

AÑO 2016

Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia
Departamento de
Farmacia y Tecnología
Farmacéutica

Alba Díaz Ríos



**[TFG: ESTUDIO DE
DEGRADACIÓN DE TIMOLOL
MALEATO, ACETAZOLAMIDA E
HIDROXIPROPIL- β -
CICLODEXTRINA: APLICACIÓN
PARA LA FORMULACIÓN DE UN
COLIRIO DISOLUCIÓN]**



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

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

TÍTULO: ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE TIMOLOL MALEATO, ACETAZOLAMIDA E
HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA: APLICACIÓN PARA LA FORMULACION DE UN
COLIRIO DISOLUCIÓN

PROYECTO TIPO EXPERIMENTAL

ALBA DÍAZ RÍOS

LUGAR DE PRESENTACIÓN: Aula 2.3

FECHA DE PRESENTACIÓN: 4 julio 2016

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

TUTELADO POR EL DOCTOR: JOSÉ IGNACIO PÉREZ MARTÍNEZ

RESUMEN

El glaucoma es una de las enfermedades con más incidencia en el mundo. Su tratamiento farmacológico está destinado a disminuir la presión intraocular mediante la reducción del humor acuoso. Esta reducción de presión es necesaria tratarla en la mayoría de los casos con combinaciones de fármacos, entre los que se encuentran los fármacos empleados para desarrollar el presente estudio, acetazolamida y timolol maleato. Al tener vías de administración diferentes (oral y oftálmica respectivamente) se hace necesario el estudio una formulación oftálmica con ambos fármacos, pero debido a la baja solubilidad de acetazolamida es necesario recurrir a un agente complejante como es hidroxipropil- β -ciclodextrina, capaz de complejar e incrementar notablemente la solubilidad de acetazolamida. En el presente trabajo hemos evaluado la influencia de la temperatura en la degradación de acetazolamida y timolol maleato en presencia y ausencia del agente complejante durante seis meses. Los resultados obtenidos muestran una cinética de degradación de primer orden para acetazolamida, mientras que timolol maleato no presenta degradación en el período de tiempo ensayado y bajo las condiciones de nuestro ensayo. Es especialmente interesante la influencia de hidroxipropil- β -ciclodextrina en la cinética de degradación de acetazolamida, siendo capaz de incrementar sensiblemente la estabilidad de dicho fármaco en solución bajo las condiciones ensayadas.

PALABRAS CLAVE: Acetazolamida, timolol maleato, hidroxipropil- β -ciclodextrina, ensayo estabilidad acelerado, colirios.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	(pág. 6)
1.1. GLAUCOMA.....	(pág. 6)
1.1.1. Concepto.....	(pág. 6)
1.1.2. Tratamiento del glaucoma.....	(pág. 6)
1.2. TIMOLOL MALEATO (TIM).....	(pág. 8)
1.2.1. Antecedentes.....	(pág. 8)
1.2.2. Mecanismo de acción.....	(pág. 8)
1.2.3. Características fisicoquímicas y farmacocinéticas.....	(pág. 8)
1.2.4. Posología.....	(pág. 9)
1.3. ACETAZOLAMIDA (ACZ).....	(pág. 10)
1.3.1. Antecedentes.....	(pág. 10)
1.3.2. Mecanismo de acción.....	(pág. 10)
1.3.3. Características fisicoquímicas y farmacocinéticas.....	(pág. 11)
1.3.4. Posología.....	(pág. 12)
1.4. SOLUBILIZACIÓN MEDIANTE EL EMPLEO DE CICLODEXTRINAS.....	(pág. 12)
1.5. COLIRIOS.....	(pág. 14)
1.5.1. Características de colirios.....	(pág. 14)
1.6. ESTABILIDAD.....	(pág. 15)
1.6.1. Ensayos de estabilidad.....	(pág. 15)
1.6.2. Estudio de estabilidad acelerado.....	(pág. 16)
2. OBJETIVOS.....	(pág. 17)
3. METODOLOGÍA.....	(pág. 18)
3.1. MATERIALES.....	(pág. 18)
3.1.1. Fármacos.....	(pág. 18)
3.1.2. Excipientes.....	(pág. 18)
3.1.2.1. Agente complejante.....	(pág. 18)
3.1.2.2. Conservante.....	(pág. 18)
3.1.2.3. Antioxidante/Quelante.....	(pág. 18)
3.1.2.4. Isotonizante.....	(pág. 18)
3.1.2.5. Tampón.....	(pág. 18)
3.1.3. Reactivos para la fase móvil del HPLC.....	(pág. 19)
3.2. MÉTODOS.....	(pág. 19)
3.2.1. Valoración de ACZ y TIM mediante HPLC.....	(pág. 19)

