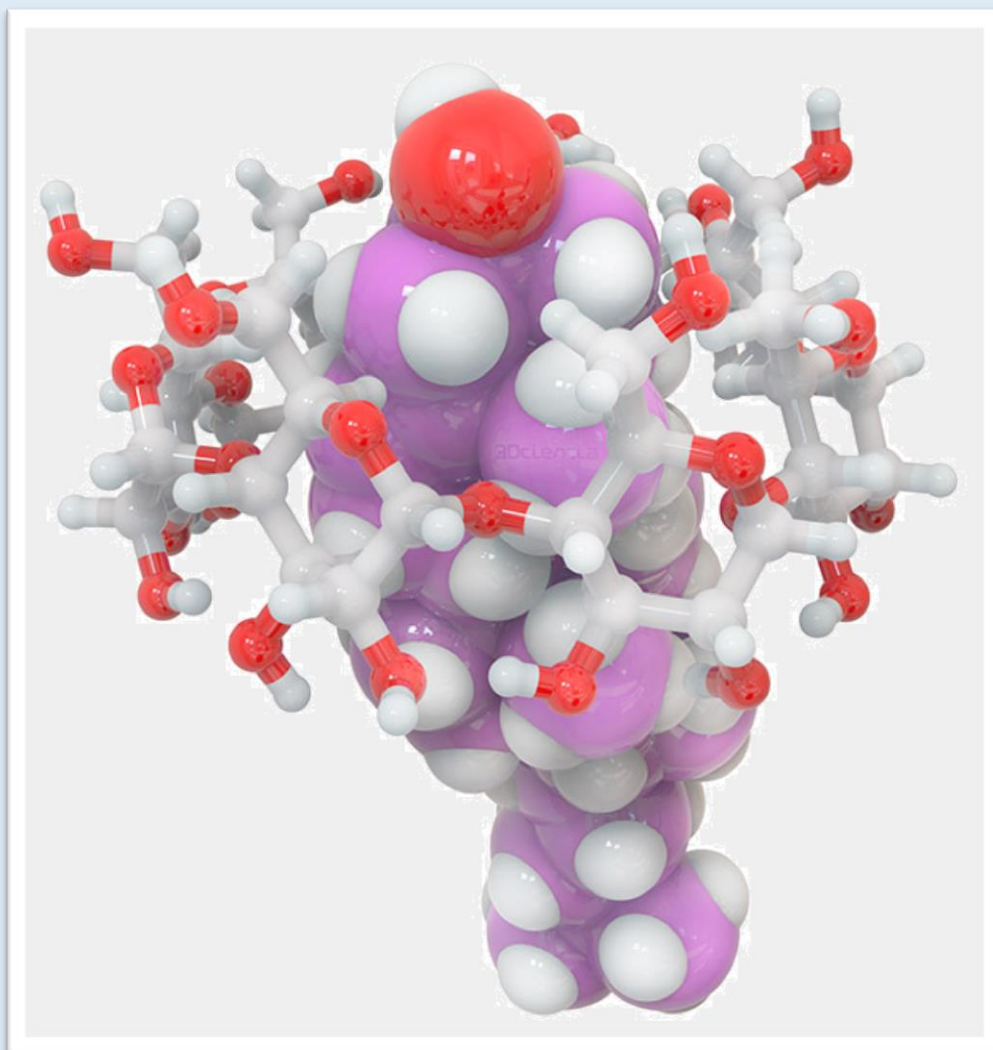




TFG

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD FRENTE A LA TEMPERATURA
DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN
ACETAZOLAMIDA/HIDROXIPROPIL-BETA-CICLODEXTRINA



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

FRANCISCO JOSÉ GARRIDO GAMBOA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

TRABAJO DE FIN DE GRADO DEL GRADO EN FARMACIA PROMOCIÓN
2011/2016

TÍTULO: ESTUDIOS DE ESTABILIDAD FRENTE A LA TEMPERATURA DEL COMPLEJO DE
INCLUSIÓN ACETAZOLAMIDA / HIDROXIPROPIL-BETA-CICLODEXTRINA

PROYECTO TIPO EXPERIMENTAL

FRANCISCO JOSÉ GARRIDO GAMBOA

Lugar de presentación: Aula 0.4.

Fecha de presentación: 6 julio 2016

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

TUTELADO POR EL DOCTOR: JOSÉ IGNACIO PÉREZ MARTÍNEZ

RESUMEN

Acetazolamida (ACZ) es un fármaco inhibidor de la anhidrasa carbónica, utilizado principalmente para el tratamiento del glaucoma. Esta patología es la segunda causa de ceguera a nivel mundial. De momento, el tratamiento con ACZ solo es posible por vía oral. Debido a su baja solubilidad, no existen en el mercado otras formas farmacéuticas. Éste fármaco presenta diferencia en la biodisponibilidad entre individuos. Para el posible desarrollo de una formulación oftálmica de ACZ, hay que buscar formas de mejorar la solubilidad de este principio activo. Para ello se ensaya con el uso de ciclodextrina (CD), en concreto con la hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP- β -CD), que forma un complejo de inclusión con ACZ mejorando su solubilidad, estabilidad y toxicidad. Posteriormente, hay que tener en cuenta los requisitos y los ensayos que necesitan las formulaciones oftálmicas, y más en concreto los colirios. Es fundamental llevar a cabo estudios de estabilidad tanto del fármaco, como de los complejos que forma con ciclodextrina, para ver cómo se degradan con el tiempo a diferentes temperaturas. En el ensayo acelerado se estudiaron 3 lotes de 2 formulaciones diferentes, una con ACZ y otra con HP- β -CD y ACZ durante 6 meses. La cantidad de fármaco presente en los viales se cuantificó por HPLC de fase reversa. Mediante su representación, se determinó que ACZ presenta una cinética de degradación de primer orden, la cual sufre un metabolismo de hidrólisis. Aplicando la ecuación de Arrhenius, el cálculo de la energía de activación para la reacción de degradación fue aproximadamente 27 kcal/mol. Al analizar el ensayo acelerado realizado, obtuvimos que la presencia de ciclodextrina reduce la degradación que sufre ACZ a las temperaturas ensayadas.

Palabras clave: acetazolamida, hidroxipropil-beta ciclodextrinas, ensayo de estabilidad acelerado, colirios.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. ACETAZOLAMIDA (ACZ)	5
1.1.1. Antecedentes	5
1.1.2. Mecanismo de acción	5
1.1.3. Estructura química, características fisicoquímicas y farmacocinéticas	6
1.1.4. Glaucoma	7
1.2. CICLODEXTRINAS (CDs)	8
1.2.1. Antecedentes históricos y concepto	8
1.2.2. Estructura química	9
1.2.3. Derivados	10
1.2.4. Solubilización mediante complejación con CDs	10
1.2.5. Aplicación de complejos de inclusión con CDs en administración oftálmica ...	11
1.3. PREPARACIONES OFTÁLMICAS	13
1.3.1. Colirios	13
1.3.2. Ensayos de colirios	14
1.3.3. Consideraciones en el desarrollo de una formulación oftálmica	14
1.4. ESTABILIDAD	15
1.4.1. Estudios de estabilidad	15
1.4.2. Estudio de estabilidad acelerado	16
1.4.3. Protocolo de estudio de estabilidad	16
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. MATERIALES	19
3.1.1. Formulación	19
3.1.1.1. Fármaco	19
3.1.1.2. Agente complejante (solubilizante)	19
3.1.1.3. Conservante	19

3.1.1.4.	Antioxidante/Quelante	19
3.1.1.5.	Isotonizante.....	19
3.1.1.6.	Tampón.....	19
3.1.2.	Reactivos para la fase móvil del HPLC	19
3.2.	MÉTODOS.....	20
3.2.1.	Valoración de acetazolamida mediante HPLC	20
3.2.2.	Elaboración de la formulación oftálmica	21
3.2.2.1.	Composición de las formulaciones bajo ensayo	21
3.2.2.2.	Selección de excipientes	23
3.2.3.	Diseño del estudio de estabilidad	24
3.2.3.1.	Selección de lotes.....	24
3.2.3.2.	Condiciones	24
3.2.3.3.	Frecuencia de muestreo.....	24
3.2.4.	Estudio cinético de degradación	24
3.2.4.1.	Órdenes de reacción	24
3.2.4.2.	Cálculos de órdenes de reacción.....	26
3.2.4.3.	Ecuación de Arrhenius.....	26
3.2.4.4.	Parámetros de degradación	26
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1.	INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE ACZ28	
4.2.	INFLUENCIA DE HP-β-CD EN LOS ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN	29
4.3.	APLICACIÓN DE LA ECUACIÓN DE ARREHNIUS PARA DETERMINAR LA ESTABILIDAD DE ACZ.....	31
5.	CONCLUSIONES.....	34
6.	BIBLIOGRAFÍA	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Equilibrio entre el ión bicarbonato y el ácido carbónico.	6
Figura 2. Flujo del humor acuoso.....	8
Figura 3. Estructura química de CDs naturales.....	9
Figura 4. Formación del complejo de inclusión.	11
Figura 5. Esquema de absorción de un fármaco administrado vía ocular en forma de complejo de inclusión con CDs.....	12
Figura 6. Representación de reacción de orden 0.	25
Figura 7. Representación de reacción de orden 1.	25
Figura 8. Representación de reacción de orden 2.	25
Figura 9. Degradación de ACZ en la Formulación 1: (●) 30 °C, (●) 40 °C,(●) 50 °C.....	28
Figura 10. Degradación de ACZ en la Formulación 1: (●) 30 °C, (●) 40 °C, (●) 50 °C.....	29
Figura 11. % de ACZ disuelto durante el ensayo a 30 °C.....	30
Figura 12. % de ACZ disuelto durante el ensayo a 40 °C.....	31
Figura 13. % de ACZ disuelto durante el ensayo a 50 °C.....	31
Figura 14. Representación de la ecuación de Arrhenius para la formulación 1.	32
Figura 15. Representación de la ecuación de Arrhenius para la formulación 2.	32
Figura 16. Posible degradación de ACZ e inclusión en HP-β-CD.	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de ACZ.....	6
Tabla 2. Formulaciones oftálmicas elaboradas con CDs.....	12
Tabla 3. Elaboración del tampón.	21
Tabla 4. Elaboración de la formulación 1.....	22
Tabla 5. Elaboración de la formulación 2.....	23
Tabla 6. Constantes de degradación de ACZ en la Formulación 1.....	28
Tabla 7. Constantes de degradación de ACZ en la Formulación 2.....	29
Tabla 8. % remanente de cada formulación a diferentes tiempos de ensayo.	30
Tabla 9. Parámetros de degradación de ambas formulaciones.	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ACETAZOLAMIDA (ACZ)

Acetazolamida (ACZ) es un principio activo usado por vía oral principalmente para el tratamiento del glaucoma. Al ser inhibidor de la anhidrasa carbónica, su mecanismo de acción desencadena una reducción de la presión intraocular (PIO), favoreciendo la regulación de la entrada y salida del humor acuoso.

Uno de los inconvenientes que presenta ACZ, es su baja solubilidad acuosa (aproximadamente de 1 mg/ml) que unido a su baja permeabilidad ocular, dificulta el desarrollo de una formulación oftálmica (Mora y cols., 2015) que presente las propiedades adecuadas para garantizar su eficacia y efectividad, por lo que no está comercializado en este tipo de formas farmacéuticas.

1.1.1. Antecedentes

La sulfanilamida, fue el punto de partida en el descubrimiento de los inhibidores de la anhidrasa carbónica de la mano de Mann y Keilin en 1940 (Keilin y Mann, 1940). Este descubrimiento, tuvo lugar gracias a la observación de la aparición de acidosis metabólica tras administrar sulfanilamida como agente quimioterápico. Esto condujo a una evaluación exhaustiva in vitro e in vivo, demostrando así la capacidad de ésta como inhibidor de la anhidrasa carbónica.

