIO) juega un papel decisivo en el trascurso de esta patología, con un valor límite de 21 mm Hg (Díaz, 2010). Reducir este valor es el principal objetivo para la prevención del llamado efecto túnel visión que provoca el glaucoma, aunque no garantiza la eliminación total de la patología, pues existen pacientes glaucomatosos con PIO estable, incluso después de un proceso postoperatorio, con una pérdida progresiva del campo visual (Dive et al., 2016).

La PIO está vinculada a la actividad del humor acuoso (HA), un fluido orgánico claro constituido por agua, glucosa, proteínas y enzimas (lo que ayuda a estructuras avasculares cercanas, como el cristalino o la córnea, en el aporte de nutrientes y la eliminación de productos de desecho). Esta sustancia, producto del cuerpo ciliar (situado en la cámara posterior del ojo que separa el iris del cristalino), fluye a través de la pupila y atraviesa la cámara posterior en dirección a la anterior, donde es drenado por dos vías (Braunger et al., 2015):

- Trabecular o convencional, atravesando el canal de Schlemm y la malla trabecular (se produce un drenaje del 90 % del HA).
- Uveoescleral o no convencional, atravesando los cuerpos ciliares (se produce un drenaje del 10 % del HA).

En un ojo sano con un balance equilibrado, las tasas de secreción y drenaje de HA deben ser similares. En caso de que se incrementase dicha producción o si se produjese una reducción por bloqueo en la salida del mismo, se produciría un aumento en la PIO (Tártara, 2013).

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

En este tipo de situaciones, tal y como se aprecia en la figura 1, la presión en las cámaras anterior y posterior asciende, lo que provoca una alteración de las fibras nerviosas que conectan la retina con el nervio óptico. Esta variación modifica la morfología del disco óptico, el cual adopta forma de copa, generando un daño ocular que, en caso de no ser tratado, puede ser irreversible.

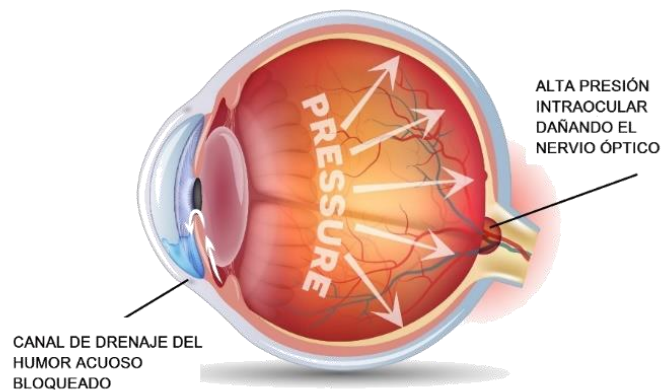


Figura 1.- Efectos en la presión intraocular por glaucoma. Imagen disponible en <https://www.vissum.com/enfermedades-de-los-ojos/glaucoma/> [consultado el 20-5-2019].

Inciendiando más profundamente en la patología, es posible diferenciar dos tipos de glaucoma según la amplitud del ángulo iridocorneal, formado por la unión entre iris y córnea (Gupta y Chen, 2016; Tártara, 2013). Según este concepto, podemos distinguir:

- Glaucoma de ángulo abierto: en este caso, el ángulo iridocorneal es amplio, lo cual hace que el bloqueo en la salida del HA no sea completo (figura 2). El HA producido en la cámara posterior atraviesa sin problemas la pupila y llega a la cámara anterior, donde existe un bloqueo parcial en el canal de drenaje, generando un flujo lento y un aumento

gradual de la presión intraocular. Esto dificulta aún más el diagnóstico de la patología y da lugar a una pérdida gradual de la visión que comienza por la periferia y finaliza con una pérdida de visión central.

- Glaucoma de ángulo cerrado: dado que en este tipo de glaucoma el ángulo iridocorneal se reduce, el HA se acumula en la cámara posterior y empuja al iris, que se curva hacia delante y bloquea completamente el canal de drenaje (figura 2). El aumento de la PIO en este caso es rápido y fácilmente diagnosticable produciendo una pérdida de visión total de forma inmediata.

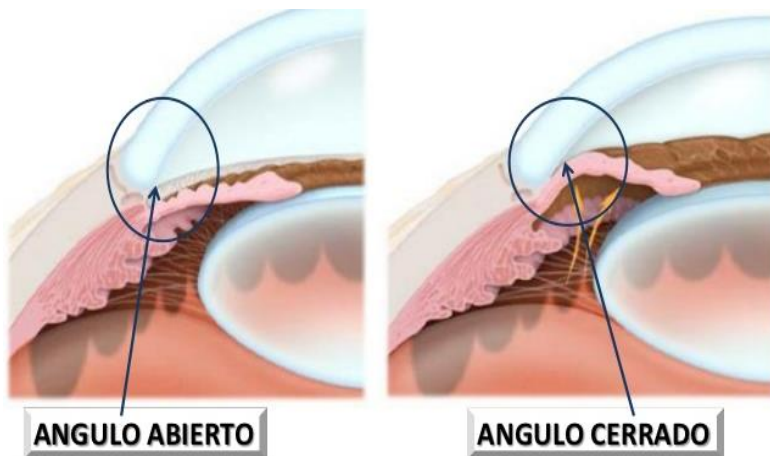


Figura 2.- Tipos de glaucoma. Imagen disponible <https://pt.slideshare.net/DrVictorMLD/glaucoma-8451025> [consultado el 20-5-2019].

Por otra parte, existe también una variante denominada glaucoma secundario, la cual es consecuencia de la evolución de otras patologías, que pueden ser tanto oculares como sistémicas (Foster y Johnson, 2001).

1.1.2. Factores de riesgo

Según la bibliografía consultada (Jaén Díaz et al., 2001; McMonnies, 2017), es posible diferenciar numerosos factores de riesgo que aumentan la probabilidad de padecer o acrecentar el impacto del glaucoma en la población mundial.

- Genética e historial familiar: su prevalencia y transmisión hereditaria es un factor clave. Alrededor del 50 % de todos los pacientes con glaucoma de ángulo abierto poseen antecedentes familiares positivos.
- Edad: el índice de incidencia del glaucoma puede estar relacionado con otras patologías asociadas con la edad, como las enfermedades vasculares, degeneración macular, el síndrome de pseudoexfoliación o el síndrome de apnea obstructiva del sueño.
- Raza: parece ser que las diferencias étnicas también juegan un papel clave en la incidencia de esta patología, tanto es así que existe una mayor prevalencia de glaucoma de ángulo abierto en la población afroamericana. Este hecho es similar al estudio comparativo entre pacientes asiáticos y caucásicos para la prevalencia de glaucoma primario de ángulo cerrado.
- Miopía: el aumento de la longitud axial del ojo asociado a la miopía también supone un factor de riesgo. Además, al estar esta patología muy extendida en la población asiática, existe una mayor prevalencia en ella.
- Migraña: factor relevante en grupos poblacionales que superen los 70 años.

- Vasoespasmio: con este tipo de patologías, el ojo suele estar involucrado en un síndrome vasoespástico con neuropatía óptica sistémica anterior y glaucoma.
- Hipotensión sistémica e hipertensión: en relación a la PIO y la presión arterial, existen estudios que vinculan la presión diastólica baja con la disminución de la presión ocular y el impacto que este hecho puede tener sobre la incidencia de glaucoma.
- Síndrome de dispersión pigmentaria: existe un tipo de glaucoma secundario denominado glaucoma pigmentario, que se desarrolla en pacientes miopes jóvenes que presentan esta patología.
- Diabetes: la hiperglucemia produce una mayor sensibilidad a la PIO y aumenta el riesgo de lesión neuronal, lo cual puede aumentar el riesgo de padecer glaucoma.
- Alopatía: existen medicamentos comercializados que aumentan el riesgo de aparición del glaucoma, como por ejemplo los midriáticos y ciclopléjicos.
- Tabaquismo: los estudios que asocian el glaucoma con el tabaco no son capaces de aunar un consenso claro. Aun así, el riesgo es mayor en hombres fumadores que en mujeres.
- Otros factores: existen actividades que pueden aumentar o modificar la PIO. Frotarse los ojos, usar gafas de natación, el esfuerzo muscular, adoptar posiciones invertidas del cuerpo, son algunas de las causas conocidas.

1.1.3. Diagnóstico

En la actualidad, se han ido incorporando nuevos métodos oftalmológicos para visualizar con precisión los cambios a lo largo del tiempo del disco óptico y así, conseguir un diagnóstico más preciso de la patología (Díaz, 2010). Algunos ejemplos son:

- Fotografía de fondo de ojo.
- Tomografía de coherencia óptica.
- Láser confocal de barrido.
- Polarimetría Láser.
- Perimetría automatizada de onda corta.

Este último método es capaz de detectar la aparición y progresión de glaucoma mucho antes que las técnicas convencionales.

1.1.4. Tratamiento

La correcta elección del tratamiento dependerá del tipo de glaucoma que presente el paciente, y puede ser farmacoterapia o bien quirúrgico. En ambos casos, el objetivo consiste en reducir la PIO, ya sea disminuyendo la producción de humor acuoso o mejorando su flujo de salida (Gooch et al., 2012). De este modo, sería posible mantener la función y estructura del nervio óptico para así conservar la función visual del individuo a lo largo del tiempo. Se considera un resultado significativo cuando se consigue disminuir la PIO entre un 20 % y un 50 %.

1.1.4.1. Quirúrgico

La cirugía sería la elección solo en caso de fallo del tratamiento farmacológico, o lo que es lo mismo, siempre que el paciente no alcance

una PIO estable y/o no se logre eliminar las fluctuaciones de presión (especialmente nocturnas) que provocan un daño progresivo.

El uso de este tipo de tratamiento es muy limitado ya que, aunque se consigue una disminución de la PIO de hasta el 48 % (Weinreb et al., 2004), con los farmacológicos se puede alcanzar hasta el 30 %, sin necesidad de intervención quirúrgica, evitándose los posibles efectos adversos de una intervención quirúrgica (hipotonía, hemorragias coroideas, cataratas y endoftalmítis).

En los glaucomas secundarios existe la posibilidad del uso de tubos de drenaje, que pueden ser valvulados o no, dependiendo del paciente o del impacto inflamatorio del postoperatorio.

Por último, en glaucoma pediátrico y congénito, donde todos los casos son de resolución quirúrgica, la farmacoterapia estará indicada sólo como medida hipotensora previa a la cirugía y como coadyuvante tras la misma.

1.1.4.2. Farmacológico

En la actualidad, existen diferentes grupos farmacológicos que pueden utilizarse para la disminución de la PIO (tabla 1).

Existen evidencias que confirman que el tratamiento combinado de dos o varios principios activos, a dosis fijas, mejora notablemente los resultados obtenidos (Berson y Epstein, 1981; Glaucoma Research Foundation, 2016). Este efecto sinérgico permite reducir la dosis, manteniendo la actividad farmacológica y así mejorar la tolerancia ocular (Córdoba y Hernández, 1998).

Tabla 1.- Grupos terapéuticos, mecanismo de acción y % de reducción de la PIO (Díaz, 2010).

Grupo terapéutico	Mecanismo de acción	% de reducción
<i>Simpaticomiméticos</i>	↓ la producción de HA	20-25 %
<i>Parasimpaticomiméticos</i>	↑ la eliminación de HA	20-25 %
<i>β-bloqueantes</i>		20-25 %
<i>Inhibidores de la Anhidrasa Carbónica</i>	↓ la producción de HA	variable vía oral 10-20 % vía tópica
<i>Análogos de prostaglandinas</i>	↑ la eliminación de HA	30-35 %

Sin embargo, nada de esto es eficaz sin el cumplimiento terapéutico por parte del paciente. Según la bibliografía consultada, un 33 % de la población glaucomatosa confiesa no seguir bien el tratamiento, un 41 % conoce que pueden tener posibilidades de tenerlo por prevalencia genética y solo un 45 % afirma que, sabiendo que algún familiar padece dicha enfermedad, se ha presentado a screening selectivos de glaucoma (Deokule et al., 2004).

1.1.4.2.1. Simpaticomiméticos

Este grupo terapéutico incluye aquellos medicamentos que imitan los efectos simpáticos de los nervios postganglionares. Son estimuladores de receptores adrenérgicos, lo cual provoca la dilatación de la pupila,

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
 APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

por lo que no deben de ser utilizados por pacientes que presenta glaucoma de ángulo cerrado.

Los más antiguos (epinefrina y derivados de la misma), estimulan tanto a los receptores α -1 y α -2 adrenérgicos como los β -2 en el ojo, por lo que han sido sustituidos por apraclonidina y brimonidina, selectivos para los receptores α -2 adrenérgicos. Actúan reduciendo la producción de humor acuoso y aumentando el flujo de salida a través de la vía uveoescleral (Costagliola, 2009). Se comercializan tanto en forma individual como asociados (tabla 2).

Tabla 2.- Medicamentos formulados con simpaticomiméticos comercializados en España.

Principio(s) activo(s)	Forma farmacéutica	Marca comercial
<i>Apraclonidina hidrocloreuro</i>	Colirio en solución	Iopimax 0,5 y 1 % [®]
<i>Brimonidina tartrato</i>	Colirio en solución	Alfadina [®] Alphagan [®] Brimvera [®] EFG (4) *
<i>Brimonidina tartrato + Timolol maleato</i>	Colirio en solución	Combigan [®]
<i>Brimonidina tartrato + Brinzolamida</i>	Colirio en suspensión	Simbrinza [®]

** El número entre paréntesis hace referencia al total de presentaciones farmacéuticas comercializadas como genéricos.*

1.1.4.2.2. Parasimpaticomiméticos

Este grupo es objeto de especial interés, ya que fue el primero utilizado en el tratamiento de la PIO, en concreto la pilocarpina en 1877 (Von Weber, 1877). Su mecanismo de acción se basa en la mejora del flujo

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

del humor acuoso al abrir las láminas trabeculares, lo cual aumenta la secreción por las glándulas exocrinas y produce contracción del iris y del músculo ciliar (Costagliola, 2009). En la tabla 3 se muestran los medicamentos comercializados en España.

Tabla 3.- Medicamentos formulados con parasimpaticomiméticos comercializados en España.

Principio(s) activo(s)	Forma farmacéutica	Marca comercial
<i>Pilocarpina hidrocloruro</i>	Colirio en solución	Colircusí Pilocarpina®
<i>Acetilcolina cloruro</i>	Polvo y disolvente para sol. inyectable	Acetilcolina Cusí®

1.1.4.2.3. Betabloqueantes

Este grupo pertenece a la familia de los antagonistas no selectivos de receptores β -bloqueantes simpaticomiméticos (Mohamed et al., 2014). Su mecanismo de acción consiste en bloquear tanto los receptores presentes en el cuerpo ciliar β -1 como β -2, lo que disminuye la producción de HA (Jung et al., 2013).

Timolol fue el primer β -bloqueante utilizado en el tratamiento del glaucoma, aunque en la actualidad existen numerosos principios activos perteneciente a la misma familia (como son betaxolol y carteolol) ya comercializados, tal y como puede verse reflejado en la tabla 4.

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
 APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

Tabla 4.- Medicamentos formulados con betabloqueantes comercializados en España.

Principio(s) activo(s)	Forma farmacéutica	Marca comercial
<i>Timolol maleato</i>	Colirio en solución	Cusimolol® Timabak® 2,5 y 5 % Timoftol® 2,5 y 5 % EFG 2,5 % (1) EFG 5 % (1)
<i>Timolol maleato + brinzolamida</i>	Colirio en suspensión	Azarga®
<i>Timolol maleato + Dorzolamida hidrocloreuro</i>	Colirio en solución	Cosduo® Cosopt® Duokopt® EFG (9)
<i>Timolol maleato + travoprost</i>	Colirio en solución	Duotrav® EFG (3)
<i>Timolol maleato + bimatoprost</i>	Colirio en solución	Ganfort®
<i>Timolol maleato + latanoprost</i>	Colirio en solución	Arucom® Xalacom® EFG (4)
<i>Timolol maleato + tafluprost</i>	Colirio en solución	Taptiqom®
<i>Betaxolol hidrocloreuro</i>	Colirio en suspensión	Betoptic®
<i>Carteolol hidrocloreuro</i>	Colirio de liberación prolongada Colirio en solución	Arteoptic® 1 y 2 % Elebloc®

Existen dos teorías fundamentadas para explicar el mecanismo de acción de estos principios activos. La primera, como ya se ha

comentado, se basa en bloquear los receptores β que modulan una vía de monofosfato de adenosina cíclico proteinquinasa A (AMPC). El bloqueo de estos receptores disminuye la actividad simpaticomimética de esta vía, evitando la estimulación de los receptores β por catecolaminas y reduciendo así el AMPC intracelular para así reducir la producción de HA. Por su parte, la segunda se basa en la reducción de la ultrafiltración, mecanismo necesario para producir HA, mediante la disminución del flujo sanguíneo en el ojo (Henderer y Rapuano, 2007).

1.1.4.2.4. Inhibidores de la anhidrasa carbónica

Este grupo actúa reduciendo la producción de HA, disminuyendo así la PIO. Para ello, el principio activo inhibe la actividad de la anhidrasa carbónica (AC), metaloenzima presente en diferentes partes del organismo (entre las que destaca el ojo), capaz de catalizar de forma reversible la reacción que se da entre H_2O y CO_2 para formar ácido carbónico y posteriormente el ion bicarbonato, como se muestra en la figura 3:

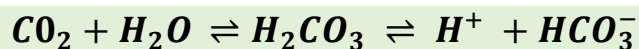


Figura 3.- Reacción catalizada por la enzima AC.

El ion bicarbonato es parte fundamental en el proceso de producción del HA, ya que es capaz de atraer ion sodio al interior del ojo, lo que a su vez provoca la entrada de agua, necesaria para la formación del HA. Por tanto, la disminución del bicarbonato generada por la acción del principio activo reducirá la producción de HA y por ende los valores de PIO (Kaur et al., 2002). Este efecto terapéutico supone la principal baza

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

de este grupo para su uso continuado en el tratamiento del glaucoma durante más de 40 años (tabla 5).

Tabla 5.- Medicamentos formulados con IAC comercializados en España.

Principio(s) activo(s)	Forma farmacéutica	Marca comercial
Acetazolamida	Comprimido	Edemox®
Brinzolamida	Colirio en suspensión	Azopt® EFG (3)
Dorzolamida hidrocloruro	Colirio en solución	Trusopt® EFG (3)

1.1.4.2.5. Análogos de prostaglandinas

En 1955, Ambache aisló una sustancia que era capaz de contraer el iris del gato, denominándola Irin (Ambache, 1957). Más tarde, se puso de manifiesto que se trataba una mezcla de prostaglandinas (PGs), principalmente PGF-2 α y PGE-2. Actualmente en España se comercializan 4 PGs diferentes (tabla 6) para la disminución de la PIO, cuyo mecanismo de acción reside en un aumento del flujo de salida uveoescleral.

Estos efectos se ven potenciados a través de asociaciones con fármacos de diferentes grupos que presenten efectos sinérgicos, como pueden ser los β -bloqueantes, tal y como se muestra en la tabla 4 (Linden y Alm, 1999).

Tabla 6.- Medicamentos formulados con análogos de prostaglandinas comercializados en España.

Principio(s) activo(s)	Forma farmacéutica	Marca comercial
<i>Bimatoprost</i>	Colirio en solución	Lumigan® 0,01 y 0,03 % Vizibim® 0,03 % EFG 0,01 % (1) EFG 0,03 % (1)
<i>Latanoprost</i>	Colirio en solución	Arulatan® Latanest® Monoprost® Tonlit® Xalatan® EFG (10)
<i>Tafluprost</i>	Colirio en solución	Saflutan®
<i>Travoprost</i>	Colirio en solución	Travatan® Vizitrav® EFG (3)

1.2. DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN LÍQUIDA DE ADMINISTRACIÓN OFTÁLMICA

Para la puesta en el mercado de una formulación oftálmica vía tópica, además de los parámetros fisicoquímicos referentes al fármaco, hemos de tener en cuenta tantos aspectos biofarmacéuticos como los tecnofarmacéuticos de la forma de dosificación elegida.

1.2.1. Factores que influyen en la permeación de fármacos a nivel ocular

1.2.1.1. Factores derivados de la anatomía y fisiología ocular

El sistema visual detecta e interpreta estímulos luminosos, que se presentan en forma de ondas electromagnéticas. El ojo es un órgano cuya función principal es distinguir dos cualidades de la luz: su brillo y su longitud de onda. Para los humanos, las longitudes de ondas comprendidas entre 400 y 750 nm constituyen la luz visible (Costanzo, 2011). Posee una forma esférica y puede ser estructurado en 3 capas principales tal como se puede observar en la figura 4.

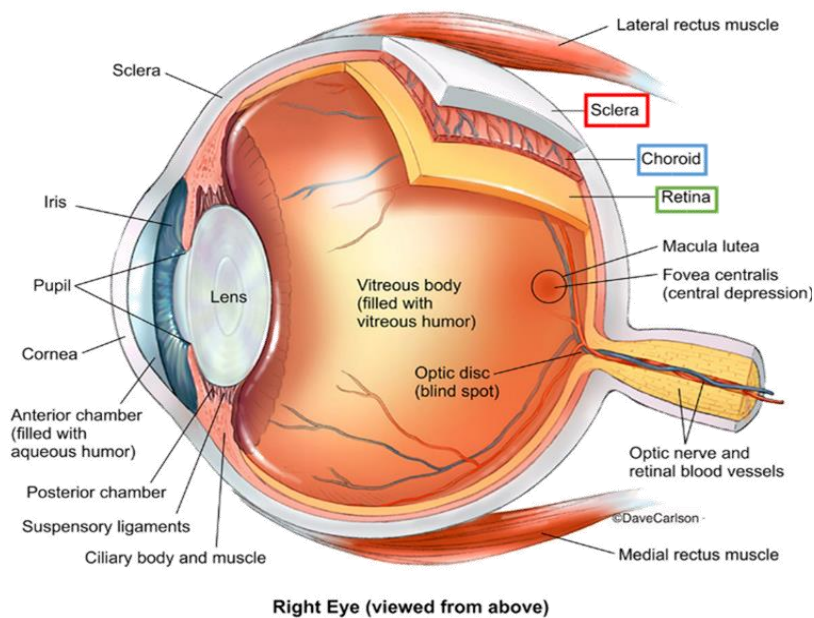


Figura 4.- Morfología estructurada del ojo. Imagen disponible en <https://dianapachon.com/slide-item/anatomia/> [Consultado el 20-5-2019].

1.2.1.1.1. Túnica externa

La superficie más externa del globo ocular está formada por dos segmentos conjuntivos de diferente tamaño: **la esclera** (o esclerótica) y **la córnea**. Ambas partes se encuentran unidas o ancladas por el limbo esclerocorneal formando una capa fibrosa, resistente y no extensible cuya función radica en la protección de los tejidos oculares. Además, ofrecen una función de soporte para los músculos extraoculares.

La penetración de fármacos administrados vía tópica se puede producir a través de las dos vías principales, la transcorneal (paso a través de la córnea) y la vía conjuntival/escleral (paso a través de ambos tejidos). En la mayoría de los casos, la vía transcorneal es la principal ruta de penetración de sustancias activas, lo que justifica que durante mucho tiempo se pensara en la vía conjuntival/escleral únicamente como una vía de eliminación de fármacos por el ojo (Andrés-Guerrero y Herrero-Vanrell, 2008). Hoy en día, se sabe que hay sustancias capaces de atravesar la conjuntiva y la esclera, llegando a alcanzar el segmento posterior del globo ocular, especialmente aquellas sustancias de alto peso molecular y cierta hidrosolubilidad (Urtti, 2006).

La **esclera** es una cubierta blanca esférica con un diámetro promedio de 22 mm, opaca, que constituye 5/6 partes de la túnica externa. Estructuralmente está compuesta de colágeno, fibras elásticas, fibroblastos, proteoglicanos y melanocitos. El 68 % de la esclera es agua mientras que las fibras constituyen el 75 % de su peso en seco. A diferencia de la córnea, los haces y fibrillas de colágeno escleral tienen un diámetro variable y se entrelazan irregularmente y no en laminillas regulares. En su morfología están presentes dos orificios, uno anterior

que rodea la córnea y otro posterior, donde sus capas externas se continúan con la duramadre y la aracnoides que rodean al fascículo óptico. Dentro de estas capas, la epiesclera es la porción más superficial y se trata de una delgada capa fibrovascular con haces sueltos de colágeno, de menor diámetro y con sustancia fundamental más abundante que el estroma escleral (capa central). Su superficie interna se relaciona con la coroides, a la que está unida a base de vasos y nervios, así como por una capa de tejido conjuntivo llamada lámina fusca, que recibe esa denominación debido a su ligera coloración oscura por la presencia de melanocitos.

La **córnea** se encuentra en continuidad con la esclera. Se presenta como un tejido transparente resistente a la deformación, avascular, ricamente inervada y de aproximadamente 0,5 mm de espesor. En su parte central está constituido por seis capas de diferente naturaleza hidrófila / lipófila. Su cara anterior está bañada por la película lagrimal y la posterior bañada por el humor acuoso de la cámara anterior. Por debajo del **epitelio** se encuentra **la membrana de Bowman**, formada por fibras de colágeno de varios tipos. A continuación, se encuentra **el estroma**, que es la capa más extensa de la córnea formada por tejido conjuntivo denso; **la capa Dua**, formada por placas de colágeno que se ramifican para formar el núcleo de una auténtica malla, conocida como malla trabecular, principal vía de drenaje del humor acuoso (Dua et al., 2013). Por último, **la membrana de Descemet**, formada fundamentalmente por colágeno y **el endotelio**, está constituida por una sola capa de células poligonales.

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

La córnea está considerada la principal vía de penetración ocular para una aplicación tópica, por delante de tejidos más permeables como la conjuntiva y la esclera (Barar et al., 2009).

De las seis capas corneales citadas (figura 5), el epitelio permite el paso de fármacos de naturaleza hidrófila entre los espacios de las células epiteliales que lo componen, en lo que se conoce como ruta paracelular. Por otro lado, este mismo epitelio junto con el estroma permite también el paso de moléculas lipofílicas de pequeño tamaño a través de dichas células por difusión (ruta transcelular), por lo que suponen las principales barreras al paso a través del tejido ocular (Majumdar et al., 2010).

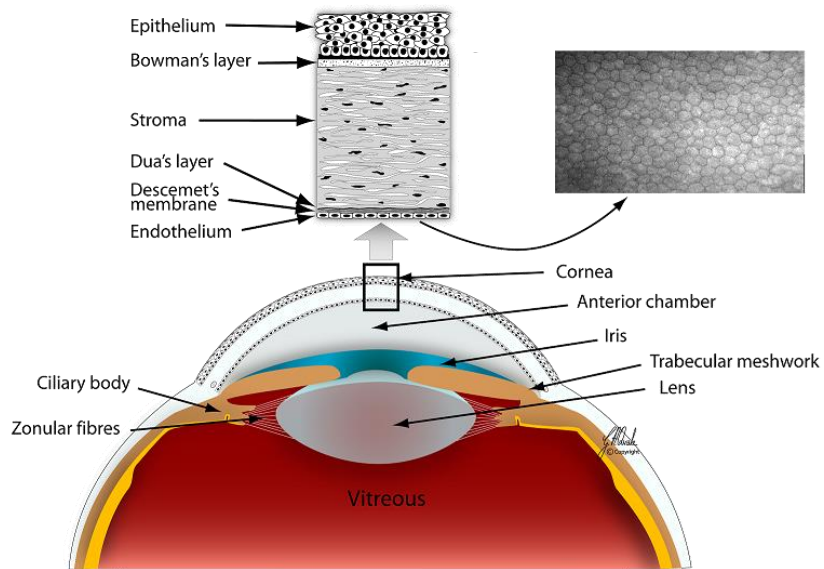


Figura 5.- Estrato córneo. Imagen disponible en https://www.researchgate.net/figure/Anatomy-of-the-cornea-a-Section-of-the-anterior-part-of-the-eye-β-Section-of-the_fig1_282040072 [Consultado el 20-5-2019].

1.2.1.1.2. Túnica media

Conocida también como capa vascular o úvea (debido a su color), presenta una forma esférica con pigmentación marrón y dos orificios, la pupila y el canal óptico. De ella depende el metabolismo de las otras dos capas y presenta tres regiones bien diferenciadas: el iris, el cuerpo ciliar y la coroides.

El **iris** se encuentra situado en la parte anterior de la túnica media. En él se encuentra una abertura central, la pupila, que es la encargada de regular la cantidad de luz que entra en el ojo. El músculo dilatador del iris se encuentra adyacente al estroma, adoptando una disposición radial y orientándose hacia la pupila, de manera que cuando el músculo se contrae se ejecuta un movimiento en cadena que dilata la pupila.

Situado entre el iris y la capa coroides se encuentra el **cuerpo ciliar**, cuyo músculo permite que el cristalino cambie de forma y produce la salida del HA a través del canal de Schlemm.

La capa **coroides**, que conforma la parte posterior de la túnica media, es una delgada membrana de color oscuro, situada entre la parte interna de la esclera y el epitelio pigmentario de la retina. Presenta una región muy vascularizada cuya función es la de nutrir a las otras capas y recoger productos de desecho. Se subdivide en tres capas bien diferenciadas de fuera hacia dentro:

- La capa supracoroidea, constituida de tejido conjuntivo, melanocitos y fibroblastos que separa los capilares de la esclerótica.

- La capa estromática o lámina vasculosa, la cual ocupa la mayor parte y es la propiamente vascular, con ramas ciliares de la arteria oftálmica la cual nutre a los melanocitos de la retina.
- La membrana de Bruch, la cual se encuentra en íntima relación con la retina.

1.2.1.1.3. Túnica interna

La conforma en su totalidad la **retina**. Esta capa se encuentra situada en la superficie interior del ojo y es muy sensible a la luz, de manera que cuando incide un haz, se desencadena una serie de fenómenos químicos y eléctricos que finalmente se traducen en impulsos nerviosos, que son enviados por el nervio óptico hacia el cerebro para su interpretación.

Es una membrana delgada, transparente y de pigmentación ligeramente rosada debido a su vascularización. En la parte central está situada la mácula lútea, que presenta una zona de depresión llamada fovea central. En esta zona también se halla el disco óptico, el cual es ampliamente conocido como punto ciego debido a la ausencia de fotorreceptores.

La retina presenta 9 capas, entre las que destaca la barrera hematorretiniana (formada principalmente por las células endoteliales unidas muy estrechamente), que constituye una verdadera barrera hemato-ocular y cuya principal función es dificultar el acceso de cualquier sustancia al espacio extravascular, evitando la difusión libre desde los vasos del iris y ciliares al humor acuoso. Con ello, previene el acceso de la albúmina y limita considerablemente el paso de cualquier sustancia hasta el humor vítreo, especialmente las de carácter hidrófilo.

Al ser un sistema ampliamente estratificado, la retina puede estructurarse en dos partes principales: la parte posterior sensorial, que es la porción óptica de la retina, y la parte anterior, compuesta por la porción ciliar e iridiana, que controla el paso de nutrientes desde el coroides hasta la retina neurosensorial, participa en la eliminación de desechos y capta, almacena y distribuye la vitamina A, la cual es el cromóforo de todos los pigmentos visuales humanos.

1.2.1.1.4. Otras estructuras

Finalmente, otras partes importantes mostradas en la figura 6 complementan la base de la morfología ocular:

- **Cámara anterior:** es una pequeña cavidad situada por detrás de la córnea y por delante del iris, la cual está llena de HA. Su cara anterior está formada por el endotelio corneal y en su cara posterior se puede encontrar tanto el iris (en su parte central) como el cristalino (en la parte anterior). En el margen periférico se sitúa la red trabecular, que es el principal sistema de drenaje del HA.
- **Cámara posterior:** es otra pequeña cavidad llena de HA, la cual está rodeada por la cara posterior del iris, por el cuerpo ciliar y por el cristalino. Mantiene la conexión a la cámara anterior a través de la pupila.
- **Cuerpo vítreo:** se trata de una sustancia transparente pseudogelatinosa que llena el interior del globo ocular. Está formado principalmente de agua y, además, de fibras colágenas, proteoglicanos y ácido hialurónico.

- **Cristalino:** es una lente biconvexa, transparente y elástica, encargada del enfoque de objetos a diferentes distancias. Es avascular y carece de inervación. Forma, junto con la córnea, el HA y el cuerpo vítreo, el sistema dióptrico del ojo.
- **Conjuntiva:** es una delgada membrana transparente, que recubre la parte interna de los párpados y la superficie anterior del globo ocular, con excepción de la córnea. Anatómicamente se divide en tres partes:
 - Conjuntiva palpebral.
 - Conjuntiva de fondo de saco o fórnix conjuntival. Es la parte donde la conjuntiva se repliega.
 - Conjuntiva bulbar. La más delgada y transparente.

Al igual que la córnea, la conjuntiva es partícipe como una de las rutas alternativas de penetración de fármaco. El paso a través de esta capa puede ser tanto por vía transcelular como paracelular. El área superficial de este tejido es mucho mayor respecto a la córnea (Urtti, 2006; Hämäläinen et al., 1997). Asimismo, posee mayor permeabilidad, especialmente para moléculas hidrofílicas y grandes (como proteínas y péptidos), de ahí que existan numerosos estudios recientes que la sitúen como una vía de interés (del Amo et al. 2017; Urtti, 2006; Prausnitz y Noonan, 1998; Hämäläinen et al., 1997). Sin embargo, los principios activos usados clínicamente son generalmente de pequeño tamaño y bastante lipofílicos, por lo

que la ruta corneal aún se considera como la vía de elección para la administración de fármacos.

- **Sistema lagrimal:** está formado por el sistema excretor, o vías lagrimales, y por el sistema secretor. La película lagrimal está compuesta por tres capas representadas en la figura 7: la capa oleaginosa o lipídica que es la parte exterior, la capa acuosa en el centro y la capa mucosa que es la capa más interna de la película lagrimal. Su función es recubrir la córnea y la conjuntiva palpebral y bulbar película lagrimal.

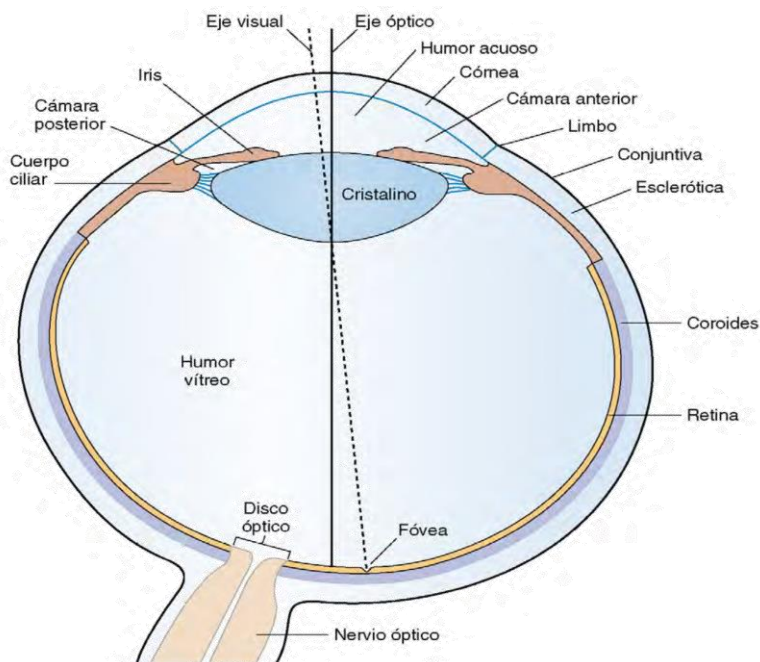


Figura 6.- Estructura del ojo. Adaptado de *Fisiología 4ª Ed (p. 80)*, por L.S. Costanzo, 2011. Barcelona: Elsevier [Consultado el 2-6-2019].