3.2.2. Elaboración de la formulación oftálmica.....	(pág. 20)
3.2.2.1. Composición de las formulaciones bajo ensayo.....	(pág. 20)
3.2.2.2. Selección de excipientes.....	(pág. 23)
3.2.3. Diseño del estudio de estabilidad.....	(pág. 23)
3.2.3.1. Selección de lotes.....	(pág. 23)
3.2.3.2. Condiciones.....	(pág. 23)
3.2.3.3. Frecuencia de muestreo.....	(pág. 24)
3.2.4. Estudio cinético de degradación.....	(pág. 24)
3.2.4.1. Órdenes de reacción.....	(pág. 24)
3.2.4.2. Cálculo de órdenes de reacción.....	(pág. 25)
3.2.4.3. Ecuación de Arrhenius.....	(pág. 25)
3.2.4.4. Parámetros de degradación.....	(pág. 26)
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	(pág. 27)
4.1. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE ACZ Y TIM.....	(pág. 27)
4.2. INFLUENCIA DE HP-β-CD EN LOS ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN.....	(pág. 29)
4.3. APLICACIÓN DE LA ECUACIÓN DE ARRHENIUS PARA DETERMINAR LA ESTABILIDAD DE LA FORMULACIÓN OFTÁLMICA.....	(pág. 31)
5. CONCLUSIONES.....	(pág. 34)
6. BIBLIOGRAFÍA.....	(pág. 35)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos farmacológicos más utilizados en el tratamiento del glaucoma.....	(pág. 7)
Tabla 2. Listado de asociaciones de fármacos contra el glaucoma comercializados en España.....	(pág. 7)
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de TIM.....	(pág. 9)
Tabla 4. Posología de TIM.....	(pág. 9)
Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de ACZ.....	(pág. 11)
Tabla 6. Posología de ACZ.....	(pág. 12)
Tabla 7. Elaboración del tampón.....	(pág. 20)
Tabla 8. Elaboración de la formulación 1.....	(pág. 21)
Tabla 9. Elaboración de la formulación 2.....	(pág. 22)
Tabla 10. Constantes de degradación de ACZ en la formulación 1 y formulación de referencia.....	(pág. 28)
Tabla 11. Resumen de los % remanentes de ACZ en las dos formulaciones ensayadas.....	(pág. 29)
Tabla 12. Constantes de degradación de ACZ en la formulación 2 y formulación de referencia.....	(pág. 30)
Tabla 13. Parámetros obtenidos a partir de la ecuación de Arrhenius para ACZ en la formulación 1.....	(pág. 32)
Tabla 14. Parámetros obtenidos a partir de la ecuación de Arrhenius para ACZ en la formulación 2.....	(pág. 32)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de las CDs naturales.....	(pág. 13)
Figura 2. Esquema de la formación de un complejo de inclusión.....	(pág. 13)
Figura 3. Representación de una ecuación de orden 0.....	(pág. 24)
Figura 4. Representación de una ecuación de orden 1.....	(pág. 24)
Figura 5. Representación de una ecuación de orden 2.....	(pág. 25)
Figura 6. Degradación de ACZ en la formulación 1 (○) 30 °C, (○) 40 °C, (○) 50 °C.....	(pág. 27)
Figura 7. Degradación de TIM en la formulación 1 (○) 30 °C, (○) 40 °C, (○) 50 °C.....	(pág. 28)
Figura 8. Degradación de ACZ en la formulación 2 (○) 30 °C, (○) 40 °C, (○) 50 °C.....	(pág. 29)
Figura 9. Degradación de TIM en la formulación 2 (○) 30 °C, (○) 40 °C, (○) 50 °C.....	(pág. 30)
Figura 10. Representación de los logaritmos neperianos de las constantes de degradación de ACZ frente a la inversa de la temperatura para la formulación 1.....	(pág. 31)
Figura 11. Representación de los logaritmos neperianos de las constantes de degradación de ACZ frente a la inversa de la temperatura para la formulación 2.....	(pág. 32)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GLAUCOMA

1.1.1. Concepto

La Sociedad Europea de Glaucoma define esta patología como un grupo de neuropatías ópticas crónicas y progresivas 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 asocian la muerte de células ganglionares de manera progresiva y pérdida del campo visual (Castañeda y cols., 2014). El glaucoma es la segunda causa más importante de ceguera en el mundo. En la actualidad más de 60 millones de personas sufren esta enfermedad (Braunger y cols., 2015) y se calcula que en 2020 afectará aproximadamente a 80 millones de personas en todo el mundo (Pardha y Giri, 2016).

La definición de la Academia Americana de Oftalmología amplía esta definición incluyendo la importancia de valores altos 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). La reducción de la PIO es el único factor de riesgo modificable, de esta manera se previene la pérdida de visión progresiva relacionada con el glaucoma (Pardha y Giri, 2016). Para reducir esta PIO es importante conocer los mecanismos por los que se regulan y de esta manera poder entender la fisiología del glaucoma.

La PIO está regulada por el equilibrio entre la producción y la eliminación del humor acuoso. El humor acuoso es un líquido transparente que es secretado por el cuerpo ciliar (Chiang y cols., 2016), éste pasa desde la cámara posterior a través de la pupila hacia la cámara anterior y sale del ojo a través de dos vías: la vía de flujo de salida trabecular, también conocida como convencional, o la vía de flujo de salida uveoescleral o no convencional (Braunger y cols., 2015).

1.1.2. Tratamiento del Glaucoma

El tratamiento médico y quirúrgico para el glaucoma busca controlar la PIO reduciendo la producción de humor acuoso y/o incremento del aclaramiento del humor acuoso (Chiang y cols., 2016). La guía de la Sociedad Europea de Glaucoma indica que el tratamiento médico raramente es eficaz, siendo el abordaje fundamentalmente quirúrgico, bien mediante láser, procedimientos filtrantes o cirugía de cristalino, aislada o asociada a cirugía filtrante. El tratamiento médico se considera como preparación al tratamiento láser-quirúrgico o como complemento en caso de respuesta insuficiente (Muñoz-Negrete y cols., 2015). En la tabla 1 se recogen los grupos farmacológicos más destacados en la terapia del glaucoma (Glaucoma Research Foundation, 2015; Bucolo y cols., 2013; Díaz-P, 2010).

Tabla 1. Grupos farmacológicos más utilizados en el tratamiento del glaucoma.