Tras este acontecimiento, fue en 1954, cuando se introdujo su aplicación en oftalmología tras demostrar que los niveles de PIO descendían gracias al mecanismo de acción del fármaco (Becker, 1954). Estos nuevos hallazgos dieron lugar a que otros investigadores confirmasen la efectividad de este fármaco por vía oral en pacientes con glaucoma (Gloster y Perkins, 1955).

A partir de este momento comienzan a aparecer nuevos inhibidores de la anhidrasa carbónica, como la dorzolamida, fármaco que en la actualidad es el único de estos inhibidores que se puede emplear por vía oftálmica para el tratamiento del glaucoma, gracias a su excelente solubilidad acuosa (Jansook y cols., 2010; Sigurdsson y cols., 2005).

1.1.2. Mecanismo de acción

ACZ es un fármaco inhibidor de la anhidrasa carbónica. Esta enzima se encarga de producir y distribuir el ácido carbónico por el organismo. Además de ácido carbónico también produce bicarbonato, que es necesario para la producción de humor acuoso. Al disminuir la formación de bicarbonato, también disminuye la cantidad de humor acuoso que produce el ojo, dando

lugar a una disminución de la PIO. El equilibrio químico que cataliza la anhidrasa carbónica es el que se muestra a continuación:

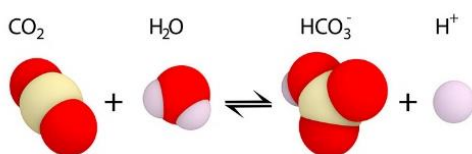


Figura 1. Equilibrio entre el ion bicarbonato y el ácido carbónico.

El ion HCO_3^- desencadena el movimiento de Na^+ en el ojo, atrayendo este último el agua necesaria para la formación de humor acuoso. Por tanto, al inhibir a la enzima, disminuye la concentración de HCO_3^- y por consiguiente el flujo de Na^+ y H_2O , obteniendo como resultado una disminución de la secreción de humor acuoso y reducción de la PIO (Kaur y cols., 2002).

1.1.3. Estructura química, características fisicoquímicas y farmacocinéticas

En la tabla 1 se muestra algunas de las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de ACZ:

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de ACZ.
(Micromedex database; Drugbank database)

PROPIEDADES DE ACZ	
FÓRMULA MOLECULAR	$\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2$
PESO MOLECULAR	222,245 g/mol
NOMBRE QUÍMICO	N-(5-sulfanoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-acetamida
ESTRUCTURA	
LONGITUD DE ONDA	265 nm
PKA	7.4
COMIENZO EFECTO	30-60 min
EFECTO MÁXIMO	2-4 h
DURACIÓN EFECTO	4-6 h
SOLUBILIDAD ACUOSA	0,98 mg/ml
COEFICIENTE DE REPARTO OCTANOL/AGUA	0,26

ACZ administrada por vía oral se absorbe a través del tracto gastrointestinal de manera adecuada. Su concentración plasmática máxima, aparece entre las 2-4 horas de su administración y mantiene niveles efectivos durante 4-6 horas, desapareciendo después de 8-10 horas. El fármaco se excreta rápidamente por el riñón de forma inalterada, el 80% en 8-10 horas y el resto en las 24 horas siguientes, realizándose la excreción por filtración glomerular y secreción tubular. Actualmente, no existen datos clínicos del comportamiento de este fármaco cuando es administrado por vía ocular en forma de colirio.

El problema del uso de este fármaco por vía oral, es alcanzar y mantener los niveles plasmáticos dentro del intervalo de eficacia terapéutica, 5-20 µg/ml (Theeuwes y cols., 1978). Porque a pesar de administrar una misma dosis, las concentraciones plasmáticas alcanzadas pueden variar entre los individuos. Además de la multitud de efectos adversos sistémicos, que conlleva el administrar altas dosis para conseguir alcanzar niveles adecuados en la zona ocular. Este problema podría solucionarse desarrollando una formulación oftálmica. De esta forma, se conseguiría vectorizar el fármaco, colocándolo en el lugar donde queremos que ejerza su acción. Evitando el fenómeno de primer paso hepático que sufren las formulaciones existentes administradas por vía oral (Hannan y cols., 2016). ACZ es un fármaco muy poco soluble, que además presenta una baja permeabilidad (Mora y cols., 2015). Por tanto, para lograr una formulación tópica oftálmica es necesario recurrir a estrategias que puedan solventar dichos problemas de solubilidad y permeabilidad.

1.1.4. Glaucoma

La Sociedad Europea de Glaucoma, define esta patología como un grupo de neuropatías ópticas progresivas y crónicas, que tienen en común cambios morfológicos característicos en la cabeza del nervio óptico y en la capa de fibras nerviosas, en ausencia de otra patología ocular o anomalía congénita. A estos cambios se asocia la muerte de células ganglionares de manera progresiva y la pérdida del campo visual (Hejil y cols., 2008).

Por otro lado, la definición de la Academia Americana de Oftalmología deja ver la importancia de valores elevados de Presión Intraocular (PIO), originados por un desequilibrio entre la producción y salida de humor acuoso, como principal factor de riesgo (Castañeda y cols., 2014).

A esto se debe que la reducción de la misma sea el objetivo principal de su tratamiento. La PIO es regulada fundamentalmente por el humor acuoso. Éste sale del ojo a través del ángulo

iridocorneal, que es el ángulo formado por la córnea y la esclerótida con el iris. En este lugar, el líquido se filtra a través del retículo trabecular e ingresa en el canal de Schlemm, para regresar a la circulación venosa. La causa más frecuente por la que se incrementa la PIO es por una interferencia en la salida de este líquido (Tártara y cols., 2008).

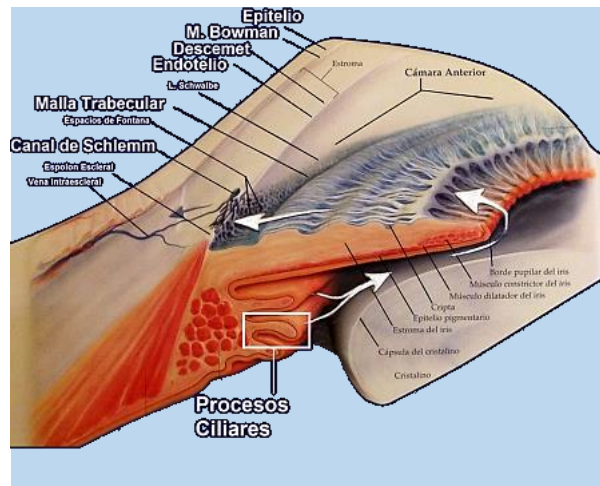


Figura 2. Flujo del humor acuoso.

(<http://www.ofthalmologia-online.es/anatom%C3%ADa-del-globo-ocular/humor-acuoso/>)

Existen dos tipos de glaucoma, de ángulo estrecho o agudo y de ángulo abierto o crónico. Siendo éste último el más frecuente.

Atendiendo a los datos epidemiológicos sobre dicha patología, se puede situar al glaucoma en segunda posición en el ranking de causas principales de ceguera en el mundo (Gupta y Chen, 2016; Braunger y cols., 2015). Se calcula que aproximadamente 60 millones de personas en todo el mundo tienen glaucoma en la actualidad, y se estima que alrededor de 80 millones de personas padecerán en 2020 esta neuropatía (Pardha y Giri, 2016; Quigley y Broman, 2006).

1.2. CICLODEXTRINAS (CDs)

1.2.1. Antecedentes históricos y concepto

El primer trabajo sobre aislamiento de una sustancia reconocible como ciclodextrina (CD), se realizó en 1891 por Villiers (Duchêne y cols., 1987). Dicho investigador, aisló una pequeña cantidad de sustancia cristalina de un medio de cultivo de *bacillus amylobacter*, el cual fue denominado celulosina, debido a su semejanza con la celulosa. Dichas inclusiones o "encapsulaciones moleculares" pueden ser utilizadas en Tecnología Farmacéutica para la

mejora, entre otras características, de la solubilidad acuosa, la estabilidad físico-química o la biodisponibilidad.

En los últimos años se ha demostrado que las CDs también pueden participar en diversos tipos de complejos de no inclusión, por ejemplo, con sales orgánicas y polímeros solubles en agua (Jarho y cols., 1997). También ha sido demostrada su capacidad de formar agregados, ya sean solos o en combinaciones con otros excipientes. Estos agregados pueden formar sistemas dispersos de administración de fármacos, tales como micro y nanopartículas. Por lo tanto, cien años después de su descubrimiento, las CDs son todavía consideradas como nuevos excipientes de posibilidades inexploradas (Loftsson y Duchêne, 2007). Las CDs actualmente se pueden encontrar en más de 35 productos farmacéuticos, así como en un gran número de productos alimenticios (Kurkov y Loftsson, 2013).

1.2.2. Estructura química

Las CDs son oligosacáridos cíclicos, constituidos por un número variable de unidades de glucosa unidas por enlaces $\alpha \rightarrow (1,4)$. El número de unidades α -D-glucopiranosas, define el nombre de la CD, siendo las más usuales las de seis, siete y ocho unidades (" α ", " β " y " γ "-CD, respectivamente) (Szejtli, 1982).

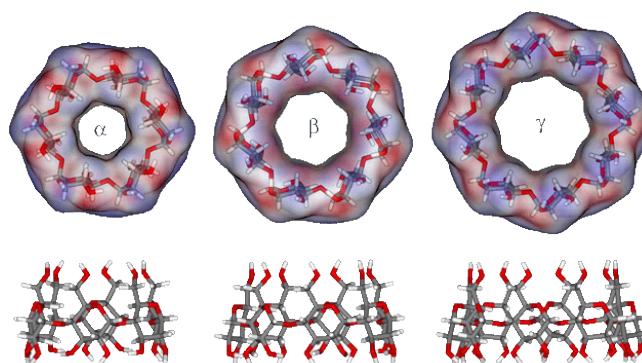


Figura 3. Estructura química de CDs naturales.

(<http://www.glycomicscentre.ca/services/carbohydrate-synthesis/novel-cyclodextrin-derivatives/what-are-cyclodextrins/>)

De esta manera, la cavidad de la CD está formada por: un anillo de átomos de hidrógeno portados por los C_3 , otro anillo de átomos de oxígeno (los cuales corresponden a los oxígenos de los enlaces glucosídicos) y un último anillo de átomos de hidrógeno portados por los C_5 , mostrando de esta forma la cavidad un carácter relativamente apolar (Szejtli, 1982). Debido a su estructura cíclica, las CDs son de tres a cinco veces más resistentes a la hidrólisis no enzimática, en comparación con las dextrinas lineales. Se pueden almacenar durante varios años a temperatura ambiente sin degradación detectable. Se piensa que la baja solubilidad de

las CDs se debe a su estructura, ya que sus dimensiones moleculares son óptimas para la formación de un anillo de enlaces de hidrógeno intramoleculares, que contrarresten su hidratación.

1.2.3. Derivados

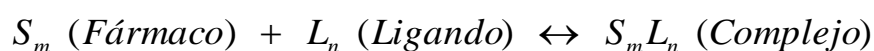
La baja solubilidad relativa de CDs naturales en agua, especialmente en el caso de β -CD (Jambhekar y Breen, 2016), limita considerablemente el campo de aplicación farmacéutica de estos compuestos. De esta forma, con el fin de mejorar algunas de sus características, como por ejemplo: aumentar la baja solubilidad en agua de β -CD o disminuir su toxicidad en aplicación por vía parenteral, se han desarrollado diferentes modificaciones sobre estas.