La función del sistema excretor es drenar las lágrimas que no se han evaporado. Está constituido por los puntos lagrimales, los canaliculos,

el saco lagrimal y el conducto nasolagrimal. Por otro lado, el sistema secretor está formado por la glándula lagrimal principal y las accesorias que sintetizan el componente acuoso de la película lagrimal (García-Feijóo y Pablo-Júlvez, 2012).

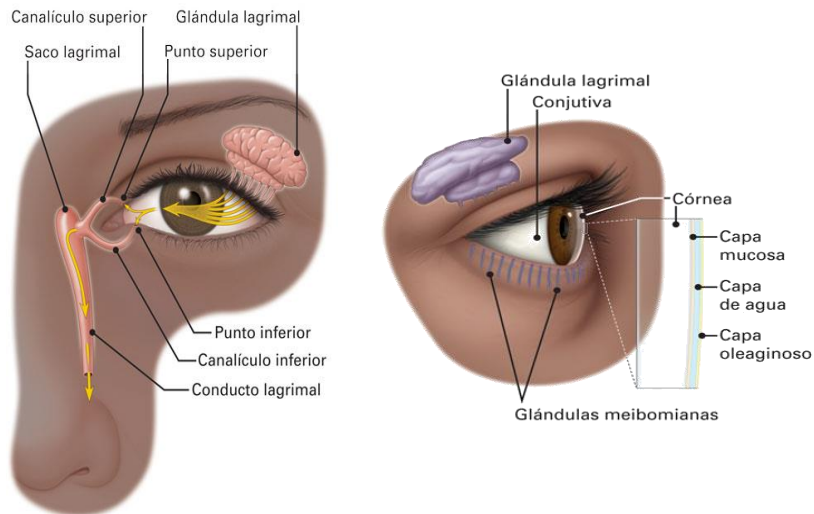


Figura 7.- Sistema lagrimal y estratos de la película lagrimal. Imágenes disponibles en <https://www.aao.org/salud-ocular/anatomia/conducto-lagrimal> y <https://www.aao.org/salud-ocular/anatomia/pelicula-lagrimal> [Consultado el 20-5-2019].

1.2.1.2. Factores derivados de la naturaleza del fármaco

Para garantizar la eficacia de un fármaco administrado por vía oftálmica, hay que conseguir que el principio activo alcance la diana terapéutica y se mantenga el tiempo necesario para lograr la concentración mínima eficaz. Desafortunadamente, la vía tópica ocular, aun siendo vía de elección para el tratamiento de estas patologías, presenta numerosos factores que determinarán el grado de absorción del fármaco seleccionado, como pueden ser el tamaño molecular, la solubilidad acuosa o el grado de ionización entre otros (Lozano et al., 2012; Loftsson

y Järvinen, 1999). Tanto es así, que la influencia de todos los mecanismos citados anteriormente hace que sólo el 5 % del fármaco aplicado sea capaz de atravesar la córnea y alcanzar tejidos intraoculares (Lee y Robinson, 1979).

- Tamaño molecular:

Dado que el mecanismo principal de entrada a los tejidos intraoculares es un proceso de difusión pasiva, en líneas generales, a menor tamaño molecular mayor permeación (Yellepeddi y Palakurthi, 2016). Sin embargo, no debemos olvidar que este proceso también está condicionado por la ruta de penetración (vía transcorneal o vía conjuntival/escleral).

- Grado de ionización:

La córnea, considerada como principal vía de penetración de fármacos en el ojo, posee dos tipos de estratos de naturaleza opuesta. Tal y como se observa en la figura 8, solamente la fracción no ionizada del fármaco será capaz de penetrar el epitelio ocular (de naturaleza lipófila). Seguidamente, la fracción ionizada (polar), difundirá a través del estroma, que posee naturaleza hidrófila, hasta alcanzar el endotelio. De nuevo, será la fracción no ionizada la que atravesará el endotelio con mayor facilidad, alcanzando el humor acuoso (Doménech et al., 2013). Su porcentaje relativo dependerá del pKa del fármaco y del pH al que se encuentre.

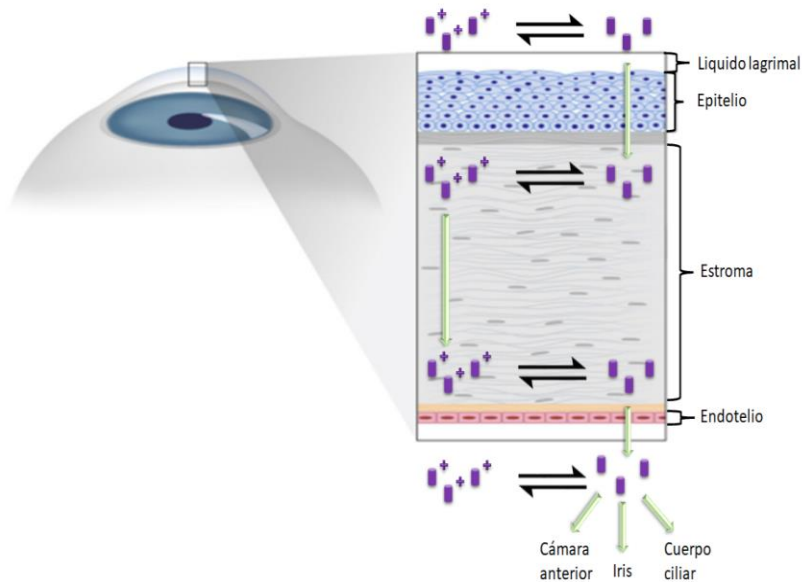


Figura 8.- Esquema del proceso de permeación de un fármaco.

- Fijación a proteínas plasmáticas:

En la fase acuosa de la película lagrimal, se hallan disueltas una serie de proteínas que son secretadas por las glándulas lagrimales (lisozima) o procedentes de la filtración plasmática (albúmina y mucina), cuanto mayor sea su porcentaje presente, mayor es la probabilidad de que puedan formar complejos macromoleculares con los fármacos instilados, interfiriendo en su proceso de absorción.

1.2.1.3. Factores que influyen en la retención del fármaco en la córnea

Independientemente de la naturaleza del principio activo, es necesario considerar que cuando un preparado es instilado en el saco conjuntival, se desencadenan una serie de reacciones que tendrán como objetivo el restablecimiento total del fluido lagrimal, por lo que también es

importante el análisis de aquellos factores que entran en juego en la retención del fármaco en la zona diana.

- Volumen instilado y drenaje ocular:

Es incorrecto pensar que, a mayor volumen de colirio instilado, mayor concentración de fármaco se alcanzará y más tiempo permanecerá en la córnea para que pueda permear. En realidad, es más bien todo lo contrario, pues es necesario tener en cuenta que el volumen total de una gota de colirio ronda entre 25 y 50 μ l. Así, tras ser administrado, cuando alcanza el saco conjuntival, -cuya capacidad de almacenamiento es tan solo de 10 μ l- ésta se ve rebasada, lo que desencadena un efecto de parpadeo involuntario y exceso de lagrimeo aumentando el aclaramiento ocular del fármaco. De hecho, si el volumen instilado es superior a una gota, puede provocar la aparición de efectos sistémicos mediante el drenaje ocular del fármaco por el conducto nasolagrimal, como mostramos en la figura 7, hasta la mucosa nasal (donde éste puede ser absorbido) (Farnós, 2010; Van Santvliet y Ludwig, 2004; Ramsay et al., 2018).

- pH del medio:

Aunque el pH de la lágrima oscila entre 7,4 y 7,7 (Carney y Hill, 1976; Herrero-Vanrell, 2007; González y Esteban, 2011), el ojo presenta una amplia tolerabilidad en este aspecto, pudiéndose administrar formulaciones con valores de pH comprendidos entre 3,5 y 10,5 (Bilbao, 2018; González y Esteban, 2011; SEFH, 2019).

Salirse de este intervalo implica un riesgo a nivel oftálmico, pues puede producir irritación ocular y aumento en la frecuencia del parpadeo y del lagrimeo (Ludwig y Van Oocteghem, 1986). Este mecanismo aumentaría la eliminación del principio activo disuelto en la lágrima a través de las vías lagrimales o bien vertiéndose por los bordes palpebrales, creando un serio inconveniente, especialmente en el tiempo de retención del mismo en la zona diana.

- Osmolaridad de la lágrima:

La osmolaridad fisiológica del fluido lagrimal está comprendida entre 312 y 318 mOsm/l, aunque el rango de presión osmótica tolerada según algunos autores puede resultar un poco más amplio. Hay que tener en cuenta que las formulaciones hipertónicas o hipotónicas cuyos valores superen estos límites promueven también el lagrimeo y la irritación, reduciendo el tiempo de permanencia ocular de la formulación (Tomlinson, 2006; Holly y Lemp, 1977).

- Componentes de la formulación:

Por último, es necesario también tener en cuenta la influencia que puedan ejercer el resto de los componentes de la formulación sobre el proceso de retención del fármaco en la córnea. Por ejemplo, el efecto que puede aportar un aumento de viscosidad del preparado, o la posible irritación que algún componente de la formulación pudiera ejercer sobre la superficie ocular y que induciría al lagrimeo.

1.2.2. Formulación oftálmica tipo solución

“Las preparaciones oftálmicas son todas aquellas preparaciones líquidas, semisólidas o sólidas, estériles, destinadas a ser administradas en el globo ocular y/o en las conjuntivas, o a ser introducidas en el saco conjuntival” (RFE, 2015), pudiendo diferenciar entre:

- Colirios
- Baños oculares
- Polvos para colirios y polvos para baños oculares
- Preparaciones oftálmicas semisólidas
- Insertos oftálmicos

De todas ellas, los colirios son los más ampliamente utilizados, algo que queda demostrado según los datos consultados en enero de 2021 en el Centro de Información online de Medicamentos Autorizados (CIMA) de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) (AEMPS, 2021).

Hablando de cifras (figura 9), hemos encontrado que, en el mercado español, de las 315 formulaciones oftálmicas comercializadas (tanto para dispensación en oficina de farmacia como para su uso a nivel hospitalario), 294 (el 93,4 %) están destinadas a la administración por vía tópica, 20 de ellas (un 6,4 %) correspondería a una aplicación parenteral y tan solo hay 1 medicamento de administración oral.

De esos 294 que se corresponden a la vía tópica ocular, 267 (un 90,8 %) son colirios, mientras que los 27 restantes (9,2 %) son preparados semisólidos. Es justo esta forma de dosificación la que hemos seleccionado para nuestra formulación.

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

Según la Real Farmacopea Española (RFE), “los colirios son disoluciones, emulsiones o suspensiones acuosas u oleosas, estériles, de uno o más principios activos, destinados a su instilación en el ojo.

Los colirios pueden contener excipientes, por ejemplo, para ajustar la tonicidad o la viscosidad de la preparación, ajustar o estabilizar el pH, aumentar la solubilidad del principio activo o estabilizar la preparación. Estas sustancias no afectan negativamente a la acción medicamentosa deseada ni, a las concentraciones utilizadas, provocan una irritación local indebida” (RFE, 2015).

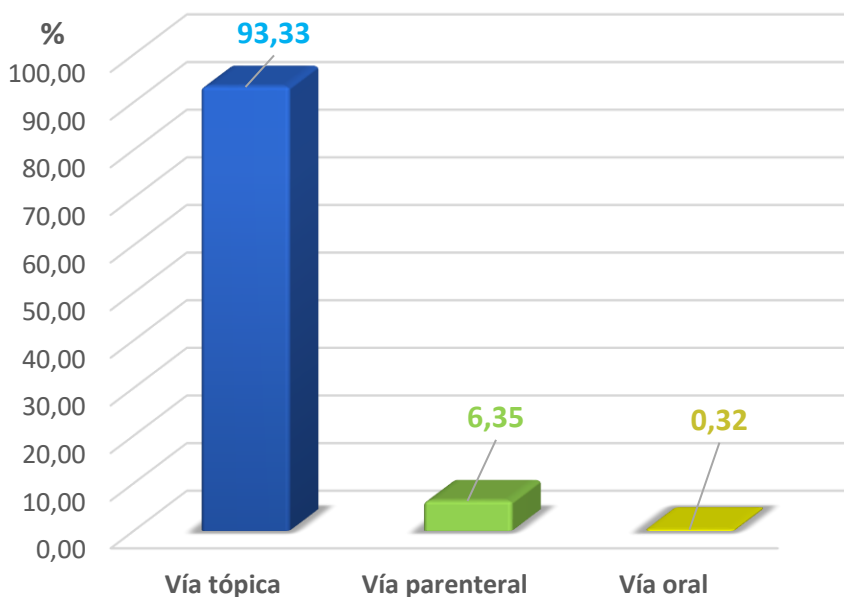


Figura 9.- Porcentaje de medicamentos comercializados en España frente al glaucoma en función de la vía de administración.

1.2.2.1. Principios activos

Como ya hemos señalado anteriormente, las formulaciones antiglaucomatosas del mercado, suelen incorporar dos principios activos pertenecientes a diferentes grupos terapéuticos, debido a su

efecto sinérgico (Berson y Epstein, 1981; Glaucoma Research Foundation, 2016; Córdoba y Hernández, 1998). En el caso de nuestra formulación, es el TIM, el otro principio activo que acompañara a ACZ en la formulación, ya que su sinergia ha sido demostrada (Arroyo-García et al., 2021; Kass et al., 1982).

1.2.2.1.1. Acetazolamida

Como ya hemos indicado, es un derivado de las sulfonamidas que pertenece al grupo de los IAC, usado vía oral en el tratamiento adyuvante del glaucoma, ya que su utilización vía tópica presenta una gran limitación, al no poseer propiedades fisicoquímicas compatibles con una penetración adecuada a través de la córnea, al igual que ocurre con el resto de las sulfamidas.

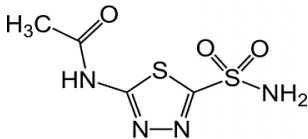
En la tabla 7 se recogen algunas de las características fisicoquímicas de este fármaco, así como su estructura. El valor del coeficiente de permeabilidad para este fármaco puede variar dependiendo del tipo de membrana que haya sido utilizada en cada ensayo y las propiedades del medio estudiado, si bien todos los artículos publicados coinciden en presentar unos valores que se sitúan en el intervalo entre 0,05 y $3,04 \cdot 10^{-5}$ cm/s (Mora et al., 2013; ICH, 2018; Loch et al., 2012; Tártara et al., 2012), indicando su baja permeabilidad (Amidon et al., 1995; Maren y Conroy, 1993; Kaur et al., 2000; Kasim et al., 2004).

Aunque administrado por vía oral presenta una absorción adecuada en el tracto gastrointestinal, con un valor de C_{max} entre 2 y 4 horas, manteniéndose los niveles plasmáticos efectivos de 4 a 6 horas, su uso no está generalizado. La principal limitación reside en la necesidad de optimización del tratamiento debido a su particular farmacocinética.

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP-β-CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

Según la bibliografía (Kunka y Mattocks, 1979; Reiss y Oles, 1996), ACZ responde a un modelo cinético no lineal, lo cual hace que para una misma dosis oral de 500 mg los niveles plasmáticos puedan oscilar entre 5 y 20 µg/ml, lo que se traduce en un efecto farmacológico impredecible en muchos casos.

Tabla 7.- Características fisicoquímicas de ACZ (Drugbank Database; Kaur et al., 2002; Remko y von der Lieth, 2004; Machatha y Yalkowsky, 2005).

Fórmula molecular	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃ S ₂
Peso molecular	222,245 g/mol
Nombre químico	N-(5-sulfanoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-acetamida
Estructura	
Absorción UV máxima	261-265 nm
pKa	7,2 y 8,6
log P	-0,26
Solubilidad acuosa (25 °C)	0,72 mg/ml

Su baja solubilidad implica que, para obtener una solución a una dosis adecuada, sea necesario recurrir a técnicas de solubilización. El empleo de polímeros como la polivinilpirrolidona, la hidroxipropilmetilcelulosa (Nagarwal et al., 2009; Loftsson et al., 1996) y sobre todo los complejos de inclusión con ciclodextrinas (CDs) (Loftsson et al., 1996; Moyano et

al., 1994; Baranowski et al., 2014), se muestran herramientas eficaces a la hora de mejorar su solubilidad acuosa (Ghadi y Dand, 2017).

Además, su coeficiente de permeabilidad (Obiedallah et al., 2018; Morsi et al., 2014) es insuficiente *per se* a la hora de plantear su administración por vía tópica ocular. Para la mejora de este factor a nivel corneal, se han utilizado diferentes estrategias entre las que pueden destacar la elaboración de un gel *in situ* o el uso de formulaciones con liposomas (Jyothi et al., 2010; Peng et al., 2012; Mishra et al., 2011; Pattni et al., 2015; Samad et al., 2007; Grit y Crommelin, 1993; Gugleva et al., 2019; Guinedi et al., 2005; Kazi et al., 2010; Liu et al., 2010; Arroyo-García et al., 2021).

Otro dato fisicoquímico que va a condicionar nuestra formulación es el intervalo de pH de máxima estabilidad en solución, que oscila entre 3,5 y 5,5 unidades (Parasrampur y Gupta, 1989; del Pilar-Corena et al., 2006). Aunque en un principio, el pH de una formulación oftálmica ideal debería ser lo más próximo posible al de la lágrima, especialmente en aquellos tratamientos de larga duración, se puede ampliar hasta un intervalo de 3,5 a 10,5 unidades si fuera necesario (Bilbao, 2018; González y Esteban, 2011; SEFH, 2019).

1.2.2.1.2. Timolol maleato

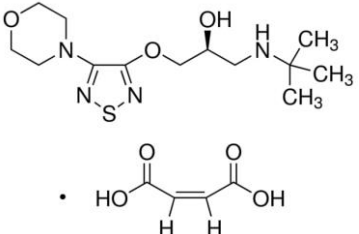
Es un fármaco antagonista no selectivo de los receptores β -bloqueantes simpaticomiméticos (Mohamed et al., 2014, que al bloquear los receptores β del cuerpo ciliar disminuye la producción de humor acuoso (Jung et al., 2013). Se considera la primera línea de tratamiento del glaucoma (Mohamed et al., 2014), ya que a pesar de ser el primer β -

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP-β-CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

bloqueante utilizado, hasta la fecha no se ha demostrado que exista otro más eficaz (Hassib et al., 2016; Wanare et al., 2012).

A diferencia de ACZ, TIM solo se administra por vía tópica ocular en forma de gotas oftálmicas, ya que en forma de sal (maleato), no presenta problemas de solubilidad (Lavik et al., 2011; Jung et al., 2013). Hemos de tener en cuenta que, si se absorbe a nivel sistémico, puede provocar efectos secundarios a nivel cardíaco y pulmonar debido a su mecanismo de acción no selectivo (Henderer y Rapuano, 2007). En la tabla 8 se recogen algunas de las características fisicoquímicas de este fármaco.

Tabla 8.- Características fisicoquímicas de TIM (Drugbank Database; Mohamed et al., 2014; Wermuth, 2008).

Fórmula molecular	C ₁₇ H ₂₈ N ₄ O ₇ S
Peso molecular	432,49 g/mol
Nombre químico	(Monomaleato de (S) -3- [3- (terc-butilamino) -2- hidroxipropoxi] -4-morfolino-1,2,5-tiadiazol
Estructura	
Absorción UV máxima	294 nm
pKa	9,2
log P	-0,04

Aunque es una molécula muy soluble en agua (Yang et al., 2007) y su intervalo de pH de óptima estabilidad es muy amplio, entre 3,5 y 8,5

(Loch et al., 2012; Rodríguez et al., 2017; Rathore, 2011; Kulkarni y Amin, 2000), debido a su bajo coeficiente de permeabilidad, el cual se sitúa en un intervalo entre los 0,4 y $4,3 \cdot 10^{-5}$ cm/s (Wei et al., 2001; Tan et al., 2017; Attama et al., 2009), también podría llegar a presentar problemas para su permeación.

1.2.2.2. Vehículo

Para elaborar una forma líquida de administración oftálmica en medio acuoso es posible utilizar dos tipos de agua: agua de calidad inyectable o bien agua purificada. La diferencia entre ambos medios es que la utilizada para inyectables debe ser estéril y estar exenta de pirógenos, mientras que para la purificada no es una condición indispensable.

1.2.2.3. Regulación del pH

Aunque el pH ideal para una formulación oftálmica debería estar próximo a 7,4, en la práctica el ajuste del pH final de la formulación debe contemplar otros aspectos tales como la solubilidad o estabilidad del fármaco. Prueba de ello es la existencia de diferentes colirios comercializados a pH ácido, como pueden ser Colircusí Pilocarpina[®] o Colircusí Ciclopléjico[®] a pH 3,72 y 3,55 respectivamente (García-Valdecabres et al., 2004; Lim et al., 2014), situación que no supone ningún riesgo debido al efecto tampón que ejerce el fluido lagrimal (Le Hir, 1995).

El ajuste del pH en las formulaciones se suele realizar mediante soluciones buffers o tampones en combinación con cantidades controladas de hidróxido sódico (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) para alcanzar con exactitud el valor deseado. Algunos ejemplos de los más utilizados (Bot Plus Web, 2018; AEMPS, 2019), así como su intervalo

efectivo de pH se muestran a continuación (Schuerer et al., 2017; Lundblad y Macdonald, 2018).

- Fosfato monosódico /disódico: pH 5,0–8,0
- Ácido acético/acetato: pH 4,0-6,6.
- Cítrico-fosfato: pH 2,2-7,8.
- Ácido bórico/borato: pH 6,8-9,1.
- Ácido cítrico/citrato: pH 3,5-6,5.
- Tris: pH 7,2-9,0.

1.2.2.4. Viscosizante

El control de la viscosidad del preparado puede permitir un incremento en el tiempo de retención del fármaco en la superficie ocular y por tanto una mejora de su absorción. Los valores óptimos para formulaciones acuosas oscilan entre 15-30 cP (Felt et al., 2000).

Sin embargo, el empleo de viscosizantes específicos no siempre es necesario. Por una parte, su exceso induciría la cascada de reacciones del sistema de drenaje que favorecería el aclaramiento del fármaco. Además, por regla general suelen ser macromoléculas de amplio peso molecular, lo cual dificulta la difusión del fármaco a través de las barreras biológicas, ya sea por impedimento físico o por la formación de complejos mediante enlaces débiles, tipo puentes de hidrógeno (Irimia et al., 2018). Además, debido a sus características fisicoquímicas, pueden condicionar el proceso de elaboración o esterilización, por reacciones de interacción con los demás excipientes.

1.2.2.5. *Conservante*

Según la normativa vigente recogida en la RFE, todo preparado oftálmico debe mantener la esterilidad durante el intervalo posológico demandado por el paciente. No obstante, el uso de conservantes solo estaría justificado en envases multidosis, donde es probable la contaminación microbiana por la apertura del envase (RFE, 2015).

El principal problema que presentan los conservantes es su alta toxicidad ocular, destacando alteraciones en el cristalino, en la córnea o incluso en la película lagrimal. Por ello su uso queda bastante restringido y las concentraciones utilizadas deben ser las mínimas posibles para así evitar los efectos en tratamientos con instilaciones diarias (García-Sánchez et al., 2013).

Entre los excipientes de este grupo, destaca el cloruro de benzalconio, el cual está posicionado como el conservante más utilizado a nivel oftálmico. Se trata de una sal de amonio cuaternario, la cual posee características desinfectantes, bactericidas e inhibidoras de la actividad viral. Aunque es comúnmente usado vía tópica, es posible encontrarlo en algunas formulaciones oftálmicas gracias a que, a través de su mecanismo de acción, puede inactivar enzimas productoras de ATP, así como desnaturalizar proteínas celulares (Merchel Piovesan Pereira y Tagkopoulos, 2019).

1.2.2.6. *Isotonizante*

Una formulación oftálmica debe cumplir la condición de isotonía frente al fluido lagrimal, consiguiendo así mantener la presión osmótica del ojo y evitando procesos como el lagrimeo.

La superficie ocular es capaz de tolerar concentraciones que oscilan entre 0,7 y 2,0 % p/v de NaCl. Sin embargo, existen comercializadas formulaciones ligeramente hipertónicas, para mejorar la absorción y una acción más efectiva del principio activo. Dado que el volumen que se emplea en este tipo de soluciones es pequeño, su dilución con la lágrima se produce rápidamente y el malestar o los efectos adversos provocados por la hipertonidad son solo temporales (Chow y Chan, 2021).

1.2.2.7. Antioxidante

La utilización de este tipo de excipientes estaría justificada en base a las características específicas del fármaco. Su uso permite evitar la oxidación tanto de sustancias activas como de excipientes seleccionados. Se clasifican en función de su mecanismo de acción, según sean quelantes, sinérgicos o reductores (Nema et al., 2002). Uno de los más utilizados es el etilendiamintetraacetato (EDTA), el cual suele emplearse en forma de sal disódica. Se trata de un agente quelante que actúa captando trazas de iones metálicos (Fe^{+3} , Cu^{+2}) que actúan como catalizadores de reacciones oxidativas, por lo que se le suele catalogar como antioxidante secundario (Cagnasso et al., 2010).

Además, posee cierta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas, aunque de baja intensidad, por lo que no se le considera un agente antimicrobiano (Lambert et al., 2004). Su efecto sinérgico con el cloruro de benzalconio, lo hacen el antioxidante de elección, cuando en las formulaciones se utilicen dicho conservante (Lambert et al., 2004; Rowe et al., 2012). Algunos autores le asignan una función adicional de promotor de la absorción, ya que presenta la capacidad de alterar la

estructura celular de la córnea y facilitar el transporte del fármaco en el interior del ojo (Sasaki et al., 1995; Kaur y Smitha, 2002).

1.2.2.8. Solubilizante

Este tipo de excipientes es imprescindible cuando el fármaco presenta problemas de solubilización. Como es bien conocido, existen diferentes estrategias para mejorar la solubilidad de un principio activo, ya sea actuando sobre el solvente (modificación del pH del medio, empleo de cosolventes) o sobre propio soluto (formación de sales, micelas o complejos). Esta última opción, en concreto con CDs, ha mostrado muy buenos resultados en la mejora de la solubilidad de ACZ, por lo que será la que empleemos en nuestra formulación.

1.2.2.8.1. Ciclodextrinas

Las CDs se pueden definir como azúcares cíclicos constituidos por un número variable de subunidades de glucopiranosas. La característica estructural más importante de estos compuestos es su conformación toroidal, que delimita una cavidad interior relativamente apolar, siendo la parte externa de naturaleza hidrofílica. Gracias a dicha conformación, estas moléculas son capaces de formar compuestos de inclusión con moléculas apolares, tanto en medio líquido como en estado sólido (Davis y Brewster, 2004).

Estas macromoléculas son producidas por la acción de la enzima CD-glucosiltransferasa en un medio rico en almidón. Así, el producto primario (formado de la rotura de las moléculas de almidón por la acción de la enzima), experimenta una reacción intramolecular que da lugar a compuestos cíclicos por medio de enlaces α -(1,4) (Dodziuk, 2006; Martín del Valle, 2004). Las CDs se nombran por medio de letras

griegas para denotar el número de unidades de D-glucosa que contienen: α , β y γ , para las de 6, 7 y 8 unidades respectivamente. Pueden existir homólogos de 9 o más unidades, pero su capacidad de complejación es pobre. Por otra parte, no pueden formarse CDs de menos de 6 unidades debido a impedimentos estéricos (Larsen, 2002). En los últimos 40 años, Las CDs han acaparado un considerable interés dentro del campo farmacéutico, debido a su capacidad para formar compuestos de inclusión con fármacos de muy diferentes estructuras para mejorar, por ejemplo, la solubilidad acuosa, la estabilidad química o la biodisponibilidad de un principio activo (Rowe et al., 2012; Crini, 2014; Al Azzam y Muhammad, 2015; Jansook et al., 2010).

Como consecuencia de la conformación del C1 de las unidades de α -D-glucopiranososa y la ausencia de libre rotación de los enlaces glucosídicos, las moléculas no son totalmente cilíndricas, sino que presentan una conformación troncocónica como podemos ver en la figura 10 (Szejtli, 1998; Szejtli, 2004; Loh et al., 2016; Mora et al., 2015; Schöffner et al., 2017).

La zona donde se encuentran situados los hidroxilos secundarios (átomos C2 y C3) es más ancha que aquella donde se encuentran los primarios. Esto se debe a la libre rotación de estos últimos, no rodeados por átomos de hidrógeno, lo cual reduce el diámetro efectivo de la cavidad en esa zona (Loftsson y Brewster, 1996). Esta particular conformación, aporta a la molécula un carácter hidrofílico en su parte externa (Parmar et al., 2018; Loftsson et al., 2002).

CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN

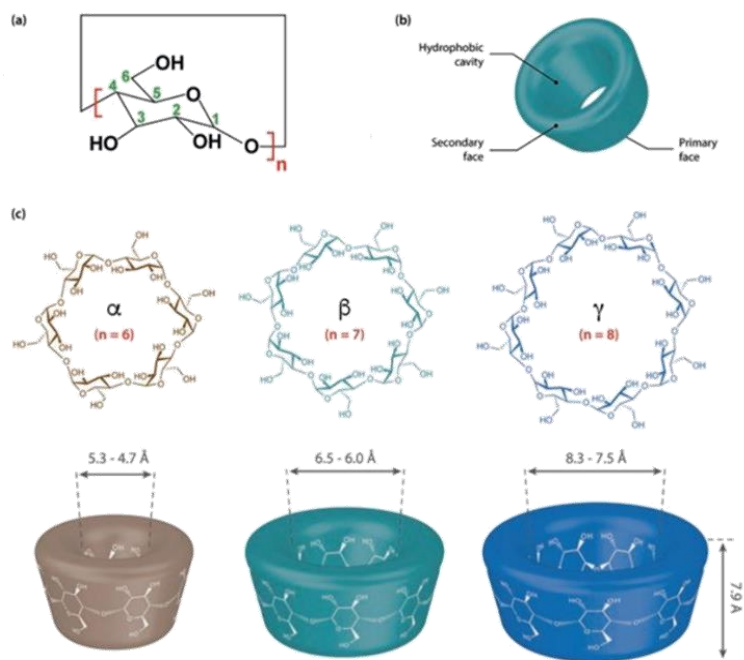


Figura 10.- (a) Estructura molecular de α -D-glucopiranosu, (b) Disposición toroidal de la CD, (c) Estructura química de las CDs naturales. Imagen disponible en https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-76159-6_1 [Consultado el 24-5-2019].

La baja solubilidad acuosa de las CDs naturales, en especial de la β -CD, limita considerablemente el campo de aplicación farmacéutica de estos compuestos. Este hecho parece ser el resultado de la presencia de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares entre los grupos hidroxilo (Jambhekar y Breen, 2016). Con el fin de mejorar esta característica o disminuir su toxicidad en aplicación por vía parenteral, se han obtenido derivados. Los grupos hidroxilo se encuentran disponibles como puntos de partida para modificaciones estructurales, pudiendo incorporar

diversos grupos funcionales obteniéndose así CDs hidroxipropiladas o metiladas, que ocupan un lugar destacado debido a su uso y polivalencia (Cyclolab, 2016; Stella y Rajewsky, 1994; Szejtli, 1998; Uekama et al., 1998; Brewster y Loftsson, 2007).

A pesar de la gran variedad de derivados existentes, según los datos aportados por la AEMPS, solo existe en el mercado español una única presentación comercial para preparados oftálmicos que contiene en su formulación CD, es el caso del Voltarén® 1 mg/ml colirio en solución, formulado con la hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD).

Sin duda, HP- β -CD (figura 11) es el derivado más utilizado para incrementar la solubilidad, ya que presenta una solubilidad acuosa superior al 50 % p/v, resultado de su naturaleza química y estructura amorfa (Muller y Brauns, 1986). En efecto, hemos de tener en cuenta que la hidroxipropilación no da como resultado una sustitución selectiva, sino que conduce a una mezcla de productos con diferentes grados de sustitución, lo que explica su incapacidad para cristalizar y, en consecuencia, su naturaleza amorfa (Li et al., 2016).

Además, la presencia de los radicales hidroxipropilo, expanden su cavidad en comparación con la β -CD, lo que amplía sus posibilidades a la hora de facilitar el proceso de complejación (Concha-Santos et al., 2013). En este sentido, aparece recogido en la bibliografía, que la HP- β -CD es la CD más adecuada para complejar ACZ (Loftsson y Stefánsson, 2002).

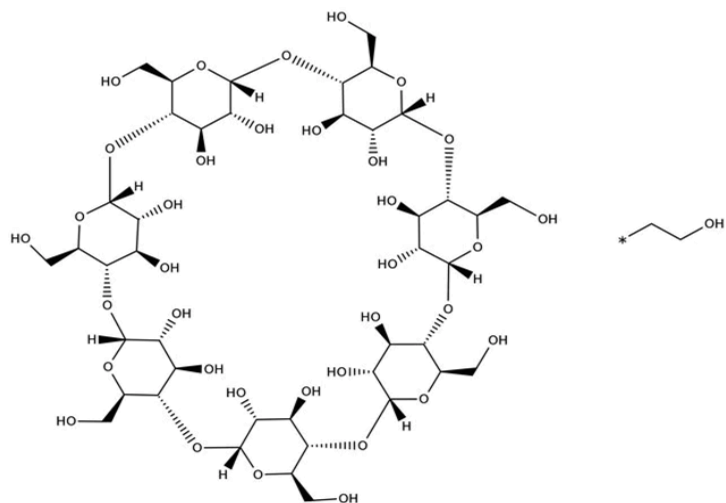
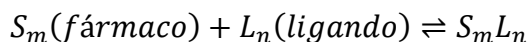


Figura 11.- Estructura química de HP- β -CD. Imagen disponible en <https://www.fishersci.ca/shop/products/hydroxypropyl-cyclodextrin-97-acros-organics-3/p-3736700> [Consultado el 24-11-2020].

1.2.2.8.2. Complejos de inclusión

Los complejos de inclusión son compuestos moleculares en los cuales una molécula hospedadora (CD), envuelve espacialmente a otra (fármaco), sin que su estructura se afecte de forma significativa. Aparte de una leve deformación, un hecho característico es que el tamaño y la forma de la cavidad disponible permanecen prácticamente inalterados.