Bloqueantes β -adrenérgicos	Mióticos	Agonistas α -adrenérgicos	Inhibidores de la anhidrasa carbónica	Análogos de prostaglandinas
Betaxolol	Carbacol	Apraclonidina	Acetazolamida	Bimatoprost
Carteolol	Pilocarpina	Brimonidida	Brinzolamida	Latanoprost
Metipranolol			Dorzolamida	Tafluprost
Timolol Levobunolol				Travoprost

Los medicamentos combinados pueden ofrecer una alternativa para los pacientes que necesitan más de un tipo de medicamento. Además de la conveniencia de usar un frasco de gota oftálmica en lugar de dos, es posible que también exista una ventaja económica (Glaucoma Research Foundation, 2015). En la tabla 2 se muestran las asociaciones de principios activos comercializados actualmente para el tratamiento del glaucoma (CIMA, 2016).

Tabla 2. Listado de asociaciones de fármacos contra el glaucoma comercializados en España.

NOMBRE COMERCIAL	PRINCIPIO ACTIVO	POSOLOGÍA
Arucom ®	6,8 mg/mL timolol maleato + 50 μ g/ml latanoprost	1 gota/24h
Azarga ®	6,8 mg/mL timolol maleato + 10 mg/ml brinzolamida	1 gota/12h
Combigan ®	6,8 mg/mL timolol maleato + 1,3 mg/ml brimonodina	1 gota /12h
Cosopt ®	6,83 mg/mL timolol maleato + 20 mg/ml dorzolamida	1 gota/12h
Duokopt ®	6,83 mg/mL timolol maleato + 20 mg/ml dorzolamida	1 gota/12h
Duotrav ®	6,8 mg/mL timolol maleato + 40 μ g/ml travoprost	1 gota/24h
Ganfort ®	6,8 mg/mL timolol maleato + 300 μ g/ml bimatoprost	1 gota/24h
Xalacom ®	6,8 mg/mL timolol maleato + 50 μ g/ml latanoprost	1 gota/24h

Como se observa en la tabla 2, todas las combinaciones de fármacos antiglaucomatosos son asociaciones de timolol maleato (6,8 mg de timolol maleato equivalen a 5 mg de timolol) junto con un principio activo de otro grupo farmacológico, sin embargo, no hay combinaciones de timolol maleato y acetazolamida, ya que éste último fármaco presenta importantes problemas de solubilidad.

Un 39,7 % de los pacientes tratados de glaucoma usan dos o más medicamentos y un 9,3 % usan tres o más. Se debe considerar que la eficacia de tratamiento no aumenta al doble al asociar dos principios activos como se podría pensar inicialmente (Díaz-P, 2010).

Se debe tener en cuenta las variaciones circadianas de la PIO al elegir los fármacos hipotensores, por tanto, los objetivos son obtener eficacia durante las 24 horas y evitar al máximo las fluctuaciones de la PIO (Díaz-P, 2010).

1.2. TIMOLOL MALEATO (TIM)

TIM, es un fármaco betabloqueante no selectivo, siendo el primer betabloqueante utilizado en el tratamiento del glaucoma (Hassib y cols., 2016). Disminuye la PIO reduciendo el humor acuoso mediante el bloqueo de los receptores beta presentes en el cuerpo ciliar (Shihui y cols., 2015). Su efectividad parece estar relacionada más con sus propiedades farmacocinéticas que con su afinidad por los dos subtipos de receptores β , sin embargo, el mecanismo de acción no se conoce aún con certeza (Goodman & Gilman, 2007).

1.2.1. Antecedentes

En 1979, TIM fue aprobado para su uso en oftalmología. Desde entonces, este fármaco se ha convertido, según la FDA, en el patrón de referencia para la reducción intraocular en pacientes con glaucoma (Lavik y cols., 2011).

1.2.2. Mecanismo de acción

Está descrito en la literatura que este fármaco bloquea los receptores adrenérgicos β -1 y β -2, aunque no se conoce con certeza el mecanismo por el cual el bloqueo de los receptores β disminuye la producción de humor acuoso y reduce la PIO. Un posible mecanismo es la activación de la producción de humor acuoso por una vía monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) proteincinasa A mediada por el receptor β ; el bloqueo de los R- β amortigua la actividad adrenérgica por esta vía, previniendo la estimulación del R- β por catecolaminas y disminuyendo, como consecuencia, el cAMP intracelular. Otra hipótesis planteada es que los β -bloqueantes disminuyen el flujo sanguíneo ocular, lo que reduce el proceso de ultrafiltración que causa la producción acuosa (Goodman & Gilman, 2007).

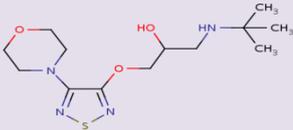
1.2.3. Características fisicoquímicas y farmacocinéticas

TIM se absorbe rápida y completamente cuando es administrado por vía oral, sufriendo un fuerte metabolismo de primer paso hepático y una biodisponibilidad oral aproximadamente del 50 %. Después de la administración oftálmica puede ocurrir alguna absorción sistémica, pero los datos son muy limitados. Normalmente la acción farmacológica se inicia a los 30 minutos, alcanzando la concentración máxima en 1 o 2 horas. La administración oftálmica de TIM reduce la presión intraocular a los 30 minutos después de la aplicación, las concentraciones pico se

observan 1-2 horas más tarde, pudiendo durar el efecto hasta 24 horas. Es metabolizado ampliamente a metabolitos inactivos y tanto el fármaco de origen como los metabolitos se excretan por vía renal, presentando una semivida de eliminación de 4 horas (Goodman & Gilman, 2007). En la tabla 3 se recopilan las principales características fisicoquímicas y farmacocinéticas de TIM.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de TIM.