Los grupos hidroxilo de CDs constituyen el punto de partida a la hora de realizar modificaciones estructurales, mediante la incorporación de diversos grupos funcionales. Según el tipo de sustituyente introducido, pueden diferenciarse distintos tipos de derivados. Uno de los más utilizados son los derivados hidroxipropilados (Pitha, 1988).

El objetivo principal de la hidroxipropilación de CDs ha sido aumentar la solubilidad acuosa del producto de partida, uniendo las ventajas de un derivado hidrosoluble y una estructura amorfa (Kurkov y Loftsson, 2013). Esto conduce a una combinación de productos con diferentes grados de sustitución, ya que no es una reacción selectiva. En la mezcla final coexisten diferentes tipos de hidroxipropil-CDs que evita la cristalización y con ello, la obtención de un producto amorfo (Pitha, 1988; Badi y Guégan, 2007).

1.2.4. Solubilización mediante complejación con CDs

Se entiende por complejo, a la asociación reversible de moléculas de substrato (principio activo) con “n” moléculas de ligando (sustancia complejante), para dar lugar a una nueva especie que puede presentar diferentes características, como por ejemplo una mayor solubilidad o mayor velocidad de disolución (Kurkov y Loftsson, 2013).



La expresión que define a la constante de asociación o estabilidad del complejo (K) es la siguiente:

$$K_{m:n} = \frac{(S_m L_n)}{(S)^m \cdot (L)^n}$$

Existe una gran variedad de sustancias complejantes, entre las que destacan las CDs. En las que el fármaco queda incluido en su cavidad de carácter relativamente apolar (Szejtli, 1982), formándose los denominados complejos de inclusión (figura 4). Las diversas CDs presentan cavidades de diferentes dimensiones ($\gamma > \beta > \alpha$). Por lo que una buena acomodación de la molécula huésped (o alguna parte de la misma) al tamaño de la cavidad, se traducirá en un mayor número de interacciones entre ambas moléculas. Hecho que supondrá un valor más alto de la constante de complejación (Blanco y cols., 1991; Másson y Pitha, 1999).

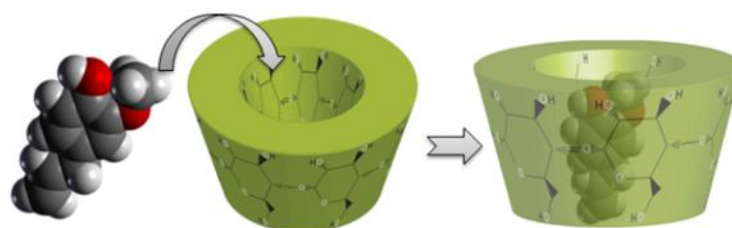


Figura 4. Formación del complejo de inclusión.

(<https://scientiablog.com/2014/02/19/el-comienzo-de-una-edad-la-historia-de-como-sauro-creo-sus-ciclodextrinas/>)

1.2.5. Aplicación de complejos de inclusión con CDs en administración oftálmica

En los preparados oftálmicos se nos presenta la oportunidad de utilizar CDs. Esto se debe a las reducidas dosis de medicamento necesarias por esta vía, la baja toxicidad de estos oligosacáridos (Van Doorne, 1993; Hippalgaonkar y cols. 2011), así como la mejora de la biodisponibilidad de los principios activos con los que forman complejo (Loftsson y Stefánsson, 1997).

Hemos de tener en cuenta que sólo la fracción libre es susceptible de ser absorbida., ya que sólo las moléculas de principio activo en forma libre atraviesan las membranas biológicas (Szejtli, 1985; Loftsson y Stefánsson, 1997; Loftsson y Järvinen., 1999). La posibilidad de que la molécula de CD y el propio complejo de inclusión, sean capaces de atravesar la membrana es muy reducida, debido a su gran tamaño y naturaleza hidrofílica de su superficie exterior, aunque hay diversos autores que recogen esta posibilidad (Frömming y Szejtli, 1994).

También debemos señalar, que el proceso de complejación es un equilibrio dinámico en el que coexisten en solución, la forma complejada con las formas libres de CD y el principio activo (Stella y Rajewski, 1997; Mora y cols., 2015), sin que se originen uniones covalentes ni iónicas entre las dos especies. La formación y disociación del complejo son procesos que tienen lugar muy rápido.

Mediante el empleo de CDs se pueden conseguir concentraciones muy altas de fármaco en los epitelios de absorción. En la figura 5, se esquematiza el proceso de absorción ocular de un fármaco administrado en forma de complejo de inclusión. El proceso de complejación ideal, implicaría una constante suficientemente alta, como para que la mejora en la solubilidad del fármaco sea apreciable, pero no excesivamente elevada, ya que en este caso predominaría la forma complejada, que tiene grandes dificultades en ser absorbida (Carriers y cols., 2007).

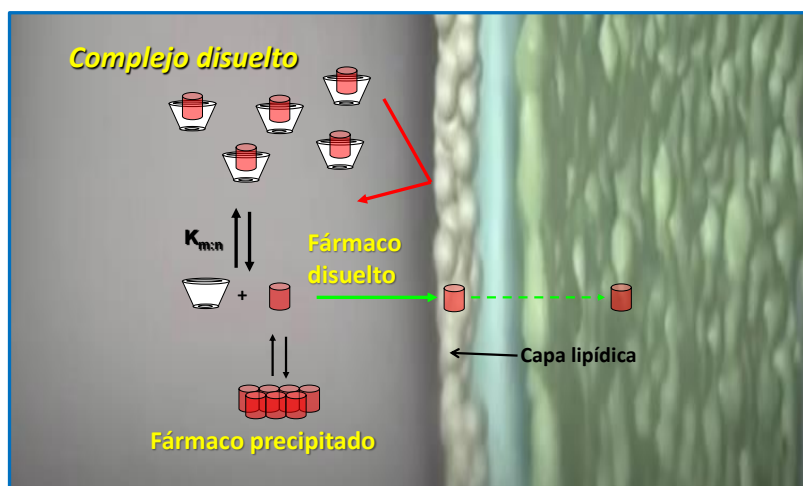


Figura 5. Esquema de absorción de un fármaco administrado vía ocular en forma de complejo de inclusión con CDs.

Tabla 2. Formulaciones oftálmicas elaboradas con CDs.

Principio activo	CD	Efecto	Referencias
Ciprofloxacino y norfloxacino	β -CD	Aumento de la biodisponibilidad	Udupa y cols., 1992
Ciclosporina	α -CD.	Aumento de la penetración corneal	Cheeks y cols., 1992
Acetato de hidrocortisona	α , β y γ -CD	Control de cesión	Ceschel y cols., 1993
Acetazolamida, etizolamida y timolol	HP- β -CD	Aumento de la biodisponibilidad y la eficacia de la formulación tópica	Loftsson y cols., 1994
Hidrocortisona	HP- β -CD	Aumento de la biodisponibilidad	Davies y cols., 1997
Ciprofloxacino	HP- β -CD	Aumento de la solubilidad y la estabilidad	Bozkir y cols., 2012

En la tabla 2 se recogen algunos ejemplos relativos al empleo de CDs en preparados oftálmicos. En ellos se pone de manifiesto que estas sustancias mejoran las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de los principios activos ensayados.

1.3. PREPARACIONES OFTÁLMICAS

Según la Real Farmacopea Española, son preparados estériles líquidos, semisólidos o sólidos, destinados a ser administrados en el globo ocular o en la conjuntiva, o bien a su inserción en el saco conjuntival. Distingue varios tipos de preparaciones oftálmicas: colirios, baños oculares, polvos para colirios y polvos para baños oculares, preparaciones oftálmicas semisólidas e insertos oftálmicos (Real Farmacopea Española, 5ª Ed., 2015).

1.3.1. Colirios

Los colirios son disoluciones, emulsiones o suspensiones acuosas u oleosas, estériles, de uno o más principios activos, destinados a su instilación en el ojo. Estos pueden contener excipientes con las siguientes funciones: 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 provocan una irritación local indebida a las concentraciones utilizadas (Real Farmacopea Española, 5ª Ed., 2015).

Las preparaciones acuosas que se presentan en envases multidosis, contienen un conservante antimicrobiano apropiado a la concentración adecuada (Baudouin y cols., 2010), excepto cuando la preparación tenga por sí misma suficientes propiedades antimicrobianas. El conservante antimicrobiano elegido, debe ser compatible con los otros componentes de la preparación y debe permanecer activo durante el período en que se utilice el colirio. Si los colirios no contienen conservantes antimicrobianos, se suministran en envases unidosis o en envases multidosis que eviten la contaminación microbiana de su contenido una vez abiertos.

Los colirios en forma de disolución son límpidos y están prácticamente exentos de partículas, cuando se examinan en condiciones adecuadas de visibilidad. Los colirios en forma de suspensión pueden presentar un sedimento que se redispersa fácilmente por agitación, de modo que resulte una suspensión suficientemente estable para permitir la administración de la dosis correcta (Real Farmacopea Española, 5ª Ed., 2015).

1.3.2. Ensayos de colirios

Según la Real Farmacopea Española, los colirios tienen que satisfacer los ensayos de esterilidad y de tamaño de partícula (Real Farmacopea Española, 5º Ed., 2015).

- Esterilidad (R.F.E. 2.6.1): puede seguirse la técnica de filtración a través de una membrana. Para ello se utilizan membranas filtrantes con un tamaño nominal de poro de como máximo 0,45 μm , y cuya eficacia para retener microorganismos se haya demostrado. Otra técnica es la siembra directa del producto a examinar en un medio de cultivo, en la que se detecta si aparece crecimiento bacteriano. En ambos casos se incluyen controles negativos apropiados.
- Tamaño de partícula: salvo excepción justificada y autorizada, los colirios en forma de suspensión satisfacen el ensayo siguiente: introducir una cantidad adecuada de la suspensión en una cámara de recuento, o bien depositar la suspensión con una micropipeta en un portaobjetos, según proceda, y examinar al microscopio un área que corresponda a 10 μg de la fase sólida. Por razones prácticas, se recomienda examinar inicialmente la totalidad de la muestra con un aumento pequeño (por ejemplo, 50 aumentos) e identificar las partículas superiores a 25 μm . A continuación, pueden medirse estas partículas grandes con un aumento mayor (por ejemplo, de 200 aumentos a 500 aumentos). Por cada 10 μg de principio activo sólido, no más de 20 partículas presentan una dimensión máxima superior a 25 μm y no más de 2 de estas partículas tienen una dimensión máxima superior a 50 μm . Ninguna partícula tiene una dimensión máxima superior a 90 μm .

1.3.3. Consideraciones en el desarrollo de una formulación oftálmica

Una formulación oftálmica consta de tres elementos fundamentales: principio activo, vehículo y excipientes. El principio activo debe ser de pureza elevada, el vehículo suele ser agua purificada y estéril, aunque también existen colirios oleosos que provocan a menudo alergias de contacto e irritaciones. Como excipientes se utilizan isotonzantes, reguladores de pH, conservantes, antioxidantes o solubilizantes.