Las CDs presentan la posibilidad de interactuar con una amplia variedad de especies iónicas y moleculares. El equilibrio CD-huésped es una asociación reversible (Kurkov y Loftsson, 2013) fruto de una interacción molecular débil (normalmente por puentes de hidrógeno) entre el sustrato S (principio activo) y n moléculas de ligando L (sustancia complejante) tal como queda representado en el siguiente esquema:



La constante de asociación o estabilidad del complejo ($k_{m:n}$) viene dada por la siguiente expresión:

$$k_{m:n} = \frac{[S_mL_n]}{[S]_m \cdot [L]_n}$$

Sin embargo, para que este tipo de interacciones puedan producirse es necesario que se cumplan varios requerimientos, los cuales serán mencionados detalladamente a continuación:

El primer requisito es la **compatibilidad geométrica**. En efecto, la formación de un compuesto de inclusión requiere que la molécula huésped pueda introducirse total o, al menos, parcialmente, en la cavidad de la CD (Singh, 2010). Como ha sido comentado, las naturales presentan cavidades de diferentes dimensiones ($\gamma > \beta > \alpha$), y los derivados además la expanden (Eftink et al., 1989), por lo que, la adecuada adaptación de la molécula del fármaco se traducirá en un mayor número de interacciones entre ambas moléculas, lo que se reflejará en un valor más alto de constante de estabilidad y en la estequiometría del complejo. Dependiendo de esa adecuación, no sólo podemos encontrar en solución complejos de estequiometría 1:1, sino también 1:2, 2:1, ó 2:2 (Chmurski, 2016).

Un segundo aspecto a tener en cuenta en la **polaridad y carga** del huésped. Hay que señalar que moléculas fuertemente hidrófilas (muy solubles en agua) y grupos fuertemente hidratados e ionizados, son débilmente complejables, dado el carácter hidrofóbico de la cavidad de la CD (Zhang y Ma, 2013).

Por último, hemos de considerar que, aunque en principio no es necesario ningún tipo de *medio disolvente* para que se pueda formar un compuesto de inclusión, el proceso de complejación se ve favorecido en presencia de agua. En solución, la formación del complejo es un proceso muy rápido, pero por regla general, las sustancias que posean buena solubilidad se complejan sólo débilmente mientras que las que presenten buenas características para su inclusión suelen presentar baja solubilidad acuosa.

Para finalizar este apartado, queremos destacar la influencia que puede ejercer la formación del complejo de inclusión fármaco-CD en el proceso de penetración. Los factores limitantes para la penetración corneal del complejo de inclusión son los siguientes (Frömming y Szejtli, 1994; Lipinski y cols., 2001):

1. La estructura química de la CD y del complejo de inclusión (cuya zona más externa presenta un carácter hidrofílico).
2. El alto peso molecular de la CD.
3. El bajo coeficiente de partición octanol/agua de los complejos obtenidos.

Por todo ello, es imposible que ni el complejo ni la CD atraviesen la córnea, siendo únicamente la fracción libre del fármaco la que puede hacerlo (figura 12).

Como ya se ha comentado con anterioridad, debido a que la unión entre principio activo y CD es muy lábil, el equilibrio es muy rápido, lo permite mantener en solución un cierto porcentaje de fármaco libre (dependiendo de la constante), siempre disponible para atravesar la membrana corneal, lo que desplazará el equilibrio, hacia la forma no

complejada del fármaco, si bien en el hipotético caso de que se supere su solubilidad, este podría incluso precipitar.

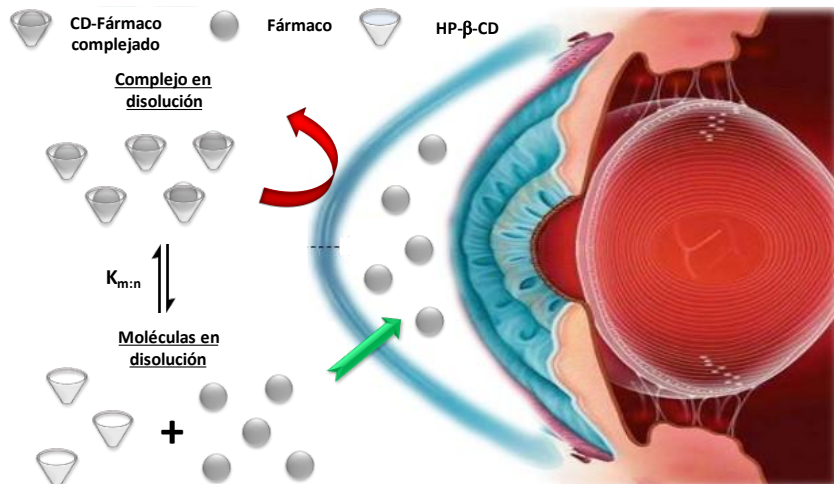


Figura 12.- Esquema del proceso de absorción de un fármaco administrado vía ocular en forma de complejo de inclusión con CDs.

1.3. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

A la hora de desarrollar un colirio es necesario garantizar la estabilidad del preparado durante su vida útil, así como establecer las condiciones óptimas de conservación. Entendemos por estabilidad, la capacidad que posee un producto o un principio activo de mantener, por un tiempo determinado, sus propiedades originales (físicas, químicas, biológicas y microbiológicas) dentro de las especificaciones de calidad establecidas (RFE, 2015).

En nuestro trabajo, estos estudios están plenamente justificados debido al problema de degradación por hidrolisis que presenta ACZ, tal como está recogido en la bibliografía (de Pilar-Corena et al., 2006; Srinivasu et al., 2010). Los estudios de estabilidad aportarán los resultados

necesarios, según los protocolos estandarizados (EMA, 1999), para establecer el **periodo de validez**, es decir la fecha límite para garantizar la estabilidad del fármaco en su recipiente o envase original desde su fabricación, siempre que este no esté abierto ni manipulado y se haya conservado en condiciones de almacenamiento indicadas en él.

1.3.1. Estudios acelerados

Según los términos establecidos por el Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH) en su guía Q1A R2 (ICH Q1A, 2019), un estudio de estabilidad tiene como objetivo principal proporcionar evidencias sobre como varía la calidad de un medicamento a lo largo del tiempo bajo la influencia de una serie de factores ambientales tales como la temperatura, la humedad y la luz, así como definir las condiciones recomendadas de almacenamiento.

Las condiciones a las que son sometidas las muestras de estos estudios están basadas en un análisis de los efectos que pueda producir la zona climática en las que se encuentren. Es por ello que la ICH divide el mundo en cuatro zonas climáticas:

- zona I: templada
- zona II: subtropical
- zona III: cálida/seca
- zona IV: cálida/húmeda

A pesar de ello, la ICH ha establecido un principio por el cual la información de estabilidad generada en cualquiera de las tres regiones principales que participan en el desarrollo de la guía (Europa, Japón y Estados Unidos) puede ser aceptada para las demás regiones, siempre

que dicha información cumpla con las directrices demandadas y el etiquetado esté de acuerdo con requisitos nacionales/regionales.

En nuestro caso, estas condiciones serán adaptadas a las condiciones de almacenamiento dictadas para España (zona II), que se basan en la temperatura cinética media calculada en nuestro país (Gallardo et al., 2004).

Los estudios de estabilidad acelerados están basados en someter las muestras a condiciones de estrés de temperatura y humedad con el fin de incrementar la velocidad de degradación del principio activo (RFE, 2015). Este tipo de estudios permiten establecer el **periodo de validez provisional** del medicamento en un intervalo corto de tiempo.

Según la normativa vigente expuesta por la ICH y que ha sido revisada por última vez en de abril de 2019 (ICH Q1A, 2019), para la inclusión en el mercado de una formulación oftálmica comercial, es posible obtener el valor del periodo de validez provisional a través de un ensayo acelerado con solo 6 meses de duración. Este periodo de validez provisional en ningún caso será superior a dos años. Para establecer el **periodo de validez definitivo** del medicamento, es necesario realizar un estudio de estabilidad a largo plazo en las condiciones de almacenamiento que la ICH dictamine, y que en ningún caso será superior a cinco años, salvo excepciones puntuales.

1.4. ESTUDIOS DE PERMEACIÓN “*IN VITRO*”

El estudio de permeación de fármacos *in vivo* en humanos es el método más efectivo para el análisis del paso del principio activo a través de la zona diana. Sin embargo, por razones éticas este tipo de ensayos están limitados hasta poseer datos suficientes sobre la seguridad de las

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

concentraciones de fármaco estudiadas (Jacobi et al., 2005). Es por ello que el planteamiento de ensayos *in vitro* adquiere mayor importancia en este campo.

Desde su desarrollo en 1975, los estudios en celdas de Franz representan el principal método utilizado para evaluar la penetración transepitelial de fármacos (Villarino y Landoni, 2006). Este método consiste en un sistema de celdas de difusión, cada una compuesta por dos cámaras, una donante y otra aceptora, separadas por una membrana que puede ser epitelio (ya sea humano o animal) o bien de origen sintética y que permitirá evaluar la difusión de fármacos de una cámara a otra, tal como se puede apreciar en la figura 13 (Villarino y Landoni, 2006; Chattaraj et al., 2005).

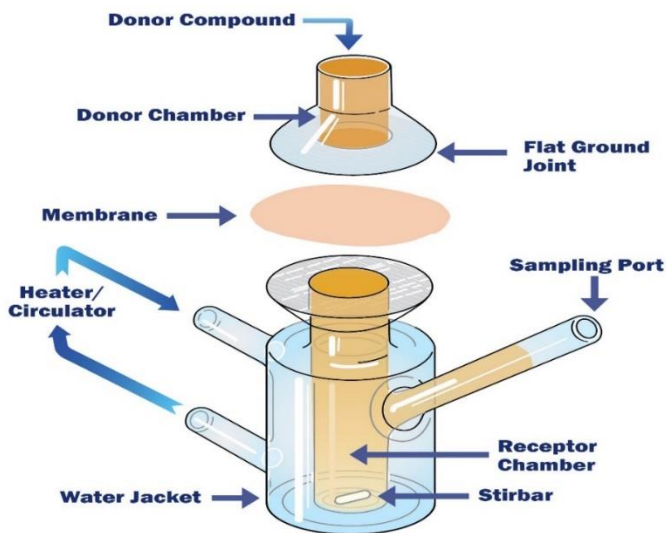


Figura 13.- Esquema de una celda de Franz utilizada para los ensayos de permeación, imagen disponible en <https://permeagear.com/franz-cells/> [Consultado el 24-6-2019].

La formulación a estudio se sitúa en el compartimento superior, desde donde tendrá que atravesar la membrana seleccionada hasta llegar al

compartimento inferior. La evaluación del proceso de difusión del fármaco se lleva a cabo mediante la recogida secuencial de muestras del fluido receptor, la cual puede estar automatizada (Baena et al., 2011).

Es importante también mencionar algunos de los parámetros que influyen en la difusión, entre los que destacan la temperatura, el tipo y naturaleza de la membrana, la velocidad de agitación y el medio del compartimento receptor (Estévez et al., 2000).

El desarrollo de un estudio de permeación *in vitro* utilizando membranas artificiales presentan varias limitaciones (Villarino y Landoni, 2006; Chattaraj et al., 2005), por lo que se han desarrollado sistemas alternativos (Estévez et al., 2000; Bosman et al., 1992; Friend, 1993), pero las celdas de Franz siguen siendo el sistema más utilizado.

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo de investigación es triple:

- Caracterizar el proceso de complejación de ACZ con HP- β -CD, poniendo de manifiesto la influencia del resto de excipientes de la formulación en dicho proceso. Esto servirá como punto de partida para la obtención de una formulación oftálmica liposomal que incluiría dicho complejo y TIM, la cual está siendo desarrollada por el grupo de investigación CTS 214.
- Poner de manifiesto el efecto que la complejación con HP- β -CD ejerce sobre la estabilidad acuosa y proceso de permeación de ACZ.
- Establecer una formulación oftálmica acuosa antiglaucomatosa tipo solución a base de ACZ y TIM, estudiando la influencia que el resto de los excipientes ejerce en el proceso de complejación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Principio activo y excipientes de la formulación propuesta

- **Acetazolamida (ACZ):** se presenta como un polvo blanco cristalino e inodoro. Su peso molecular es de 222,25 g/mol (Acofarma, España).
- **Ácido cítrico 1-hidrato:** se presenta como un polvo blanco cristalino. Su peso molecular es de 210,14 g/mol (Panreac, España).
- **Cloruro de benzalconio (CB):** se presenta como solución con una riqueza del 50 %, ligeramente amarillenta y con cierta viscosidad. Su peso molecular es de 364,00 g/mol (Acofarma, España).
- **Cloruro sódico (NaCl):** se presenta como un sólido blanco cristalino. Su peso molecular es de 58,44 g/mol (Panreac, España).
- **Di-sodio hidrogenofosfato 2-hidrato:** se presenta en forma de polvo blanco cristalino. Su peso molecular es de 177,99 g/mol (Panreac, España).
- **Etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA):** se presenta como un polvo blanco cristalino. Su peso molecular es de 372,24 g/mol (Fagron, España).
- **Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD):** se presenta como un polvo blanco, que posee un grado de sustitución de 0,6 y cuyo peso molecular es de 1380,00 g/mol (Fluka, Japón).

- **Timolol maleato (TIM):** se presenta como un polvo blanco cristalino. Su peso molecular es de 316,42 g/mol (Acofarma, España).

3.1.2. Excipientes usados en otras formulaciones

- **Ácido clorhídrico 0,5 N:** se presenta como una solución incolora. Su peso molecular es de 36,46 g/mol (Panreac, España).
- **Ácido-2-[4-(2-hidroxietyl)-1-piperaciny]-etanosulfónico:** se presenta como polvo blanco cristalino. Su peso molecular es de 238,30 g/mol (Panreac, España).
- **Benzoato sódico:** se presenta como un polvo cristalino blanco. Su peso molecular es de 144,11 g/mol (Acofarma, España).
- **Tri-ricinoleato de polioxietilenglicol (35):** también conocido como Cremophor®EL, se presenta como un líquido claro amarillo pálido. Su peso molecular es de 1113,60 g/mol (Acofarma, España).
- **Dietilenglicol monoetiléter:** también conocido como Transcutol®P, se presenta como un líquido incoloro transparente. Su peso molecular es de 134,17 g/mol (Acofarma, España).
- **Hidróxido sódico:** se presenta en forma de lentejas de color blanco. Su peso molecular es de 39,99 g/mol (Panreac, España).

- **Hidroximetil aminometano:** se presenta como polvo blanco cristalino. Su peso molecular es de 121,14 g/mol (Panreac, España).
- **Metilparabeno sódico:** también conocido como Nipagín® sódico, se presenta como un polvo cristalino blanco. Su peso molecular es de 152,14 g/mol (Acofarma, España).
- **Monooleato de polioxietileno (20) sorbitán:** también conocido como Polisorbato 80 o Tween®80, se presenta como líquido oleoso límpido, o ligeramente opalescente, incoloro o amarillo parduzco. Su peso molecular es de 1310,00 g/mol (Acofarma, España).
- **Dihidrogenofosfato de potasio:** se presenta como polvo blanco cristalino. Su peso molecular es de 136,09 g/mol (Panreac, España).

3.1.3. Materiales para la cromatografía líquida de alta resolución

La fase móvil de la columna cromatográfica está constituida por:

- **Acetato sódico 3-hidrato:** se presenta como un polvo blanco cristalino. Su peso molecular es de 136,08 g/mol (VWR Prolabo, Bélgica).
- **Acetonitrilo calidad HPLC (ACN):** se presenta como un líquido de apariencia incolora. Su peso molecular es de 41,05 g/mol (Sigma-Aldrich, USA).
- **Ácido acético glacial:** se presenta como un líquido claro y de apariencia incolora. Su peso molecular es de 60,05 g/mol (Panreac, España).

- **Agua Milli-Q®:** agua destilada ultrapura, la cual es obtenida a través de un sistema de filtrado Milli-Q® Advantage, Millipore®.

3.1.4. Materiales para los estudios de permeación

- **Filtros de membrana:** se emplearon discos de Poliétersulfona: HT-450 100/PK TUFFRYN de 47 mm de diámetro y 0,2 μ m de tamaño de poro (Pall Corporation, España).
- **Gelatina:** se presenta como un polvo amarillento cristalino específicamente diseñado para análisis y bacteriología. Tiene un peso estimado entre 95.000-100.000 Da (Acofarma, España).
- **Bicarbonato de sodio:** se presenta como un polvo cristalino blanco. Su peso molecular es de 84,01 g/mol (Acofarma, España).
- **Cloruro de calcio dihidrato:** se presenta como un polvo cristalino blanco. Su peso molecular es de 147,02 g/mol (Acofarma, España).
- **Cloruro de potasio:** se presenta como un polvo cristalino blanco. Su peso molecular es de 74,55 g/mol (Acofarma, España).

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Elaboración de la formulación propuesta

El proceso de elaboración de la formulación se realizó en una campana de flujo laminar con el objetivo de trabajar en condiciones de asepsia.

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

Sobre 500 ml de una solución tampón de cítrico/fosfato, la cual será ajustada al pH necesario dependiendo de las necesidades de cada tipo de ensayo, serán añadidos 100 μ L de cloruro de benzalconio y 250 mg de EDTA.

Para la elaboración de 100 ml de la formulación propuesta, se añadieron 13,80 g de HP- β -CD a 95 ml de la solución anteriormente elaborada, hasta su completa disolución. Posteriormente, se adicionó primero TIM (680 mg) y seguidamente ACZ (500 mg). Por último, se incorporó a la formulación una cantidad de 124 mg de NaCl para alcanzar la isotonicidad y se enrasó el volumen hasta los 100 ml finales. A modo de resumen, en la tabla 9 se recogen las cantidades utilizadas de cada componente en dicha formulación.

Tabla 9.- Composición final de 100 ml de colirio.

Componentes de la formulación	% p/v
Acetazolamida (ACZ)	0,50
Timolol maleato (TIM)	0,68
Hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD)	13,80
Etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA)	0,05
Cloruro de Benzalconio (CB)	0,01
Cloruro sódico (NaCl)	0,12
Ácido cítrico 1-hidrato	1,13
Di-sodio hidrogenofosfato 2-hidrato	1,64

3.2.2. Valoración de los principios activos

Se empleó el método cromatográfico descrito por Arroyo (Arroyo-García, 2018; Arroyo-García et al., 2021), el cual se resume a continuación:

Equipo cromatográfico (Hitachi LaChrom HPLC System Manager) compuesto por:

- Bomba isocrática L-2130
- Inyector automático de muestras L-2200
- Detector *diode array* L-2455
- Horno Elite LaChrom Hitachi L-2350

La columna seleccionada fue LiChrospher 100 RP-18® (Merck) de 4 mm de diámetro y 125 mm de longitud. La cuantificación de los principios activos se realizó a la longitud de onda para la que se observa la respuesta media tanto para ACZ como para TIM, ya que se propone una detección conjunta en un solo cromatograma. La longitud de onda seleccionada fue 286 nm. Como fase móvil, se empleó una combinación de una solución tampón de acetato sódico 0,05 M (ajustado a pH 4,1 con ácido acético glacial) y acetonitrilo acondicionado para estudios de HPLC (ACN). Se usó un sistema de gradiente (ver tabla 10), con objeto de asegurar una separación adecuada de los picos de ambos fármacos, así como de las posibles interferencias que presente el sistema.

Tabla 10.- Resumen de las condiciones cromatográficas en gradiente diseñadas para la valoración de ACZ y TIM.

<i>Tiempo (min)</i>	<i>% ACN</i>	<i>% Tampón acetato</i>	<i>Flujo (ml/min)</i>
0	10	90	1,5
2,3	40	60	2,0
4,1	10	90	2,0
5,0	10	90	2,0

Para cada carga de muestra, el volumen de inyección fue de 10 μ l, manteniéndose una temperatura de 45 ± 1 °C en horno y tomando como referencia los tiempos de retención de los fármacos analizados (1,7 minutos para ACZ y 4,1 minutos para TIM).

3.2.3. Estudio de complejación de ACZ en medio líquido

3.2.3.1. Diagramas de solubilidad

Los ensayos de solubilidad se realizaron según el método propuesto por Higuchi y Connors (Higuchi y Connors, 1965). Estos estudios miden el cambio de solubilidad aparente de un sustrato frente a cantidades o concentraciones crecientes de un agente complejante. Para ello, la molécula en estudio se adiciona como sólido en exceso a diferentes viales que contienen soluciones con concentraciones crecientes de CD, bajo agitación y a temperatura constante. Una vez alcanzado el equilibrio, se determinará la concentración de la molécula solubilizada y se procederá su representación gráfica.

En viales de vidrio de 10 ml, se adicionaron alícuotas de 5 ml de solución de HP- β -CD en concentraciones que oscilaban entre 0 y 0,1 M, a los que

se añadió un exceso de 30 mg de ACZ, preparándose tres lotes de cada muestra. Posteriormente, se sometieron a agitación (agitador ACS 360 TS-K 412) a temperatura ambiente (que oscilaba entre 24-27 grados) durante una semana. Una vez alcanzado el equilibrio, las muestras se sometieron a filtración a través de un filtro Millipore® de 0,22 μm, y las soluciones resultantes, tras dilución, se analizaron por duplicado mediante HPLC. A partir de los datos de los diagramas de solubilidad se procedió al cálculo de la constante de estabilidad (para una estequiometría 1:1), mediante la siguiente ecuación:

$$K_{1:1} = \frac{\textit{pendiente}}{S_0 \cdot (1 - \textit{pendiente})}$$

donde S_0 representa la solubilidad del fármaco en ausencia de CD.

Igualmente, se calculó la eficacia solubilizante (E_S) de la CD en el rango de concentraciones estudiado, la cual se define como el aumento de solubilidad relativa del fármaco a una concentración dada de CD, según la siguiente ecuación:

$$E_S = \frac{S_{CD}}{S_0}$$

donde S_{CD} representa la solubilidad del fármaco a dicha concentración de CD y S_0 al igual que en la ecuación anterior, corresponde a la solubilidad del fármaco en ausencia de CD.

Además de estos dos parámetros, determinamos la eficacia de complejación (E_c). Este valor, nos indica la afinidad de las moléculas de ACZ por la cavidad de la HP-β-CD (Loftsson et al., 2005; Cavalcanti et al., 2011, Jansook et al., 2021; Arroyo-García, 2021). E_c está estrechamente

relacionada con la constante de estabilidad del complejo y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$E_c = \frac{\text{pendiente}}{1 - \text{pendiente}}$$

Los ensayos se realizaron en diferentes medios:

- **Agua Milli-Q®**
- **Tampón Cítrico/Fosfato:** para su preparación, se disolvió 2,10 g de ácido cítrico en un matraz aforado de 100 ml y 3,56 g de Na₂HPO₄·2H₂O en otro matraz aforado de 100 ml. Una vez completamente disueltas ambas soluciones tomamos 13,05 ml de la solución de cítrico y 86,95 ml de la solución de Na₂HPO₄·2H₂O y lo llevamos a un matraz aforado de 100 ml (para un pH de 7,2), o 46 ml de cítrico y 54 ml de Na₂HPO₄·2H₂O para una solución de 100 ml (para pH 5,3).
- **Tampón Hepes:** para preparar el tampón disolvemos 0,24 g de C₈H₁₈N₂O₄S en un matraz aforado de 100 ml y ajustamos al pH deseado con NaOH 0,01 N.
- **Tampón Sörensen:** Para su elaboración, disolvemos 0,91 g de KH₂PO₄ en un matraz aforado de 100 ml y 1,20 g de Na₂HPO₄·2H₂O en un segundo matraz de 100 ml. A continuación, tomamos 28,50 ml de la primera solución y 71,50 ml de la segunda y lo llevamos a un matraz aforado de 100 ml para alcanzar el pH requerido.
- **Tampón Tris:** Para preparar el tampón disolvemos 2,42 g de C₄H₁₁NO₃ en un matraz aforado de 100 ml, preparamos una solución de HCl 0,50 N en un matraz de 100 ml, tomamos 25 ml

de la solución de Tris y 22,10 ml de la solución de HCl y enrasamos con agua hasta 100 ml.

Una vez establecido el diagrama de solubilidad de ACZ en presencia de HP-β-CD, se adicionaron resto de los componentes de la formulación, para estudiar su influencia el equilibrio de complejación, y poder seleccionar en base a los resultados obtenidos, la formulación más idónea.

Excipientes ensayados:

Antioxidantes

- **EDTA:** La concentración utilizada en este estudio será de 0,05 % p/v.

Conservantes

- **Cloruro de benzalconio:** la concentración utilizada en este estudio será de 0,01 % p/v.
- **Benzoato sódico:** la concentración utilizada en este estudio será de 0,1 % p/v.
- **Nipagín® sódico:** la concentración utilizada en este estudio será de 0,1 % p/v.

Solubilizantes / humectantes

Se ensayaron dos concentraciones, seleccionadas en base a estudios previos realizados.

- **Tween®80:** 1,08 y 2,16 % p/v.
- **Transcutol®P:** 0,99 y 1,98 % p/v.
- **Cremophor®EL:** 1,05 y 2,10 % p/v.

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

En la figura 14, se recoge el esquema secuencial seguido para realizar los diferentes ensayos de solubilidad, que nos llevaron a seleccionar los componentes de la formulación propuesta.

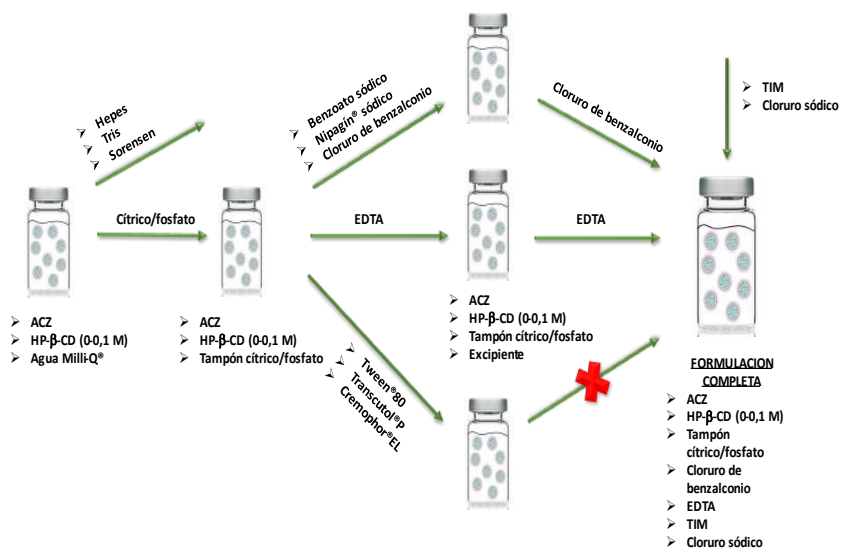


Figura 14.- Esquema secuencial seguido en la realización de los ensayos de solubilidad.

3.2.3.2. Resonancia magnética nuclear de protones

Los espectros de ¹H-RMN se obtuvieron mediante un equipo Bruker Avance III (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Alemania) operando a 300 MHz, con una temperatura de adquisición de señal de 296,9 K. Las muestras (ACZ, CD y ACZ/HP- β -CD) se prepararon en agua deuterada (D₂O) (Sigma-Aldrich, St. Louis MI). El resto de las condiciones de los ensayos se recogen en la tabla 11.

Tabla 11.- Características del ensayo de RMN.

Parámetros	Valor
Tiempo de adquisición	5,29 s
Pulso de ^1H	45°
Duración del pulso	14,30 ms
Potencia del pulso	10,23 w
Retraso del pulso	1 s
Tamaño de la FID	65536
Scans de prueba	2
N.º de scans	16
Ventana espectral	20,61 ppm

3.2.3.2.1. Determinación de la geometría de complejo en solución mediante espectro ROESY

El objetivo del experimento ROESY (*Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy*) es la detección de señales cruzadas (efecto nuclear Overhauser) entre los picos de los protones del interior de la cavidad de la CD (H_3 y H_5) y los de los protones vecinos correspondientes a ACZ, aportando información sobre orientación y, por tanto, de la geometría del compuesto de inclusión resultante.

El espectro bidimensional ROESY (2D-ROESY) se adquirió en un espectrómetro Bruker AV-500 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Alemania) operando a 500 MHz (^1H). La muestra se preparó mediante disolución en D_2O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI), a concentraciones de 2,8 mg/ml de ACZ y 17,2 mg/ml de HP- β -CD. El espectro se adquirió bajo las siguientes condiciones: 16384 puntos de datos con 2048

incrementos, con 16 scans por incremento, y un bloqueo de spin de onda continua. Los datos sensibles a la fase se recopilieron utilizando un esquema de supresión de agua.

3.2.3.2.2. Determinación espectrofotométrica de la constante de complejación: Método de Benesi Hildebrand

Para el cálculo de la constante de complejación se recurrió al método de Benesi-Hildebrand (Benesi y Hildebrand, 1949; Scott, 1956; Kuntz et al., 1968; Wang y Yu, 2007; Chalumot et al., 2009; Kfoury et al., 2018), el cual se basa en que la absorptividad molar del principio activo y del compuesto de inclusión difieren a una misma longitud de onda, lo que permite determinar la constante de estabilidad a partir de los datos espectrales obtenidos, ya que en caso de estequiometría 1:1, la inversa de la variación de la absorbancia a una longitud de onda dada ($1/\Delta A$) es proporcional a la inversa de la concentración de CD ($1/[CD]$), según la ecuación:

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{[F] \cdot K_{1:1} \cdot \Delta \varepsilon} \cdot \frac{1}{[CD]} + \frac{1}{[F] \cdot \Delta \varepsilon}$$

La representación resultante origina una línea recta, donde $\frac{1}{[F]K_{1:1}\Delta\varepsilon}$ es la pendiente de la recta, $\frac{1}{[F]\Delta\varepsilon}$ es la ordenada en el origen, $\Delta\varepsilon$ la diferencia de absorptividad molar y $[F]$ concentración de fármaco. El valor la constante de complejación $K_{1:1}$ se obtendrá a partir del cociente entre el valor de la ordenada en el origen y la pendiente, calculados previamente mediante regresión lineal.

Para su realización, preparó una solución ACZ (1,2 mM) y otra de HP-β-CD (10 mM). A partir de dichas soluciones se elaboraron una batería de

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

muestras de hasta 15 viales por ensayo, tal y como se recoge en la tabla 12.

Tabla 12.- Condiciones del ensayo de Benesi-Hildebrand.

Muestra	[HP-β-CD] mM	[ACZ] mM	ml (HP-β- CD)	ml (H₂O)	ml (ACZ)
1	0,00	1,20	0,00	5,00	5,00
2	0,40	1,20	0,20	4,80	5,00
3	0,80	1,20	0,40	4,60	5,00
4	1,00	1,20	0,50	4,50	5,00
5	1,20	1,20	0,60	4,40	5,00
6	1,40	1,20	0,70	4,30	5,00
7	1,60	1,20	0,80	4,20	5,00
8	1,80	1,20	0,90	4,10	5,00
9	2,00	1,20	1,00	4,00	5,00
10	4,00	1,20	2,00	3,00	5,00
11	6,00	1,20	3,00	2,00	5,00
12	7,00	1,20	3,50	1,50	5,00
13	8,00	1,20	4,00	1,00	5,00
14	9,00	1,20	4,50	0,50	5,00
15	10,00	1,20	5,00	0,00	5,00

Por último, a los valores de absorbancia de las muestras que contenían CD se les realizó una corrección, consistente en restarles el valor de la absorbancia de la solución de CD pura a la misma concentración, en el máximo de absorción de 265 nm, realizándose todos los ensayos por triplicado.

3.2.3.3. Estudio de complejación *in silico* (modelización molecular)

Los estudios de modelización por mecánica molecular y cuántica se realizaron a través de los paquetes de software Hyperchem® versión 8.0.8 (Hypercube, 2016), Gaussian 09W versión 9.0 y Gaussview 5.0 (Frisch et al., 2009; Dennington et al., 2009).

La estructura inicial de β -CD se obtuvo del *Protein Data Bank* (PDB ID: 3CGT). La construcción de la HP- β -CD se llevó a cabo añadiendo sustituyentes 2-hidroxipropilo al esqueleto de β -CD, siguiendo las indicaciones de la “Cyclodextrin KnowledgeBase” (Hazai et al., 2010). Por su parte, la estructura molecular de ACZ se construyó mediante el editor de Hyperchem.

Con objeto de obtener las conformaciones más estables de las estructuras de la CD y la molécula huésped, necesarias como punto de partida válido para las simulaciones (Schlick, 2010), se ejecutó un análisis conformacional mediante Hyperchem. Se establecieron las siguientes condiciones:

- a) El tratamiento se llevó a cabo usando el campo de fuerza MM+ en Hyperchem, aplicando el algoritmo Polak-Ribière, con un valor de convergencia de rms (media cuadrática) de 0,01 Kcal/Å mol.
- b) La variación de la flexibilidad de los ángulos de torsión se fijó en $\pm 60^\circ \div \pm 180^\circ$.
- c) El criterio de energía para la aceptación de la conformación se estableció en 4 Kcal/mol sobre el mínimo.
- d) Se descartaron todas las conformaciones con distancias atómicas menores de 0,5 Å y diferencias entre ángulos de

torsión menores de 15° , así como conformaciones con diferencias de energía menores de 0,05 Kcal/mol.

e) El número máximo de optimizaciones y cálculos iterativos fue de 1000, hasta un máximo de 100 conformaciones.

f) Los átomos de hidrogeno no se tuvieron en cuenta en el proceso (Pînzaru et al., 2011).

Las estructuras de ACZ y HP- β -CD así obtenidas por MM+ se refinaron posteriormente mediante el método semiempírico PM3 (Parametric Model 3) incluido en Gaussian 09W. Se aplicó una optimización sin restricciones, con un valor de convergencia de 0,01 Kcal/Å mol.

La estructura de los complejos correspondientes a los mínimos globales de la energía potencial superficial de CDs se dilucidó según el método descrito por Fathallah (Fathallah et al., 1994). De este modo, posicionando la molécula de CD en el origen de un sistema de coordenadas, se orientó de manera que los átomos de oxígeno glucosídico se situasen en el plano XY, mientras que los grupos hidroxilos secundarios se orientaron en la dirección del eje Z.

A continuación, la molécula huésped se situó a lo largo de dicho eje teniendo en cuenta las diferentes orientaciones de la molécula huésped. En el caso del complejo de estequiometría 1:1 hay dos orientaciones posibles de partida: hidroxilos secundarios hacia la derecha (orientación A) y hacia la izquierda (orientación B).

En un tercer paso, la molécula huésped se introduce y pasa a través de la cavidad de la CD por pasos (Figura 15). En cada paso, de 1 Å (desde -10 Å hasta +10 Å), se realiza una optimización geométrica en vacío

(campo de fuerza MM+, algoritmo Polak-Ribière, con rms de 0,01 Kcal/Å mol) registrándose el valor de la energía tras cada optimización. Dichas energías se representan frente a las coordenadas y se toma el estado de mínima energía para cada complejo fármaco-CD.

Por último, los complejos más estables hallados por MM+ se re-optimizaron por el método semiempírico PM3 sin restricciones mediante Gaussian 09W / Gausview 5 e Hyperchem versión 8.0.8.

De forma paralela, se realizó el mismo ensayo exclusivamente por MM+, partiendo de las estructuras de ACZ y HP- β -CD obtenidas tras análisis conformacional, prescindiendo de cualquier refinamiento por PM3.

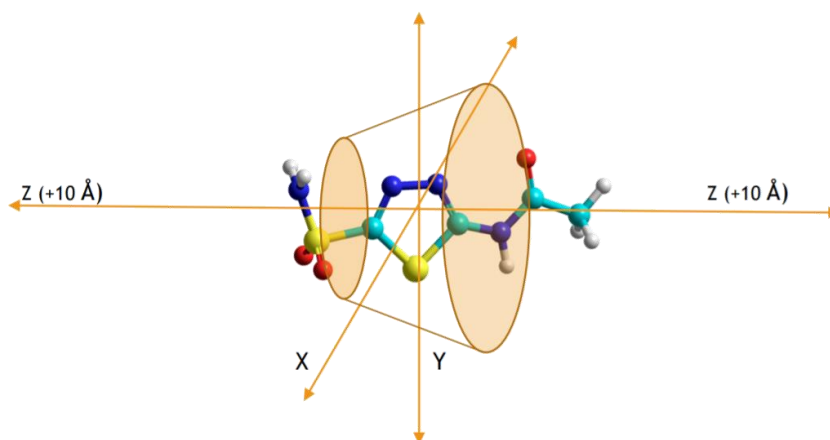


Figura 15.- Orientación tipo A del complejo ACZ-CD 1:1. En la minimización, el huésped (CD) se desplaza por el eje Z en pasos de 1 Å.