(http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/4093-c8fbd377eca8010037fc121151cf8d727b8e34/main/files/Timolol_maleato.pdf)

PROPIEDADES DE TIM	
Fórmula molecular	C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ S·C ₄ H ₄ O ₄
Peso molecular	432,50
Nombre químico	(s)-1-(terc-butilamino)-3-[(4-morfolino-l-2,5-tiadiazol-3-il)oxi]-propan-2-ol maleato (1:1) (sal)
Estructura	
Absorción UV máxima	294 nm
pKa	9,21
Comienzo efecto	30 min
Efecto máximo	1-2 h
Duración efecto	4 h
Solubilidad	115 mg/mL en agua y etanol al 96 %

1.2.4. Posología

En la tabla 4 se recoge de forma resumida algunos aspectos de la posología de TIM.

Tabla 4. Posología de TIM.
(Catálogo de medicamentos, 2012)

VIA OFTÁLMICA		
ADULTOS	COLIRIO	Inicio tratamiento: 0,25 % p/v→1 gota/12 h Respuesta insuficiente: 0,50 % p/v→1 gota/12 h Dosis de mantenimiento: 1 gota/24 h
	GEL OFTÁLMICO	1 gota/24 h
NIÑOS	Se recomienda utilizar la misma dosis que en adultos	

1.3. ACETAZOLAMIDA (ACZ)

ACZ es un fármaco inhibidor de la anhidrasa carbónica (CA) y ha sido utilizado durante muchos años en el tratamiento de glaucoma. La administración oral de ACZ disminuye la cantidad de humor acuoso producido por el epitelio ciliar. Su potente efecto hipotensor ocular es bien conocido pero su uso está limitado debido a las grandes dosis orales que se necesitan de ACZ para disminuir la PIO, causando por lo general una multitud de efectos secundarios sistémicos que se deben a la amplia distribución por el cuerpo de la enzima CA.

Los mecanismos precisos que controlan los procesos de su transporte intestinal aún no se han dilucidado. A pesar de la alta biodisponibilidad oral se ha clasificado a ACZ en la Clase IV de los sistemas de clasificación biofarmacéutica (BCS), lo cual indica la baja solubilidad (0,72 mg/mL en agua a 25 °C) y permeabilidad de este fármaco, además se ha establecido el coeficiente de reparto (log P) en octanol/agua con un valor de 0,26 (Mora y cols., 2015).

1.3.1. Antecedentes

Sulfanilamida fue el punto de partida en el descubrimiento de los inhibidores de la anhidrasa carbónica de la mano de Keilin y Mann 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, lo que condujo a una evaluación exhaustiva in vitro e in vivo, demostrando así la capacidad de ésta como inhibidor de la CA.

Tras este acontecimiento, fue en 1954 cuando se introdujo su aplicación en oftalmología, tras demostrar que una vez administrado por vía oral, 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 CA 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.

1.3.2. Mecanismo de acción

ACZ es un fármaco que, como se ha mencionado anteriormente, inhibe la enzima CA, la cual se encarga de producir y distribuir el ácido carbónico por el organismo. Además de ácido carbónico también produce bicarbonato, el cual es necesario para la producción del humor acuoso.

ACZ 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.

La reacción que se inhibe se muestra a continuación:

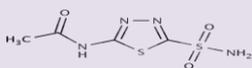


El ión HCO_3^- desencadena el movimiento de Na^+ en el ojo, atrayendo éste último el agua necesaria para la formación de humor acuoso. Por tanto, al inhibir la reacción anterior, disminuye la concentración de HCO_3^- y por consiguiente el flujo de Na^+ y H_2O , obteniendo como resultado una disminución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

1.3.3. Características fisicoquímicas y farmacocinéticas

Se sabe que después de la administración oral, ACZ presenta una biodisponibilidad próxima al 100 %, alcanzando la concentración plasmática máxima aproximadamente de 1 a 3 horas después de la administración oral. Su concentración plasmática máxima aparece en torno a las 2 horas de su administración y mantiene niveles efectivos durante 4-6 horas, desapareciendo después de 8-12 horas. El fármaco se excreta rápidamente por vía renal de forma inalterada, el 80 % en las primeras 8-10 horas y el resto dentro de las primeras 24 horas, realizándose la excreción por filtración glomerular y secreción tubular. En la tabla 5 se muestran algunas de las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de ACZ.

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de ACZ.
(Micromedexdatabase; Drugbankdatabase)

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	
Absorción UV máxima	265 nm
pKa	7,4
Comienzo efecto	30-60 min
Efecto máximo	2-4 h
Duración efecto	4-6 h
Solubilidad	0,98 mg/mL

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 mantener los niveles plasmáticos dentro del intervalo de eficacia terapéutica, 5-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ya que, a pesar de administrar una misma dosis, las concentraciones plasmáticas pueden variar. Dicho esto, el problema podría solucionarse desarrollándose una formulación oftálmica, pero como ya se ha indicado, ACZ es un fármaco poco soluble que además presenta una baja

permeabilidad, por tanto, para lograr una formulación tópica es necesario recurrir a estrategias que puedan solventar dichos problemas de solubilidad.

1.3.4. Posología

A diferencia de TIM, la posología de ACZ es distinta en adultos y niños, si bien, hemos de señalar que los datos no son comparables entre ambos fármacos dadas las diferentes vías de administración. En la tabla 6 se recogen los aspectos más destacados de la posología de la administración oral de ACZ.