El desarrollo de un medicamento de administración oftálmica implica varios condicionantes, que han de ser tenidos en cuenta a la hora de lograr una correcta formulación. Todo preparado oftálmico debe presentar un pH adecuado. Dado que si existen diferencias entre el pH de la formulación y el de las lágrimas, ocasionan efectos irritantes en el ojo, produciendo

un aumento del lagrimeo y la consiguiente pérdida del medicamento por vía precorneal. Para ello, el valor del pH deberá ajustarse entre el correspondiente al de máxima estabilidad del fármaco y el requerido por el ojo ($pH_{\text{lágrimal}}=7,45$). (Echezarreta, 1998). Además, debe ser isotónico con las lágrimas, con el fin de que su administración sea compatible con la presión osmótica del ojo y la patología ocular que se trate. Dentro de los isotonizantes destaca el NaCl como sustancia más empleada. Se ha demostrado que el ojo sano puede tolerar soluciones oftálmicas con una presión osmótica entre 0,7 y 2% p/v de NaCl.

Ambos requerimientos se pueden lograr adicionando correctores del pH o agentes isotonizantes a la formulación, pero lo más habitual es emplear como vehículo uno de los diferentes medios tampón existentes, compatibles desde el punto de vista isotónico con la vía ocular. Entre otros, destacan por su utilización la solución de ácido bórico, la solución tampón Sörensen, la solución tampón Cítrico/Fosfato, solución tampón Hepes, y la solución tampón Tris. No debemos olvidar que el preparado, desde el punto de vista fisicoquímico es recomendable que sea una solución, ya que la administración de partículas puede producir un efecto irritante sobre la córnea y además para que el fármaco pueda atravesarla es necesario que se encuentre disuelto. En el caso de que el fármaco presente poca solubilidad en el vehículo, implicaría la necesidad de incorporar a la formulación un agente solubilizante, que permita aumentar la solubilidad del fármaco sin afectar a su coeficiente de partición. Para solucionar esta problemática resulta especialmente interesante el empleo de CDs y más en concreto de hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP- β -CD), ensayada con éxito. (Loftsson y Järvinen, 1999; Granero y cols., 2008).

También se ha de tener en cuenta la adición de agentes conservantes, que aseguren la estabilidad microbiológica una vez abierto el envase. Entre los más utilizados en la vía oftálmica destacan: cloruro de benzalconio, benzoato sódico y los parabenos (Herrero, 2007). Existe un efecto de sinergismo cuando se utiliza cloruro de benzalconio con EDTA frente a *pseudomonas aerogiosa*, por lo que es habitual verlos juntos en formulaciones oftálmicas.

1.4. ESTABILIDAD

1.4.1. Estudios de estabilidad

Los estudios de estabilidad son aquellos estudios o serie de ensayos, cuyos resultados permiten establecer el período de validez de un medicamento en su envase original y en las condiciones de almacenamiento indicadas en él. Entendiendo por estabilidad, la capacidad que tiene 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 (Real Farmacopea Española, 5º Ed., 2015).

El período de validez o periodo de vida útil, es el tiempo durante el cual se espera que un producto permanezca dentro de las especificaciones aprobadas en el registro sanitario, si es almacenado bajo las condiciones definidas en su rotulado. El periodo de vida útil está estrechamente relacionado con las condiciones de almacenamiento señaladas.

Existen diferentes tipos de estudios de estabilidad: estudios acelerados o a corto plazo, estudios intermedios y estudios a tiempo real o a largo plazo. El principal factor que tienen en cuenta estos estudios, es la temperatura a la que se encuentran los lotes ensayados. También se tiene en consideración la humedad relativa del lugar donde se realiza el ensayo.

Los estudios de estabilidad se llevan a cabo en cámaras climáticas o cámaras de estabilidad. Estas cámaras permiten un registro continuo y un control preciso de la temperatura y humedad relativa. Gracias a esto, permiten realizar ensayos farmacéuticos de estabilidad conforme a las normas ICH (ICH, 2016).

1.4.2. Estudio de estabilidad acelerado

Estudio de estabilidad diseñado para aumentar la velocidad de degradación química o los cambios físicos de un principio activo o producto farmacéutico, usando condiciones de almacenamiento extremas de temperatura y humedad (condiciones de estrés), como parte de un programa de almacenamiento formal o definitivo (Real Farmacopea Española, 5º Ed., 2015).

A la hora de comercializar una formulación oftálmica, se permite determinar el periodo de validez a través de un ensayo acelerado, con solo 6 meses de duración. Obteniendo así un período de validez provisional. El poder predictivo procedente de los datos de este estudio acelerado, se fundamenta en la ecuación de Arrhenius. Esto no quita, que haya que llevar a cabo un ensayo a largo plazo para determinar el periodo de validez definitivo. Éste se llevará a cabo antes de que pasen 2 años a partir de la comercialización. Una vez realizado este ensayo, ya podremos establecer un periodo de vida útil definitivo.

1.4.3. Protocolo de estudio de estabilidad

A la hora de diseñar un protocolo de estudio de estabilidad, hay que tener en cuenta los siguientes aspectos: metodología para evaluar la estabilidad o integridad del fármaco (método

analítico), el diseño experimental propuesto, justificando las condiciones empleadas para el estudio, y el análisis de los datos y resultados.

El método analítico debe estar validado y ser específico para la evaluación de la estabilidad. Se debe establecer con toda claridad la especificidad, selectividad, precisión y exactitud del método. Cuando no exista, ni esté disponible la información adecuada sobre la estabilidad de un fármaco, se debe llevar a cabo un programa de evaluación de ésta en condiciones ambientales y bajo condiciones de estrés.

Para el diseño experimental, hay que tener en cuenta la selección de lotes bajo ensayo, el tipo de envase en los que realizar el estudio, la frecuencia de muestreo y las condiciones de almacenamiento (Banerjee y cols., 2014).

Los ensayos siempre se realizan sobre tres lotes, pero su selección depende de si se trata de una solicitud de inscripción, una renovación o una modificación del registro por cambios mayores en la formulación o en el envase. Entendiendo por lote, la cantidad definida del producto obtenido en un proceso único o en una serie de procesos y que, por consiguiente, cabe esperar que sea homogéneo.

La frecuencia de muestreo depende del tipo de ensayo. Se suelen analizar las muestras cada 3 ó 6 meses. Hay que tener muy claro que como mínimo se necesitan tres muestreos a lo largo del tiempo, para conseguir tres puntos, dentro de los cuales se encuentra el momento inicial y final, para poder obtener un perfil de estabilidad y analizarlo posteriormente. Si se prevé un cambio significativo en la formulación a partir del tercer punto, se añade un cuarto punto. La longitud del estudio debe ser suficiente para cubrir el tiempo de almacenamiento, venta y consumo de la formulación.

Las condiciones del ensayo serán determinadas por la Zona climática a la cual el producto está destinado (ICH, 2016). La estabilidad de un preparado farmacéutico en general presenta una relación inversa con la temperatura, aunque con la humedad la relación es más compleja, ya que depende de la forma farmacéutica y del material de acondicionamiento utilizado.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es determinar la cinética de degradación de acetazolamida cuando se encuentra en una solución oftálmica estándar. Así pretendemos evaluar tanto el orden de la cinética de degradación, como calcular el valor de la constante de degradación de dicho fármaco. Análogamente se pretende evaluar la influencia que ejerce un agente complejante como hidroxipropil-beta-ciclodextrina, sobre la cinética de degradación del fármaco bajo estudio. Los resultados obtenidos van dirigidos al desarrollo de una posible formulación oftálmica de acetazolamida en solución, gracias a su complejación con hidroxipropil-beta-ciclodextrina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

Los productos utilizados en la realización de este trabajo de investigación han sido los siguientes:

3.1.1. Formulación

3.1.1.1. Fármaco

Acetazolamida (ACZ): conocida también por su nombre químico, N-(5-(aminosulfonil)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-acetamida. Se encuentra en forma de polvo blanco cristalino, inodoro, con fórmula molecular $C_4H_6N_4O_3S_2$ y peso molecular de 222,24 g/mol (Acofarma, Barcelona).

3.1.1.2. Agente complejante (solubilizante)

Hidroxiopropil-beta-ciclodextrina (HP- β -CD): se encuentra como polvo cristalino blanco, con un grado de sustitución de 0,6 y peso molecular de 1380 g/mol (Fluka, Japón).

3.1.1.3. Conservante

Cloruro de benzalconio: se encuentra como líquido incoloro y poco viscoso, su fórmula molecular es $C_9H_{13}ClR$ (R: C_8H_{17} a $C_{18}H_{37}$), ya que se trata de una solución compuesta por varios cloruros y su peso molecular aproximadamente de 360 g/mol (Guinama, Valencia).

3.1.1.4. Antioxidante/Quelante

Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA): se encuentra como polvo blanco cristalino, su fórmula molecular es $C_{10}H_{16}N_2O_8$, con peso molecular de 327.24 g/mol y posee una riqueza del 99.2% (Fargon, Barcelona)

3.1.1.5. Isotonizante

Cloruro sódico: se encuentra como un sólido blanco cristalino, cuya fórmula molecular es NaCl, y su peso molecular de 58,44 g/mol (Panreac, Barcelona).

3.1.1.6. Tampón

Tampón Cítrico/Fosfato (pH \approx 7,2): ácido cítrico 1-Hidrato y $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$.

- Ácido cítrico 1-Hidrato: se encuentra como un polvo blanco cristalino, con fórmula molecular $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ y con un peso molecular de 210,14 g/mol (Panreac, Barcelona).
- Di-Sodio Hidrógeno Fosfato 2-Hidrato: se encuentra como polvo blanco cristalino, con fórmula molecular $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ y un peso molecular de 177,99 g/mol (Panreac, Barcelona).

3.1.2. Reactivos para la fase móvil del HPLC

Acetato sódico: se encuentra como polvo blanco cristalino, con fórmula molecular CH_3COONa . Su peso molecular es 82.04 g/mol y su solubilidad en agua es 0,47 g/ml (VWR Prolabo, Bélgica).

Acetonitrilo: de calidad HPLC, se encuentra como líquido incoloro, de olor característico. Su fórmula molecular es CH₃CN y con peso molecular de 41.05 g/mol (Sigma-Aldrich, USA).

Agua Milli-Q®: agua destilada ultrapura obtenida con un sistema Milli-Q® Advantage, Millipore®.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Valoración de acetazolamida mediante HPLC

La cuantificación de ACZ de forma exacta y precisa se realiza por el método analítico de elección, siendo este la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Este método ha sido puesto a punto por el grupo de investigación CTS-240 de forma previa (Cabanzo, 2013; Abad, 2012). La determinación, se llevó a cabo por HPLC de fase reversa mediante un cromatógrafo (Hitachi HPLC Elite Lachrom) compuesto de:

- Bomba isocrática L-2130.
- Inyector automático de muestras L-2200.
- Detector de diodo L-2455.
- Horno Elite LaChrom Hitachi L-2350.

El equipo se encuentra conectado a un ordenador, con el programa EZChrom para procesar los resultados. El sistema cromatográfico utilizado para la técnica analítica a desarrollar se encuentra constituido por un cartucho (Merck, RP-18 LichroCART®) de 125 mm de longitud y 4 mm de diámetro, relleno de partículas de silicagel enlazadas con partículas de octadecilsilano de 5 µm de diámetro.

La cuantificación de ACZ se llevó a cabo a una longitud de onda de 265 nm. Se desarrolló un método analítico isocrático, cuya fase móvil está compuesta por el componente A: solución de acetato sódico 0,05 M ajustado a pH de 4,02 y el componente B: acetonitrilo. Los componentes de la fase móvil se encuentran en una proporción 90/10 v/v respectivamente. La velocidad de flujo se fijó a 1,5 ml/min, el volumen de inyección fue de 10 µL y la temperatura del horno de 45 °C ± 1 (Oswaldo, 2013). Con estas condiciones se asegura una adecuada separación entre los picos de la molécula activa y el resto de componentes de las muestras, presentando ACZ un tiempo de retención de 1,7 minutos en estas condiciones.