3.2.4. Otros estudios

3.2.4.1. Viscosidad

La viscosidad (μ) es un término introducido por Newton, el cual se suele describir matemáticamente a partir de la relación entre el esfuerzo por unidad de área (τ) y el gradiente de velocidades también llamado velocidad de deformación o velocidad de cizalla (θ):

$$\mu = \frac{\tau}{\theta}$$

Para los fluidos newtonianos, este valor es una constante (μ) y representa el valor de viscosidad, a una presión y temperatura dadas, siendo independiente de la velocidad y tiempo de aplicación de la cizalla (Beltrán y Marcilla, 2012; Wilson, 2018).

Para fluidos no newtonianos se habla de viscosidad aparente (η), en ellos la viscosidad deja de ser constante para convertirse en una función de la velocidad de deformación del fluido (Nakanishi et al., 2012; Laschet et al., 2004).

En la figura 16 se muestran diferentes curvas de flujo (representación de τ frente θ), utilizadas normalmente para expresar el comportamiento reológico de los fluidos.

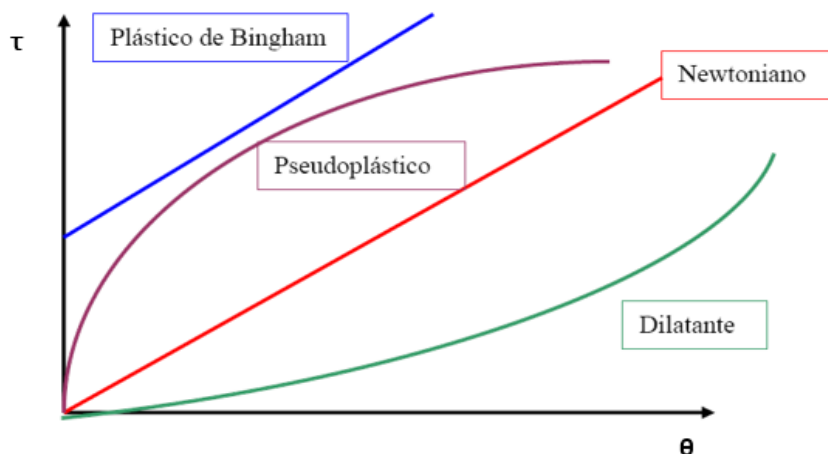


Figura 16.- Curvas de flujo de los principales fluidos. Imagen modificada disponible <https://www.agitador.es/blog/wp-content/uploads/2011/07/visosidad-y-tipo-fluidos.png> [Consultado el 20-9-2022].

Los estudios de viscosidad se llevaron a cabo sobre tres lotes experimentales de la formulación propuesta. Las muestras, de 20 ml, fueron testadas en un reómetro Thermo Scientific HAAKE modelo MARS utilizando un sistema sensor como plato de 60 mm de diámetro y un ángulo de 1°. La temperatura a la que se midieron las muestras fue de 25 °C y el tiempo de muestreo fue de 150 min.

3.2.4.2. Estabilidad

Para el desarrollo del estudio de estabilidad acelerado se procedió a elaborar varias formulaciones diferentes, las cuales se recogen en la tabla 13, junto con todas las posibles variables que pueden llegar a afectar la cinética de degradación de la formulación propuesta.

Los ensayos de estabilidad se dividieron en dos etapas. En una primera, se realizó un estudio acelerado de estabilidad a tres temperaturas para la formulación 1 (tabla 13). De este modo, se determinó tanto la energía

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

de activación de la reacción de degradación de ACZ, así como su cinética de degradación al pH utilizado por la mayoría de los colirios comercializados.

Tabla 13.- Formulaciones ensayadas a diferentes pH en % p/v.

	ACZ	TIM	HP- β -CD	EDTA	CB	NaCl	pH
Formulación 1	0,05	-	-	0,05	0,01	0,92	7,20
Formulación 2	0,50	-	13,80	0,05	0,01	0,22	7,20
Formulación 3	0,05	0,68	-	0,05	0,01	0,91	7,20
Formulación 4	0,50	0,68	13,80	0,05	0,01	0,12	7,20
Formulación 5	0,05	-	-	0,05	0,01	0,92	5,30
Formulación 6	0,50	-	13,80	0,05	0,01	0,22	5,30
Formulación 7	0,05	0,68	-	0,05	0,01	0,91	5,30
Formulación 8	0,50	0,68	13,80	0,05	0,01	0,12	5,30

De cada formulación a pH 7,2, se prepararon tres lotes diferentes para cada temperatura ensayada (30, 40 y 50 °C) y fueron conservados en estufa (Indelab IDL-AI80), manteniendo estables las condiciones de humedad relativa (17 \pm 5 %) durante todo el ensayo. Cada toma de muestra de los lotes mencionados se realizará por duplicado. Estos valores serán procesados y representados con su desviación estándar y su coeficiente de variación.

Una vez establecido el orden de reacción y la energía de activación para la reacción de hidrólisis de ACZ, en una segunda etapa se estudió la influencia que puede ejercer otra variable como es el pH en la degradación de ACZ, así como la influencia de la CD sobre los diferentes parámetros de degradación bajo estudio. Al igual que en los ensayos del bloque anterior, se trabajó sobre tres lotes de cada formulación, pero bajo una sola condición de estrés (40 °C). La conservación de las muestras y el tratamiento matemático de los datos obtenidos se realizaron de forma análoga al bloque de ensayos anterior.

Condiciones del ensayo

Las variables a controlar dentro del diseño de este estudio se establecieron según norma ICH Q1A(R2) (ICH, 2018):

- Temperatura: se trabajó a 3 temperaturas constantes en la estufa (30, 40 y 50 °C), aunque siguiendo las pautas marcadas por la ICH se decidirá una de ellas (40 °C) para el desarrollo completo del ensayo.
- Humedad: de acuerdo con la norma Q1A(R2) se trabajó a una humedad relativa en la estufa inferior al 25 %.
- Se usaron viales topacio para evitar la posible fotodegradación de ACZ (Valencia et al., 2013).

Frecuencia de muestreo

La frecuencia de muestro siguió un calendario preestablecido de 6 meses, tal y como está establecido en las normas ICH. Sin embargo, debido a los resultados obtenidos, el máximo de días de muestreo alcanzado fue de 180. Los puntos seleccionados para la representación

gráfica de los resultados obtenidos siguieron una misma secuencia, siendo esta de 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 15 días para todos los ensayos.

Cálculo de la constante de degradación

Las constantes de degradación de ACZ se calcularon a partir de la pendiente obtenida tras la regresión lineal de los datos experimentales.

Parámetros de degradación

Existen dos parámetros fundamentales para valorar la estabilidad de una formulación farmacéutica:

- **Período de validez:** valor que marca el límite de tiempo en el que el medicamento conserva su potencia en los intervalos legalmente establecidos. Para establecer la fecha de caducidad de una formulación es fundamental conocer este periodo de tiempo. Se calcula mediante la expresión t_{90} que corresponde con la degradación del 10 % de la cantidad de fármaco inicial (ICH Q1A, 2019).

La ecuación matemática que se emplea para el cálculo del periodo de validez varía según el tipo de cinética que siga el proceso de degradación:

Orden cero	Primer orden	Segundo orden
$t_{90} = \frac{0,1 \cdot Q_0}{k}$	$t_{90} = \frac{0,105}{k}$	$t_{90} = \frac{0,111}{Q_0 \cdot k}$

Siendo Q_0 la cantidad inicial o cantidad real de fármaco en el medicamento al inicio del ensayo y k la constante de degradación (calculada a 25 °C).

- **Semivida de degradación:** se define como el tiempo necesario para que la cantidad de fármaco estudiado disminuya hasta el 50 % (Abdel-Hay et al., 2019). Dependiendo del tipo de cinética de degradación, se puede calcular mediante las siguientes ecuaciones:

Orden cero	Primer orden	Segundo orden
$t_{50} = \frac{0,5 \cdot Q_0}{k}$	$t_{50} = \frac{\ln 2}{k}$	$t_{50} = \frac{1}{Q_0 \cdot k}$

3.2.4.3. Permeación

Los estudios de permeación se llevaron a cabo utilizando celdas de difusión de Franz dispuestas en un equipo de permeación (SES EmbH Analyssysteme, Alemania). Cada celda de Franz presenta un compartimento receptor y un compartimento donador, ambos separados por un disco que actúa como un filtro de membrana de Poliétersulfona. A este disco, se le adicionaron 220 µl de una solución de gelatina al 12 % p/v con el fin de recrear las condiciones de las proteínas de la córnea (Lee et al., 2004).

En el compartimento donador, se colocaron 2 ml de la muestra bajo estudio (según la formulación seleccionada), y en el compartimento receptor, que está en constante agitación (500 rpm), se adicionaron 15 ml de la solución receptora. La temperatura de las celdas se mantuvo a

37 °C con ayuda de un baño de agua termostatzado (Baena et al., 2011). La superficie de la membrana expuesta al proceso de permeación en las celdas de Franz utilizada es de 3,14 cm².

Existen diversas posibilidades en cuanto al periodo de tiempo de evaluación de los ensayos. Así, dependiendo del tipo de formulación, algunos autores lo hacen tan solo durante dos horas (Tártara et al., 2012; Manchanda et al., 2016; Zimmerman et al., 1984), mientras que otros como nosotros (Loftsson y Brewster, 2011; Tan et al., 2017; Attama et al., 2009), los prolongan hasta 6 horas. Para realizar el ensayo, se tomaron muestras de 0,5 ml del compartimiento receptor a intervalos de tiempo predeterminados de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 h (Abul Kalam et al., 2013; Kaur et al., 2004; Rodríguez et al., 2017).

La extracción de cada alícuota se realizó cuidadosamente para no generar burbujas en el medio, reponiendo inmediatamente el volumen con el mismo medio existente en el compartimiento receptor. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y las muestras obtenidas fueron filtradas previo a su análisis mediante HPLC.

En el compartimiento receptor de la celda de Franz se intentó recrear una solución de fluido lagrimal artificial:

- NaHCO₃ 0,218 % p/p
- NaCl 0,678 % p/p
- CaCl₂·2H₂O 0,0084 % p/p
- KCl 0,138 % p/p

Para evitar la saturación de ACZ en el compartimiento receptor y su posible influencia en la difusión del fármaco a través de la membrana, a

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

los 15 ml de la solución receptora se le adicionaron 0,75 g de HP- β -CD como agente complejante. De esta manera se pudo controlar la concentración de ACZ permeada, evitando la precipitación del fármaco en el compartimento receptor.

Para los ensayos planteados se elaboraron hasta 6 tipos de formulaciones diferentes siguiendo el modelo de las presentadas en la tabla 14, las cuales se corresponden con aquellas que presentaban un pH de 5,3 (formulaciones 5, 6 y 8) junto con aquellas a pH 7,2 que contenían el fármaco libre y complejado (formulaciones 1, 2 y 4).

***Tabla 14.-** Formulaciones ensayadas a diferentes pH en % p/v.*

	ACZ	TIM	HP- β -CD	EDTA	CB	NaCl	pH
Formulación 1	0,05	-	-	0,05	0,01	0,92	7,20
Formulación 2	0,50	-	13,80	0,05	0,01	0,22	7,20
Formulación 4	0,50	0,68	13,80	0,05	0,01	0,12	7,20
Formulación 5	0,05	-	-	0,05	0,01	0,92	5,30
Formulación 6	0,50	-	13,80	0,05	0,01	0,22	5,30
Formulación 8	0,50	0,68	13,80	0,05	0,01	0,12	5,30

Parámetros de permeación

Los parámetros calculados para comparar todos los perfiles de permeación fueron los siguientes:

- **Flujo (J):** cantidad de fármaco que atraviesa la membrana corneal por unidad de tiempo. El flujo a través de las

membranas se calcula en base diversos modelos matemáticos, como pueden ser la ley de Darcy (Permeabilidad) y la ley de Fick (Difusión). En nuestro modelo, el flujo se obtendrá a partir de la pendiente de la curva que representa la cantidad de fármaco permeado durante nuestro ensayo.

- **Flujo en estado estacionario (J_{ss}):** cantidad de fármaco permeado por unidad de superficie y unidad de tiempo. Se calcula a partir del cociente entre la cantidad de fármaco permeado por unidad de área, usando la parte lineal de las curvas (estado estacionario) y el tiempo necesario para alcanzarla, según viene definido por siguiente relación (Attama et al., 2008):

$$J_{ss} = \frac{dQ}{A \cdot dt}$$

Donde dQ indica la cantidad de fármaco permeada (mg) en un intervalo de tiempo (dt) y A es el área de difusión en cm^2 . Representadas gráficamente podríamos obtener J mediante su extrapolación en el gráfico.

- **Coefficiente de permeabilidad (P):** se define como la relación entre el flujo en estado estacionario y la concentración de partida en el compartimento donador, sus unidades son $cm \cdot s^{-1}$ y se calcula según la siguiente ecuación (Suhonen et al., 1991):

$$P = \frac{J_{ss}}{C_0}$$

Donde C_0 es la concentración de fármaco en el medio donador en $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$.

3.2.4.4. Análisis estadístico

A partir de los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad y permeación de nuestras formulaciones, se llevaron a cabo una serie de análisis estadísticos elaborados mediante el Programa SPSS® versión 15.0 (George y Mallery, 2019).

Algunos de los procedimientos para comparación de medias (ANOVA, t de student), asumen el supuesto de homogeneidad de varianzas (homocedasticidad). Dicho supuesto considera que la varianza es constante (no varía) en los diferentes niveles de un factor, es decir, entre diferentes grupos (Rodríguez Vignoli, 2001; Amat, 2016). Una de las herramientas que permiten verificar este supuesto es la prueba de Levene (Nordstokke y Zumbo, 2010). En ella, se pone a prueba la hipótesis nula de que las varianzas de las medias son iguales, así si el valor de P resultante de la prueba de Levene es inferior a un cierto nivel de significación (normalmente 0,05), es poco probable que las diferencias obtenidas en las variaciones se hayan producido de forma casual, por lo que la hipótesis nula se rechaza y se concluye que no hay igualdad de varianzas. En nuestro caso, se asumirá la igualdad de varianzas para todos los resultados sometidos a estudio, ya que el valor obtenido en esta prueba es superior a 0,05 en todos los supuestos.

Según Hernández, Fernández y Baptista (Sampieri 2018) la prueba "**t** de Student" "es una prueba estadística para evaluar si dos grupos difieren entre sí de manera significativa respecto a sus medias".

Esta prueba, es un tipo de estadística deductiva (asumimos que las variables dependientes tienen una distribución normal). Una distribución normal tiene características matemáticas especiales que la hacen la base de la mayoría de los test estadísticos, su fundamento radica en el Teorema del Límite Central, tal y como cita Maurandi-López en su artículo (Maurandi-López et al., 2019). Este teorema afirma que *“si las muestras son suficientemente grandes, la distribución de las medias seguirá una distribución normal con la misma media que la distribución original”*.

En nuestro caso, esto se podría resumir como que, dada una población con una distribución cualquiera, es posible obtener aleatoriamente varias muestras de esta, calcular sus medias y construir un histograma de la distribución de frecuencias de las medias. Esta distribución de medias sigue una distribución “normal”, la cual no presentará diferencias frente a una distribución normal con esa media y esa desviación estándar.

Para garantizar la fiabilidad de nuestro estudio estadístico, es necesario que todas nuestras analizadas sigan una distribución “normal”. Debido a la pequeña cantidad de muestras analíticas para este procedimiento ($n < 50$), la técnica utilizada para el análisis de la normalidad fue la prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965)

Conceptualmente, el valor de **t** representa el número de unidades estándares que están separando las medias de los dos grupos, y se define para muestras independientes con igualdad de varianzas (ecuación A) o con diferentes varianzas (ecuación B).

Ecuación A	Ecuación B
$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{X_1-X_2} \cdot \sqrt{\frac{2}{n}}}$	$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{\bar{X}_1-\bar{X}_2}}$
$S_{X_1X_2} = \sqrt{\frac{1}{2} \cdot (S_{X_1}^2 + S_{X_2}^2)}$	$S_{\bar{X}_1-\bar{X}_2} = \sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}$

Una vez calculados los valores de t de Student, será el valor de **P (Probabilidad)** el que permitirá dar respuesta a la hipótesis planteada. El valor P representa una probabilidad que oscila entre el 0 y el 1. Si p es pequeño, podemos concluir que la diferencia entre muestras “probablemente” no es debida al azar y concluiríamos que tienen distintas medias (Maurandi-López et al., 2019).

Visto de otro modo, los estadísticos hablan de hipótesis nula, la cual afirma que “no hay diferencia entre las medias”. Por lo tanto, podemos definir el valor p como la probabilidad de observar una diferencia tan grande o mayor que la observada si la hipótesis nula fuera cierta. Se dice que rechazamos la hipótesis nula si el valor p es inferior a 0,05 (para un nivel de significancia $\alpha=0,05$), con lo cual la diferencia es estadísticamente significativa (Frick, 1995; Ferrer et al., 2011; Sampieri 2018; George y Mallery, 2019; Diaz-Valle et al., 2012; Montés-Micó et al., 2010).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ELECCIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA FORMULACIÓN

Nuestra formulación está constituida inicialmente por ACZ, TIM y agua Milli-Q®. En este apartado vamos a estudiar y justificar el resto de los excipientes que emplearemos.

4.1.1. HP- β -CD

Como ya se comentó en el apartado de introducción, la baja solubilidad acuosa de ACZ, implica la necesidad de mejorarla a la hora de realizar una formulación oftálmica tipo solución. Para ello, en base a los datos bibliográficos, hemos optado por la complejación con CDs, y más en concreto con HP- β -CD.

4.1.1.1. Determinación de la constante de complejación

4.1.1.1.1. Estudios de solubilidad

El primer aspecto a estudiar fue la influencia de la CD en la solubilidad de la ACZ, para lo cual realizamos el correspondiente diagrama de solubilidad (figura 17). Los resultados mostraron una relación lineal entre ambas concentraciones, al menos en el intervalo seleccionado para el ensayo, lo que se corresponde con un diagrama de tipo A_L de Higuchi de estequiometría 1:1. En este tipo de casos, no se observa un límite de solubilidad aparente en el complejo, algo que es también posible apreciar en otros muchos artículos presentes en la bibliografía consultada (Pérez-Barrales et al., 1995; Loftsson et al., 1994; Cappello et al., 2001; Challa et al., 2005).

CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN

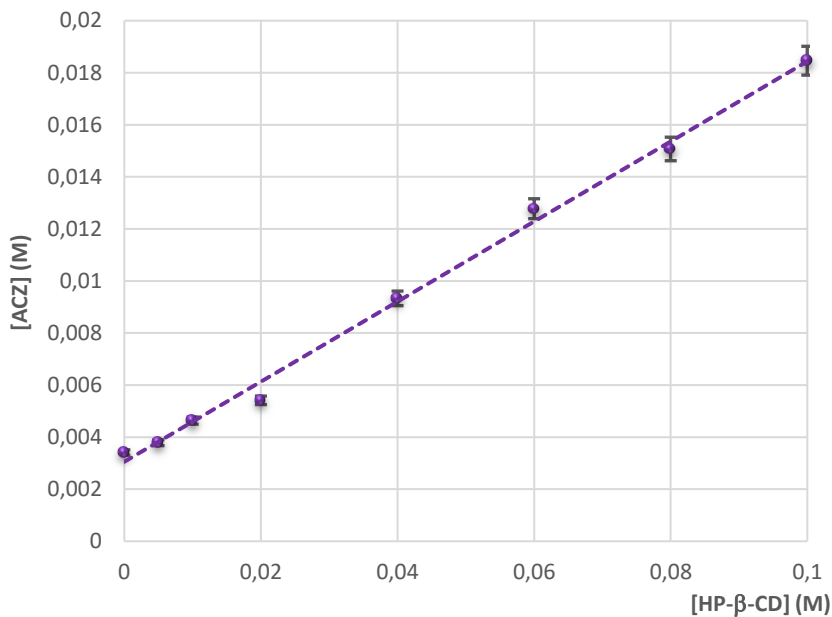


Figura 17.- Diagrama de solubilidad de ACZ en presencia de HP- β -CD.

Como se recoge en la tabla 15, la K_c , E_s (a 0,1 M en HP- β -CD) y E_c obtenidas, fueron del mismo orden de magnitud, y muestran un valor intermedio respecto a las obtenidas por otros autores. Las leves diferencias pueden atribuirse a posibles variaciones en las condiciones experimentales, en especial la temperatura, parámetro de difícil control en este tipo de ensayos.

Tabla 15.- Tipo de complejo, constante de estabilidad, eficacia solubilizante y eficacia de complejación para diferentes autores en agua.

Autores	Tipo de complejo	$K_{1:1}$ (M^{-1})	E_s	E_c
Loftsson et al., 2005	(1:1)	85,00	6,84	0,25
Granero et al., 2008	(1:1)	66,67	6,08	0,24
Valor obtenido	(1:1)	58,63\pm1,76	5,96\pm0,18	0,18\pm0,01
Arroyo-García, 2021	(1:1)	54,80	5,60	0,19
Pérez-Barrales et al., 1995	(1:1)	24,64	5,30	0,09

Los resultados muestran en cuanto a la E_s , que la presencia de HP- β -CD a una concentración 0,1 M, llega a quintuplicar la solubilidad inicial de ACZ en solución acuosa, y respecto a la E_c , que una de cada 6,6 moléculas de CD forma complejo con el fármaco.

4.1.1.1.2. Método de Benesi-Hildebrand

En este apartado, abordaremos el estudio del proceso de complejación mediante espectrofotometría ultravioleta visible. En la Figura 18 se recogen los espectros UV-VIS de ACZ frente a concentraciones crecientes de CD, manteniéndose constante la concentración de huésped. Los resultados muestran una leve disminución de la absorbancia de ACZ, sin desplazamientos en el máximo de absorción,

indicando de esta forma la interacción en medio líquido entre ambas especies.

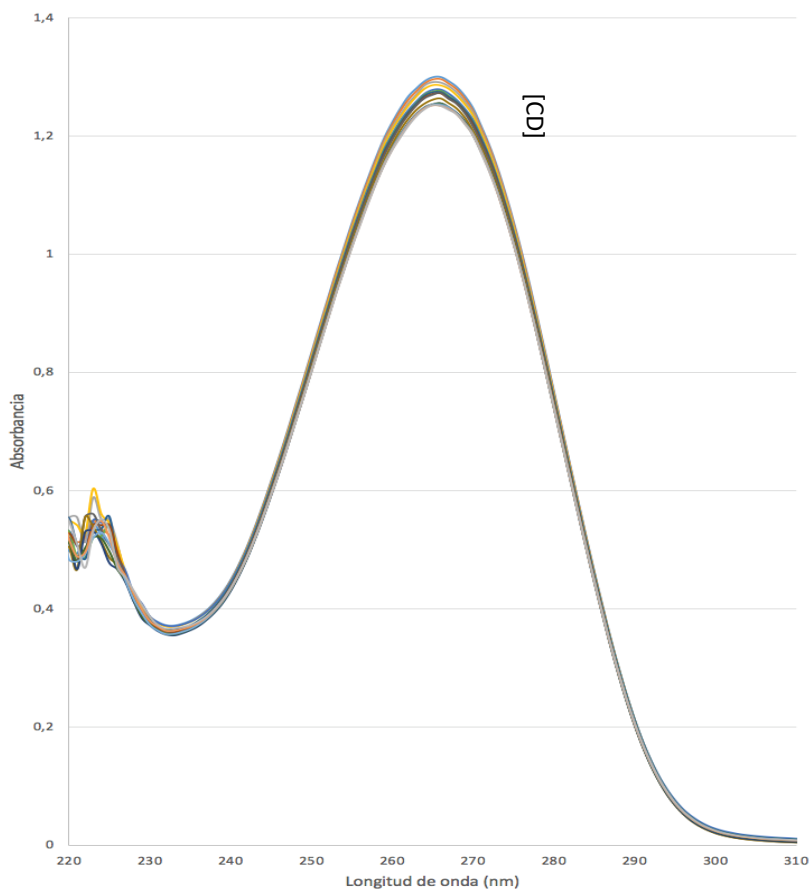


Figura 18.- Espectros UV-VIS de ACZ frente a concentraciones crecientes de HP- β -CD.

En la Figura 19, se representa la inversa del incremento de absorbancia de ACZ a 265 nm frente al recíproco de la concentración de CD. Tras regresión lineal, se procedió al cálculo de la constante de estabilidad tal y como viene descrito en la sección de Material y métodos, obteniéndose un valor de 545 M^{-1} , sensiblemente más alto que el obtenido a través de los estudios de solubilidad de fases, $58,63 \text{ M}^{-1}$. Esta

diferencia de valores también ha sido recogida por otros autores (Alvarez-Parrilla et al., 2005; Tønnesen et al., 2002; o Cirri et al., 2005), los cuales justifican este hecho debido a la baja solubilidad y concentración utilizada de principio activo o a las diferentes condiciones experimentales propuestas para cada ensayo, confirmando la influencia que pueden llegar a tener cualquier tipo de factores en la determinación de la constante de estabilidad (algo que también es extrapolable a nuestro caso).

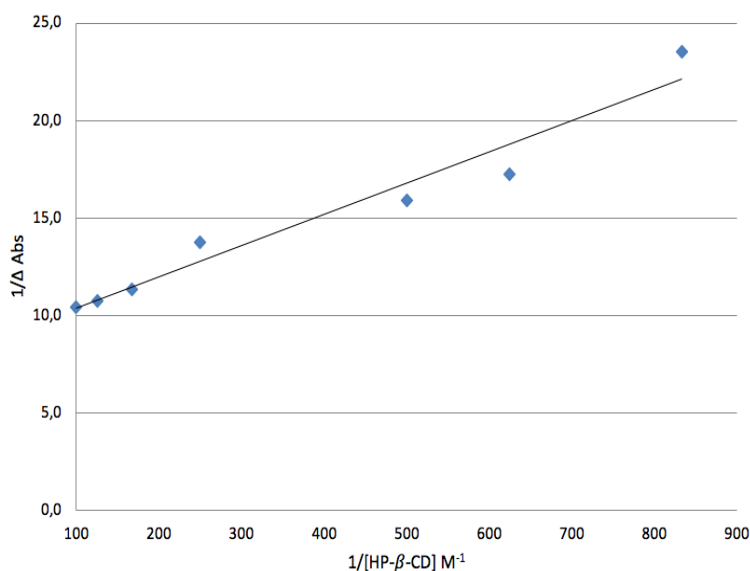


Figura 19.- Representación de la gráfica de Benesi-Hildebrand para el sistema ACZ/HP- β -CD (1:1).

4.1.1.2. Caracterización estructural del complejo ACZ/HP- β -CD

Aunque como ya hemos comentado, existen numerosos investigadores que han estudiado la constante de complejación del sistema ACZ/HP- β -CD, respecto a los aspectos estructurales del complejo no hemos encontrado referencia alguna en la bibliografía. Estos aspectos, serán

abordados en profundidad en los dos siguientes subapartados de la memoria, mediante los estudios de RMN y modelización molecular.

4.1.1.2.1. Resonancia Magnética Nuclear

En la Figura 20 se recogen la asignación de protones de ACZ y HP- β -CD, mientras que la Figura 21 recoge los espectros de ^1H RMN correspondientes a HP- β -CD, el sistema binario ACZ/HP- β -CD (1:1) y ACZ. Por su parte, en la tabla 16 se recogen las señales de los protones del hospedador y el huésped en forma libre, así como las modificaciones o desplazamientos registrados correspondientes al complejo ACZ/HP- β -CD.

Debido a la estructura de ACZ, los únicos protones del huésped que puede someterse a evaluación son los del grupo acetamida (resaltados en amarillo), cuya señal singlete se sitúa a 2,253 ppm respecto a la referencia (TMS).

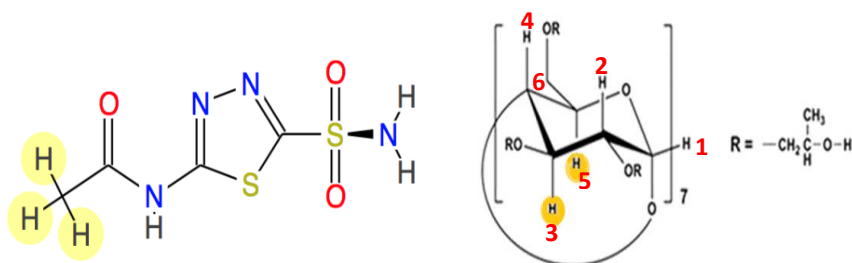


Figura 20.- Estructura y asignación de protones para ACZ y HP- β -CD.

Tabla 16.- Desplazamientos químicos (en ppm) de las señales de ACZ y HP- β -CD libres y para el complejo 1:1.

		δ_{libre}	$\delta_{\text{complejado}}$	$\Delta\delta$ (ppm)
HP-β-CD	H₁	5,003	5,007	0,004
	H₂	3,397	3,393	-0,005
	H₃	3,931	3,954	0,023
	H₄	3,541	3,544	0,003
	H₆	3,792	3,789	-0,003
ACZ	-CH₃	2,253	2,239	-0,014

Como ya es bien sabido, las variaciones sobre las señales de los protones localizados en la cavidad de la CD (H₃, H₅ y en menor medida H₆) se asocian a la presencia de un huésped en dicha cavidad. En nuestro caso, las variaciones registradas de las señales son de baja magnitud, siendo las que sufren mayor modificación en el espectro del complejo las correspondientes al protón H₃ de la CD (desplazamiento a campo bajo), junto con los protones del grupo acetamida de ACZ. Ello es indicativo de una débil interacción en medio líquido entre ACZ e HP- β -CD, lo cual se halla en consonancia con los datos de polaridad de ACZ, logP=-0,26 (Remko y von der Lieth, 2004; Machatha y Yalkowsky, 2005). En cuanto a la señal del protón H₅, no se pudo observar con la resolución deseable en los espectros realizados a 300 MHz.

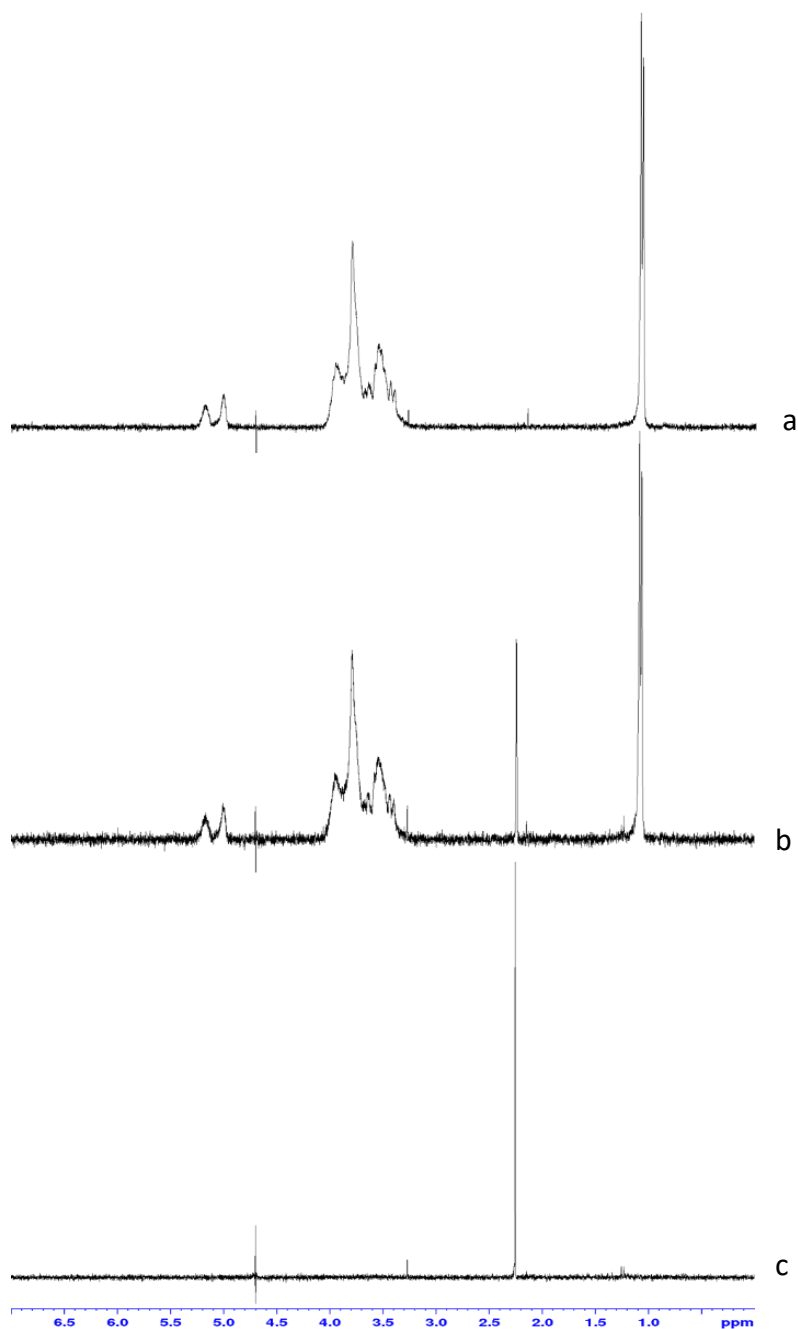


Figura 21.- Espectros ^1H RMN a 300 MHz: a) HP- β -CD; b) sistema binario ACZ/HP- β -CD (1:1) y c) ACZ.

Con el objeto de confirmar la presencia de complejos de inclusión en solución, así como para obtener información adicional sobre la geometría del complejo formado, se realizó un estudio de espectros RMN bidimensional ROESY, el cual aparece representado en la Figura 22.

En dicho espectro se puede observar una débil señal cruzada (*crosspeak*) entre los protones H₃ del anillo interno de la CD y los protones de ACZ. Dicha señal indica la presencia de un efecto NOE (*Nuclear Overhauser Effect*) entre ambos protones, confirmando la proximidad de estos a una distancia de entre 2 y 5 Å, y confirmando la interacción de ACZ y HP- β -CD en medio líquido. El carácter débil de dicha señal se halla correlacionado con el bajo valor de constante de estabilidad obtenido a través de los estudios de solubilidad de fases. Estos resultados se hallan en consonancia con otros previamente reportados en la literatura (Palma et al., 2009). Por otra parte, esa señal débil también puede indicar que la porción de la molécula de ACZ a la que pertenece dicho grupo no se encuentre completamente orientada hacia la cavidad, o bien la presencia o coexistencia de diferentes modos de complejación entre ACZ y HP- β -CD.