Tabla 6. Posología de ACZ.
(www.vademecum.es)

ADMINISTRACIÓN ORAL	
ADULTOS	250-1000 mg/día repartidos en varias tomas
NIÑOS	125-750 mg/día repartidos en varias tomas

1.4. SOLUBILIZACIÓN MEDIANTE EL EMPLEO DE CICLODEXTRINAS

Las ciclodextrinas (CDs) son una familia de oligosacáridos cíclicos, obtenidos a partir de almidón por la degradación enzimática y se compone a partir de subunidades de glucopiranosas unidas por enlace α -1,4. Estos hidratos de carbono macrocíclicos poseen cavidades internas apolares, que pueden formar complejos con varias moléculas huésped, éstos complejos son dinámicos, es decir, la molécula huésped está en continua asociación y disociación con la CD (Mora y cols., 2015).

Un complejo es la asociación reversible de moléculas de sustrato (principio activo) con n moléculas de ligando (sustancia complejante) para dar lugar a una nueva especie que puede presentar una mayor solubilidad y velocidad de disolución (Kurkov y Loftsson, 2013).



La constante de asociación o estabilidad del complejo (K) viene dada por la siguiente expresión:

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

El número de unidades de α -D-glucopiranososa que posea define el nombre de la CD, siendo las más usuales las de seis, siete y ocho unidades (α -, β - y γ -CD, respectivamente). En su cavidad, de carácter relativamente apolar (Szejtli, 1982), se pueden alojar moléculas de fármaco formándose los denominados complejos de inclusión (figura 1).

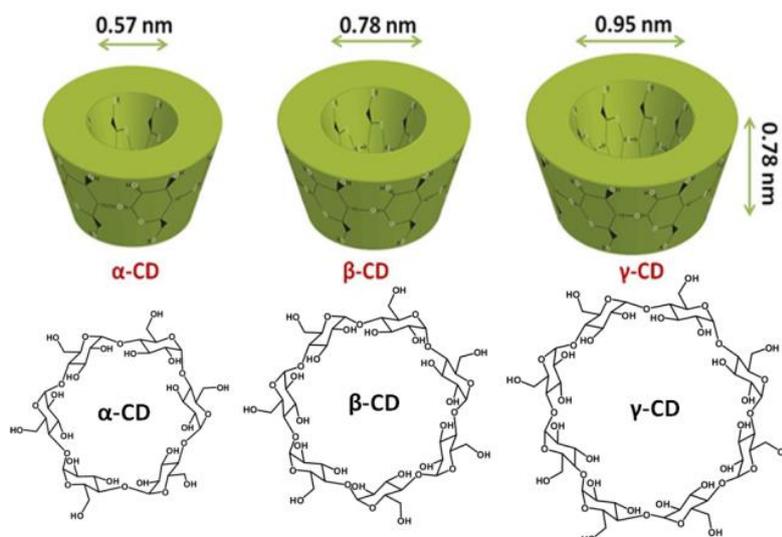


Figura 1. Estructura química de las CDs naturales.

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

La baja solubilidad relativa de las CDs naturales en agua, en especial en el caso de β -CD (Jambhekar y Breen, 2016), limita considerablemente el campo de aplicación farmacéutica de estos compuestos. Los grupos hidroxilo de las CDs constituyen los puntos de partida a la hora de realizar modificaciones estructurales, mediante incorporación de diversos grupos funcionales. Uno de los más utilizados son los derivados hidroxipropilados. En la figura 2 se representa el proceso de formación de un complejo de inclusión fármaco-ligando, pudiendo observarse como el fármaco queda incluido en la cavidad apolar de la CD.

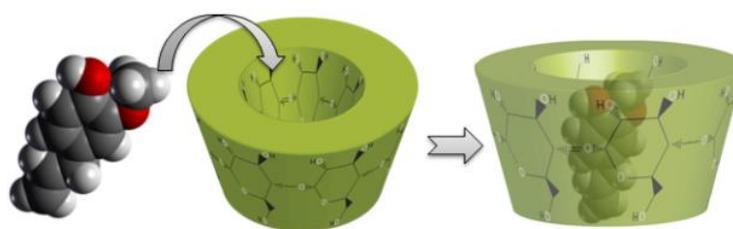


Figura 2. Esquema de la formación de un complejo de inclusión.

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

Las CDs poseen muchas de las mismas características fisicoquímicas y biológicas que sus análogos solubles en agua, las dextrinas lineales. Debido a su estructura cíclica, las CDs son de tres a cinco veces más resistentes a una hidrólisis no enzimática en comparación con las dextrinas lineales.

En el estado sólido, las CDs son al menos tan estables como la sacarosa o el almidón y se pueden almacenar durante varios años a temperatura ambiente sin degradación detectable. La

degradación no enzimática de CDs en soluciones acuosas sigue la hidrólisis catalizada por ácido. En las soluciones acuosas puras, la vida media ($t_{1/2}$) para la apertura de anillo de CD se determinó que era de aproximadamente 15 horas a 70 °C y un pH de 1,1.

Se cree que la baja solubilidad de las CDs es causada por su estructura; sus dimensiones moleculares son óptimas para la formación de un anillo de enlaces de hidrógeno intramoleculares que contrarrestan la hidratación de la CD, lo que reduce su solubilidad. Debido a su baja solubilidad acuosa, β -CD no es adecuada para la administración parenteral. Este problema se solucionó sustituyendo grupos hidroxilos por grupos hidroxipropilos mejorando, además de su solubilidad, su toxicidad, ampliando así su tolerancia (Kurkov y Loftsson, 2013).