Una vez ajustada la técnica cromatográfica, se determinó la linealidad del método. La linealidad sirve para determinar la proporcionalidad entre la concentración del principio activo y su respuesta, demostrando la capacidad del método para obtener resultados linealmente

proporcionales. Para determinar la linealidad del método se realizó una recta de calibrado, de la que se integrarán las áreas registradas en el espectro para cuantificar la cantidad de fármaco presente en nuestra muestra.

3.2.2. Elaboración de la formulación oftálmica

3.2.2.1. Composición de las formulaciones bajo ensayo

En el desarrollo del estudio de estabilidad se pondrán de manifiesto dos tipos diferentes de formulaciones cuya única diferencia es la presencia de HP- β -CD.

Antes de comenzar con el desarrollo de la formulación, se procede a la elaboración del vehículo seleccionado. Cabe destacar que todo el proceso de elaboración de cada formulación, será realizado en una campana de flujo laminar para asegurar la esterilidad del preparado final con el fin de evitar el crecimiento microbiano que pueda falsear los datos de degradación química.

Como se mencionó anteriormente, el tampón está compuesto por dos tipos de reactivos disueltos en un vehículo acuoso (en este caso agua Milli-Q®). En primer lugar se prepara el Di-Sodio Hidrógeno Fosfato 2-Hidrato disolviendo 36,5 g de éste compuesto en un matraz aforado de 1000 mL, seguidamente se disuelven 21,0 g de ácido cítrico 1-hidrato también en una matraz aforado de 1000 mL. Una vez están preparadas ambas disoluciones se toman 130,5 mL de la solución de ácido cítrico y 869,5 mL de la solución de fosfato 2-Hidrato, y se llevan a un matraz de 1000 mL. Mezclando bien ambas soluciones, obtendremos la disolución tampón final que presenta un pH en torno a 7,2 medido en un pH-metro CRISON GLP21 (tabla 3).

El tampón que reúne las características demandadas será el tampón cítrico/fosfato, el cual necesita ser filtrado antes de su uso en la formulación por un filtro RephiQuik de Nylon de 0,22 μ m.

Tabla 3. Elaboración del tampón.

Reactivo	g a tomar	g reales	V _{final} (mL)	mL	pH tampón
Ácido cítrico 1-hidrato	21	21,0002	1000	130,5	
Di-Sodio hidrogeno fosfato 2-hidrato	36,5	36,5002	1000	869,5	
<u>TOTAL</u>				1000	7,26

Una vez elaborado el vehículo, se procedió a la elaboración de cada lote de la formulación siguiendo las pautas que se detallan a continuación y será resumido en las tablas 4 y 5:

Formulación 1:

Cada lote requiere 100 mL a preparar, para ello se añade en un vaso de precipitado 80 mL de la solución tampón, junto con 0,05 g de EDTA y 20 µL de cloruro de benzalconio. Posteriormente se adiciona el fármaco, 0,050 g de ACZ. Para alcanzar la isotonicidad del preparado se calculó, por el método del descenso crioscópico la cantidad de cloruro sódico necesario, el resultado final fue de 0,92 g. Una vez disuelta la formulación y enrasada en un matraz aforado de vidrio hasta los 100 mL, se filtra con filtros RephiQuik de Nylon de 0,22 µm. Finalmente se toma 1 mL de esta formulación y se sella en viales de vidrio topacios, que serán analizado por cromatografía de alta resolución. La cantidad de viales necesarios para cada lote será de 66 para cada estufa INDELAB, donde quedarán almacenados a una temperatura determinada.

Tabla 4. Elaboración de la formulación 1.

Formulación 1	Reactivos	g teóricos	g reales	% p/v	mL de formulación	pH
Lote 1	EDTA	0,05	0,05027	0,05		
	Benzalconio Cl ⁻	0,01	0,01000	0,01		
	ACZ	0,05	0,05005	0,05		
	NaCl	0,92	0,92023	hasta isotonicidad		
	TOTAL				100	7,26
Lote 2	EDTA	0,05	0,04998	0,05		
	Benzalconio Cl ⁻	0,01	0,01000	0,01		
	ACZ	0,05	0,05003	0,05		
	NaCl	0,92	0,92003	hasta isotonicidad		
	TOTAL				100	7,22
Lote 3	EDTA	0,05	0,05002	0,05		
	Benzalconio Cl ⁻	0,01	0,01000	0,01		
	ACZ	0,05	0,04999	0,05		
	NaCl	0,92	0,92002	hasta isotonicidad		
	TOTAL				100	7,25

Formulación 2:

Cada lote requiere 100 ml a preparar, para ello se añade en un vaso de precipitado 80 mL de la solución tampón, junto con 0,05 g de EDTA, 20 µL de cloruro de benzalconio y el agente complejante, 13,8 g de HP-β-CD. Una vez solubilizado, se adiciona el fármaco, 0,5 g de ACZ. Para alcanzar la isotonicidad del preparado, se calculó por el método del descenso crioscópico la cantidad de cloruro sódico necesario, el resultado final fue de 0,216 g. Una vez disuelta la

formulación y enrasada en un matraz aforado de vidrio hasta los 100 mL, se filtra con filtros RephiQuik de Nylon de 0,22 μm . Finalmente se toma 1 mL de esta formulación y se sella en viales de vidrio topacios, que serán analizados por cromatografía de alta resolución. La cantidad de viales necesarios para cada lote será de 66 para cada estufa INDELAB, donde quedarán almacenados a una temperatura determinada.

Tabla 5. Elaboración de la formulación 2.

Formulación 2	Reactivos	g teóricos	g reales	% p/v	mL de formulación	pH
Lote 1	EDTA	0,05	0,05015	0,05		
	BenzalconioCl ⁻	0,01	0,01000	0,01		
	ACZ	0,5	0,50001	0,5		
	HP- β -CD	13,8	13,80003	13,8		
	NaCl	0,216	0,21602	hasta isotonicidad		
	TOTAL				100	7,23
Lote 2	EDTA	0,05	0,05019	0,05		
	BenzalconioCl ⁻	0,01	0,01000	0,01		
	ACZ	0,5	0,49997	0,5		
	HP- β -CD	13,8	13,80005	13,8		
	NaCl	0,216	0,21605	hasta isotonicidad		
	TOTAL				100	7,3
Lote 3	EDTA	0,05	0,04999	0,05		
	BenzalconioCl ⁻	0,01	0,01000	0,01		
	ACZ	0,5	0,50004	0,5		
	HP- β -CD	13,8	13,8001	13,8		
	NaCl	0,216	0,21601	hasta isotonicidad		
	TOTAL				100	7,27

3.2.2.2. Selección de excipientes

- **Agente complejante (solubilizante):** HP- β -CD. La elección de este polímero hidrosoluble se debe a los problemas que presenta β -CD tanto en su solubilidad acuosa como por su seguridad (Kurkov y Loftsson, 2013).
- **Isotonizante:** NaCl. Se elige esta sal como isotonizante debido a su fácil accesibilidad en el mercado y sus múltiples usos en vía oftálmica.
- **Conservante:** Cloruro de benzalconio. La elección de este reactivo está cimentada en base a diferentes estudios realizados por el grupo de investigación CTS612 Y CTS214, donde se pusieron de manifiesto dos clases de conservantes que podrían servir de elección en este tipo de formulaciones, cloruro de benzalconio y Nipagin® sódico, siendo este último promotor de una mejora en la solubilidad intrínseca de ACZ, por

una variación del pH del medio (Ruiz-Davis, 2015). El deseo de mantener constante el pH del medio justifica la elección del primero.

- **Antioxidante/Quelante:** EDTA. El EDTA es un antioxidante secundario, si se formula junto con cloruro de benzalconio, hace un efecto sinérgico contra *Pseudomonas aeruginosa* (Molier y Rojas, 2007).

3.2.3. Diseño del estudio de estabilidad

Teniendo en cuenta la limitación de tiempo para desarrollar este trabajo, se realizará un estudio de estabilidad bajo condiciones de estrés sobre dos formulaciones diferentes (ACZ y ACZ+HP- β -CD), sometiendo bajo estudio a tres lotes diferentes de cada una de ellas.

3.2.3.1. Selección de lotes

Cada formulación será desarrollada en 3 lotes diferentes para cada temperatura ensayada (30, 40 y 50 °C), de estos lotes cada muestra se analizará por duplicado, con lo cual el volumen necesario de viales preparados para cada formulación sería de 198 viales.

3.2.3.2. Condiciones

Las variables a controlar dentro del diseño de este estudio serán:

- Temperatura: se trabajará en condiciones de tres temperaturas: 30, 40 y 50 °C.
- Humedad relativa: se trabajará a una humedad constante de 65 %.
- Para evitar la posible fotoxidación que presenta ACZ (Valencia y cols., 2013), se prepararán las muestras en viales de vidrio topacio de HPLC.

3.2.3.3. Frecuencia de muestreo

Las muestras en estos ensayos fueron tomadas a 2, 4, 6, 8, 10, 15, 30, 60, 90 y 180 días a todas las temperaturas.

3.2.4. Estudio cinético de degradación

A partir de los datos obtenidos de los estudios de estabilidad, es fundamental conocer la cinética de degradación del principio activo para establecer su constante de degradación.

3.2.4.1. Órdenes de reacción

El orden total de una reacción, es igual a la suma de los exponentes a los que están elevadas las concentraciones. Según la ley de acción de masas, para una reacción química general, obtenemos la siguiente ecuación: Velocidad = $K [A]^a [B]^b$, donde "A" y "B", son los reactivos, y "a" y "b", son los órdenes de reacción, pudiendo ser estos de orden 0, 1 ó 2.

- Reacciones de orden 0: son aquellas reacciones que se dan a velocidad constante. La cantidad de fármaco presente en la formulación, varía de forma lineal respecto al tiempo (figura 6).

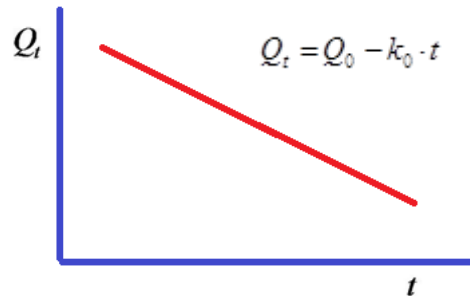


Figura 6. Representación de reacción de orden 0.

- Reacciones de orden 1: este es un proceso que se da a velocidad no constante. La cantidad de fármaco presente, varía de forma exponencial respecto al tiempo. Comportándose como en la figura 7.

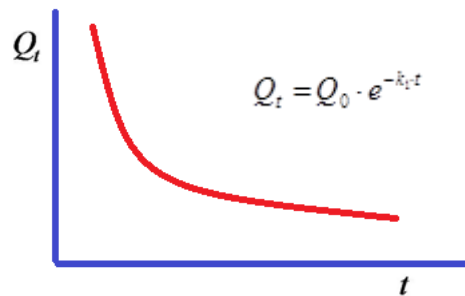


Figura 7. Representación de reacción de orden 1.

- Reacciones de orden 2: estas reacciones, al igual que las de orden 1, se dan a velocidad no constante. La inversa de la cantidad de fármaco varía de forma lineal respecto al tiempo, representándose en la figura 8.

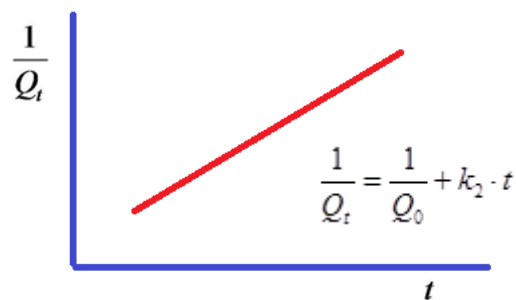


Figura 8. Representación de reacción de orden 2.