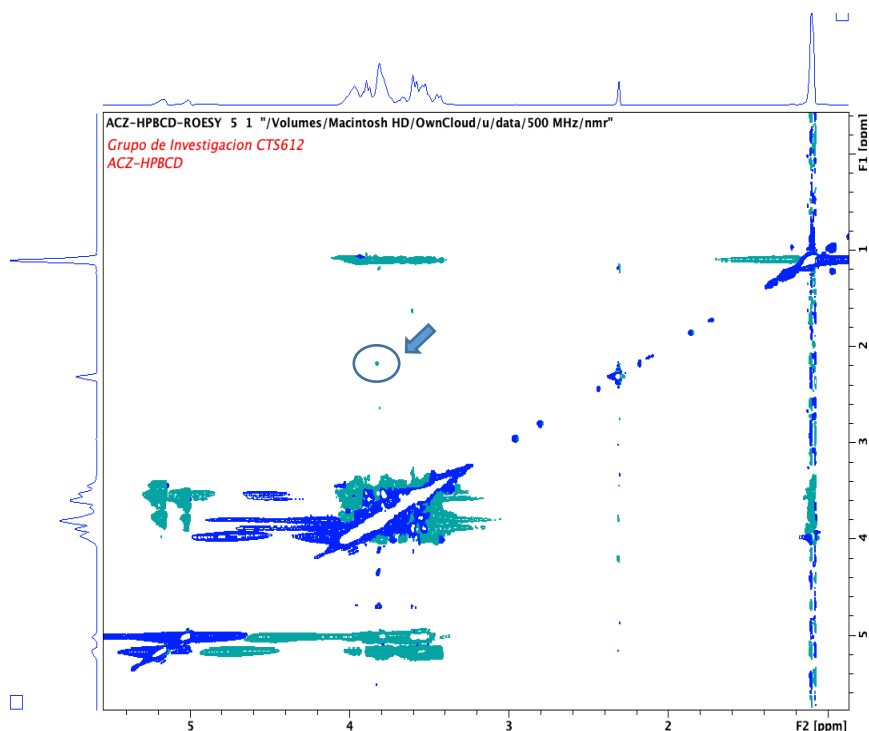


Figura 22.- Espectro 2D-ROESY correspondiente al sistema ACZ/HP- β -CD (1:1). Dentro del círculo resaltado aparece la señal cruzada entre H₃ y los protones del grupo acetamida de ACZ.

4.1.1.2.2. Modelización molecular

Con el objetivo de obtener datos sobre la posible geometría del complejo formado en solución entre ACZ e HP- β -CD se realizaron los correspondientes estudios de modelización molecular. A continuación, se representan los resultados más relevantes de la minimización energética realizada para las dos orientaciones posibles, A y B.

Los resultados obtenidos tras refinado por algoritmo PM3 presentaron una serie de errores en la minimización, pues el doble tratamiento (MM+ seguido de optimización PM3) reveló que no permitía partir de la

estructura de mínima energía global para la HP- β -CD y, por tanto, los resultados obtenidos no podrían darse como válidos. Por otra parte, basándonos en la experiencia de varios autores, los cuales consideran el uso de algoritmos de mecánica molecular suficiente para explicar la formación de complejos de inclusión con CDs (Dodziuk, 2006; Lipkowitz, 1998; Morillo et al., 2012; Schlick, 2010), decidimos tomar en consideración exclusivamente los resultados basados en MM+.

Las Figuras 23 y 24 recogen las gráficas de energía de complejo y de Van der Waals para las minimizaciones por MM+ a diferentes coordenadas. Se observa, para la orientación A, un mínimo de energía sobre la simulación del complejo situada a +9 Å, mientras que, para la orientación tipo B, el estado de mínima energía se registró en la minimización realizada a -3 Å. Otro hecho destacable son las tendencias paralelas que presentan las energías de los complejos con las correspondientes energías de Van der Waals, indicando que dichas fuerzas pueden contribuir de forma significativa a la interacción fármaco-CD.

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

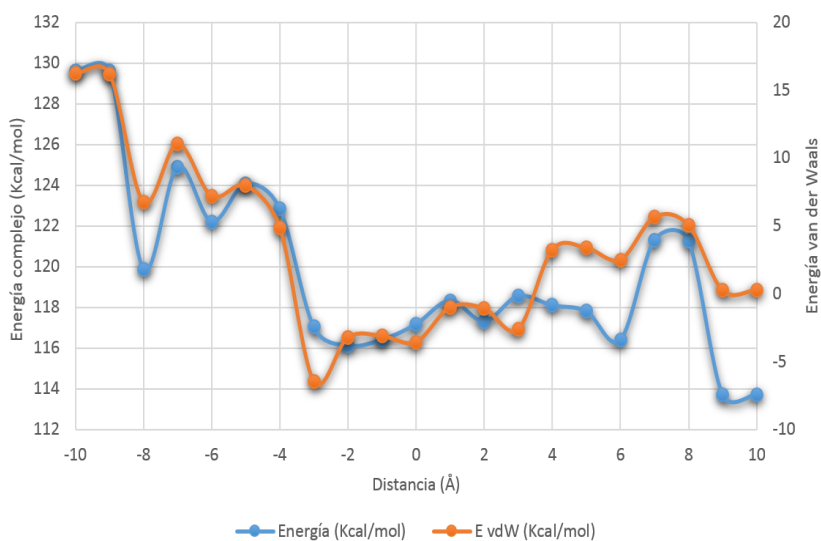


Figura 23.- Resultado de la minimización energética por MM+ para el complejo 1:1 en orientación A.

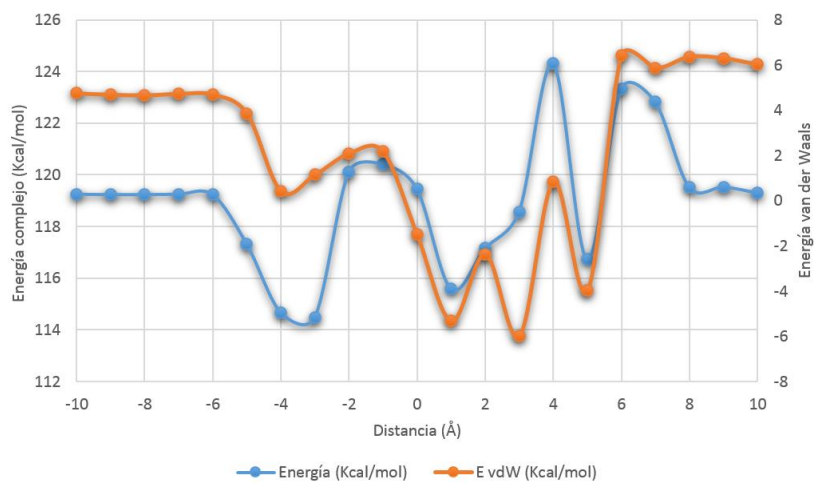


Figura 24.- Resultado de la minimización energética por MM+ para el complejo 1:1 en orientación B.

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP-β-CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

En la tabla 17 se recogen los resultados de energía potencial superficial (SEP) expresados en Kcal/mol de los complejos de inclusión de la CD para las conformaciones más estables. Donde, tal y como han sido expresados en la bibliografía consultada (Barbiric et al., 2000; Leila et al., 2011):

- $\Delta E_{\text{complejación}} = E_{\text{complejo}} - (E_{\text{CD libre}} + E_{\text{huésped libre}})$
- $\Delta E_{\text{interacción}} = E_{\text{complejo}} - (E_{\text{CD en el complejo}} + E_{\text{huésped en el complejo}})$
- $\Delta E_{\text{deformación CD}} = E_{\text{CD en el complejo}} - E_{\text{CD libre}}$

Tal y como se puede apreciar en dicha tabla, las variaciones de las energías de complejación e interacción fueron de signo negativo, indicando una interacción favorable entre ACZ e HP-β-CD. Asimismo, destacan las bajas energías de deformación registradas para la HP-β-CD, lo cual indica un balance energético favorable en la interacción con ACZ (Leila et al., 2011).

Tabla 17.- Energías de los complejos ACZ/HP-β-CD tras simulación MM+. Todas las energías están expresadas en Kcal/mol.

	E	E ACZ en complejo	E CD en complejo	ΔE Complejación	ΔE Interacción	ΔE Deformación
ACZ/HP-β-CD (A)	113,72	52,38	82,32	-11,44	-20,98	0,54
ACZ/HP-β-CD (B)	114,48	52,15	82,44	-10,68	-20,10	0,66
ACZ (libre)	43,38					
HP-β-CD (libre)	81,78					

Observando la magnitud de los cambios de energía, el balance es levemente favorable para la conformación correspondiente a la orientación A. Sin embargo, ello no descarta, dado el pequeño salto energético, la coexistencia de varias conformaciones o modos de complejación entre ACZ e HP- β -CD.

En la Figura 25, mostramos las conformaciones más estables correspondientes a las orientaciones A y B del complejo ACZ/HP- β -CD.

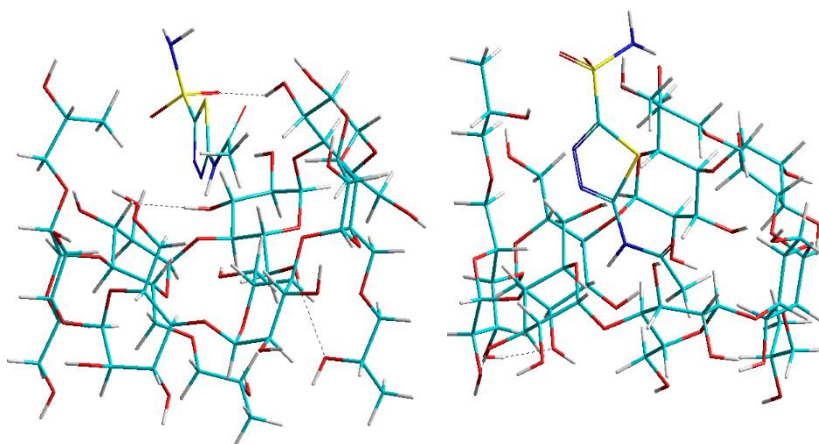


Figura 25.- Conformaciones del complejo en orientación A (izquierda) y orientación B (derecha).

En la conformación A, se observó que la interacción de ACZ tiene lugar principalmente en la zona externa de la cavidad de la CD. Este hecho es achacable a la polaridad de la molécula y por consiguiente a su baja tendencia a la interacción con la cavidad apolar de la CD. En nuestros cálculos, dicha conformación aparece estabilizada por medio de la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares.

Por su parte, en la conformación B se aprecia claramente la penetración de la molécula de ACZ en el interior de la cavidad de la CD, con los

grupos acetamida y tiadiazol en las cercanías de los protones internos (H_3 y H_5), siendo esta una de las estructuras más probables del complejo ACZ/HP- β -CD. La presencia de los grupos acetamida y tiadiazol en la cavidad estarían en consonancia con el desplazamiento a campos bajos (desapantallamiento) de la señal del protón H_3 de la CD.

Ambas conformaciones son muy cercanas en energía, lo que sugiere la presencia de varios modos de interacción entre ACZ y la CD en condiciones de intercambio rápido, lo que explicaría la leve interacción detectada por RMN.

En conclusión, los estudios de modelización molecular confirman la débil interacción de ACZ con HP- β -CD, en línea con los resultados de los estudios de solubilidad de fases y RMN.

4.1.2. Reguladores del pH

La elección del pH más adecuado para formular un medicamento tipo solución, suele ser un equilibrio entre el pH fisiológico de la zona de administración, y aquel que proporciona unas adecuadas condiciones para la solubilización y estabilidad del fármaco.

En nuestra formulación, también tendremos que evaluar su posible influencia en el proceso de complejación con la CD, por lo que se ha procedido a realizar los correspondientes diagramas de solubilidad en los diferentes tampones seleccionados (figura 26), ajustados a pH 7,2.

Aunque no existen grandes diferencias entre ellos, es el cítrico/fosfato el que conduce a los mejores resultados de K_c , E_s y E_c (tabla 18), lo que, unido a su amplio intervalo de actuación, ha hecho que sea el tampón de elección.

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
 APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

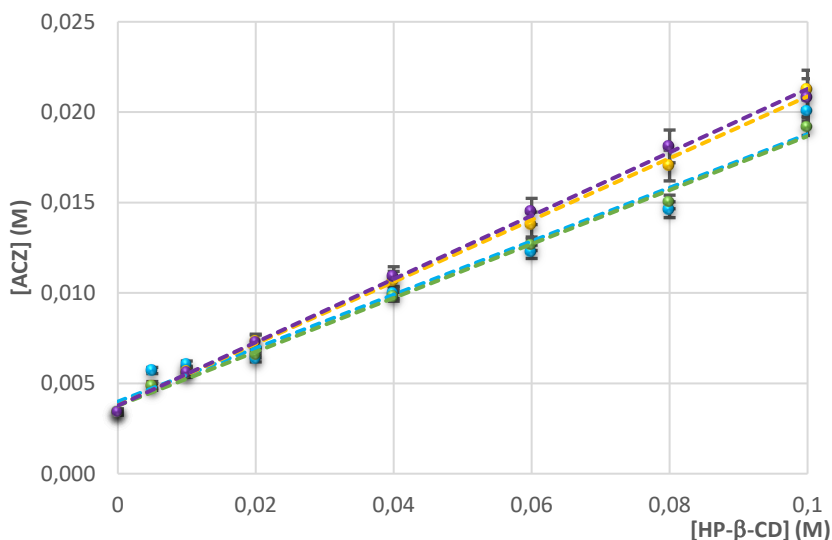


Figura 26.- Diagrama de solubilidad de ACZ/HP- β -CD en los diferentes tampones utilizados: (●) Cítrico/fosfato 7,2 (●) Sörensen (●) Hepes (●) Tris.

Tabla 18.- Parámetros del proceso de complejación ACZ/HP- β -CD en los diferentes tampones ensayados a pH 7,2. $K_{1:1}$ (Constante de estabilidad), E_s (eficacia solubilizante), E_c (eficacia de complejación), S_0 (concentración inicial) y r^2 (coeficiente de determinación).

Tampón	$K_{1:1}$ (M^{-1})	E_s	E_c	S_0 (mM)	r^2
Tris	43,39	5,02	0,17	3,98	0,9749
	$\pm 1,30$	$\pm 0,15$	$\pm 0,01$	$\pm 0,11$	
Hepes	46,11	5,05	0,18	3,76	0,9951
	$\pm 1,38$	$\pm 0,14$	$\pm 0,01$	$\pm 0,12$	
Sörensen	54,28	5,59	0,20	3,77	0,9978
	$\pm 1,63$	$\pm 0,17$	$\pm 0,02$	$\pm 0,11$	
Agua Milli-Q®	58,63	5,96	0,18	3,06	0,9957
	$\pm 1,76$	$\pm 0,18$	$\pm 0,01$	$\pm 0,09$	
Cítrico/fosfato (7,2)	59,37	5,63	0,22	3,67	0,9925
	$\pm 1,78$	$\pm 0,18$	$\pm 0,01$	$\pm 0,11$	

4.1.3. Otros solubilizantes

Aunque es muy frecuente combinar más de una estrategia para aumentar la solubilidad de un fármaco, en el caso de sistemas ternarios en los que uno de los componentes es una CD, la correcta elección del coadyuvante es crítica, pues hay que contemplar la posibilidad de que éste tenga afinidad por la cavidad de la CD, y por tanto limite la complejación de la molécula activa. Así, junto a autores como Fridriksdóttir o Jansook (Fridriksdóttir et al., 1997; Jansook et al., 2010), que al utilizar un sistema ternario logran una mejora efectiva en la solubilización, otros obtienen el efecto inverso.

En nuestro caso, diseñamos un nuevo ensayo de solubilidad a pH 7,2, en el que se incorporó a la formulación base (ACZ + HP- β -CD) tres excipientes de uso común en formas oftálmicas, un cosolvente (Transcutol®P) y dos tensioactivos (Tween®80, y Cremophor®EL), con una contrastada capacidad solubilizante frente a la ACZ (Morsi et al., 2014), a diferentes concentraciones (tabla 19). En el caso de los tensioactivos, dichas concentraciones siempre serán superiores a su concentración micelar crítica (CMC), 0,0131 y 0,0098 % p/v respectivamente (xi et al., 2009; Akhtar et al., 2017; Chou et al., 2005).

Los resultados, muestran que la adición de los solubilizantes seleccionados, no producen el efecto deseado, al contrario, disminuyen la solubilidad del fármaco. Dado que en la bibliografía aparece recogido el efecto solubilizante que estas moléculas de forma aislada ejercen sobre la ACZ, hemos de interpretar estos resultados en base a que su incorporación dificulta el proceso de complejación de ACZ en la cavidad de la CD.

Tabla 19.- *Parámetros del proceso de complejación, obtenidos a partir de los diagramas de solubilidad en presencia de varios solubilizantes a diferentes concentraciones.*

	$K_{1:1}$ (M^{-1})	E_s	E_c	S_0 (mM)	r^2
Tween®80	43,28	4,65	0,18	4,08	0,9977
(1,08 % p/v)	$\pm 2,16$	$\pm 0,23$	$\pm 0,01$	$\pm 0,12$	
Tween®80	38,23	4,29	0,16	4,08	0,9995
(2,16 % p/v)	$\pm 1,91$	$\pm 0,21$	$\pm 0,01$	$\pm 0,12$	
Transcutol®P	53,73	5,71	0,18	3,32	0,9955
(0,99 % p/v)	$\pm 2,69$	$\pm 0,29$	$\pm 0,01$	$\pm 0,09$	
Transcutol®P	44,66	5,02	0,16	3,61	0,9952
(1,98 % p/v)	$\pm 2,23$	$\pm 0,18$	$\pm 0,01$	$\pm 0,11$	
Cremophor®EL	52,73	5,35	0,18	3,45	0,9963
(1,05 % p/v)	$\pm 2,64$	$\pm 0,27$	$\pm 0,01$	$\pm 0,10$	
Cremophor®EL	53,62	5,51	0,18	3,40	0,9976
(2,10 % p/v)	$\pm 2,68$	$\pm 0,28$	$\pm 0,01$	$\pm 0,10$	
Sin	59,37	5,63	0,22	3,67	0,9925
tensioactivo	$\pm 1,78$	$\pm 0,18$	$\pm 0,01$	$\pm 0,11$	

Unos resultados similares obtuvieron Melo y Saokman al emplear cosolventes (como la trietanolamina, el propilenglicol o la 1-metil-2-pirrolidona) en sistemas binarios de benzonidazol y metiltestosterona con HP- β -CD respectivamente (de Melo et al., 2016; Saokham et al., 2018). En ambos casos se producía una disminución de los valores de $K_{1:1}$ en comparación con los del sistema binarios en ausencia de solubilizante. En base a estos resultados, descartamos incorporar un solubilizante complementario a nuestra formulación.

4.1.4. Antioxidantes

Los problemas de oxidación de ACZ (Valencia et al., 2013; Vargas et al., 1998) nos llevaron a incorporar un antioxidante en la formulación. Al igual que otros autores (Kaur et al., 2004; Granero y Longhi, 2010), para

minimizarlos, hemos seleccionado el ácido etilendiamintetraacético (EDTA) en forma de sal disódica.

En efecto, el EDTA es un agente quelante (Freeman y Kahook, 2009; Aguayo Bonniard et al., 2016) que posee una limitada -aunque efectiva- actividad antimicrobiana. Además, también puede utilizarse como promotor de la absorción oftálmica, característica descrita por algunos autores (Sasaki et al., 2000; Leccisotti e Islam, 2010), en base a su capacidad para alterar la estructura celular de la córnea y facilitar la absorción del fármaco en el ojo (Sasaki et al., 1995), lo cual lo hacen un candidato idóneo para nuestra formulación.

La figura 27 muestra el diagrama de solubilidad de ACZ/HP- β -CD en presencia de EDTA al 0,05 % p/v en medio tampón cítrico/fosfato a pH 7,2.

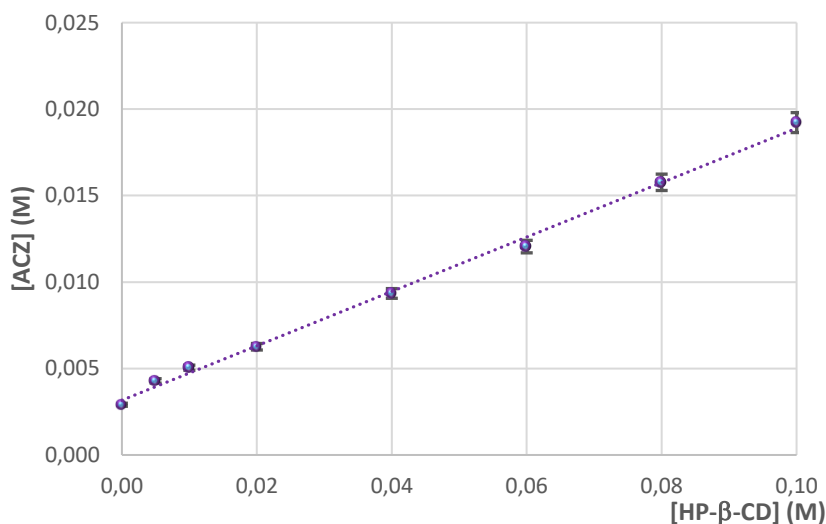


Figura 27.- Diagrama de solubilidad de ACZ en presencia de HP- β -CD y EDTA como antioxidante.

Los valores obtenidos para la $K_{1:1}$ ($58,33 \pm 1,75 \text{ mol}^{-1}$), E_s ($6,00 \pm 0,18$) e incluso E_c ($0,19 \pm 0,01$), muestran que su empleo no ejerce una influencia

destacable en el proceso de complejación (tabla 20). Esto puede explicarse debido a su estructura molecular y naturaleza iónica, lo cual dificulta sin duda su posible inclusión en la cavidad de la CD.

Tabla 20.- *Parámetros del proceso de complejación, obtenidos a partir de los diagramas de solubilidad en presencia de EDTA.*

	$K_{1:1}$ (M^{-1})	E_s	E_c	S_0 (mM)	r^2
Cítrico/fosfato (7,2) (Con EDTA)	58,33 $\pm 1,75$	6,00 $\pm 0,17$	0,19 $\pm 0,01$	3,18 $\pm 0,10$	0,9980
Cítrico/fosfato (7,2) (sin EDTA)	59,37 $\pm 1,78$	5,63 $\pm 0,18$	0,22 $\pm 0,01$	3,67 $\pm 0,11$	0,9925

4.1.5. Conservantes

La elaboración de una fórmula farmacéutica oftálmica acuosa en envase multidosis, donde es probable la contaminación bacteriana por la apertura del mismo (RFE, 2015), nos obliga a incluir en la formulación un conservante, dado que la alternativa de envasado con sistema filtrante (Abak[®]) o unidosis, supondría un gran aumento en el coste (Lambert et al., 2004; Rowe et al., 2012).

Así, tras elegir tres de los más habituales, cloruro de benzalconio, benzoato sódico y metilparabeno sódico (Nipagín[®] sódico), hemos procedido a estudiar si su empleo, puede modificar los equilibrios de complejación de ACZ. Los diagramas de solubilidad de la ACZ/HP- β -CD en presencia de estos tres conservantes se muestran en la figura 28.

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

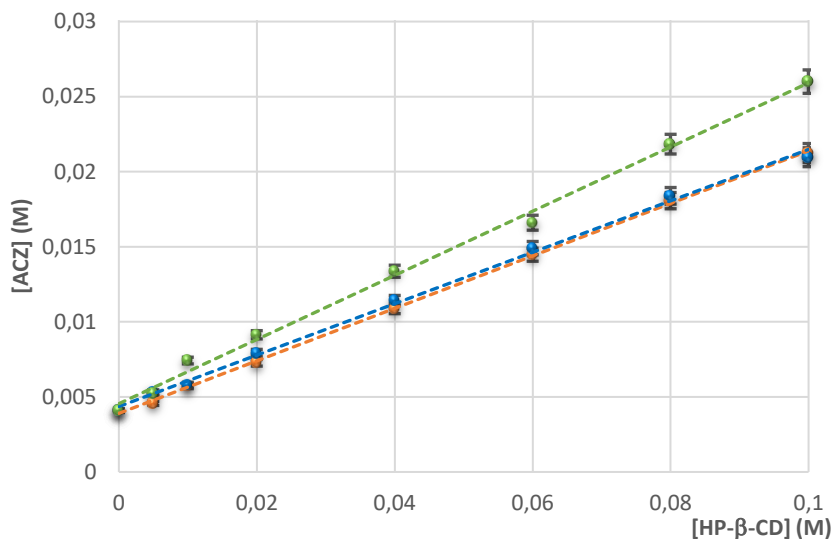


Figura 28.- Diagrama de solubilidad de ACZ/HP- β -CD en los diferentes conservantes utilizados: (●) Nipagin® sódico (●) Cloruro de benzalconio (●) Benzoato sódico.

En la tabla 21 se muestran los principales parámetros del proceso de complejación comparados con la ausencia de conservante.

Tabla 21.- Parámetros del proceso de complejación, obtenidos a partir de los diagramas de solubilidad para los conservantes utilizados.

	$K_{1:1}$ (M^{-1})	E_s	E_c	S_0 (mM)	r^2
Benzoato sódico	46,98 $\pm 1,41$	4,76 $\pm 0,14$	0,20 $\pm 0,01$	4,36 $\pm 0,13$	0,9976
Cloruro de benzalconio	54,35 $\pm 1,63$	5,45 $\pm 0,16$	0,21 $\pm 0,01$	3,90 $\pm 0,12$	0,9995
Ausencia de conservante	59,37 $\pm 1,78$	5,63 $\pm 0,18$	0,22 $\pm 0,01$	3,67 $\pm 0,11$	0,9925
Nipagin® sódico	60,40 $\pm 1,79$	5,78 $\pm 0,17$	0,27 $\pm 0,02$	4,55 $\pm 0,14$	0,9962

Los resultados obtenidos pueden explicarse en base a la estructura química de estos compuestos. En efecto, el benzoato sódico y el cloruro de benzalconio presentan un anillo bencénico con un solo radical, fácilmente complejable en la cavidad de la CD, que conduce a una disminución en los tres parámetros a valorar ($K_{1:1}$, E_s y E_c). Por contra, el Nipagin® sódico, debido a su dos radicales hidrofílicos, tendría más limitado el proceso de complejación, por lo que prácticamente no se modifican los parámetros del proceso, respecto a los obtenidos en ausencia de conservante.

A pesar de estos resultados, para la formulación propuesta nos hemos decantado por el cloruro de benzalconio, en base a su alto porcentaje de utilización en formulaciones oftálmicas y su efecto sinérgico frente a *pseudomonas aeruginosa* que puede llegar a ejercer en combinación con EDTA, tal y como se recoge en literatura (Lambert et al., 2004; Rowe et al., 2012; Jansook et al., 2010; Loftsson y Brewster, 2011; Gavrilin et al., 1999).

4.1.6. Isotonizantes

Alcanzar un medio isotónico es otro de los puntos a tener en cuenta en el desarrollo de un preparado oftálmico comercial. Datos bibliográficos muestran que en los preparados oftálmicos antiglaucomatosos del mercado español (Lafita, 2018), los más utilizados son el NaCl y el manitol, solos o en combinación, siendo el primero, el que será utilizado en nuestra formulación.

4.1.7. Viscosizantes

El uso de viscosizantes en formulaciones oftálmicas, está estrechamente unido a la necesidad de aumentar el tiempo de

permanencia del fármaco en la superficie ocular, tras su instilación de este sobre el saco conjuntival. Su empleo, caso de ser necesario, permite retrasar el sistema de drenaje ocular y mantener un volumen de líquido 3 veces superior al normal (de 10 hasta 30 μ l), lo cual aumentaría el tiempo de permanencia del fármaco en la retina. Sin embargo, cuando la viscosidad del preparado no es la óptima, se produce un aumento del parpadeo, que se vuelve una molestia para el paciente, y su presencia dificulta la renovación mecánica y natural de la película lagrimal (Jumelle et al., 2020, Zignani et al., 1995; Bozdağ et al., 2008; Zhu y Chauhan., 2008).

Además, desde el punto de vista tecnológico, la elección de un viscosizante puede condicionar el proceso tecnológico de elaboración del medicamento, hecho que está relacionado con la posible interacción de este excipiente con los demás componentes de la formulación o los posibles problemas de esterilización del preparado (Lang, 1995).

Resulta evidente que debemos conocer la viscosidad inicial del preparado, para decidir si es necesario o no incluir un viscosizante específico. En la figura 29, se representa la media del esfuerzo frente a la velocidad de deformación o de cizalla para los tres lotes de la formulación propuesta a pH 7,2.

En base a la linealidad de los datos obtenidos, podemos concluir que nuestra formulación presenta un comportamiento newtoniano, donde se mantiene constante la relación entre la velocidad de cizalla o deformación y el esfuerzo sobre el fluido. Resultados similares aparecen recogidas en la bibliografía para con otros IAC, como la metazolamida (Qian et al., 2010) o la Dorzolamida (Sigurdsson et al., 2005).

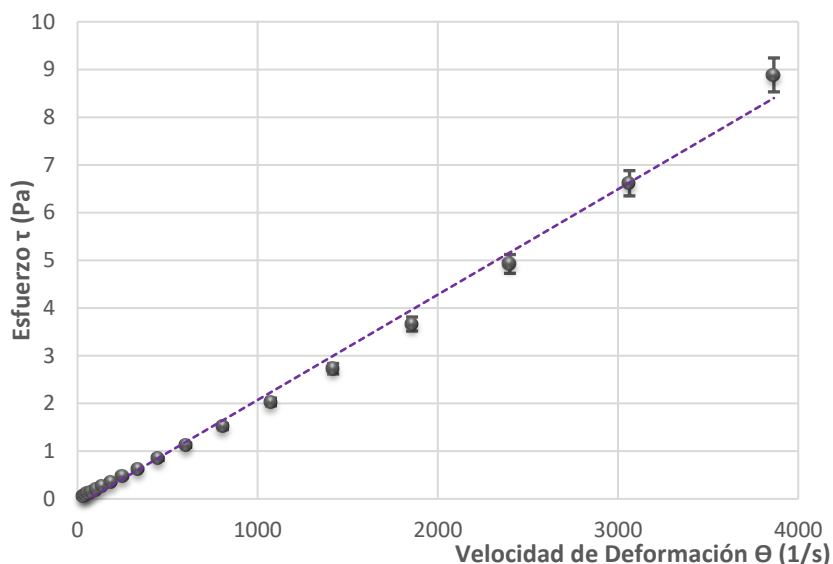


Figura 29.- Variación del esfuerzo (τ) en función de la velocidad de deformación (θ) para la formulación propuesta a pH 7,2.

Los resultados muestran una viscosidad media para nuestra formulación de $2,21 \pm 0,01$ cP. Dado que dicho resultado de viscosidad se encuentra comprendido entre 1 y 30 cP, valores establecidos como adecuados para las administraciones oculares (Kompella, 2010; Faulí et al., 1993; Felt et al., 2000), y que la viscosidad del fluido lagrimal oscila entre 1,05–5,97 cP (Aldrich et al., 2013), consideramos que no es necesario la inclusión de ningún tipo de viscosizante específico en la formulación.

Además, aparece recogido en la bibliografía que, en los fluidos de muy baja viscosidad, un aumento incluso hasta valores de 4,4 cP no conduce a una mejora de la biodisponibilidad por el aumento de permanencia del fármaco en la zona diana.

4.1.8. Formulación propuesta

Una vez que han sido seleccionados todos los componentes para la formulación, se realizó un ensayo de solubilidad de la misma. Los resultados, recogidos en la figura 30 y tabla 22, muestran que la incorporación del resto de componentes prácticamente no modifica el diagrama ni los parámetros del proceso de complejación de ACZ/HP- β -CD.

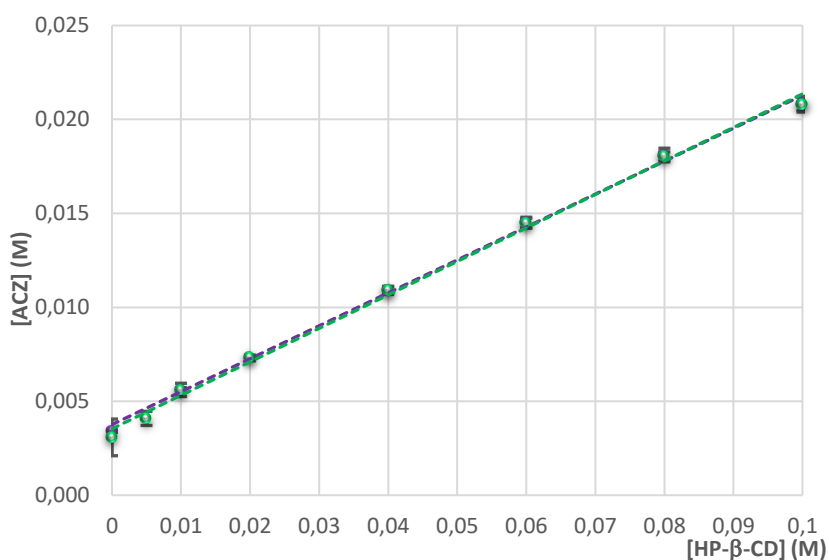


Figura 30.- Diagrama de solubilidad de nuestra formulación propuesta a pH 7,2 (●) y de la formulación solamente con cítrico/fosfato a igual pH (●).

Tabla 22.- *Parámetros del proceso de complejación, obtenidos a partir de los diagramas de solubilidad de la formulación sola con tampón y de la formulación propuesta a igual pH.*

	$K_{1:1}$ (M^{-1})	E_s	E_c	S_0 (mM)	r^2
Cítrico/fosfato (7,2)	59,37 $\pm 1,78$	5,63 $\pm 0,18$	0,22 $\pm 0,01$	3,67 $\pm 0,11$	0,9925
Formulación propuesta (7,2)	57,14 $\pm 1,14$	5,48 $\pm 0,11$	0,22 $\pm 0,01$	3,79 $\pm 0,11$	0,9909

4.2. ESTABILIDAD

Como se indicó en el apartado de metodología, los estudios de estabilidad de ambos fármacos se realizaron según normas ICH durante 180 días a 40 °C.

Aunque en la bibliografía no existen referencias a la inestabilidad de TIM en solución, hemos querido confirmarlo. Para ello, hemos determinado el ln de la concentración de fármaco remanente en la formulación 3 (figura 31).

Según estos resultados, los cuales coinciden con estudios publicados por otros autores, (Kulkarni y Amin, 2000; Qin et al., 2016; Lotfy et al., 2014), TIM es muy estable en solución en las condiciones ensayadas.

Por el contrario, la molécula de ACZ sufre una reacción química de degradación mediante un mecanismo de hidrólisis (de Pilar-Corena et al., 2006; Srinivasu et al., 2010), que afecta al grupo acetamida, tal y como se esquematiza en la figura 32.