1.5. COLIRIOS

Los colirios son disoluciones (colirios en solución acuosa u oleosa) o suspensiones (colirios en suspensión) estériles, de uno o más principios activos, destinados a su instilación en el ojo (Real Farmacopea Española, 5ª Ed., 2015).

1.5.1. Características de colirios

Los colirios pueden contener excipientes, para ajustar la tonicidad o viscosidad de la preparación, para ajustar o estabilizar el pH, para incrementar la solubilidad del principio activo o para estabilizar la preparación. Estas sustancias no afectan negativamente a la acción medicamentosa que se persigue ni causan una irritación local indebida a las concentraciones utilizadas.

Excipientes:

- Ajuste de la tonicidad: se usa cloruro sódico (NaCl), manitol o sorbitol. Se considera isotónico en el intervalo de 0,7-2% p/v de NaCl.
- Ajuste de la viscosidad: se usan sustancias mucoadhesivas como hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), metilcelulosa (MC), alcohol polivinílico, dextranos, Carbopol®.
- Ajuste o estabilización del pH: se diferencia entre baja escala o gran escala. Se usan disoluciones muy diluidas de hidróxido sódico (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) para el ajuste de pH a baja escala, así como tampones, éstos pueden ser el ácido cítrico/citrato sódico (pH= 2,5-6,5), fosfato monosódico/fosfato disódico (pH= 4,5-8,5) o ácido bórico/borato sódico (pH= 6,8-9,1) si es a gran escala.
- Incremento de la solubilidad del principio activo o estabilizar la preparación: se usan tensioactivos a baja concentración para conseguirlo. Estos tensioactivos pueden ser no iónicos o catiónicos.

Los conservantes más usados en los colirios son: cloruro de benzalconio, nitrato de fenilmercurio, acetato de fenilmercurio, clorambutol y acetato de clorhexidina.

Los colirios disoluciones son prácticamente límpidos y están prácticamente exentos de partículas cuando se examinan con una luz adecuada. Los colirios suspensiones pueden presentar un sedimento, que se dispersa fácilmente por agitación dando una suspensión lo suficientemente estable para permitir administrar la dosis correcta (Real Farmacopea Española, 5ª Ed., 2015; Piñeiro-Corrales, 2011).

1.6. ESTABILIDAD

La Real Academia Española de la lengua define estable como aquello que se mantiene sin peligro de cambiar, caer o desaparecer (Real Academia Española, 2016).

La estabilidad se define como la capacidad que tiene un producto o un principio activo de mantener por determinado tiempo sus propiedades originales (físicas, químicas, biológicas y microbiológicas) dentro de las especificaciones de calidad establecidas (World Health Organization, 2009).

El concepto de estabilidad en farmacia se entiende como la capacidad de un producto farmacéutico para mantener sus propiedades dentro de los límites especificados durante su vida útil declarada. Para definir la vida útil del medicamento deben de realizarse pruebas e investigaciones de acuerdo a un programa previamente diseñado, obteniendo información química física y biológica.

De acuerdo a un ensayo de estabilidad, los objetivos son los siguientes: seleccionar una formulación farmacéutica y un material de envasado primario adecuados y determinar la vida útil y las condiciones de almacenamiento del medicamento (Banerjee y cols., 2014).

1.6.1. Ensayos de estabilidad

El propósito de un estudio de estabilidad es establecer el periodo de tiempo en el cual las propiedades de las sustancias y/o productos farmacéuticos se mantienen dentro de sus especificaciones, bajo la influencia de una variedad de factores ambientales tales como temperatura, humedad y luz, los demás componentes de la formulación y sus envases, permitiendo determinar las condiciones de almacenamiento, periodos de reanálisis y un periodo de vida útil (Real Farmacopea Española, 5ª Ed., 2015).

Estos ensayos se realizan con la finalidad de ver cómo se comporta la forma farmacéutica o medicamento en un tiempo, con el fin de observar el comportamiento del principio activo en sí y el principio activo junto con los excipientes. La inestabilidad de la forma farmacéutica puede desencadenar la aparición de productos tóxicos por degradación de alguno de los componentes de la fórmula, pérdida de eficacia del principio activo o cambios en la apariencia del producto,

los cuales pueden llegar a ser importantes en el cumplimiento terapéutico por parte del paciente.

1.6.2. Estudio de estabilidad acelerado

Estudio diseñado para aumentar la velocidad de degradación química o cambios en las propiedades físicas de una sustancia o un producto farmacéutico, empleando condiciones de almacenamiento extremas. Estos estudios tienen como objeto determinar los parámetros cinéticos de los procesos de degradación o predecir la vida útil del producto farmacéutico en condiciones normales de almacenamiento.

Estos datos pueden también emplearse para evaluar efectos químicos a largo plazo en condiciones no aceleradas y para evaluar el impacto de desviaciones de corta duración de las condiciones de almacenamiento declaradas en el rótulo, como las que pueden ocurrir durante el transporte y distribución (Real Farmacopea Española, 5º Ed., 2015).

2. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es evaluar la posible influencia que ejerce un fármaco como timolol maleato en la degradación de acetazolamida en presencia y en ausencia de un agente complejante como hidroxipropil beta ciclodextrina.

Como objetivo secundario nos planteamos evaluar la cinética de degradación de timolol maleato con el fin poder aplicar los resultados obtenidos en el desarrollo de una formulación oftálmica que contenga tanto a los dos fármacos ensayados como a hidroxipropil- β -ciclodextrina como agente solubilizante.