3.2.4.2. Cálculos de órdenes de reacción

Se utiliza el método de sustitución o de la representación gráfica de los datos: éste se lleva a cabo por la representación frente al tiempo, de los datos experimentales obtenidos. Los datos se ajustan a las diferentes cinéticas, siendo la cinética final la que mejor coeficiente de determinación obtenga, siendo mejor cuanto más próximo a la unidad sea.

Puede ser complejo descubrir qué tipo de cinética sigue el proceso degradativo. No obstante, los efectos de degradación siempre son más patentes a temperaturas más altas, por lo que en caso de duda observamos qué ocurre a las temperaturas superiores.

3.2.4.3. Ecuación de Arrhenius

Según la ICH, la ecuación de Arrhenius es la expresión matemática de elección para predecir el periodo de validez de un medicamento. Algunas de las condiciones más relevantes que afectan a la estabilidad de un medicamento son la temperatura, la luz y la humedad relativa (Liu y cols., 2016). Siendo la temperatura la que mayor efecto ejerce en la estabilidad. Debido a esto, la ecuación de Arrhenius sólo tiene en cuenta este parámetro de degradación.

La ecuación en cuestión es la siguiente: $K = A \cdot e^{-E_a/RT}$

Donde:

- A = factor de frecuencia (cte)
- E_a = energía de activación ($\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1}$)
- R = cte de los gases ($1,987 \text{ cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)
- T = temperatura en grados Kelvin

Con esta ecuación podemos predecir cuál será el valor de la constante de degradación (K) a temperaturas ordinarias, a partir de datos obtenidos a altas temperaturas. Esta es la base de los estudios de estabilidad acelerados. Para ello, primero hay que conocer la energía de activación de la reacción, así como el factor de frecuencia A. El factor de frecuencia o factor preexponencial, es un índice relacionado con la frecuencia de las colisiones entre las moléculas de reactivos. La velocidad de una reacción es proporcional al número de colisiones por unidad de tiempo, y éste número aumenta conforme sube la temperatura. Este valor se obtiene de la ordenada en el origen, cuando se representan los logaritmos neperianos de las constantes de degradación frente a la inversa de la temperatura. Pudiendo calcular de la pendiente de esa recta la energía de activación de la reacción (E_a), siendo esta última la energía mínima necesaria para que se produzca una reacción química.

3.2.4.4. Parámetros de degradación

Período de validez o de vida útil: es el límite de tiempo en el que el medicamento conserva su potencia en los límites establecidos (90-110%). 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, 2016).

Esta expresión varía según la cinética del proceso sea de orden 0, 1 o 2:

$$t_{90} = \frac{0,1 \cdot Q_0}{k_0}; t_{90} = \frac{0,105}{k_1}; t_{90} = \frac{0,111}{Q_0 \cdot k_2}$$

Semivida de degradación del producto: se define como el tiempo necesario para que una concentración de fármaco disminuya a la mitad. Dependiendo de si la cinética de degradación sigue un orden 0, 1 ó 2 se rige por las siguientes ecuaciones:

$$t_{50} = \frac{0,5 \cdot Q_0}{k_0}; t_{50} = \frac{\ln 2}{k_1}; t_{50} = \frac{1}{Q_0 \cdot k_2}$$

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE ACZ

En la figura 9, se representa como varía el porcentaje de ACZ frente al tiempo en la formulación 1 (ausencia de CD), a las temperaturas ensayadas.

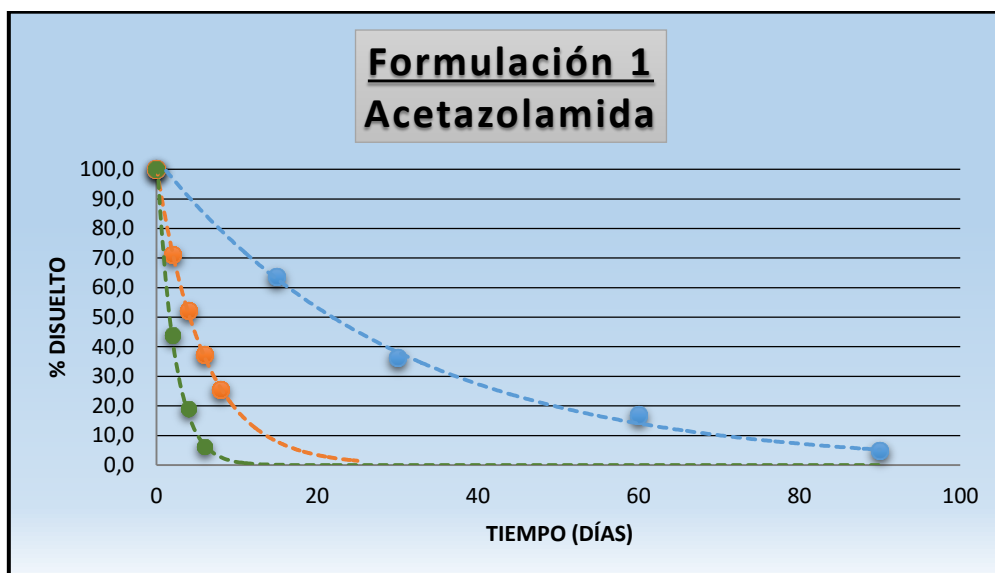


Figura 9. Degradación de ACZ en la Formulación 1: (●) 30 °C, (●) 40 °C, (●) 50 °C.

Se observa como el porcentaje de ACZ disminuye drásticamente frente al tiempo, a lo largo de los 6 meses de ensayo y a las tres temperaturas ensayadas. Siendo mayor la velocidad de degradación, cuanto mayor es la temperatura (Corena M, 2006). Es interesante señalar que la cinética de degradación de ACZ es de primer orden, por lo que sigue una curva exponencial decreciente (El-Kimary y El-Yazbi, 2016). En la tabla 6, se recogen los valores de las diferentes constantes de degradación a las tres temperaturas ensayadas, así como los coeficientes de determinación de cada una de las funciones exponenciales que mejor se ajustan a los datos experimentales obtenidos.

Tabla 6. Constantes de degradación de ACZ en la Formulación 1.

Temperatura (K)	K (días ⁻¹)	R ²
303	0,033	0,9946
313	0,162	0,9913
323	0,502	0,9958

4.2. INFLUENCIA DE HP- β -CD EN LOS ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN

Los resultados obtenidos por este mismo grupo de investigación, en el trabajo de fin de grado denominado “Estudios de complejación de acetazolamida con diferentes ciclodextrinas” (pendiente de publicar) desarrollado por Pablo Prieto Caravaca y tutelado por el doctor Juan Manuel Ginés Dorado, demostraron la importancia de la dimensión de la cavidad de CD en el proceso de complejación de ACZ. Deduciendo que HP- β -CD se presenta como la mejor opción de las CDs ensayadas, ya que consigue un mayor aumento de la solubilidad de nuestro fármaco y su cavidad se adapta mejor a la estructura de éste. La Figura 10 muestra la gráfica de cinética de degradación de la formulación 2, con la presencia de HP- β -CD a las diferentes temperaturas.

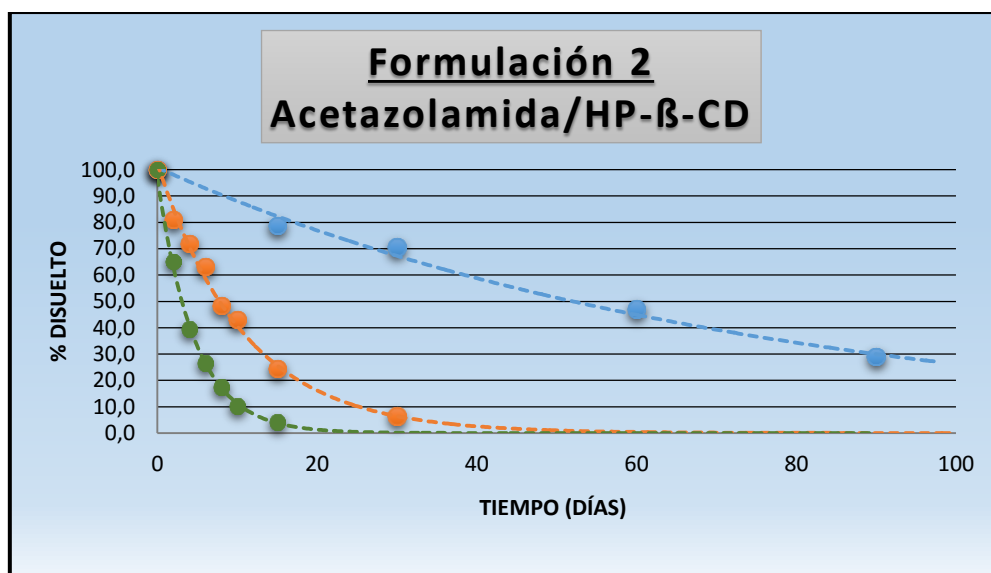


Figura 10. Degradación de ACZ en la Formulación 1: (●) 30 °C, (●) 40 °C, (●) 50 °C.

Análogamente al apartado anterior, hemos recogido en la tabla 7 los valores de las constantes de degradación obtenidas para la formulación 2 a las tres temperaturas ensayadas, así como los coeficientes de determinación de cada una de las funciones exponenciales que mejor se ajustan a los datos experimentales.

Tabla 7. Constantes de degradación de ACZ en la Formulación 2.

Temperatura (K)	K (días ⁻¹)	R ²
303	0,014	0,9943
313	0,082	0,9909
323	0,231	0,998

Al igual que en la anterior formulación 1 (sin CD), la degradación de ACZ sigue una cinética de primer orden. Es de destacar como la presencia de CD, causante de la formación de un complejo de inclusión, disminuye la degradación del fármaco (Másson y cols., 1999). Este hecho se hace más reseñable a baja temperatura (30 °C), siendo el porcentaje remanente a los 180 días de 11,3 % comparando con la formulación 1, como se aprecia en la tabla 8. Esta diferencia también se puede ver en las siguientes gráficas comparativas de las dos formulaciones a cada temperatura.

Tabla 8. % remanente de cada formulación a diferentes tiempos de ensayo.

% REMANENTE DE ACZ		30 DÍAS	90 DÍAS	180 DÍAS
30 °C	Formulación 1	30,7	4,7	0
	Formulación 2	70,5	28,8	11,3
40 °C	Formulación 1	0	0	0
	Formulación 2	6,4	0	0
50 °C	Formulación 1	0	0	0
	Formulación 2	0	0	0

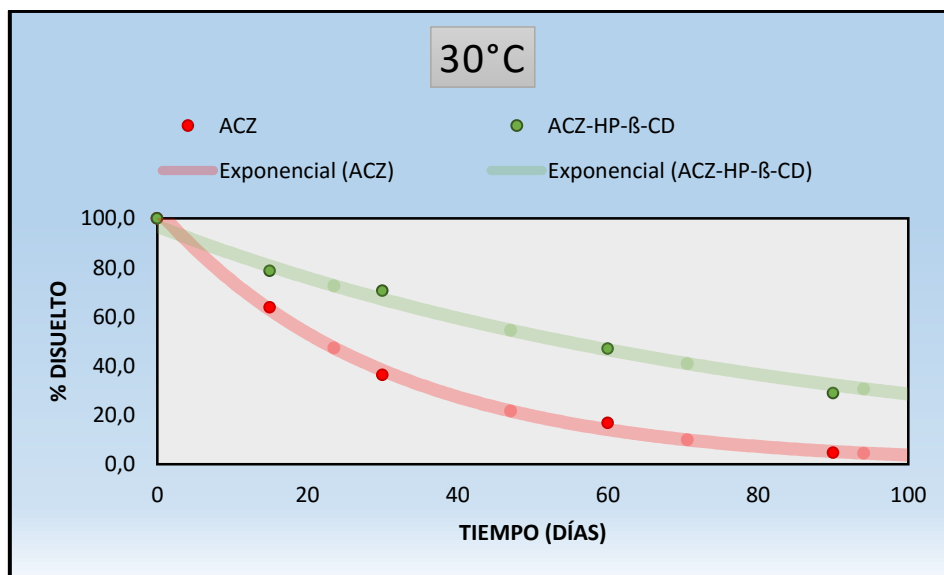


Figura 11. % de ACZ disuelto durante el ensayo a 30 °C.