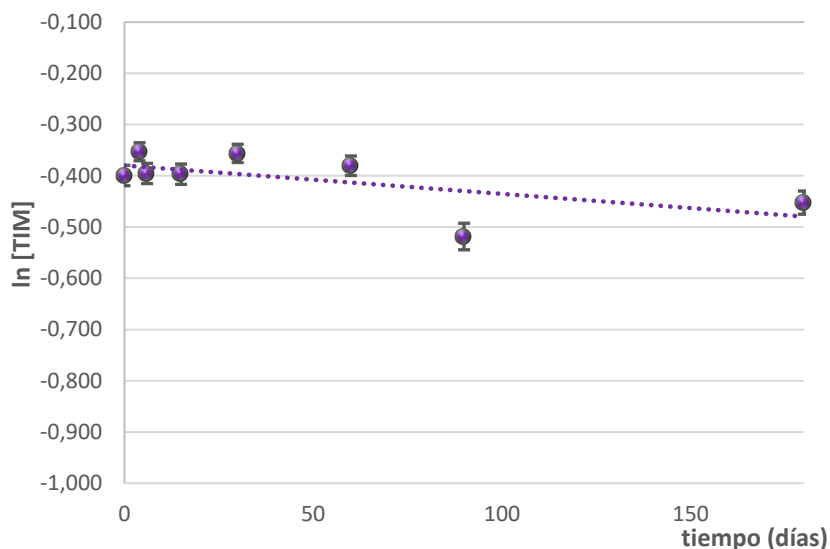


Figura 31.- Representación del $\ln [TIM]$ frente al tiempo para la formulación 3 a 40 °C.

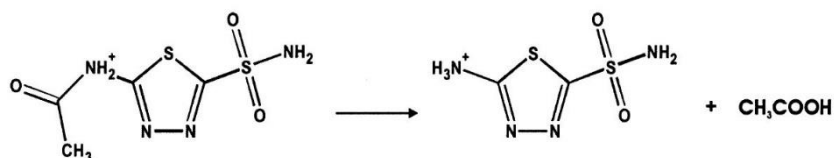


Figura 32.- Reacción de hidrólisis de ACZ (de Pilar-Corena, 2006).

Para establecer su cinética de degradación, realizamos los correspondientes ensayos de estabilidad de tres lotes de la formulación 1 (en ausencia de CD y TIM), a 30, 40 y 50 °C. Los resultados (figura 33), muestran que la cinética de degradación es de primer orden, dado que el $\ln [ACZ]$ disminuye de forma lineal frente al tiempo (El-Kimary y El-Yazbi, 2016; Corena M, 2006).

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
 APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

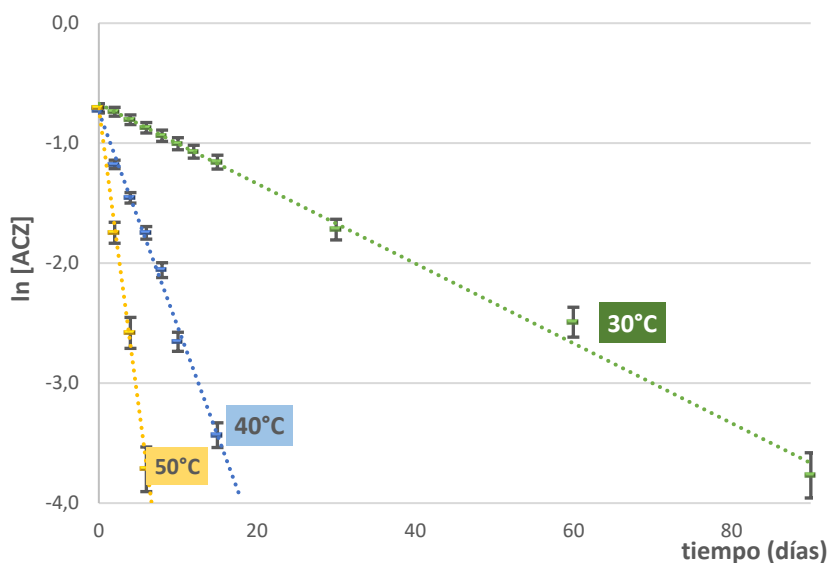


Figura 33.- Representación del $\ln [ACZ]$ frente al tiempo para la formulación 1 a las tres temperaturas ensayadas: (-) 30 °C, (-) 40 °C, (-) 50 °C.

En la tabla 23, se recogen los valores de las diferentes constantes de degradación, así como los coeficientes de determinación obtenidos para cada recta.

Tabla 23.- Constantes de degradación de ACZ en la formulación 1.

Temperatura (°C)	$K_{1.1}$ (días ⁻¹)	r^2
30	0,0342	0,9938
40	0,1813	0,9923
50	0,4934	0,9969

Mediante la ecuación de Arrhenius es posible calcular la energía de activación de la reacción de hidrólisis de la ACZ (Patterson y cols., 2015). Para ello, en la figura 34 se representa gráficamente el $\ln K$ a las tres temperaturas ensayas frente $1/T$ (en grados Kelvin).

CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN

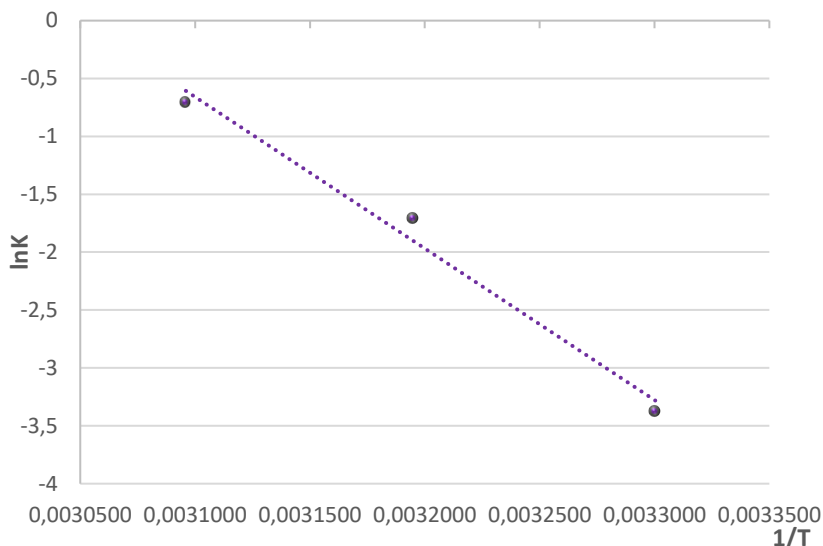


Figura 34.- Representación de la ecuación de Arrhenius para la formulación 1.

De la función lineal obtenida es posible calcular la energía de activación de la reacción, estimando un valor de 26,01 kcal/mol. A partir de este valor, se puede calcular la constante de degradación a 25 °C, así como los parámetros de degradación seleccionados para el estudio, la semivida de degradación (t_{50}) y período de validez (t_{90}), aplicando un intervalo de confianza del 95 % tal y como recoge la ICH en sus normas Q1AR2 Y M9 (EMA, 2018). Todos los datos obtenidos se recogen en la tabla 24.

En base a los resultados obtenidos, sería inviable el desarrollo de un colirio tipo solución, incluso aunque fuera de preparación extemporánea. Se hace totalmente imprescindible mejorar la estabilidad acuosa de ACZ. En este sentido nos planteamos dos posibles soluciones, dado que una de las aplicaciones de las CDs consiste en la mejora de la estabilidad de fármacos en solución, evaluar cómo afecta

la presencia de CD a la estabilidad de ACZ, y elegir un pH que minimice el proceso degradativo. En efecto, aunque existen estudios publicados que describen el proceso de degradación de ACZ en solución (Amidon et al., 1995; Maren y Conroy, 1993; Kaur et al., 2000; Kasim et al., 2004), no hemos encontrado ninguna información respecto a cómo podría afectar la presencia de HP- β -CD a este proceso.

Tabla 24.- Parámetros de degradación de ACZ obtenidos mediante la ecuación de Arrhenius.

Formulación 1	
E_a (kcal/mol)	26,01
$K_{40^\circ C}$ (días ⁻¹)	$18,13 \cdot 10^{-2}$
$k_{25^\circ C}$ (días ⁻¹)	$1,99 \cdot 10^{-2}$
t_{90} (días)	5
t_{50} (días)	34

4.2.1. Influencia de TIM sobre el proceso de degradación de ACZ a pH 7,2

Aun conociendo la escasa influencia que TIM ejerce en el equilibrio de complejación de ACZ, quisimos evidenciar si su presencia en la formulación podía afectar a la estabilidad en solución de dicho fármaco, para ello se han comparado los perfiles de degradación obtenidos de las formulaciones 1 y 3, cuya única diferencia era la presencia de TIM en esta última (figura 35).

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
 APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

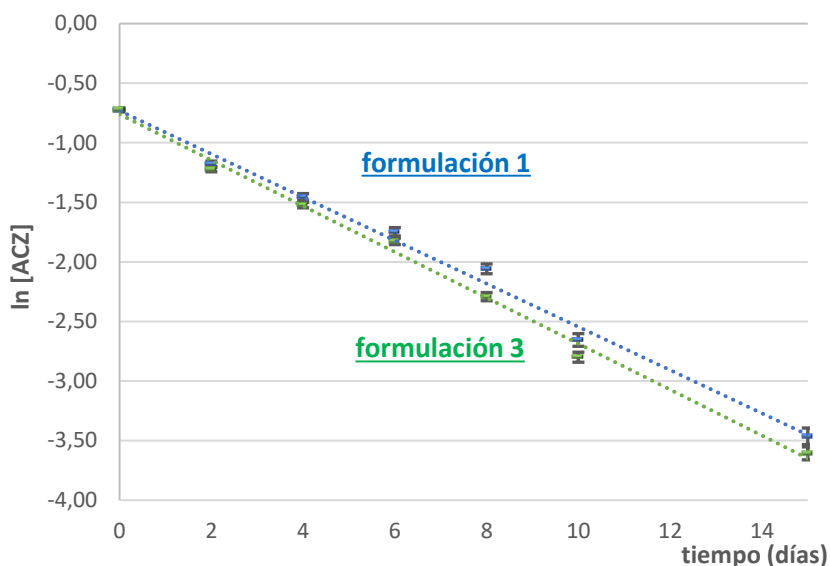


Figura 35.- Representación del $\ln [ACZ]$ frente al tiempo para las formulaciones 1 y 3 a 40 °C.

En la tabla 25 se recogen los parámetros de degradación obtenidos para las formulaciones 1 y 3. Como podemos observar, sus constantes de degradación son muy similares entre ellas, por lo que no se modifica el periodo de validez.

Tabla 25.- Parámetros de degradación de ACZ en las formulaciones 1 y 3.

	Formulación 1	Formulación 3
$k_{40^{\circ}\text{C}}$ (días ⁻¹)	$18,13 \cdot 10^{-2}$	$19,70 \cdot 10^{-2}$
$k_{25^{\circ}\text{C}}$ (días ⁻¹)	$1,99 \cdot 10^{-2}$	$2,17 \cdot 10^{-2}$
t_{90} (días)	5	5
t_{50} (días)	34	31

A la hora de analizar la significancia de los resultados obtenidos de la figura 35, se realizó un estudio estadístico mediante el programa

analítico SPSS®. Los resultados muestran que la presencia de TIM no ejerce influencia estadísticamente significativa en el proceso de degradación de ACZ (tabla 26).

Tabla 26.- Análisis estadístico de ACZ en la comparativa de las formulaciones 1 y 3 (n=3).

Prueba t para la igualdad de medias		
Días	t	P
0	0,393	0,714
2	1,553	0,195
4	3,144	0,075
6	3,803	0,090
8	4,190	0,052
10	3,501	0,072
15	1,956	0,122

4.2.2. Influencia de TIM y HP- β -CD sobre el proceso de degradación de ACZ a pH 7,2

Con objeto de estudiar la influencia conjunta en la formulación de un segundo fármaco y del agente complejante en la degradación de ACZ, se han comparado los perfiles de degradación obtenidas para las formulaciones 1 y 4 (figura 36).

Como puede observarse en la figura, la velocidad de degradación de la formulación 1 es mucho mayor a la observada para la formulación 4, este hecho indica que la formación del complejo de inclusión reduce considerablemente la hidrólisis de ACZ, de forma similar a los resultados

obtenidos por otros autores (Másson y cols., 1999; Loftsson y Brewster, 1996; Kalepu y Nekkanti, 2015; Crini, 2014). En efecto, si tenemos en cuenta que, la degradación de ACZ se produce mediante hidrólisis del grupo acetamida, la inclusión de la molécula del fármaco en la cavidad de la CD por ese grupo (evidenciado mediante los estudios de RMN), reduciría el efecto hidrolítico del mismo, lo que explicaría la mejora en los parámetros de degradación obtenidos.

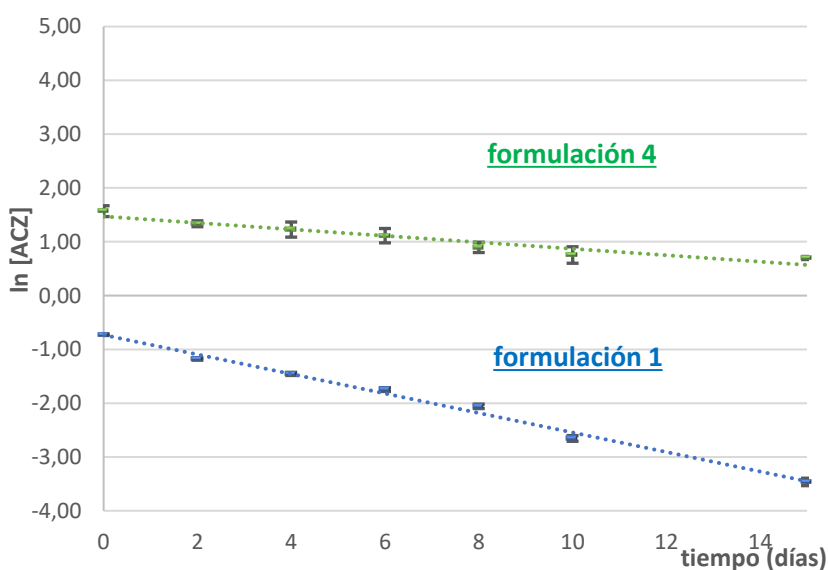


Figura 36.- Representación del $\ln [ACZ]$ frente al tiempo para las formulaciones 1 y 4 a 40 °C.

La tabla 27 recoge los parámetros más importantes obtenidos en el estudio de estabilidad, en ella, se puede observar como la presencia de CD, es capaz de casi triplicar el periodo de validez que pasa de 5 a 14 días, así como la semivida de degradación.

Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas para todos los valores estudiados, tal y como puede observarse en la

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

tabla 28, con valores de p siempre inferiores a 0,05 en cada uno de los puntos.

Tabla 27.- *Parámetros de degradación de ACZ en las formulaciones 1 y 4.*

	Formulación 1	Formulación 4
k_{40°C} (días⁻¹)	18,13·10 ⁻²	6,65·10 ⁻²
k_{25°C} (días⁻¹)	1,99·10 ⁻²	0,69·10 ⁻²
t₉₀ (días)	5	14
t₅₀ (días)	34	94

Tabla 28.- *Análisis estadístico de ACZ en la comparativa de las formulaciones 1 y 4 (n=3).*

Prueba t para la igualdad de medias		
Días	t	P
0	103,905	5,14·10 ⁻⁸
2	169,073	7,34·10 ⁻⁹
4	85,311	1,13·10 ⁻⁷
6	90,381	8,98·10 ⁻⁸
8	129,916	2,11·10 ⁻⁸
10	69,561	2,56·10 ⁻⁷
15	166,342	7,84·10 ⁻⁹

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se hizo necesario plantearnos una modificación del pH de la formulación, encaminada a lograr una mejora en la estabilidad acuosa de ACZ, que nos permita alcanzar un periodo de validez de al menos 30 días, necesarios para una formulación de preparación extemporánea. Para ello, y dado que según

los datos bibliográficos (Parasrampur y Gupta, 1989; del Pilar-Corena et al., 2006) el pH de máxima estabilidad química de ACZ se encuentra en el intervalo de pH de 4 a 5, se eligió un valor de 5,3 como pH alternativo para la formulación. Hay que señalar que, según diversos autores, es un pH factible para una administración a nivel ocular, debido al efecto tamponante de las lágrimas y al drenaje ocular (Bilbao, 2018; González y Esteban, 2011; SEFH, 2019).

4.2.3. Influencia del pH y el TIM sobre el proceso de degradación de ACZ

En este apartado, vamos a estudiar la influencia que el cambio en pH de la formulación ejerce sobre el proceso de degradación de ACZ y la influencia que ejerce la presencia de un segundo fármaco, TIM.

La figura 37 representa los valores del $\ln [ACZ]$ para la formulación 5 (que contiene ACZ) y 7 (que incluye los dos fármacos), ambas a pH 5,3.

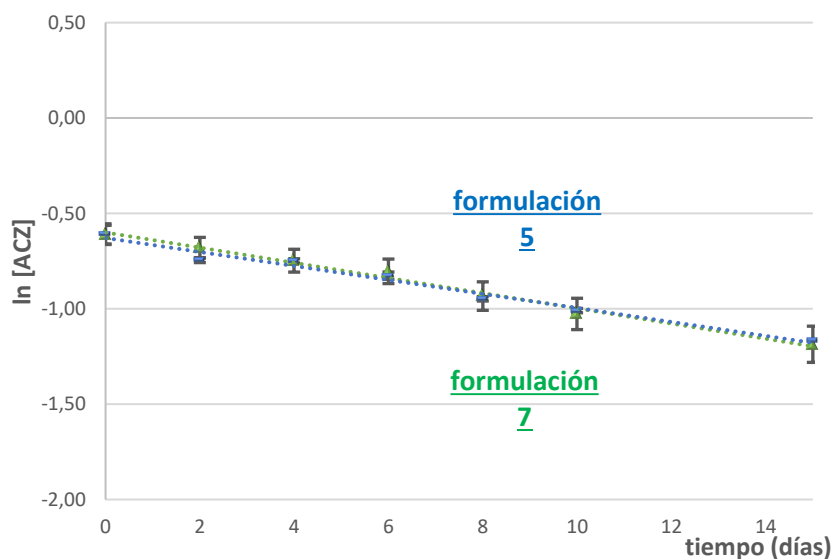


Figura 37.- Representación del $\ln [ACZ]$ frente al tiempo para las formulaciones 5 y 7 a 40 °C.

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

Los perfiles de degradación obtenidos son prácticamente idénticos, al igual que sus parámetros de degradación (tabla 29), confirmados por el correspondiente estudio estadístico (tabla 30). Los resultados obtenidos muestran que mientras que el TIM sigue sin ejercer influencia, el cambio de pH supone un aumento importante respecto a las formulaciones elaboradas a pH 7,2, ya que se cuadruplica el periodo de validez, que a este pH era de 5 días.

Tabla 29.- *Parámetros de degradación de ACZ en las formulaciones 5 y 7.*

	Formulación 5	Formulación 7
$k_{40^{\circ}\text{C}}$ (días⁻¹)	$3,67 \cdot 10^{-2}$	$3,98 \cdot 10^{-2}$
$k_{25^{\circ}\text{C}}$ (días⁻¹)	$3,92 \cdot 10^{-3}$	$4,29 \cdot 10^{-3}$
t_{90} (días)	22	23
t_{50} (días)	147	152

Tabla 30.- *Análisis estadístico de ACZ en la comparativa de las formulaciones 5 y 7 (n=3).*

Prueba t para la igualdad de medias		
Días	t	P
0	0,006	0,996
2	4,048	0,160
4	0,041	0,969
6	0,824	0,456
8	0,822	0,457
10	0,847	0,445
15	1,632	0,178

4.2.4. Influencia conjunta de TIM y HP- β -CD sobre el proceso de degradación de ACZ a pH 5,3

Al igual que para pH 7,2 y con objeto de estudiar la influencia que la inclusión de la CD va a ejercer sobre la estabilidad de ACZ en presencia de TIM, en la figura 38 se muestran los perfiles de degradación, obtenidos en ausencia (formulación 5) y presencia de CD (formulación 8).

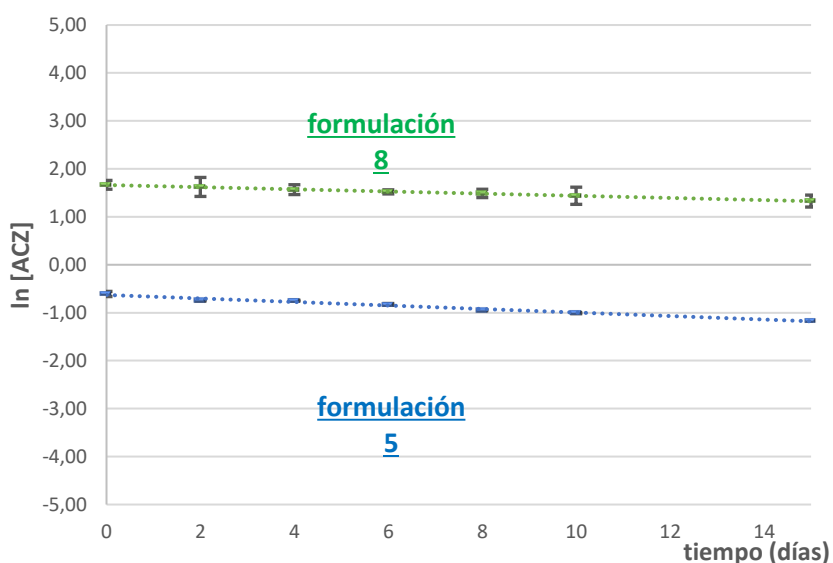


Figura 38.- Representación del $\ln [ACZ]$ frente al tiempo para las formulaciones 5 y 8 a 40 °C.

En la tabla 31 se recogen los parámetros de degradación. Los resultados indican que la formación del complejo de inclusión reduce considerablemente la hidrólisis de ACZ, al igual que ocurría a pH 7,2. Hay que tener en cuenta que la disminución del pH incrementa la fracción no ionizada de ACZ en solución, lo que favorece la complejación con HP- β -CD y por tanto incrementa la fracción de fármaco protegido frente a la hidrólisis.

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP-β-CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

Se puede observar como la presencia de CD a este pH permite alcanzar un periodo de validez de 31 días, suficiente para podernos plantear una formulación de preparación extemporánea tipo solución.

Tabla 31.- *Parámetros de degradación de ACZ en las formulaciones 5 y 8.*

	Formulación 5	Formulación 8
k_{40°C} (días⁻¹)	3,67·10 ⁻²	2,25·10 ⁻²
k_{25°C} (días⁻¹)	3,92·10 ⁻³	2,54·10 ⁻³
t₉₀ (días)	22	31
t₅₀ (días)	147	206

El estudio estadístico confirma diferencias estadísticamente significativas para ambos procesos (tabla 32).

Tabla 32.- *Análisis estadístico de ACZ en la comparativa de las formulaciones 5 y 8 (n=3).*

Prueba t para la igualdad de medias		
Días	t	P
0	36,284	3,44·10 ⁻⁶
2	85,382	1,13·10 ⁻⁷
4	126,572	2,34·10 ⁻⁸
6	89,488	9,35·10 ⁻⁸
8	119,798	2,91·10 ⁻⁸
10	80,312	1,44·10 ⁻⁷
15	64,439	3,47·10 ⁻⁷

4.2.5. Estudio de solubilidad a pH 5,3

Con el fin de mostrar la influencia que ejerce el cambio de pH en el proceso de complejación de la ACZ, mostramos en la figura 39, el diagrama de solubilidad de las formulaciones que incluyen ACZ, TIM y HP- β -CD a pH 7,2 (formulación 4) y pH 5,3 (formulación 8).

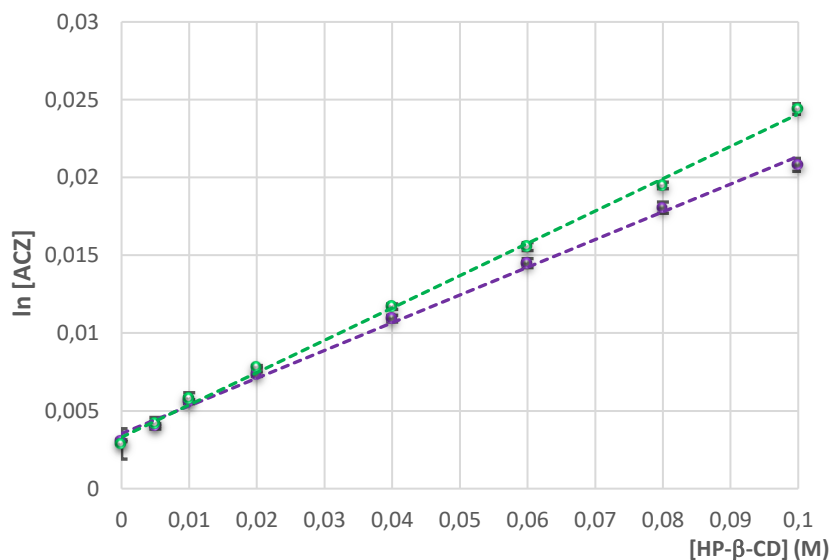


Figura 39.- Diagrama de solubilidad de la formulación 4 a pH 7,2 (\blacktriangle) y 8 a pH 5,3 (\bullet).

Los resultados muestran, como era previsible, que una disminución del pH, dado el carácter ácido de nuestro fármaco, va a favorecer la forma no ionizada, más fácilmente complejable, lo que supone un aumento en la constante de complejación, la E_s y la E_c , tal y como se recoge en la tabla 33. Con este cambio de pH, estamos favoreciendo el proceso de solubilización de ACZ, y de forma indirecta, su estabilidad acuosa, como quedó reflejado en el apartado anterior.

Tabla 33.- *Parámetros del proceso de complejación, obtenidos a partir de los diagramas de solubilidad de las formulaciones 4 y 8.*

	$K_{1:1}$ (M^{-1})	E_s	E_c	S_0 (mM)	r^2
Formulación 4 (7,2)	57,14	5,48	0,22	3,79	0,9909
	$\pm 1,14$	$\pm 0,11$	$\pm 0,01$	$\pm 0,11$	
Formulación 8 (5,3)	77,10	7,18	0,26	3,35	0,9971
	$\pm 1,54$	$\pm 0,22$	$\pm 0,01$	$\pm 0,07$	

4.2.6. Estudio de viscosidad a pH 5,3

Una vez analizada la influencia que ejerce el pH en el proceso de complejación de la ACZ, el siguiente parámetro a valorar es el cambio que puede producir dicha modificación a los valores de viscosidad de la formulación.

Para ello, en la figura 40 se representa la media del esfuerzo frente a la velocidad de deformación o de cizalla para los tres lotes de la formulación propuesta, en este caso a pH 5,3, recogiéndose un valor de viscosidad media de $2,20 \pm 0,01$ cP.

Como es posible apreciar, los resultados de viscosidad son prácticamente similares a los obtenidos para la formulación a pH 7,2 (los cuales presentaban un valor de $2,21 \pm 0,01$ cP), y vuelven a estar entre el rango de 1 y 30 cP, valores establecidos como adecuados para las administraciones oculares. Este valor se considera óptimo para la elaboración de una formulación final al pH indicado.

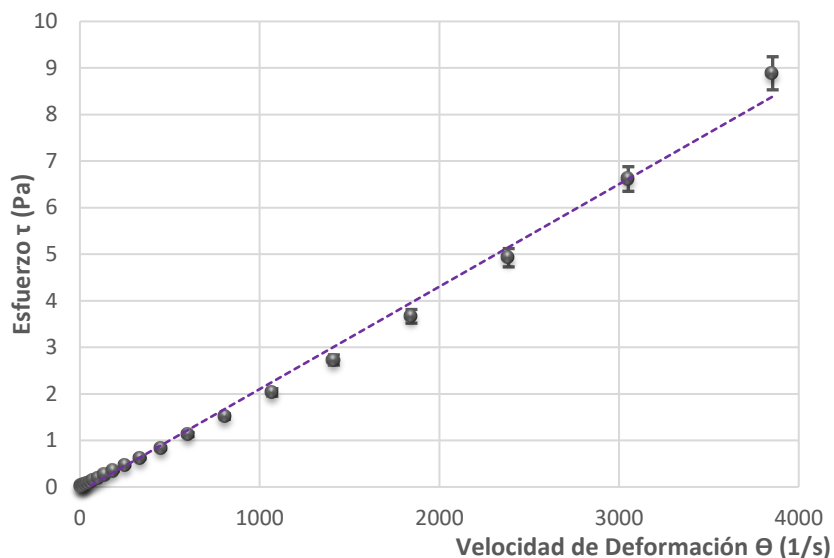


Figura 40.- Variación del esfuerzo (τ) en función de la velocidad de deformación (θ) para la formulación propuesta a pH 5,3.

4.3. PERMEACIÓN

Para simular las condiciones de la superficie corneal se ha empleado una membrana de polietersulfona tratada con gelatina, tal y como fue comentado en el apartado de materiales y métodos (Arroyo, 2018). Dicha membrana presenta numerosos poros (figura 41), los cuales van a controlar el paso del fármaco.

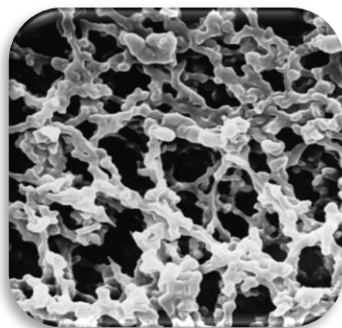


Figura 41.- Fotografía al SEM de una membrana de polietersulfona, imagen disponible en <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/mm/gpwp04700> [Consultado el 23-6-2019].

Antes de estudiar la influencia de las diferentes variables (asociación de los dos fármacos, presencia o no de CD y pH del medio), hemos realizado los perfiles de permeación de ACZ y TIM en unas condiciones ideales para el ojo, es decir a pH 7,2. En la figura 42 se muestran las cantidades permeadas para ACZ (formulación 1) y TIM (formulación 4).

Los resultados indican, como se recoge en la bibliografía, que solo la ACZ presenta problemas de permeación, lo que limitaría su efectividad en una administración tópica ocular. Resulta difícil comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores, ya que existe una gran variabilidad en el diseño de los ensayos, tanto a nivel de formulación, como por el tipo de membrana utilizada. No obstante, en las tablas 34 y 35 se muestra una comparativa con algunos de los estudios publicados.

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

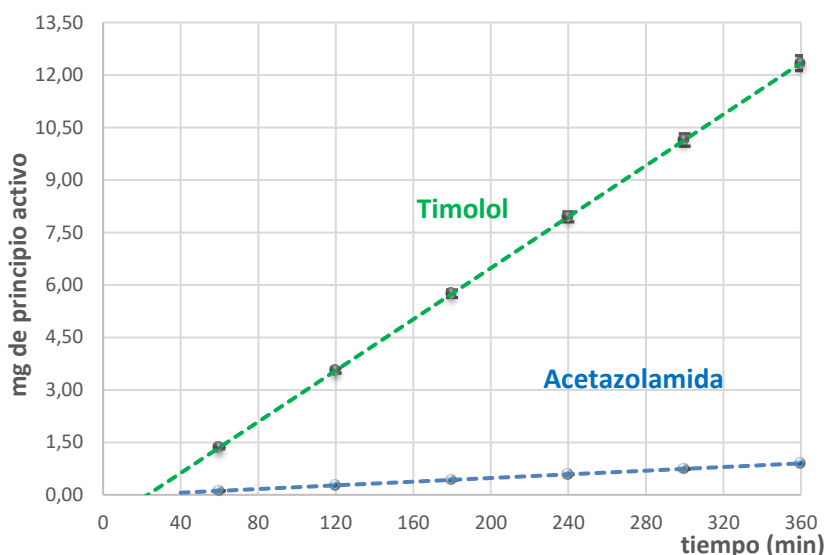


Figura 42.- Cantidad de ACZ permeada en la formulación 1 (●) y de TIM en la formulación 4 (●).

Tabla 34.- Diferentes estudios publicados sobre la cantidad de ACZ permeada a las 2h.

Autor / año	mg en el compartimento donador	Tipo de membrana (material y área)	mg/cm ² a las 2 h
Manchanda et al., 2016	1	Cornea de cabra 0,47 cm ²	0,032
Quinteros et al., 2016	1	Cornea de conejo albino 0,78 cm ²	0,041
Formulación 1	1	Membrana de polietersulfona modificada 3,14 cm ²	0,086±0,01
Tártara et al., 2012.	1	Cornea de conejo 0,79 cm ²	0,114

Tabla 35.- *Diferentes estudios publicados sobre la cantidad de TIM permeada a las 2h.*

Autor / año	mg en el compartimento donador	Tipo de membrana (material y área)	mg/cm² a las 2 h
Tan et al., 2017.	5	Cornea de conejo 0,7 cm ²	0,017
Attama et al., 2009.	10	Membrana de policarbonato tratada 0,68 cm ²	0,307
Higashiyama et al., 2004.	5	Extracto epitelial de conejo 0,04 cm ²	0,625
Formulación 4	13,60	Membrana de polietersulfona modificada 3,14 cm ²	1,130±0,07

4.3.1. Influencia de la CD y el pH sobre la cantidad de ACZ permeada

Como ya se ha reflejado en la memoria, la presencia de HP- β -CD, posibilita incrementar la concentración de ACZ disuelta y su estabilidad acuosa. Con el objetivo de estudiar la influencia de la presencia del agente complejante sobre la permeación de la ACZ, se han comparado las formulaciones sin presencia de CD con las que incluyen la HP- β -CD, a pH 7,2 y 5,3. Los resultados se recogen en las figuras 43 y 44.

CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN

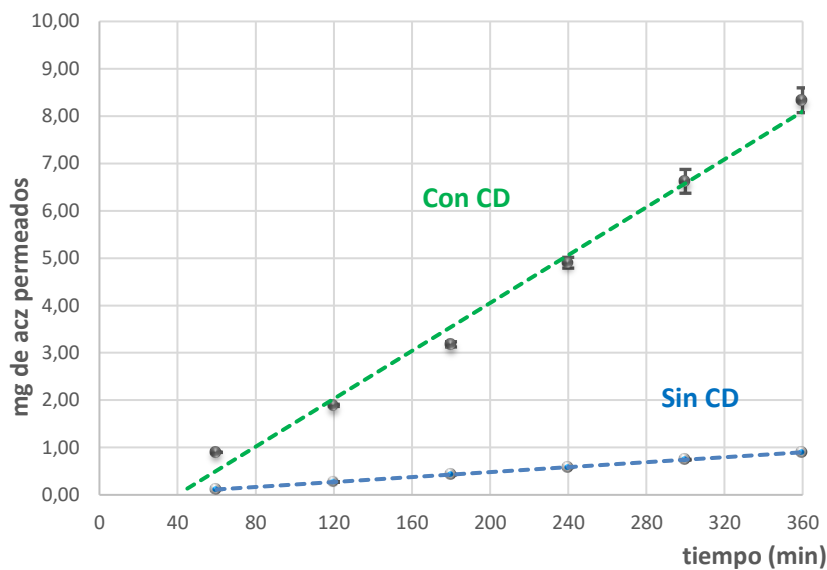


Figura 43.- Cantidad de ACZ permeada en la formulación 1 (●) sin CD y la formulación 2 (●) con CD a pH 7,2.