3. METODOLOGÍA

3.1. MATERIALES

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

3.1.1. Fármacos

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

✓ Timolol maleato (TIM): se presenta como un polvo cristalino blanco, soluble en agua y en etanol al 96%; su fórmula empírica es $C_{13}H_{24}N_4O_3S \cdot C_4H_4O_4$, su peso molecular 432,5 g/mol (Acofarma, Barcelona).

3.1.2. Excipientes

3.1.2.1. Agente complejante

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

3.1.2.2. Conservante

✓ Cloruro de benzalconio: se presenta como un líquido incoloro o amarillento ligeramente viscoso, su fórmula molecular es $C_9H_{13}Cl-R$ (R: C_8H_{17} a $C_{18}H_{37}$), su peso molecular es de 370 g/mol y presenta una riqueza del 50 % (Guinama, Valencia).

3.1.2.3. Antioxidante/Quelante

✓ Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA): se presenta como un polvo cristalino blanco, su fórmula molecular es $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$, su peso molecular es de 372,24 g/mol y posee una riqueza del 99,2% (Fagron, Barcelona).

3.1.2.4. Isotonizante

✓ Cloruro sódico (NaCl): se presenta como un sólido blanco cristalino, su fórmula molecular es NaCl y su peso molecular es de 58.44 g/mol (Panreac, Barcelona).

3.1.2.5. Tampón

- ✓ Tampón Cítrico/Fosfato (pH \approx 7,2): ácido cítrico 1-Hidrato y $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$.
 - Ácido cítrico 1-Hidrato: se presenta 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 presenta como polvo blanco cristalino, con fórmula molecular $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y con un peso molecular de 177,99 g/mol (Panreac, Barcelona).

3.1.3. Reactivos para la fase móvil del HPLC

- ✓ Acetato sódico: polvo blanco cristalino con fórmula molecular CH_3COONa . Su solubilidad en agua es 0,47 g/mL y su peso molecular es de 82,04 g/mol (VWR Prolabo, Bélgica).
- ✓ Acetonitrilo: de calidad HPLC. Líquido incoloro, de olor característico. Su fórmula empírica es CH_3CN y su peso molecular es de 41,05 g/mol (Sigma-Aldrich, USA).
- ✓ Agua Milli-Q®: agua destilada ultrapura obtenida a través de un sistema Milli-Q® Advantage, Millipore®.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Valoración de ACZ y TIM mediante HPLC

Para cuantificar de forma exacta y precisa ambos fármacos, el método analítico de elección fue la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Este método ha sido anteriormente puesto a punto por el grupo de investigación CTS-240 (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 y TIM se llevó a cabo a una longitud de onda de 265 y 295 nm respectivamente. 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 en 1,5 mL/min, el volumen de inyección fue de 10 μL y la temperatura del horno de 45 ± 1 °C. Los tiempos de retención de los fármacos analizados fueron de 1,7 minutos para ACZ y de 4,1 minutos para TIM.

Con estas condiciones se asegura una adecuada separación entre los picos de las moléculas activas y el resto de componentes de las muestras.

Una vez ajustada la técnica cromatográfica, se determinó la linealidad del método y su límite de cuantificación. 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 integran las áreas registradas en el espectro para cuantificar la cantidad de fármaco presente en la 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, una primera con ambos fármacos sin la presencia de hidroxipropil- β -ciclodextrina y una segunda con todos los reactivos presentes para nuestra formulación final.

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 es realizado en una campana de flujo laminar, acompañado de una manipulación con guantes de látex y mascarilla, para mantener así un clima de trabajo lo más aséptico posible.

Como se mencionó anteriormente, el tampón está compuesto por dos tipos de reactivos, ambos disueltos en un vehículo acuoso, en este caso se usó 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 un 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 y obteniendo la disolución tampón final que presentara un pH en torno a 7,2, medido en un pH-metro CRISON GLP21.

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

Tabla 7. Elaboración del tampón.

Reactivo	g a tomar	g reales	V final (mL)	mL	pH tampón
Ácido cítrico 1-hidrato	21,0	21,0002	1000	130,5	
Di-Sodio hidrogeno fosfato 2-hidrato	36,5	36,5002	1000	869,5	
TOTAL				1000	7,26

Una vez elaborado el vehículo, se procede a la elaboración de cada lote de la formulación asignada siguiendo las pautas que se detallan a continuación y las cuales serán resumidas en las tablas 8 y 9:

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 adicionan ambos fármacos, 0,050 g de ACZ y 0,068 g de TIM, comenzando siempre por la sal de timolol debido a su alta solubilidad acuosa. La isotonicidad del preparado se calculó por el método del descenso crioscópico, dando un resultado hipotónico, por lo que resulta necesario añadir una cantidad de 0,911 g de NaCl para alcanzar la isotonicidad. 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 para finalmente tomar 1 mL y sellarlo en viales de vidrio topacio, que serán analizados por cromatografía de alta resolución. La cantidad de viales necesarios para cada lote será de un total de 66 para cada estufa INDELAB, donde quedarán almacenados a una temperatura determinada.

Tabla 8. Elaboración de la formulación 1.