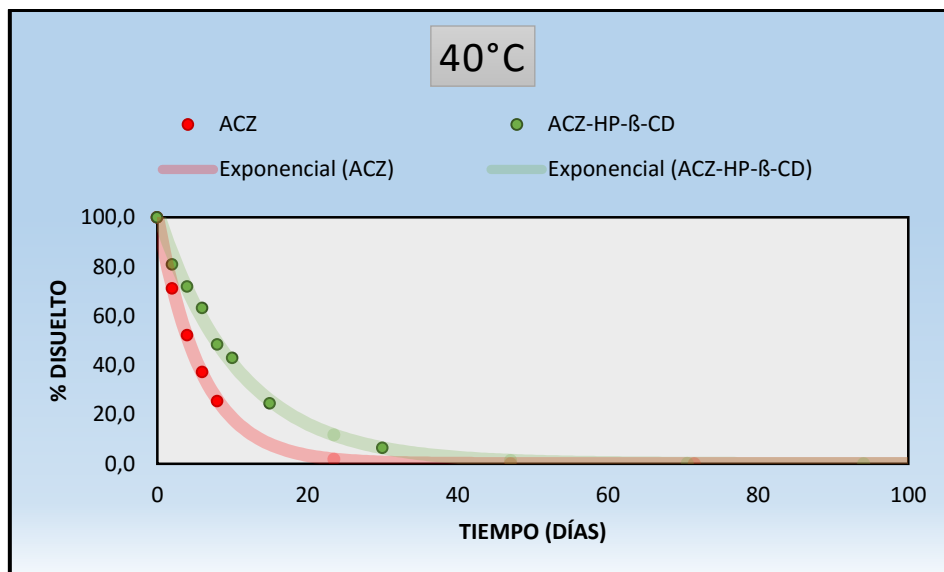


Figura 12. % de ACZ disuelto durante el ensayo a 40 °C.

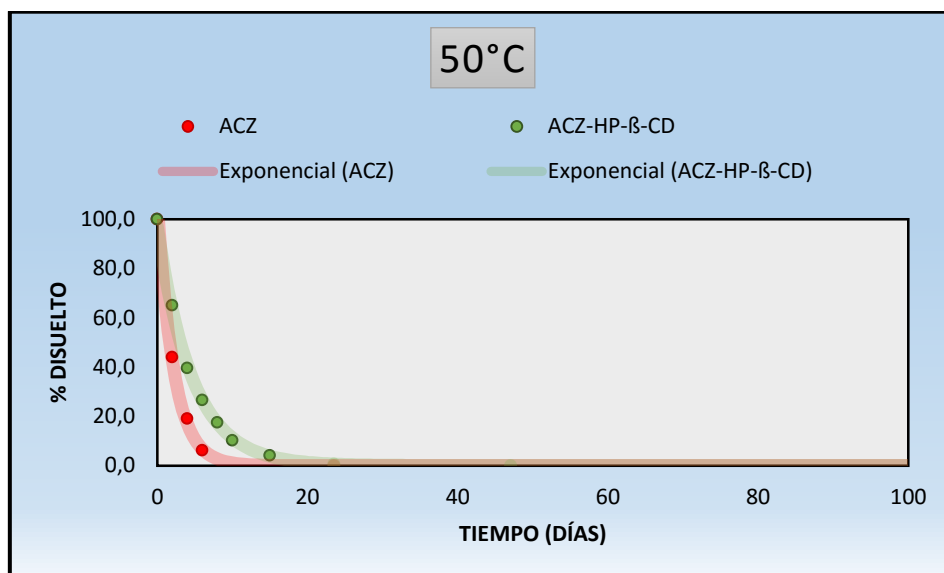


Figura 13. % de ACZ disuelto durante el ensayo a 50 °C.

4.3. APLICACIÓN DE LA ECUACIÓN DE ARREHNUS PARA DETERMINAR LA ESTABILIDAD DE ACZ

La ecuación de Arrhenius es el método de elección para reproducir los resultados obtenidos en los ensayos de estabilidad, y con ellos poder calcular el periodo de validez de un medicamento (Patterson y cols., 2015).

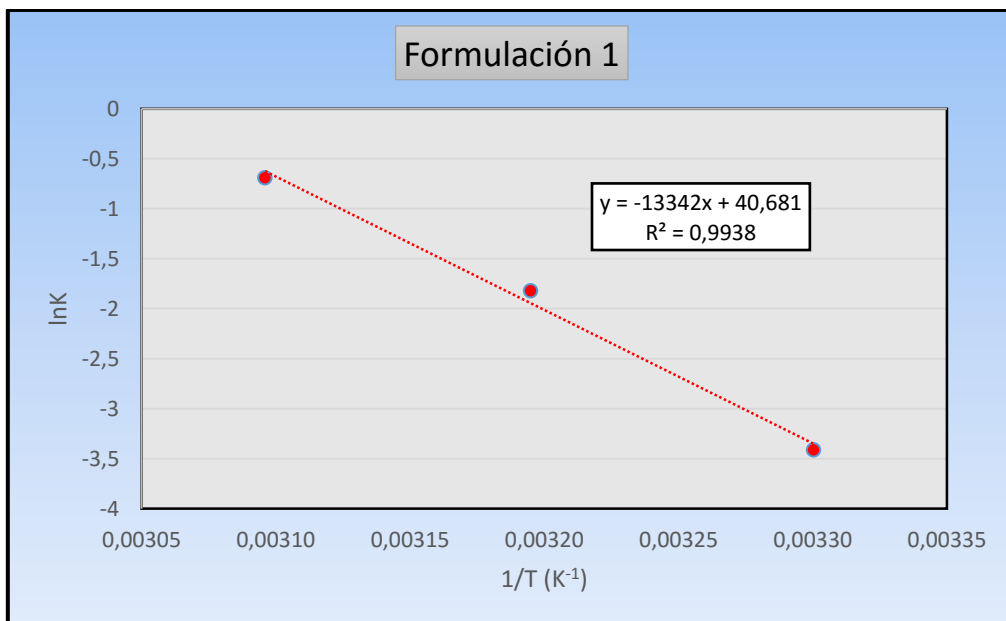


Figura 14. Representación de la ecuación de Arrhenius para la formulación 1.

Representamos gráficamente, el logaritmo neperiano de la constante de degradación a las tres temperaturas ensayas, frente a la inversa de la temperatura (en grados Kelvin) para la formulación 1 (Sin CD). Obteniendo una línea recta decreciente, con un coeficiente de determinación de 0,994. Siguiendo la ecuación de Arrhenius, calculamos a través de la pendiente la energía de activación de la reacción de degradación, siendo esta de 26,51 kcal/mol.

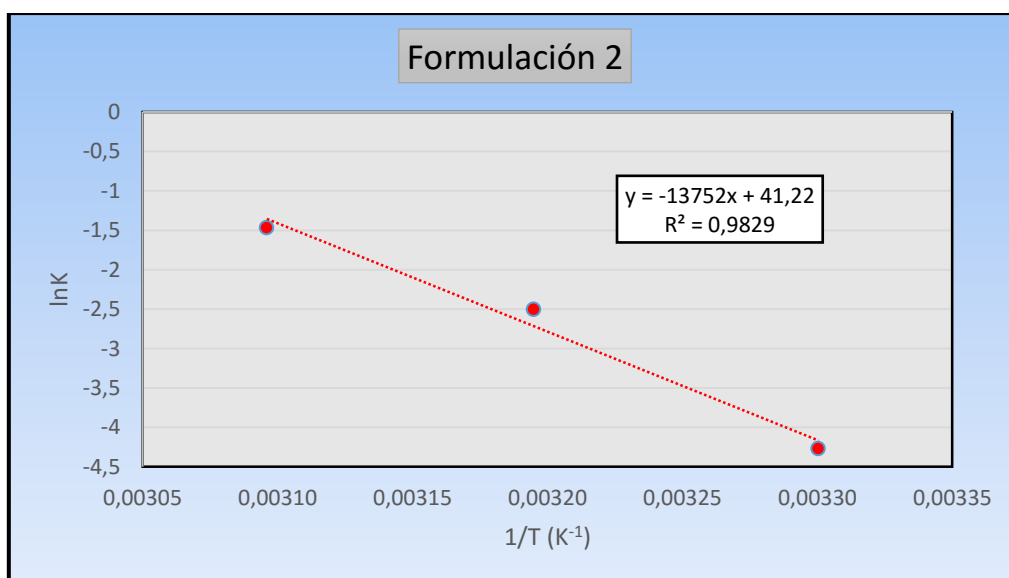


Figura 15. Representación de la ecuación de Arrhenius para la formulación 2.

En la figura 15 se recoge la representación de la ecuación de Arrhenius para la formulación 2 (con CD). La energía de activación en este caso es de 27,33 kcal/mol, que no presenta gran diferencia con la obtenida en la formulación 1. A su vez, el coeficiente de determinación para esta es de 0,983.

Extrapolando estos datos, podemos calcular la constante de degradación a 25 °C, así como el resto de parámetros de degradación como son el periodo de validez y la semivida de degradación de ACZ para ambas formulaciones (tabla 9).

Tabla 9. Parámetros de degradación de ambas formulaciones.

	Ea (kcal/mol)	K _{25°C} (días ⁻¹)	T ₅₀ (días)	T ₉₀ (días)
Formulación 1	26,51	0,0167	41,46	6,27
Formulación 2	27,33	0.0073	95,39	14,49

Estos datos de Ea son muy similares a los citados por Loftsson (Parasrampurua y Gupta, 1989). El periodo de validez de la formulación 2, como se observa, es más del doble que el de la formulación 1. Este hecho significativo confirma la complejación de ACZ con la HP-β-CD. Teniendo en cuenta que el mecanismo de degradación de ACZ es hidrólisis sobre el grupo amida del fármaco, tal y como recogen algunos autores (Srinivasu y cols., 2010), esto nos hace pensar que la molécula de fármaco, o parte de ella, se incluye en la cavidad de la HP-β-CD por ese grupo químico, por lo que el efecto de hidrólisis es menor. No obstante, este hecho debemos confirmarlo aún mediante diferentes técnicas como la resonancia magnética nuclear de protones.

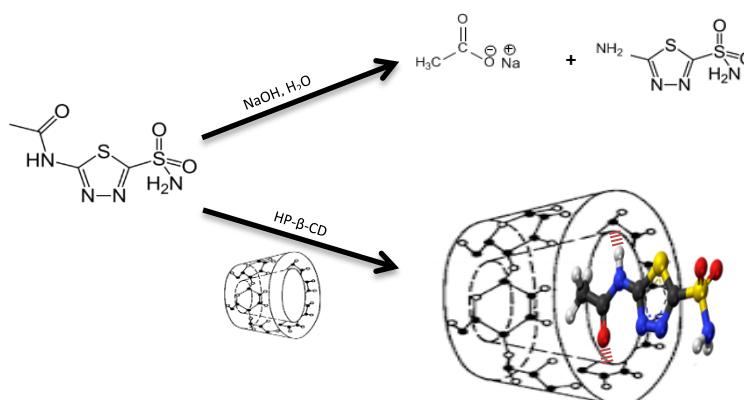


Figura 16. Posible degradación de ACZ e inclusión en HP-β-CD.