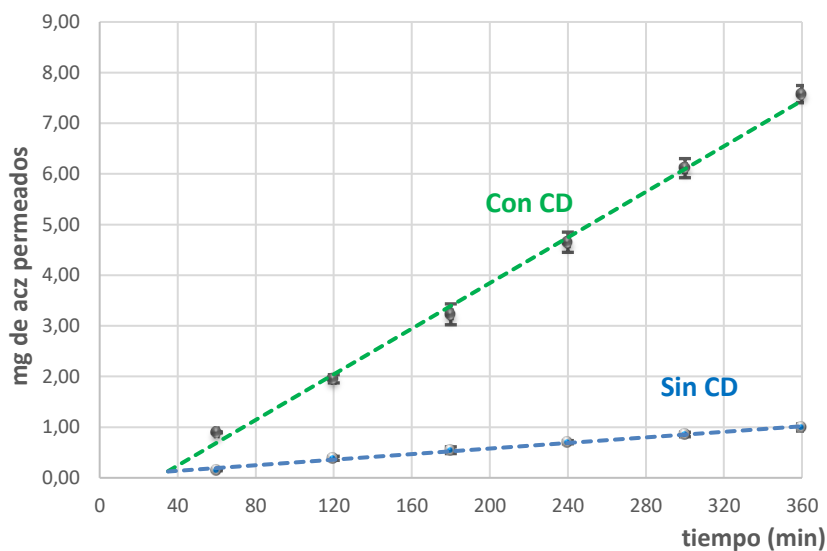


Figura 44.- Cantidad de ACZ permeada en la formulación 5 (●) sin CD y la formulación 6 (●) con CD a pH 5,3.

En ambos casos podemos observar como la presencia de una mayor concentración de fármaco disuelto, conduce a un aumento notable en la cantidad total de ACZ permeada, lo que indica que el proceso no es

saturable, al menos en las condiciones de nuestro ensayo. En efecto, el empleo de CDs permite la solubilización de una mayor cantidad de principio activo, y aunque el complejo fármaco-CD no es capaz de permear como está descrito en la bibliografía, el equilibrio de disociación del mismo es tan rápido que la complejación no supone una limitación. Resultados similares para este fármaco han sido recogidos en la bibliografía (Arroyo-García et al., 2021; Loftsson et al., 2016).

Para estudiar la influencia del pH, comparamos las formulaciones 1 y 5 (figura 45) y 2 y 6 (figura 46).

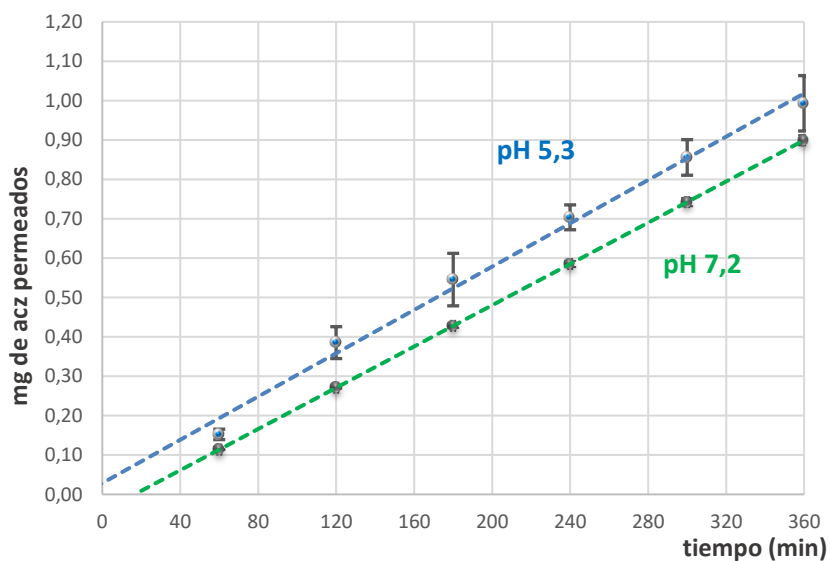


Figura 45.- Cantidad de ACZ permeada en la formulación 1 (●) y la formulación 5 (●).

Los resultados muestran perfiles paralelos, si bien la disminución en el pH conduce a un aumento en la cantidad de fármaco permeado, pasando de 0,90 mg para la formulación 1 a 0,99 mg para formulación 5, después de 6 horas de ensayo. Estos resultados podemos justificarlos, dado el comportamiento ácido de nuestro fármaco, así la disminución

del pH se traduce en una mayor concentración ACZ en forma no ionizada, que es capaz de permear más fácilmente a través de la membrana tratada. Resultados similares han sido publicados por Kaur et al., 2002 y Manchanda et al., 2016).

En base al estudio estadístico (tabla 36), podemos confirmar que existen diferencias significativas entre ambos procesos.

Tabla 36.- Análisis estadístico de ACZ permeada en la comparativa de las formulaciones 1 y 5 ($n=3$).

Prueba t para la igualdad de medias		
Horas	t	P
1	1,647	0,240
2	2,966	0,041
3	2,859	0,033
4	4,429	0,011
5	2,748	0,032
6	1,862	0,040

Sin embargo, cuando realizamos este mismo estudio en presencia de HP- β -CD a pH 7,2 (formulación 2) y pH 5,3 (formulación 6), los resultados recogidos en la figura 46, muestran perfiles prácticamente superponibles, en las primeras etapas del ensayo.

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
 APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

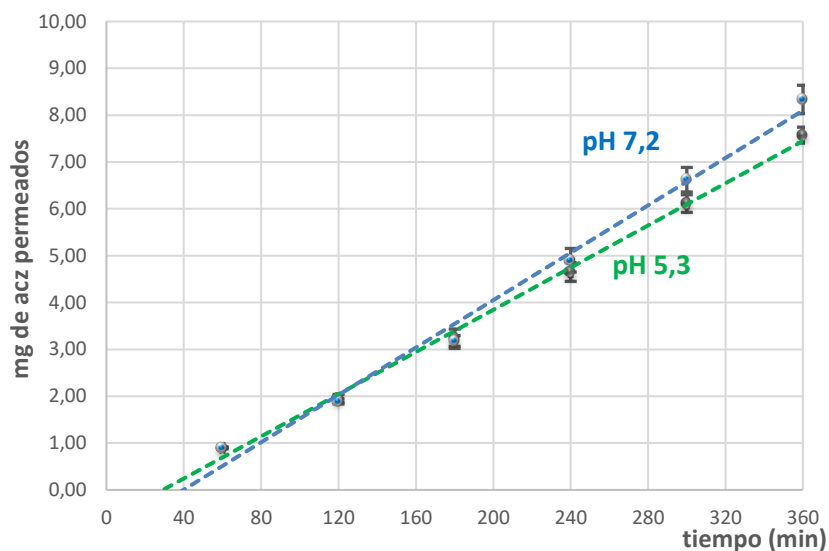


Figura 46.- Cantidad de ACZ permeada en la formulación 2 (●) y la formulación 6 (●).

Los resultados (tabla 37), confirman que, en presencia de CD, el pH no ejerce influencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$), al menos en las primeras horas de ensayo.

Tabla 37.- Análisis estadístico de ACZ permeada en la comparativa de las formulaciones 2 y 6 ($n=3$).

Prueba t para la igualdad de medias		
Horas	t	P
1	0,007	0,994
2	0,525	0,627
3	0,365	0,734
4	1,388	0,238
5	2,823	0,057
6	3,893	0,018

Resultados similares obtenemos cuando incorporamos TIM a las formulaciones que contienen ACZ y HP- β -CD, formulación 4 (pH 7,2) y formulación 8 (pH 5,3), tal y como se muestran en la figura 47, confirmando que la presencia de dicho fármaco, al igual que ocurría con el proceso de complejación, no ejerce influencia en la permeación de ACZ.

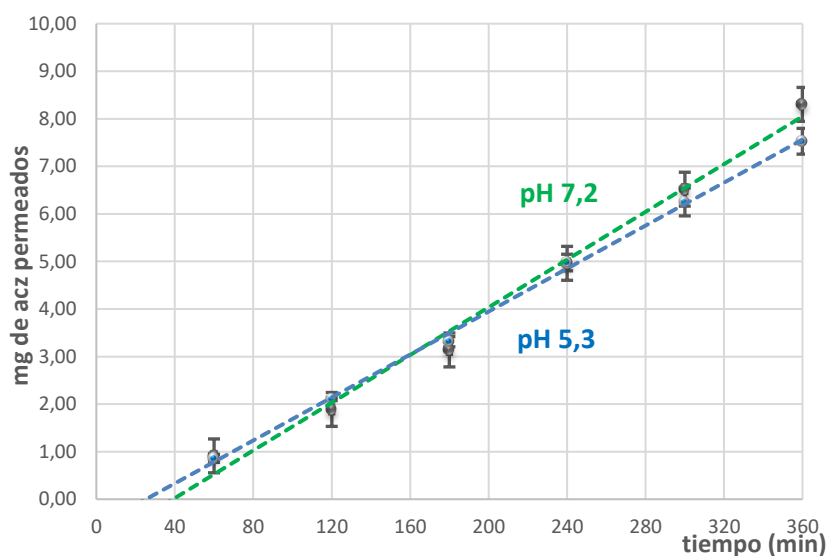


Figura 47.- Cantidad de ACZ permeada en la formulación 4 (●) y la formulación 8 (●).

Para confirmarlo, en el estudio estadístico (tabla 38) vuelve a no apreciarse diferencias significativas entre ambas formulaciones.

Tabla 38.- Análisis estadístico de ACZ permeada en la comparativa de las formulaciones 4 y 8 (n=3).

Prueba t para la igualdad de medias		
Horas	t	P
1	0,537	0,620
2	1,856	0,137
3	1,433	0,225
4	0,097	0,928
5	0,901	0,419
6	3,002	0,051

4.3.2. Influencia de la presencia de TIM en la permeación del complejo

ACZ/HP- β -CD

Con el fin de reducir el número de ensayos, la influencia que la presencia de un segundo fármaco (TIM) puede ejercer en el proceso de permeación de la ACZ sólo se ha estudiado para la previsible formulación final, aquella que contiene CD, formulada a pH 5,3. Para ello comparamos las formulaciones 6 y 8, cuyos resultados se muestran en la (figura 48).

La práctica superposición de ambas gráficas, corroborado por el estudio estadístico (tabla 39) muestra que la presencia de un segundo fármaco, TIM, no ejerce influencia en el proceso de permeación de la ACZ.

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

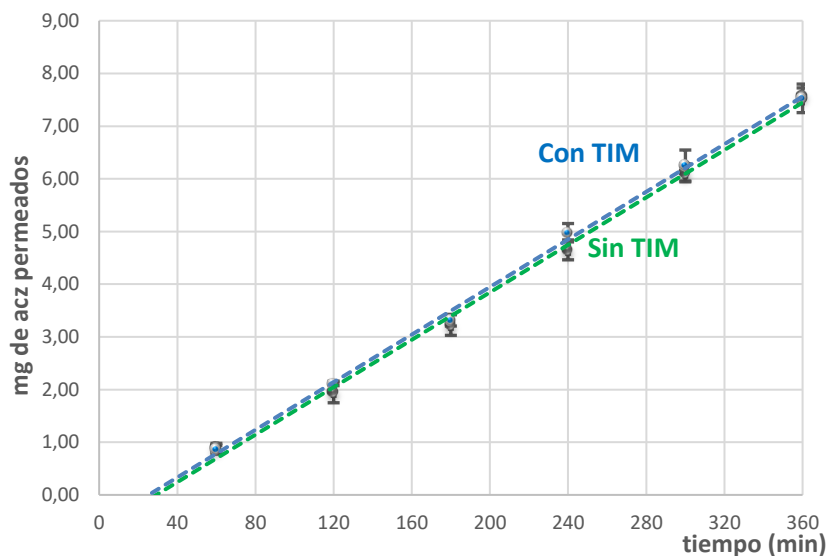


Figura 48.- Cantidad de ACZ permeada en la formulación 6 (●) y la formulación 8 (●).

Tabla 39.- Análisis estadístico de ACZ permeada en la comparativa de las formulaciones 6 y 8 (n=3).

Prueba t para la igualdad de medias		
Horas	t	P
1	0,569	0,600
2	1,257	0,277
3	0,645	0,554
4	2,194	0,093
5	0,708	0,518
6	0,266	0,803

4.3.3. Influencia del pH sobre el proceso de permeación de TIM

De forma análoga, para estudiar la posible influencia del pH sobre la permeación de TIM, en la figura 49 comparamos la formulación 4 (pH 7,2) y la formulación 8 (pH 5,3).

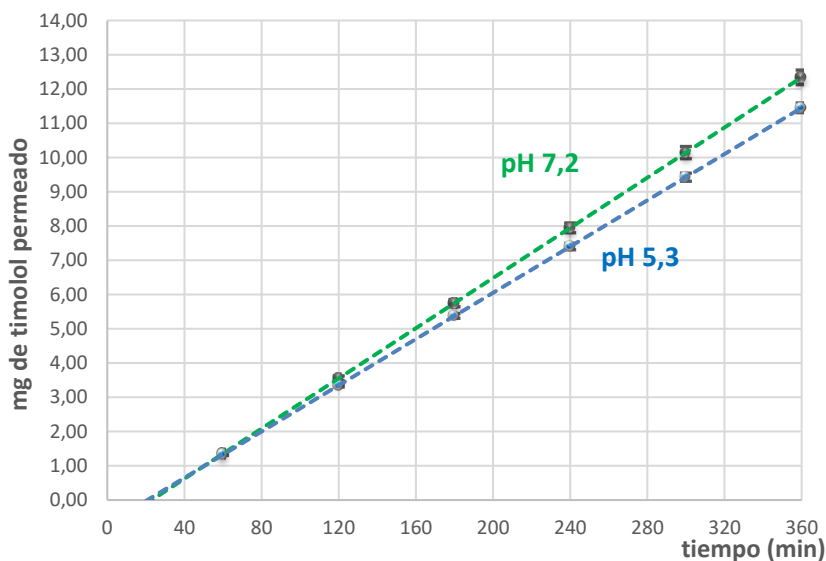


Figura 49.- Cantidad TIM permeada en la formulación 4 (●) y la formulación 8 (●).

Los resultados muestran que TIM presenta un comportamiento diferente al de la ACZ, ya que, al disminuir el pH, desciende la cantidad de fármaco permeada. Estos resultados podemos justificarlos en base al comportamiento básico de este fármaco, de tal forma que la fracción ionizada aumenta al disminuir el pH del medio, por lo que se dificulta su permeación (Wei et al., 2001; Fukuda y Sasaki, 2015). Desde un punto de vista estadístico, esta diferencia podría considerarse significativa a partir de la cuarta hora del ensayo (tabla 40).

Tabla 40.- Análisis estadístico de TIM permeada en la comparativa de las formulaciones 4 y 8 (n=3).

Prueba t para la igualdad de medias		
Horas	t	P
1	1,233	0,285
2	4,101	0,059
3	5,057	0,051
4	5,535	0,005
5	5,822	0,004
6	6,013	0,004

4.3.4. Otros parámetros del proceso de permeación

La tabla 41 muestra los valores obtenidos para el resto de parámetros de permeación de ACZ, calculados para las formulaciones seleccionadas.

De forma general observamos (tabla 41), para todos los parámetros estudiados (al igual que ocurría con la cantidad de fármaco permeado), que la presencia de TIM no ejerce influencia significativa en ninguno de ellos.

En primer lugar, el parámetro a analizar será **flujo de estado estacionario (J_{ss})**, dicho parámetro relaciona el **flujo** (cantidad de fármaco que atraviesa la membrana corneal por unidad de tiempo) frente a la superficie expuesta para la permeación (Tártara, 2013). Como era lógico, observamos que los valores más altos se registran para las formulaciones que incorporan agente complejante, dado que presentan mayor concentración de fármaco disuelto.

Respecto al **coeficiente de permeabilidad (P)**, como ya comentamos en metodología, según la ley de Darcy (Brown, 2002), es un parámetro que nos permite relacionar el flujo calculado para cada formulación y la concentración de partida en el compartimento donador. Con ello, obtenemos una idea de la resistencia que dicha membrana ejerce frente a la permeación del fármaco y permite conocer grado de permeación de este y reflejar su velocidad de transporte.

Tabla 41.- *Parámetros de permeación de ACZ en las distintas formulaciones.*

	J_{ss} ($\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	P (cm s^{-1}) ($\cdot 10^{-5}$)	mg (2h)	mg (6h)
Formulación 1 <i>pH 7,2/sin CD</i>	0,83 \pm 0,02	2,51 \pm 0,05	0,27 \pm 0,01	0,90 \pm 0,02
Formulación 2 <i>pH 7,2/con CD</i>	7,73 \pm 0,33	2,55 \pm 0,11	1,89 \pm 0,06	8,34 \pm 0,30
Formulación 4 <i>pH 7,2/con CD y TIM</i>	7,67 \pm 0,36	2,55 \pm 0,12	1,89 \pm 0,20	8,30 \pm 0,36
Formulación 5 <i>pH 5,3/sin CD</i>	0,91 \pm 0,08	2,75 \pm 0,24	0,39 \pm 0,07	0,99 \pm 0,09
Formulación 6 <i>pH 5,3/con CD</i>	7,02 \pm 0,13	2,41 \pm 0,04	1,96 \pm 0,21	7,57 \pm 0,15
Formulación 8 <i>pH 5,3/con CD y TIM</i>	7,20 \pm 0,33	2,44 \pm 0,11	2,11 \pm 0,03	7,53 \pm 0,27

Teóricamente, este valor debería ser el mismo para todas las formulaciones, ya que han sido sometidas a las mismas condiciones de ensayo, lo que garantizaría la fiabilidad del estudio. De forma empírica, si tomásemos como referencia todos los resultados obtenidos en la tabla 43 y presentásemos un valor medio, el resultado sería de

2,54 \pm 0,12 \cdot 10⁻⁵ cm/s, con un coeficiente de variación calculado de 5 %, lo cual demuestra la fiabilidad de nuestro modelo y la reproducibilidad del ensayo.

Además, este valor se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos por muchos autores, (Arroyo-García et al., 2021; Tártara et al., 2012; Quinteros et al., 2016; Manchanda et al., 2016), que obtuvieron los siguientes valores: Arroyo-García (1,86 \cdot 10⁻⁵ cm/s), Tártara (3,04 \cdot 10⁻⁵ cm/s), Quinteros (0,85 \cdot 10⁻⁵ cm/s) o Manchanda (0,44 \cdot 10⁻⁵ cm/s).

Por último, En la tabla 42 se muestran los parámetros de permeación referidos a TIM.

Tabla 42.- Parámetros de permeación de TIM en las distintas formulaciones.

	J_{ss} ($\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	P (cm s^{-1}) ($\cdot 10^{-5}$)	mg (2h)	mg (6h)
Formulación 4 pH 7,2/ACZ/CD/TIM	11,66 \pm 0,19	2,85 \pm 0,05	3,55 \pm 0,07	12,34 \pm 0,21
Formulación 8 pH 5,3/ACZ/CD/TIM	10,75 \pm 0,13	2,63 \pm 0,03	3,35 \pm 0,05	11,45 \pm 0,14

El cambio de pH a 5,3 supone una ligera disminución en los parámetros de permeación de TIM, situación que podemos justificar dado el comportamiento básico del fármaco.

Además, al igual que fue analizado para ACZ, el valor medio de **P** para las 2 formulaciones estudiadas fue de 2,74 \pm 0,16 \cdot 10⁻⁵ cm/s, con un coeficiente de variación calculado de 6 %, lo cual vuelve a demostrar la

fiabilidad de nuestro modelo. Este valor también está dentro del rango de valores presentados por otros autores, como Arroyo-García ($1,94 \cdot 10^{-5}$ cm/s), Tan ($0,4 \cdot 10^{-5}$ cm/s), Higashiyama ($1,77 \cdot 10^{-5}$ cm/s) o Attama ($4,27 \cdot 10^{-5}$ cm/s), y coincide con los datos aportados en el apartado de introducción (Arroyo-García et al., 2021; Tan et al., 2017; Higashiyama et al., 2004; Attama et al., 2009).

Tras finalizar los estudios de permeación, y dado que las formulaciones a pH 5,3 no muestra diferencias estadísticamente significativas con las elaboradas a pH 7,2 seguimos manteniendo 5,3 como pH para la formulación final, debido a los problemas de estabilidad de ACZ en solución.

5. CONCLUSIONES

1. Los estudios de solubilidad de fases, realizados entre ACZ y CD, se hallan en concordancia con los datos bibliográficos preexistentes, donde la ACZ forma un complejo de estequiometría 1:1 con la HP- β -CD, con un valor de constante de complejación de 58,63 M⁻¹. Por su parte, los estudios realizados indicaron que la presencia de TIM no modifica significativamente dicho equilibrio.
2. La caracterización del complejo ACZ/HP- β -CD mediante RMN en medio líquido puso de manifiesto la formación de un complejo en medio líquido, al registrarse una variación sobre la señal del protón H₃ localizado en la cavidad de la CD, lo cual se asocia a la presencia de un huésped en dicha cavidad. Por su parte, los resultados obtenidos del estudio del espectro bidimensional ROESY mostraron la presencia de una débil señal cruzada entre los protones H₃ del anillo interno de la CD y el protón de ACZ, confirmando la presencia del complejo en medio líquido. El carácter débil de dicha señal se halla en concordancia con los bajos valores de constante de estabilidad obtenidos a través de los estudios de solubilidad de fases y por el método de Benesi-Hildebrand.
3. Los resultados obtenidos por modelización molecular (valores negativos de energía de complejación e interacción) sugieren que la formación del complejo ACZ/HP- β -CD es viable desde el punto de vista termodinámico. La existencia de varias conformaciones muy cercanas en energía entre fármaco y CD

sugiere la posibilidad de varios modos de interacción entre ACZ y CD.

4. Tras los estudios de preformulación se descartó la utilización de otros agentes solubilizantes (Tween[®]80, Transcutol[®]P y Cremophor[®]EL), dado que su incorporación a la formulación no se tradujo en una mejora efectiva de la solubilidad de ACZ.
5. El resto de los componentes de la formulación (cloruro de benzalconio y EDTA) se seleccionaron bajo la premisa de no interferir el proceso de complejación, tal y como pusieron de manifiesto los correspondientes ensayos de solubilidad.
6. Los estudios de viscosidad mostraron un comportamiento de tipo newtoniano para nuestra formulación, cuyos valores se hallaron dentro de los márgenes idóneos para la superficie ocular, por lo que no se consideró necesaria la incorporación de viscosizantes adicionales.
7. Los resultados de las pruebas de permeación indicaron que la presencia de HP- β -CD mejoraba de forma significativa los parámetros de permeación de ACZ. Por su parte, la presencia de TIM no interfiere significativamente en dicho proceso.

8. Aunque los estudios realizados mostraron que la presencia de HP- β -CD mejora la estabilidad de la ACZ en medio acuoso, dicha mejora es claramente insuficiente para establecer una fórmula viable en forma de colirio convencional. Por tanto, proponemos que la formulación de ACZ con HP- β -CD habrá de desarrollarse en forma de un preparado de tipo extemporáneo y formulado a pH 5,3, para conseguir un tiempo de validez superior a 30 días.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Hay MH, Ragab MA, Ahmed HM, Mohyeldin SM. The use of Arrhenius kinetics to evaluate different hydrolytic stability of amiloride hydrochloride and cyclopentiazide using chromatographic methods. *Microchem J.* 2019; 147: 682-690.
- Abul Kalam M, Sultana Y, Ali A, Aqil M, Mishra AK, Chuttani K et al. Part II: Enhancement of transcorneal delivery of gatifloxacin by solid lipid nanoparticles in comparison to commercial aqueous eye drops. *J Biomed Mater Res A.* 2013; 101 (6): 1828-1836.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) [Internet]. Centro de Información online de Medicamentos Autorizados de la AEMPS (CIMA): Edemox 250 mg comprimidos [Consultado en julio 2019]. Disponible en https://cima.aemps.es/cima/dohtml/p/24408/P_24408.html.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) [Internet]. Centro de Información online de Medicamentos Autorizados de la AEMPS (CIMA): Nomenclator: Árbol de Medicamentos [Consultado en abril 2021]. Disponible en https://cima.aemps.es/cima/dohtml/p/24408/P_24408.html
<https://cima.aemps.es/cima/publico/nomenclator.html>.
- Aguayo Bonniard A, Yeung JY, Chan CC, Birt CM. Ocular surface toxicity from glaucoma topical medications and associated preservatives such as benzalkonium chloride (BAK). *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2016; 12 (11): 1279-1289.

- Akhtar N, Ahad A, Khan MF, Allaham A, Talegaonkar S. The Ameliorated Pharmacokinetics of VP-16 in Wistar rats: a possible role of P-glycoprotein inhibition by pharmaceutical excipients. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2017; 42 (2): 191-199.
- Al Azzam KM, Muhammad E. Host-guest Inclusion Complexes between Mitiglinide and the Naturally Occurring Cyclodextrins α , β , and γ : A Theoretical Approach. *Adv Pharm Bull*. 2015; 5 (2): 289-291.
- Aldrich DS, Bach CM, Brown W, Chambers W, Fleitman J, Hunt D et al. Ophthalmic preparations. *US Pharmacopeia*. 2013; 39 (5): 1-21.
- Alvarez-Parrilla E, Rosa LA, Torres-Rivas F, Rodrigo-García J, González-Aguilar GA. Complexation of apple antioxidants: chlorogenic acid, quercetin and rutin by β -cyclodextrin (β -CD). *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. 2005; 53 (1): 121-129.
- Amat J. Análisis de la homogeneidad de varianza (homocedasticidad) [Internet]. 2016 [Consultado en noviembre de 2020]. Disponible en: https://www.cienciadedatos.net/documentos/9_homogeneidad_de_varianza_homocedasticidad.html.
- Ambache N. Properties of irin, a physiological constituent of the rabbit's iris. *J Physiol (Lond)* 1957; 135: 114-32.
- American Academy of Ophthalmology [Internet]. AAO. 2016 [Consultado en mayo 2019]. Disponible en: <https://www.aao.org/salud-ocular/anatomia/conducto->

lagrimal y <https://www.aao.org/salud-ocular/anatomia/pelicula-lagrimal>.

- Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* 1995; 12 (3): 413-20.
- Andrés-Guerrero V, Herrero-Vanrell R. Ocular drug absorption by topical route. Role of conjunctiva. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2008; 83 (12): 683-5.
- Arroyo-García CM. Evaluación de nanosistemas lipídicos para coadministración de maleato de timolol y acetazolamida: nueva propuesta en el tratamiento del glaucoma [Internet]. Tesis Doctoral. Sevilla; 2018 [Consultado en mayo 2021]. Disponible en: <https://idus.us.es/handle/11441/77272>.
- Arroyo-García CM, Quinteros D, Palma SD, Jiménez de los Santos CJ, Moyano JR, Rabasco AM, González-Rodríguez ML. Synergistic Effect of Acetazolamide-(2-hydroxy) propyl β -Cyclodextrin in Timolol Liposomes for Decreasing and Prolonging Intraocular Pressure Levels. *Pharmaceutics.* 2021; 13 (12): 2010.
- Attama AA, Reichl S, Müller-Goymann CC. Diclofenac sodium delivery to the eye: in vitro evaluation of novel solid lipid nanoparticle formulation using human cornea construct. *Int J Pharm.* 2008; 355 (1): 307-313.
- Attama AA, Reichl S, Müller-Goymann CC. Sustained release and permeation of timolol from surface-modified solid lipid

- nanoparticles through bioengineered human cornea. *Curr Eye Res.* 2009; 34 (8): 698-705.
- Baena Y, Dallos J Leidy, Manzo RH, Ponce D'León LF. Estandarización de celdas de Franz para la realización de ensayos de liberación de fármacos a partir de complejos con polielectrolitos. *Rev Colomb Cienc Quím Farm.* 2011; 40 (2): 174-188.
 - Baranowski P, Karolewicz B, Gajda M, Pluta J. Ophthalmic drug dosage forms: characterisation and research methods. *Sci World J.* 2014; 2014: 861904
 - Barar J, Asadi M, Mortazavi-Tabatabaei SA, Omid Y. Ocular Drug Delivery; Impact of in vitro Cell Culture Models. *J Ophthalmic Vis Res.* 2009; 4 (4): 238-52.
 - Barbiric DJ, Castro EA, de Rossi RH. A molecular mechanics study of 1:1 complexes between azobenzene derivatives and β -cyclodextrin. *J Mol Struct (Theochem).* 2000; 532 (1): 171-81.
 - Beltrán M, Marcilla A. Tecnología de polímeros. 1st. Alicante: Universidad de Alicante; 2012.
 - Benesi HA, Hildebrand JHJ. A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *J Am Chem Soc.* 1949; 71 (8): 2703-2707.
 - Berson FG, Epstein DL. Separate and Combined Effects of Timolol Maleate and Acetazolamide in Open-Angle Glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 1981; 92 (6): 788-791.

- Bilbao A. Colirios. Panorama Actual Med. 2018; 42 (414): 602-608.
- Bosman IJ, Lawant AL, Avegaart SR, Ensing K. Novel diffusion cell for in vitro transdermal permeation, compatible with automatic dynamic sampling. J Pharm Sci. 1992; 81: 1153–1156.
- BOT Plus Web. Colirios con fosfatos: asociados a opacidades corneales [internet]. Base de Datos de Medicamentos del Consejo General de Colegios Farmacéuticos. 2013 [Consultado en noviembre 2018]. Disponible en: <https://botplusweb.portalfarma.com/documentos/2013/7/23/59076.pdf>.
- Bozdağ S, Gümüş K, Gümüş O, Unlü N. Formulation and in vitro evaluation of cysteamine hydrochloride viscous solutions for the treatment of corneal cystinosis. Eur J Pharm Biopharm. 2008; 70 (1): 260-9.
- Braunger BM, Fuchshofer R, Tamm ER. The aqueous humor outflow pathways in glaucoma: A unifying concept of disease mechanisms and causative treatment. Eur J Pharm Biopharm. 2015; 95 (Part B): 173-181.
- Brown GO. Henry Darcy and the making of a law. Water Resour Res. 2002; 38 (7): 11-1.
- Cagnasso CE, López LB, Binaghi MJ, Pellegrino NR, Valencia ME. Dializabilidad de hierro y zinc en cereales para desayunos comerciales fortificados con hierro elemental, sulfato ferroso y EDTA férrico sódico. Revista chilena de nutrición. 2010; 37 (2): 138-144.

- Cappello B, Carmignani C, Iervolino M, La Rotonda MI, Saettone MF. Solubilization of tropicamide by hydroxypropyl- β -cyclodextrin and water-soluble polymers: in vitro/in vivo studies. *Int J Pharm.* 2001; 213 (1-2): 75-81.
- Carney LG, Hill RM. Human tear pH. Diurnal variations. *Arch Ophthalmol.* 1976; 94 (5): 821-4.
- Cavalcanti IM, Mendonca EA, Lira MC, Honrato SB, Camara CA, Amorim RV et al. The encapsulation of beta-lapachone in 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex into liposomes: a physicochemical evaluation and molecular modeling approach. *Eur J Pharm Sci.* 2011; 44 (3): 332-340.
- Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar RK. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *Aaps Pharmscitech.* 2005; 6 (2): E329-E357.
- Chalumot G, Yao C, Pino V, Anderson JL. Determining the stoichiometry and binding constants of inclusion complexes formed between aromatic compounds and β -cyclodextrin by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2009; 1216 (27): 5242-5248.
- Chattaraj S, Swarbrick J, Kanfer I. A simple diffusion cell to monitor drug release from semi-solid dosage forms. *Int J Pharm.* 2005; 120: 119-124.
- Chmurski K, Stepniak P, Jurczak J. Long-chain-linked β -cyclodextrin dimers: Synthesis and relationship between reactivity and inclusion complex formation. *Carbohydr Polym.* 2016; 15 (138): 8-15.

- Chou DK, Krishnamurthy R, Randolph TW, Carpenter JF, Manning, MC. Effects of Tween 20[®] and Tween 80[®] on the stability of Albutropin during agitation. *J Pharm Sci.* 2005; 94 (6): 1368-1381.
- Chow SC, Chan JCH. Review on the use of topical ocular hypertonic saline in corneal edema. *Cornea.* 2021; 40 (4): 533-539.
- Cirri M, Maestrelli F, Orlandini S, Furlanetto S, Pinzauti S, Mura P. Determination of stability constant values of flurbiprofen-cyclodextrin complexes using different techniques. *J Pharm Biomed.* 2005; 37 (5): 995-1002.
- Concha-Santos S, Pérez-Casas S, Brocos P, Piñeiro Á. Testing the effect of the cavity size and the number of molecular substitutions in host-guest complexes formed by 2-hydroxypropyl-cyclodextrins and n-octyl- β -D-glucopyranoside. *J Chem Thermodyn.* 2013; 67: 112-119.
- Córdoba R, Hernández A. Utilidad de las asociaciones farmacológicas a dosis fijas. *Aten Primaria.* 1998; 21 (4): 186-255.
- Costagliola C, dell'Omo R, Romano MR, Rinaldi M, Zeppa L, Parmeggiani F. Pharmacotherapy of intraocular pressure: part I. Parasympathomimetic, sympathomimetic and sympatholytics. *Expert Opin Pharmacother.* 2009; 10 (16): 2663-77.
- Costanzo LS. *Fisiología.* 4th. España: Elsevier; 2011.

- Crini G. Review: a history of cyclodextrins. *Chem Rev.* 2014; 114 (21): 10940-75.
- Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3 (12): 1023-1035.
- de Melo PN, Barbosa EG, Garnero C, de Caland LB, Fernandes-Pedrosa MF, Longhi MR et al. Interaction pathways of specific co-solvents with hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes with benzimidazole in liquid and solid phase. *J Mol Liq.* 2016; 223: 350-359.
- del Amo EM, Rimpelä AK, Heikkinen E, Kari OK, Ramsay E, Lajunen T, et al. Pharmacokinetic aspects of retinal drug delivery. *Prog Retin Eye Res.* 2017; 57: 134-185.
- del Pilar-Corena M, Van den Hurk P, Zhong H, Brock C, Mowery R, Johnson JV et al. Degradation and effects of the potential mosquito larvicides methazolamide and acetazolamide in sheephead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2006; 64 (3): 369-376.
- Dennington R, Keith T, Millam J. *Gauss View, Version 5.* Semichem Inc., Shawnee Mission, USA; 2009.
- Deokule S, Sadiq S, Shah S. Chronic open angle glaucoma: patient awareness of the nature of the disease, topical medication, compliance and the prevalence of systemic symptoms. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2004; 24 (1): 9-15.

- Díaz JM. Current prevention and glaucoma treatment. Rev méd Clín Las Condes. 2010; 21 (6): 891-900.
- Diaz-Valle D, Arriola-Villalobos P, García-Vidal SE, Sánchez-Pulgarín M, Sanz LB, Gegúndez-Fernández JA et al. Effect of lubricating eyedrops on ocular light scattering as a measure of vision quality in patients with dry eye. J Cataract Refract Surg. 2012; 38 (7): 1192-1197.
- Dive S, Rouland JF, Lenoble Q, Szaffarczyk S, McKendrick AM, Boucart M. Impact of Peripheral Field Loss on the Execution of Natural Actions: A Study with Glaucomatous Patients and Normally Sighted People. J Glaucoma. 2016; 25 (10): e889-e896.
- Dodziuk H, ed. Cyclodextrins and their complexes. Wiley-VCH Verlag, Weinheim. 2006.
- Doménech J, Martínez J, Peraire C. Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética. 1st. Madrid: Síntesis; 2013.
- Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). Ophthalmology. 2013; 120 (9):1778-85.
- Eftink MR, Andy ML, Bystrom K, Perlmutter HD, Kristol DS. Cyclodextrin inclusion complexes: studies of the variation in the size of alicyclic guests. J Am Chem Soc. 1989; 111 (17): 6765-6772.

- Estévez T, Aguilera A, Sáez A, Hardy E. Diseño y validación de una celda de difusión para estudios de liberación in vitro de biomoléculas. *Biotecnología Aplicada*. 2000; 17 (3): 187-190.
- European Medicines Agency (EMA). Azarga Assessment history [Internet]. 2008 [Consultado en julio 2020]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/azarga-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- European Medicines Agency (EMA). ICH M9 guideline on biopharmaceutics classification system-based biowaivers [Internet]. 2018 [Consultado en marzo 2021]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-m9-biopharmaceutics-classification-system-based-biowaivers-step-5_en.pdf.
- European Medicines Agency (EMA). ICH Topic Q 1 A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products [Internet]. 1999 [Consultado en enero 2021]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-products-step-5_en.pdf.
- Farnós G. Manual de Protocolos y Procedimientos Generales de Enfermería [internet]. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba; 2010 [consultado en noviembre 2019]. Disponible en: https://www.sspa.juntadeandalucia.es/servicioandaluzdesalud/hrs3/fileadmin/user_upload/area_enfermeria/enfermeria/procedimientos/procedimientos_2012/rt13_admon_medificacion_ofthalmica.pdf.

- Fathallah M, Fotiadu F, Jaime C. Cyclodextrin Inclusion Complexes. MM2 Calculations Reproducing Bimodal Inclusions. *J Org Chem*. 1994; 59 (6): 1288-93.
- Faulí C, Aroztegui M, Azemar N, Barbe C, Bel E, Muñoz A y col. *Tratado de Farmacia Galénica*. 1st. Madrid. Luzán; 1993.
- Felt O, Furrer P, Mayer JM, Plazonnet B, Buri P, Gurny R. Topical use of chitosan in Fielding L. Determination of association constants (K_a) from solution NMR data. *Tetrahedron*. 2000; 56 (34): 6151-6170.
- Ferrer K, Hernández M, Blanca S, Chacín J, González E, Archile A. Evaluación del rendimiento estudiantil de química analítica en dos planes de estudio. *Educere*. 2011; 15 (52): 651-662.
- Foster PJ, Johnson GJ. Glaucoma in China: how big is the problem? *Br J Ophthalmol*. 2001; 85 (11): 1277-82.
- Freeman PD, Kahook MY. Preservatives in topical ophthalmic medications: historical and clinical perspectives. *Expert Rev Ophthalmol*. 2009; 4 (1): 59-64.
- Frick RW. Accepting the null hypothesis. *Memory & Cognition*. 1995; 23 (1): 132-138.
- Fridriksdóttir H, Loftsson T, Stefánsson E. Formulation and testing of methazolamide cyclodextrin eye drop solutions. *J Control Release*. 1997; 44 (1): 95-99.
- Friend DR. In vitro skin penetration techniques. *Int J Pharm*. 1993; 94: 23–30.

- Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR et al. Gaussian 09, Revision d. 01, Gaussian. Inc., Wallingford CT; 2009, vol. 201.
- Fukuda M, Sasaki H. The transcorneal penetration of commercial ophthalmic formulations containing timolol maleate in rabbit eyes. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2015; 31 (1): 57-60.
- Gallardo C, Rojas JJ, Flórez OA. La temperatura cinética media en los estudios de estabilidad a largo plazo y almacenamiento de los medicamentos [internet]. *Vitae.* 2004; 11 (1): 67-72 [consultado en mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=1698/169818259009>.
- García-Feijóo J, Pablo-Júlvez LE. Manual de oftalmología. España: Elsevier; 2012.
- García-Sánchez J, García-Feijóo J, Honrubia FM, Pablo L. Diagnóstico y tratamiento del glaucoma de ángulo abierto. LXXXIX Ponencia Oficial de la Sociedad Española de Oftalmología. Tenerife. 2013; 282-291.
- Garcia-Valldecabres M, López-Alemaný A, Refojo MF. pH stability of ophthalmic solutions. *Optometry.* 2004; 75 (3): 161-168.
- Gavrilin MV, Kompantseva EV, Gusova BA, Ushakova LS, Makarov VA, Karpenya LI. Dexamethasone eye drops based on the products of its interaction with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: synthesis and study. *Pharm Chem J.* 1999; 33 (3): 160-163.

- George D, Mallery P. IBM SPSS statistics 26 step by step: A simple guide and reference. Routledge. USA; 2019.
- Ghadi R, Dand N. BCS class IV drugs: Highly notorious candidates for formulation development. J Control Release. 2017; 248: 71-95.
- González M, Esteban H. Formulación magistral en Oftalmología. En: Piñeiro-Corrales G, coordinadora. Aspectos prácticos de la farmacotecnia en un servicio de farmacia. Situación actual. 1ª edición. Madrid: Master Line & Prodigio, S.L.; 2011. p.245-274.
- Gooch N, Molokhia SA, Condie R, Burr RM, Archer B, Ambati BK et al. Ocular Drug Delivery for Glaucoma Management. Pharmaceutics. 2012; 4 (1): 197-211.
- Granero GE, Longhi MR. Promising complexes of acetazolamide for topical ocular administration. Expert Opin Drug Deliv. 2010; 7 (8): 943-953.
- Granero GE, Maitre MM, Garnero C, Longhi MR. Synthesis, characterization and in vitro release studies of a new acetazolamide-HP- β -CD-TEA inclusion complex. Eur J Med Chem. 2008; 43 (3): 464-470.
- Grit M, Crommelin DJ. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. Chem Phys Lipids. 1993; 64 (1-3): 3-18.
- Gugleva V, Titeva S, Rangelov S, Momekova D. Design and in vitro evaluation of doxycycline hyclate niosomes as a potential ocular delivery system. Int J Pharm. 2019; 567: 118431.

- Guinedi AS, Mortada ND, Mansour S, Hathout RM. Preparation and evaluation of reverse-phase evaporation and multilamellar niosomes as ophthalmic carriers of acetazolamide. *Int J Pharm.* 2005; 306 (1-2): 71-82.
- Gupta D, Chen PP. Glaucoma. *Am Fam Physician.* 2016; 93 (8): 668-674.
- Hämäläinen KM, Kananen K, Auriola S, Kontturi K, Urtti A. Characterization of paracellular and aqueous penetration routes in cornea, conjunctiva, and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38 (3): 627-34.
- Hämäläinen KM, Kontturi K, Auriola S, Murtomäki L, Urtti A. Estimation of pore size and pore density of biomembranes from permeability measurements of polyethylene glycols using an effusion-like approach. *J Control Release.* 1997; 49 (2-3): 97-104.
- Hassib ST, Elkady EF, Sayed RM. Simultaneous determination of timolol maleate in combination with some other anti-glaucoma drugs in rabbit aqueous humor by high performance liquid chromatography–tandem mass spectroscopy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016; 1022: 109-117.
- Hazai E, Hazai I, Demko L, Kovacs S, Malik D, Akli P, Hari P, Szeman J, Fenyvesi E, Benes E, Szenté L, Bikadi Z. Cyclodextrin KnowledgeBase a web-based service managing CD-ligand complexation data. *J Comput Aided Mol Des.* 2010; 24 (8):713-7.

- Henderer JD, Rapuano CJ. Farmacología ocular. En: Brunton LL, editor. Goodman&Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 11ª ed. México: Mc Graw Hill; 2007. p. 1707-1737.
- Herrero-Vanrell R. Aspectos biofarmacéuticos y farmacocinéticos en oftalmología. Formas farmacéuticas oftálmicas. Nuevas formulaciones de administración ocular [internet]. Farmacología Ocular. 2007 [Consultado en enero 2019]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/329905962/Cap-02-Aspectos-Biofarmaceuticos-y-Farmacocineticos-en-Oftalmologia-Formas-Farmaceuticas-Oftalmicas-Nuevas-Formulaciones-de-Administracion-Ocular>.
- Higashiyama M, Inada K, Ohtori A, Tojo K. Improvement of the ocular bioavailability of timolol by sorbic acid. Int J Pharm. 2004; 272 (1-2): 91-98.
- Higuchi T, Connors KA. Phase Solubility Techniques. Adv Anal Chem Instrum. 1965; 4: 117-212.
- Holly FJ, Lemp MA. Tear physiology and dry eyes. Surv Ophthalmol. 1977; 22: 69-81.
- HyperChem™ Professional 8.0.8, Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, FL 32601, USA. Disponible en: <http://www.hyper.com/> (último acceso: 11 de junio de 2016).
- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use [internet]. Biopharmaceutics classification system-based. 2018 [Consultado en abril 2019]. Disponible en:

https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M9/M9EWG_DraftGuideline_Step2_2018_0606.pdf.

- Irimia T, Ghica MV, Popa L, Anuța V, Arsene AL, Dinu-Pîrvu CE. Strategies for Improving Ocular Drug Bioavailability and Corneal Wound Healing with Chitosan-Based Delivery Systems. *Polymers (Basel)*. 2018; 10 (11): E1221.
- Jacobi U, Taube H, Schäfer UF, Sterry W, Lademann J. Comparison of four different in vitro systems to study the reservoir capacity of the stratum corneum. *J Control Release*. 2005; 103 (1): 61-71.
- Jaén Díaz J, Sanz Alcolea I, López De Castro F, Pérez Martínez T, Ortega Campos P, Corral Morales R. Glaucoma and ocular hypertension in primary care. *Aten Primaria*. 2001; 28 (1): 23-30.
- Jambhekar SS, Breen P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. *Drug Discov Today*. 2016; 21 (2): 356-362
- Jansook P, Hnin HM, Loftsson T, Stefánsson E. Cyclodextrin-based formulation of carbonic anhydrase inhibitors for ocular delivery—A review. *Int J Pharm*. 2021; 606: 120955.
- Jansook P, Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins as solubilizers: formation of complex aggregates. *J Pharm Sci*. 2010; 99 (2): 719-729.

- Jansook P, Stefánsson E, Thorsteinsdóttir M, Sigurdsson BB, Kristjánssdóttir SS, Bas JF, et al. Cyclodextrin solubilization of carbonic anhydrase inhibitor drugs: Formulation of dorzolamide eye drop microparticle suspension. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010; 76 (2): 208-214.
- Jumelle C, Gholizadeh S, Annabi N, Dana R. Advances and limitations of drug delivery systems formulated as eye drops. *J Control Release.* 2020; 321: 1-22.
- Jung HJ, Abou-Jaoude M, Carbia BE, Plummer C, Chauhan A. Glaucoma therapy by extended release of timolol from nanoparticle loaded silicone-hydrogel contact lenses. *J Control Release.* 2013; 165 (1): 82-89.
- Jyothi NV, Prasanna PM, Sakarkar SN, Prabha KS, Ramaiah PS, Srawan GY. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J Microencapsul.* 2010; 27 (3): 187-97.
- Kalepu S, Nekkanti V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm Sin B.* 2015; 5 (5): 442-453.
- Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo M, Lennernäs H, Hussain AS et al. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol Pharm.* 2004; 1 (1): 85-96.
- Kass MA, Korey M, Gordon M, Becker B. Timolol and acetazolamide: a study of concurrent administration. *Arch Ophthalmol.* 1982; 100 (6): 941-942.

- Kaur IP, Kanwar M. Ocular preparations: the formulation approach. *Drug Dev Ind Pharm.* 2002; 28 (5): 473-493.
- Kaur IP, Kapil M, Smitha R, Aggarwal D. Development of topically effective formulations of acetazolamide using HP- β -CD-polymer co-complexes. *Curr Drug Deliv.* 2004; 1 (1): 65-72.
- Kaur IP, Singh M, Kanwar M. Formulation and evaluation of ophthalmic preparations of acetazolamide. *Int J Pharm.* 2000; 199 (2): 119-127.
- Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutic. *Int J Pharm.* 2002; 248 (1-2): 1-14.
- Kaur IP, Smitha R. Penetration enhancers and ocular bioadhesives: two new avenues for ophthalmic drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm.* 2002; 28 (4): 353-369.
- Kazi KM, Mandal AS, Biswas N, Guha A, Chatterjee S, Behera M et al. Niosome: a future of targeted drug delivery systems. *J Adv Pharm Technol Res.* 2010; 1 (4): 374.
- Kfoury M, Landy D, Fourmentin S. Characterization of cyclodextrin/volatile inclusion complexes: a review. *Molecules.* 2018; 23 (5): 1204.
- Kompella UB, Kadam RS, Lee VH. Recent advances in ophthalmic drug delivery. *Therapeutic delivery.* 2010; 1 (3): 435-456.

- Kulkarni SP, Amin PD. Stability indicating HPTLC determination of timolol maleate as bulk drug and in pharmaceutical preparations. *J Pharm Biomed Anal.* 2000; 23 (6): 983-987.
- Kunka RL, Mattocks AM. Nonlinear model for acetazolamide. *J Pharm Sci.* 1979; 68 (3): 342-346.
- Kuntz Jr ID, Gasparro FP, Johnston Jr MD, Taylor RP. Molecular interactions and the Benesi-Hildebrand equation. *J Am Chem Soc.* 1968; 90 (18): 4778-4781.
- Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins. *Int J Pharm.* 2013; 453: 167-180.
- Lafita Llorca CJ. Estudio galénico de los medicamentos utilizados en España para el tratamiento del Glaucoma. 2018.
- Lambert RJ, Hanlon GW, Denyer SP. The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol.* 2004; 96 (2): 244-53.
- Lang JC. Ocular drug delivery conventional ocular formulations. *Advanced drug delivery reviews.* 1995; 16 (1): 39-43.
- Larsen KL. Inclusion Phenom. *Macrocyclic Chem.* 2002; 43: 1–13.
- Laschet M, Plog JP, Clasen C, Kulicke, WM. Examination of the flow behaviour of HEC and hmHEC solutions using structure–property relationships and rheo-optical methods. *Colloid Polym Sci.* 2004; 282 (4): 373-380.
- Lavik E, Kuehn MH, Kwon YH. Novel drug delivery systems for glaucoma. *Eye.* 2011; 25: 578-586.

- Leccisotti A, Islam T. Transepithelial corneal collagen cross-linking in keratoconus. *J Refract Surg.* 2010; 26 (12): 942-948.
- Lee KY, Shim J, Lee HG. Mechanical properties of gellan and gelatin composite films. *Carbohydrate Polymers.* 2004; 56 (2): 251-254.
- Lee VH, Robinson JR. Mechanistic and quantitative evaluation of precorneal pilocarpine disposition in albino rabbits. *J Pharm Sci.* 1979; 68 (6): 673-84.
- Leila N, Sakina H, Bouhadiba A, Madi F. Theoretical study of inclusion complexation of 3-amino-5-nitrobenzisothiazole with β -cyclodextrin. *J Mol Liq.* 2011; 160 (1): 8-13.
- Li P, Song J, Ni X, Guo Q, Wen H, Zhou Q et al. Comparison in toxicity and solubilizing capacity of hydroxypropyl- β -cyclodextrin with different degree of substitution. *J Pharm.* 2016; 20: 347-356.
- Lim LT, Ah-kee EY, Collins CE. Common eye drops and their implications for pH measurements in the management of chemical eye injuries. *Int J Ophthalmol.* 2014; 7 (6): 1067-1068.
- Linden C, Alm A. Prostaglandin analogues in the treatment of glaucoma. *Drugs Aging.* 1999 May; 14 (5): 387-98.
- Lipkowitz KB. Applications of computational chemistry to the study of cyclodextrins. *Chemical reviews.* 1998; 98 (5): 1829-1874.

- Liu Y, Liu J, Zhang X, Zhang R, Huang Y, Wu C. In situ gelling gelrite/alginate formulations as vehicles for ophthalmic drug delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2010; 11 (2): 610-20.
- Loch C, Zakelj S, Kristl A, Nagel S, Guthoff R, Weitschies W et al. Determination of permeability coefficients of ophthalmic drugs through different layers of porcine, rabbit and bovine eyes. *Eur J Pharm Sci*. 2012; 47 (1): 131-138.
- Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. *J Pharm Pharmacol*. 2011; 63 (9): 1119-1135.
- Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: 1. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci*. 1996; 85 (10): 1017-1025.
- Loftsson T, Fri H, Gu TK. The effect of water-soluble polymers on aqueous solubility of drugs. *Int J Pharm*. 1996; 127 (2): 293-296.
- Loftsson T, Friðriksdóttir H, Thórisdóttir S, Stefánsson E, Sigurðardóttir AM, Guðmundsson Ö et al. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin in topical carbonic anhydrase inhibitor formulations. *Eur J Pharm Sci*. 1994; 1 (4): 175-180.
- Loftsson T, Hreinsdóttir D, Mátsson M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int J Pharm*. 2005; 302 (1-2): 18-28.
- Loftsson T, Järvinen T. Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 1999; 36 (1): 59-79.

- Loftsson T, Magnúsdóttir A, Másson M, Sigurjónsdóttir JF. Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs. *J Pharm Sci.* 2002; 91 (11): 2307-2316.
- Loftsson T, Moya-Ortega MD, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A. Pharmacokinetics of cyclodextrins and drugs after oral and parenteral administration of drug/cyclodextrin complexes. *J Pharm Pharmacol.* 2016; 68 (5): 544-555.
- Loftsson T, Stefánsson E. Cyclodextrins in eye drop formulations: enhanced topical delivery of corticosteroids to the eye. *Acta Ophthalmol Scand.* 2002; 80 (2): 144-150.
- Loh G, Tan Y, Peh K. Enhancement of norfloxacin solubility via inclusion complexation with β -cyclodextrin and its derivative hydroxypropyl- β cyclodextrin. *Asian J Pharm.* 2016; 11 (4): 536-546.
- Lotfy HM, Hegazy MA, Rezk MR, Omran YR. Novel spectrophotometric methods for simultaneous determination of timolol and dorzolamide in their binary mixture. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2014; 126: 197-207.
- Lozano MC, Córdoba D, Córdoba M. Manual de tecnología farmacéutica. España: Elsevier; 2012.
- Ludwig A, Van Ooteghem M. The study of the precorneal dynamics of ophthalmic solutions by fluorophotometry. *Pharm Acta Helv.* 1986; 61 (8): 236-240.
- Lundblad RL, Macdonald F. Handbook of biochemistry and molecular biology. Crc Press. 2018.

- Machatha SG, Yalkowsky SH. Comparison of the octanol/water partition coefficients calculated by ClogP[®], ACDlogP and KowWin[®] to experimentally determined values. *Int J Pharm.* 2005; 294 (1-2): 185-192.
- Majumdar S, Hingorani T, Srirangam R. Evaluation of active and passive transport processes in corneas extracted from preserved rabbit eyes. *J Pharm Sci.* 2010; 99 (4): 1921-30.
- Manchanda S, Sahoo PK, Majumdar DK. Effect of formulation factors on transcorneal permeation of acetazolamide from aqueous drops: in vitro and in vivo study. *Asian J Pharm*, 2016; 10: 177-182.
- Maren TH, Conroy CW. A new class of carbonic anhydrase inhibitor. *J Biol Chem.* 1993; 268 (35): 26233-9.
- Martín del Valle EM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* 2004; 39 (9):1033-46
- Maurandi-López A, Del Río Alonso L, González-Vidal A, Ferre Jaén ME, Hernández Vicente A. Fundamentos Estadísticos para Investigación. Introducción a R y Modelos. Zenodo. 2019.
- McMonnies CW. Glaucoma history and risk factors. *J Optom.* 2017; 10 (2): 71-78.
- Merchel Piovesan Pereira B, Tagkopoulos I. Benzalkonium chlorides: uses, regulatory status, and microbial resistance. *Appl Environ Microbiol.* 2019; 85 (13): e00377-19.
- Merck Sharp & Dohme (MSD) manual Consumer Version. Drug Administration [Internet]. [Consultado en julio 2019].

- Disponible en <https://www.msmanuals.com/home/drugs/administration-and-kinetics-of-drugs/drug-administration>.
- Merck Sharp & Dohme (MSD) manual Consumer Version. Overview of Optic Nerve Disorders [Internet]. [Consultado en julio 2019]. Disponible en <https://www.merckmanuals.com/home/eye-disorders/optic-nerve-disorders/overview-of-optic-nerve-disorders>.
 - Mishra GP, Bagui M, Tamboli V, Mitra AK. Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *J Drug Deliv.* 2011; 2011: 863734.
 - Mohamed AM, Abdel-Wadood HM, Mousa HS. Simultaneous determination of dorzolomide and timolol in aqueous humor: A novel salting out liquid–liquid microextraction combined with HPLC. *Talanta.* 2014; 130: 495-505.
 - Montés-Micó R, Cerviño A, Ferrer-Blasco T, García-Lázaro S, Ortí-Navarro S. Optical quality after instillation of eyedrops in dry-eye syndrome. *J Cataract Refract Surg.* 2010; 36 (6): 935-940.
 - Mora MJ, Petiti JP, Longhi MR, Torres AI, Granero GE. Intestinal uptake and toxicity evaluation of acetazolamide and its multicomponent complexes hidroxypropyl- β - cyclodextrin in rats. *Int J Pharm.* 2015; 478 (1): 258-267.
 - Mora MJ, Tártara LI, Onnainty R, Palma SD, Longhi MR, Granero GE. Characterization, dissolution and in vivo evaluation of solid

acetazolamide complexes. *Carbohydr Polym.* 2013; 98 (1): 380-390.

- Morillo E, Sánchez-Trujillo MA, Moyano JR, Villaverde J, Gómez-Pantoja ME, Pérez-Martínez JI. Enhanced solubilisation of six PAHs by three synthetic cyclodextrins for remediation applications: Molecular modelling of the inclusion complexes. *PLoS ONE.* 2012; 7 (9): e44137.
- Morsi NM, Mohamed MI, Refai H, El Sorogy HM. Nanoemulsion as a novel ophthalmic delivery system for acetazolamide. *Int J Pharm Nanoemulsion Sci.* 2014; 6 (11): 227-36.
- Moyano JR, Ginés JM, Arias-Blanco MJ, Rabasco AM. Utilidad de ciclodextrinas y derivados en el campo farmacéutico. *Industria Farmacéutica.* 1994.
- Muller BW, Brauns U. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin derivatives: Influence of average degree of substitution on complexing ability and surface activity. *J Pharm Sci.* 1986; 75 (6): 571-572.
- Nagarwal RC, Kant S, Singh PN, Maiti P, Pandit JK. Polymeric nanoparticulate system: a potential approach for ocular drug delivery. *J Control Release.* 2009; 136 (1): 2-13.
- Nakanishi H, Nagahiro S, Mitarai N. Fluid dynamics of dilatant fluids. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 2012; 85 (1 Pt 1): 011401.
- National Eye Institute (NIH) [Internet]. Glaucoma Data and Statistics [Consultado en abril 2019]. Disponible en:

<https://nei.nih.gov/learn-about-eye-health/resources-for-health-educators/eye-health-data-and-statistics/glaucoma-data-and-statistics>.

- Nema S, Brendel RJ, Washkuhn RJ. Excipients - their role in parenteral dosage forms. En: Swarbrick J ed. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 3ª ed. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002. pp. 1164–1187.
- Nordstokke DW, Zumbo BD. A new nonparametric Levene test for equal variances. *Psicológica*. 2010; 31 (2): 401-430.
- Obiedallah MM, Abdel-Mageed AM, Elfaham TH. Ocular administration of acetazolamide microsponges in situ gel formulations. *Saudi Pharm J*. 2018; 26 (7): 909-920.
- Organización Mundial de la Salud. Ceguera y discapacidad visual [Internet]. OMS, cop. 2022 [Consultado en diciembre 2022]. Disponible en. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/blindness-and-visual-impairment>.
- Palma SD, Tártara LI, Quinteros D, Allemandi DA, Longhi MR, Granero GE. An efficient ternary complex of acetazolamide with HP- β -CD and TEA for topical ocular administration. *J Control Release*. 2009; 138 (1): 24-31.
- Parasrampur J, Gupta VD. Preformulation studies of acetazolamide: effect of pH, two buffer species, ionic strength, and temperature on its stability. *J Pharm Sci*. 1989; 78 (10): 855-7.

- Parmar V, Patel G, Abu-Thabit NY. Responsive cyclodextrins as polymeric carriers for drug delivery applications. En: Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications, Volume 1. Woodhead Publishing, 2018. p. 555-580.
- Pattni BS, Chupin VV, Torchilin VP. New Developments in Liposomal Drug Delivery. Chem Rev. 2015; 115 (19): 10938-66.
- Peng A, Pisal DS, Doty A, Balu-Iyer SV. Phosphatidylinositol induces fluid phase formation and packing defects in phosphatidylcholine model membranes. Chem Phys Lipids. 2012; 165 (1): 15-22.
- Pérez-Barrales MJ, Díaz-Estévez F, Ginés JM, Moyano JR, Arias MJ, Rabasco AM. Inclusion compound of acetazolamide with different cyclodextrins in liquid and solid state. In Proceedings 7th International Conference on Pharmaceutical Technology, Budapest. 1995; 613-614.
- Pfeiffer N. Dorzolamide: Development and Clinical Application of a Topical Carbonic Anhydrase Inhibitor. Surv Ophthalmol. 1997; 42 (2): 137-151.
- Pînzaru IA, Hădărugă DI, Hădărugă NG, Peter F. Rutin-saturated fatty acid bioconjugate/cyclodextrin supramolecular systems: molecular modelling. J Agroaliment Proc Technol. 2011; 17 (2):123-9.
- Prausnitz MR, Noonan JS. Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye. J Pharm Sci. 1998; 87 (12): 1479-88.

- Qian Y, Wang F, Li R, Zhang Q, Xu Q. Preparation and evaluation of in situ gelling ophthalmic drug delivery system for methazolamide. *Drug Dev Ind Pharm.* 2010; 36 (11): 1340-7.
- Qin F, Zeng L, Zhu Y, Cao J, Wang X, Liu W. Preparation and evaluation of a timolol maleate drug-resin ophthalmic suspension as a sustained-release formulation in vitro and in vivo. *Drug Dev Ind Pharm.* 2016; 42 (4): 535-545.
- Quinteros DA, Ferreira LM, Schaffazick SR, Palma SD, Allemanni DA, Cruz L. Novel polymeric nanoparticles intended for ophthalmic administration of acetazolamide. *J Pharm Sci.* 2016; 105 (10): 3183-3190.
- Ramsay E, del Amo EM, Toropainen E, Tengvall-Unadike U, Ranta VP, Urtti A, Ruponen M. Corneal and conjunctival drug permeability: Systematic comparison and pharmacokinetic impact in the eye. *Eur J Pharm Sci.* 2018; 119: 83-89.
- Rathore KS. Development and in vivo in vitro characterizations of timolol maleate in situ gels. *Int J Pharma Bio Sci.* 2011; 2 (3): 248-263.
- Real Farmacopea Española. 5th. España: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 2015.
- Reiss WG, Oles KS. Acetazolamide in the treatment of seizures. *Ann Pharmacother.* 1996; 30 (5): 514-519.
- Remko M, von der Lieth CW. Theoretical study of gas-phase acidity, pKa, lipophilicity, and solubility of some biologically

active sulfonamides. *Bioorg Med Chem.* 2004; 12 (20): 5395-5403.

- Rodríguez I, Vázquez JA, Pastrana L, Khutoryanskiy VV. Enhancement and inhibition effects on the corneal permeability of timolol maleate: Polymers, cyclodextrins and chelating agents. *Int J Pharm.* 2017; 529 (1-2): 168-177.
- Rodríguez Vignoli, J. Segregación residencial socioeconómica: ¿qué es?, ¿cómo se mide?, ¿qué está pasando?, ¿importa? Cepal. 2001.
- Rowe R, Sheskey P, Cook W, Fenton, M. *Handbook of Pharmaceutical Excipients.* 7th ed. London: Pharmaceutical Press; 2012.
- Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: an update review. *Curr Drug Deliv.* 2007; 4 (4): 297-305
- Sampieri RH. *Metodología de la investigación: las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta.* McGraw Hill. México; 2018.
- Saokham P, Muankaew C, Jansook P, Loftsson T. Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes. *Molecules.* 2018; 23 (5): 1161.
- Sasaki H, Igarashi Y, Nagano T, Nishida K, Nakamura J. Different effects of absorption promoters on corneal and conjunctival penetration of ophthalmic beta-blockers. *Pharm Res.* 1995; 12 (8): 1146-50.
- Sasaki H, Yamamura K, Mukai T, Nishida K, Nakamura J, Nakashima M et al. Modification of ocular permeability of

- peptide drugs by absorption promoters. *Biol Pharm Bull.* 2000; 23 (12): 1524-1527.
- Schlick T. *Molecular modeling and simulation: an interdisciplinary guide* (Vol. 2). New York: Springer. 2010.
 - Schöffner JDN, Matte CR, Charqueiro DS, de Menezes EW, Costa TMH, Benvenuti EV et al. Effects of immobilization, pH and reaction time in the modulation of α -, β - or γ -cyclodextrins production by cyclodextrin glycosyltransferase: Batch and continuous process. *Carbohydr Polym.* 2017; 169: 41-49.
 - Schuerer N, Stein E, Inic-Kanada A, Pucher M, Hohenadl C, Bintner N et al. Implications for ophthalmic formulations: ocular buffers show varied cytotoxic impact on human corneal-Limbal and human Conjunctival epithelial cells. *Cornea.* 2017; 36 (6): 712.
 - Scott RL. Some comments on the Benesi-Hildebrand equation. *Recl Trav Chim Pays-Bas.* 1956; 75 (7): 787-789.
 - Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika.* 1965; 52 (3/4): 591-611.
 - Sigurdsson HH, Stefánsson E, Gudmundsdóttir E, Eysteinnsson T, Thorsteinsdóttir M, Loftsson T. Cyclodextrin formulation of dorzolamide and its distribution in the eye after topical administration. *J Control Release.* 2005; 102 (1): 255-262.
 - Singh R. Characterization of cyclodextrin inclusion complexes-A review. *J Pharm Sci.* 2010; 2 (3): 171-183.

- Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH). Controles de calidad en la preparación de colirios antiinfecciosos extemporáneos preparados en un servicio de farmacia [internet]. 2009 [Consultado en mayo 2019]. Disponible en: <https://www.sefh.es/54congresoInfo/documentos/ponencias/103.pdf>.
- Sociedad Española de Oftalmología [internet]. Catarata. [Consultado en mayo 2019]. Disponible en: <https://www.oftalmoseo.com/patologias-frecuentes-2/catarata/#>.
- Srinivasu P, Subbarao DV, Vegesna RV, Sudhakar Babu K. A validated stability-indicating LC method for acetazolamide in the presence of degradation products and its process-related impurities. *J Pharm Biomed Anal.* 2010; 52 (1): 142-8
- Stella VK, Rajewsky R. Derivatives of cyclodextrins exhibiting enhanced aqueous solubility and the use thereof. US Patent 5,376,645, 1994.
- Suhonen P, Jarrinen T, Peura P and Urtti A. Permeability of pilocarpic acid diesters across albino rabbit cornea in vitro. *Int J Pharm.* 1991; 74 (2-3): 221–228.
- Szejtli J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem Rev.* 1998; 98 (5): 1743-54.
- Szejtli J. Past, present and future of cyclodextrin research. *Pure Appl Chem.* 2004; 76 (10): 1825-1845.

- Tan G, Yu S, Pan H, Li J, Liu D, Yuan K, et al. Bioadhesive chitosan-loaded liposomes: a more efficient and higher permeable ocular delivery platform for timolol maleate. *Int J Biol Macromol.* 2017; 94: 355-363.
- Tártara LI, Quinteros DA, Saino V, Allemandi DA, Palma SD. Improvement of acetazolamide ocular permeation using ascorbyl laurate nanostructures as drug delivery system. *J Ocul Pharmacol.* 2012; 28 (2): 102-109
- Tártara LI. Efecto del sistema portador sobre la biodisponibilidad intraocular de fármacos [Internet]. 2013 [consultado en marzo 2021]. Disponible en: http://lildbi.fcm.unc.edu.ar/lildbi/tesis/tartara_luis_ignacio.pdf.
- Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, Diaper C, McFadyen A. Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47 (10): 4309-15.
- Tønnesen HH, Måsson M, Loftsson T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *Int J Pharm.* 2002; 244 (1-2): 127-135.
- Uekama K, Hirayama F, Irie T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chem Rev.* 1998; 98 (81): 2045-76.
- Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006; 58 (11): 1131-5.

- Valencia C, Tobón E, Castaño C. Acetazolamide as a singlet molecular oxygen quencher. *J Photochem Photobiol A: Chem.* 2013; 251: 113-117.
- Van Santvliet L, Ludwig A. Determinants of eye drop size. *Surv Ophthalmol.* 2004; 49 (2): 197-213.
- Vargas F, Hisbeth MV, Rojas JK. Photolysis and photosensitized degradation of the diuretic drug acetazolamide. *J Photochem Photobiol A: Chem.* 1998; 118 (1): 19-23.
- Villarino N, Landoni M. Administración transdérmica de fármacos: Una alternativa terapéutica, *Analecta Vet.* 2006; 26 (1): 28-37.
- Von Weber A. Die ursache des glaukoms. *Albr Graefes Arch Ophthalmol* 1877; 23:91-4
- Wanare RS, Kabra AO, Deshmukh A, Aher N. Simultaneous estimation of dorzolamide hydrochloride and timolol maleate in eye drops by a RP-HPLC method. *Pharmacie Globale.* 2012; 3 (2): 1-4.
- Wang R, Yu Z. Validity and reliability of Benesi-Hildebrand method. *Acta Phys-Chim Sin.* 2007; 23 (9): 1353-1359.
- Wei G, Xu H, Ma Y, Li S. M, Zheng JM. Effect of pH on the permeability of timolol maleate across isolated rabbit cornea. *Acta Pharm Sin.* 2001; 36 (9): 707-710.
- Weinreb RN, Friedman DS, Fechtner RD, Cioffi GA, Coleman AL, Girkin CA, et al. Risk assessment in the management of patients

- with ocular hypertension. *Am J Ophthalmol*. 2004; 138 (3): 458-67.
- Wermuth CG. Designing prodrugs and bioprecursors. In *The practice of medicinal chemistry*. Academic Press. 2008; 721-746.
 - Wilson DI. What is rheology? *Eye (Lond)*. 2018; 32 (2): 179–183.
 - Xi J, Chang Q, Chan CK, Meng ZY, Wang GN, Zheng Y et al. Formulation development and bioavailability evaluation of a self-nanoemulsified drug delivery system of oleanolic acid. *Aaps Pharmscitech*. 2009; 10 (1): 172-182.
 - Yang Y, Faustino PJ, Volpe DA, Ellison CD, Lyon RC, Yu LX. Biopharmaceutics classification of selected β -blockers: solubility and permeability class membership. *Mol Pharm*. 2007; 4 (4): 608-614.
 - Yellepeddi VK, Palakurthi S. Recent Advances in Topical Ocular Drug Delivery. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2016; 32 (2): 67-82.
 - Zhang J, Ma PX. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective, *Adv Drug Deliv*. 2013; 65: 1215–1233.
 - Zhu H, Chauhan A. Effect of viscosity on tear drainage and ocular residence time. *Optom Vis Sci*. 2008; 85 (8): 715-25.
 - Zignani M, Tabatabay C, Gurny R. Topical semi-solid drug delivery: kinetics and tolerance of ophthalmic hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev*. 1995; 16 (1): 51-60.

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ACETAZOLAMIDA/HP- β -CICLODEXTRINA.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UN COLIRIO TIPO SOLUCIÓN**

- Zimmerman TJ, Kooner KS, Kandarakis, AS, Ziegler LP. Improving the therapeutic index of topically applied ocular drugs. Arch Ophthalmol. 1984; 102 (4): 551-553.