5. CONCLUSIONES

1. Hemos comprobado que acetazolamida se degrada de forma más lenta, cuando se encuentra formando un complejo de inclusión con la hidroxipropil-beta-ciclodextrina. Siendo la cinética de degradación de primer orden.
2. La mejora de estabilidad presentada por el complejo de inclusión ensayado (hidroxipropil-beta-ciclodextrina y acetazolamida), podría servir para diseñar un colirio destinado al tratamiento del glaucoma, que presente acetazolamida disuelta para que pueda ejercer una acción tópica en el ojo. Evitando así las reacciones adversas de las altas dosis necesarias por vía oral, para tratar esta patología.
3. A pesar de la mejora de estabilidad al formar acetazolamida el complejo con hidroxipropil-beta-ciclodextrina, el periodo de validez es inferior a lo necesario para poder comercializar una formulación oftálmica con la composición ensayada. Para intentar solucionar este inconveniente, nuestro grupo de investigación está trabajando en diferentes posibilidades de aumentar la estabilidad y así poder comercializar la formulación oftálmica.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Abad N. Liposomas ultradeformables de acetazolamida para su administración oftálmica: Diseño y estudios de caracterización. Trabajo fin de master, CITURME. Universidad de Sevilla. Sevilla. 2012.
2. Badi N, Guégan P. Per-O-(3-hydroxy)propyl-beta-cyclodextrin: a cyclodextrin derivative bearing only primary hydroxyl groups. *Carbohydr Res.* 2007; 342 (14): 1989-1991.
3. Banerjee S, Chattopadhyay P, Ghosh A, Bhattacharya S, Kundu A, VeerV. Accelerated stability testing of a transdermal patch composed of eserine and pralidoxime chloride for prophylaxis against (\pm)-anatoxin A poisoning. *J Food Drug Anal.* 2014; 22: 264-270.
4. Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res.* 2010; 29 (4): 312-334.
5. Becker B. Decrease in intraocular pressure in man by a carbonic anhydrase inhibitor. *Diamox Am J Ophthalmol.* 1954; 37: 13-15.
6. Blanco-Mendez J, Vila-Jato JL, Otero-Espinar FJ, Anguiano-Igea S. Influence of method of preparation on inclusion complexes of naproxen with different cyclodextrins. *Drug Dev Ind Pharm.* 1991; 17 (7): 943-957.
7. Bozkir A, Denli ZF, Basaran B. Effect of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on the solubility, stability and in-vitro release of ciprofloxacin for ocular drug delivery. *Acta Pol Pharm.* 2012; 69 (4): 719-724.
8. 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: 173-181.
9. Cabanzo L. Desarrollo de una formulación de transfersomas de acetazolamida y timolol para administración oftálmica. Trabajo fin de máster, CITURME. Universidad de Sevilla. Sevilla. Junio 2013.
10. Rebecca L, Carrier RL, Miller LA, Ahmed I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *J Control Release* 2007; 123: 78-99.
11. Castañeda R, Jiménez J, Iriarte MJ. Concepto de sospecha de glaucoma de ángulo abierto: definición, diagnóstico y tratamiento. *Rev Mex Oftalmol.* 2014; 88 (4): 153-160.
12. Ceschel GC, Berlati F, Ronchi C, Porziotta E. Control of the release of corticosteroids in topical formulations. *Boll Chim Farm.* 1993; 132 (2): 49-50.
13. Cheeks L, Kaswan RL, Green K. Influence and anterior chamber protein concentration on cyclosporine penetration through the isolated rabbit cornea. *Curr Eye Res.* 1992; 11: 641.

14. 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 sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2006; 64 (3): 369-376.
15. Davies NM, Wang G, Tucker IG. Evaluation of a hydrocortisone/hydroxypropyl- β -cyclodextrin solution for ocular drug delivery. *Int J Pharm.* 1997; 156: 201-209.
16. Duchêne D, Glomot F, Vaution C. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. *Cyclodextrins and their industrial uses.* (Ed. D Duchêne), Editions de Santé: París; 1987.
17. Echezarreta MM. Utilidad de las ciclodextrinas en la resolución de problemas de incompatibilidad de fármacos. Aplicaciones en el desarrollo de formas de administración oftálmica. Tesis doctoral, departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. 1998.
18. El-Kimary EI, El-Yazbi AF. An eco-friendly stability-indicating spectrofluorimetric method for the determination of two anticancer stereoisomer drugs in their pharmaceutical preparations following micellar enhancement: Application to kinetic degradation studies. *Spectrochim. Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2016; 163: 145-153.
19. Frömring KH, Szejtli J. *Cyclodextrins in pharmacy.* 5ª ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1994.
20. Gloster J, Perkins ES. Effect of a carbonic anhydrase inhibitor (diamox) on intra-ocular pressure of rabbits and cats. *Br J Ophthalmol.* 1955; 39 (11): 647-658.
21. Granero GE, Maitre MM, Garnero C, Longhi MR. Synthesis, characterization and in vitro release studies of a new acetazolamide-HP-beta-CD-TEA inclusion complex. *Eur J Med Chem.* 2008; 43 (3): 464-470.
22. Gupta D, Chen PP. Glaucoma. *Am Fam Physician.* 2016; 93 (8): 668-674.
23. Hannan PA, Khan JA, Khan A, Safiullah S. Oral Dispersible System: A New Approach in Drug Delivery System. *Indian J Pharm Sci.* 2016; 78 (1): 2-7.
24. Hejil A, Traverso C. *European Glaucoma Society Terminology and Guidelines for Glaucoma.* 3ª ed. Savona, Italy: DOGMA; 2008.
25. Herrero-Vanrell R. Generalidades de los conservantes en las formulaciones oftálmicas. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2007; 82: 531-532.
26. Hippalgaonkar K, Gul W, ElSohly MA, Repka MA, Majumdar S. Enhanced solubility, stability, and transcorneal permeability of δ -8-tetrahydrocannabinol in the presence of cyclodextrins. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2011; 12 (2): 723-731.
27. ICH. ICH Quality Guidelines Stability [en línea] [Consultado en mayo 2016]. Disponible en: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.

28. 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.
29. 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.
30. Jarho P, Järvinen K, Urtti A, Stella VJ, Järvinen T. The use of cyclodextrins in ophthalmic formulations of dipivefrin. *Int J Pharm*. 1997; 153 (2): 225-233.
31. Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutic. *Int J Pharm*. 2002; 248: 1-14.
32. Keilin D, Mann T. Purification and nature of the enzyme. *Biochem J*. 1940; 34 (8-9): 1163-1176.
33. Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins. *Int J Pharm*. 2013; 453: 167-180.
34. Liu F, Majeed H, Antoniou J, Li Y, Ma Y, Yokoyama W, et al. pH and temperature stability of (-)-epigallocatechin-3-gallate- β -cyclodextrin inclusion complex-loaded chitosan nanoparticles. *Carbohydr Polym*. 2016; 149: 340-347.
35. Loftsson T, Duchêne D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm*. 2007; 329 (1-2): 1-11.
36. Loftsson T, Frióriksdóttir H, Stefánsson E, Thórisdóttir S, Guómundsson Ö, Sigthórsson T. Topically effective ocular hypotensive acetazolamide and ethoxzolamide formulations in rabbits. *J Pharm Pharmacol*. 1994; 46: 503-504.
37. Loftsson T, Järvinen T. Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 1999; 36: 59-79.
38. Loftsson T, Stefánsson E. Effect of the cyclodextrins as topical drug delivery to the eye. *Drug Dev Ind Pharm*. 1997; 23: 473-481.
39. Másson M, Pitha J, Loftsson T. Synthesis of Cyclic Glycerol Ether Cyclodextrin Derivatives and Investigation of their Binding Properties with Drugs. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. 1999; 33 (4): 459-467.
40. Molier-Lemus T, Rojas-Hernández NM. Evaluación de la actividad antibacteriana de los preservos industriales. *CENIC. Ciencias Biológicas*. 2007; 38 (1): 45-48.
41. Mora MJ, Petiti JP, Longhi MR, Torres AI, Granero GE. Intestinal uptake and toxicity evaluation of acetazolamide and its multicomponent complexes hydroxypropyl- β -cyclodextrin in rats. *Int J Pharm*. 2015; 478: 258-267.

42. Oswaldo C. Desarrollo y validación de un método analítico por HPLC para la cuantificación de acetazolamida y timolol en transetosomas. Aplicación del quality by desing al diseño y desarrollo de una formulación optimizada. Trabajo fin de máster. Universidad de Sevilla. Sevilla. 2013.
43. 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): 855-857.
44. Pardha SM, Giri BK. Segmentation of optic disk and optic cup from digital fundus images for the assessment of glaucoma. *Biomed Signal Process Control.* 2016; 24: 34-46.
45. Patterson A, Ferreira AP, Banks E, Skeene K, Clarke G, Nicholson S, Rawlinson-Malone C. Modelling drug degradation in a spray dried polymer dispersion using a modified Arrhenius equation. *Int J Pharm.* 2015; 478 (1): 348-60.
46. Pitha, J. Amorphous water-soluble derivatives of cyclodextrins: 2-Hydroxypropyl, 3-Hydroxypropyl, 2-Hydroxyisobutyl and Carboxymidomethyl derivatives of β -Cyclodextrin. *Pharm Res.* 1988; 5: 713-717.
47. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol.* 2006; 90: 262-267.
48. Real Farmacopea Española (2015). 5ª Ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.
49. Ruiz-Davis J. Influencia de diferentes conservantes en el equilibrio de complejación ACZ-HP- β -CD: Aplicación al desarrollo de una formulación oftálmica. Trabajo fin de grado. Universidad de Sevilla. Sevilla. 2015.
50. 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.
51. 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): 142-148.
52. Stella VJ, Rajewski RA. Cyclodextrins: Their future in drug formulation and delivery. *Pharm Resh.* 1997; 14: 556-567.
53. Szejtli J. Cyclodextrins and their inclusion complexes. (Ed.). Budapest: Akademiai Kiado; 1982.
54. Szejtli J. Molecular entrapment and release properties of drugs by cyclodextrins. 3ª ed. New York; 1985.

55. Tártara I, Jiménez-Kairuz A, Allemandi DA, Palma SD. Uso racional de tecnologías sanitarias: tratamiento del glaucoma. *Lat Am Pharm.* 2008; 27 (2): 297-302.
56. Theeuwes F, Bayne W, McGuire J. Gastrointestinal therapeutic system for acetazolamide. Efficacy and side effects. *Arch Ophthalmol.* 1978; 96 (12): 2219-2221.
57. Udupa N, Lwwlavathi B. Evaluation of few ciprofloxacin (CIP) and norfloxacin (NOR) formulations. *Drug Dev Ind Pharm.* 1992; 18: 2197-2205.
58. Valencia C, Tobón E, Castaño C. Acetazolamide as a singlet molecular oxygen quencher. *J Photochem Photobiol. A.* 2013; 251: 113-117.
59. van Doorne H. Interaction between cyclodextrins and ophthalmic drugs. *Eur J Pharm Biopharm.* 1993; 39: 133-139.
60. Vila-Jato JL, Alonso AC, Irache JM, Ballesteros P, Lacasa C, Frutos P et al. Tecnología farmacéutica Vol. II. Formas Farmacéuticas. 1ª ed. Madrid: Síntesis; 1997.