Formulación 1	Reactivos	g teóricos	g reales	% p/v	mL de formulación	pH
Lote 1	EDTA	0,05	0,05002	0,05		
	Benzalconio Cl ⁻	0,01	0,01000	0,01		
	TIM	0,068	0,06802	0,068		
	ACZ	0,05	0,05004	0,05		
	NaCl	0,911	0,91103	hasta isotonía		
	TOTAL				100	7,28
Lote 2	EDTA	0,05	0,04996	0,05		
	Benzalconio Cl ⁻	0,01	0,01000	0,01		
	TIM	0,068	0,06807	0,068		
	ACZ	0,05	0,05003	0,05		
	NaCl	0,911	0,91098	hasta isotonía		
	TOTAL				100	7,25
Lote 3	EDTA	0,05	0,05004	0,05		
	Benzalconio Cl ⁻	0,01	0,01000	0,01		
	TIM	0,068	0,06798	0,068		
	ACZ	0,05	0,04999	0,05		
	NaCl	0,911	0,91101	hasta isotonía		
	TOTAL				100	7,24

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 13,8 g del agente complejante (HP-β-CD). Una vez disuelto, se adicionan ambos fármacos, 0,5 g de ACZ y 0,68 g de TIM, comenzando siempre por la sal de timolol debido a su alta solubilidad acuosa. La isotonicidad del preparado se calculó por el método del descenso crioscópico, dando un resultado hipotónico, por lo que resulta necesario añadir una cantidad de 0,145 g de NaCl para alcanzar la isotonicidad. 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 para finalmente tomar 1 mL y sellarlo en viales de vidrio topacio, que serán analizados por cromatografía de alta resolución. La cantidad de viales necesarios para cada lote será de un total de 66 para cada estufa INDELAB, donde quedarán almacenados a una temperatura determinada.

Tabla 9. Elaboración de la formulación 2.

Formulación 2	Reactivos	g teóricos	g reales	% p/v	mL de formulación	pH
Lote 1	EDTA	0,05	0,05005	0,05		
	Benzalconio Cl ⁻	0,01	0,01000	0,01		
	TIM	0,68	0,68002	0,68		
	ACZ	0,50	0,50006	0,50		
	HP-β-CD	13,80	13,80003	13,80		
	NaCl	0,145	0,14505	hasta isotonía		
	TOTAL				100	7,26
Lote 2	EDTA	0,05	0,05001	0,05		
	Benzalconio Cl ⁻	0,01	0,01000	0,01		
	TIM	0,68	0,68005	0,68		
	ACZ	0,50	0,50003	0,50		
	HP-β-CD	13,80	13,80009	13,80		
	NaCl	0,145	0,14507	hasta isotonía		
	TOTAL				100	7,25
Lote 3	EDTA	0,05	0,04998	0,05		
	Benzalconio Cl ⁻	0,01	0,01000	0,01		
	TIM	0,68	0,68001	0,68		
	ACZ	0,50	0,50004	0,50		
	HP-β-CD	13,80	13,80006	13,80		
	NaCl	0,145	0,14498	hasta isotonía		
	TOTAL				100	7,2

3.2.2.2. Selección de excipientes

- **Agente complejante:** HP- β -CD, la elección de éste polímero hidrosoluble se debe a los problemas que presenta β -CD tanto por su solubilidad acuosa como por su seguridad.
- **Isotonizante:** NaCl, se elige ésta sal como isotonzante 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 CTS-612 Y CTS-214, donde se pusieron de manifiesto dos clases de conservantes que podría servir de elección en este tipo de formulaciones, el cloruro de benzalconio y el Nipagin® sódico, siendo éste 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 cloruro de benzalconio.
- **Antioxidante/Quelante:** EDTA, la elección de éste reactivo se debe además de por ser un antioxidante secundario, si se formula junto a el 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 +TIM y ACZ +HP- β -CD+TIM), sometiendo bajo estudio a tres lotes diferentes de cada una de las formulaciones.

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 cada formulación ensayada se realizaron 12 análisis para determinar la desviación estándar, así como el coeficiente de variación con el fin de valorar la precisión de los análisis.

3.2.3.2. Condiciones

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

- **Temperatura:** se trabajará en condiciones de tres temperaturas diferentes: 30, 40 y 50 °C, ya que según la ICH la zona climática a la que corresponde el país de comercialización (España) es una zona tipo II (temperatura media de 25 °C) (ICH, 2016).
- **Humedad:** se trabajará a una humedad constante en las tres estufas, un 65 % de humedad relativa.
- 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

Teniendo en cuenta la más que posible degradación de ACZ a las temperaturas de 40 y 50 °C, las muestras en estos ensayos fueron tomadas a 2, 4, 6, 8, 10, 15, 30, 60, 90 y 180 días en 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 = $K \cdot [A]^a \cdot [B]^b$, donde A y B son los reactivos y a y b son los órdenes de reacción, pudiendo ser estos de orden 0, 1 o 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, por lo que se rigen y se representan en la figura 3:

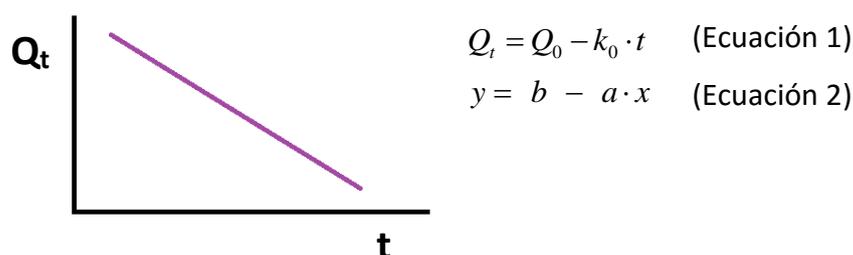


Figura 3. Representación de una ecuación de orden 0.

- 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, por lo que se rigen y se representan en la siguiente figura:

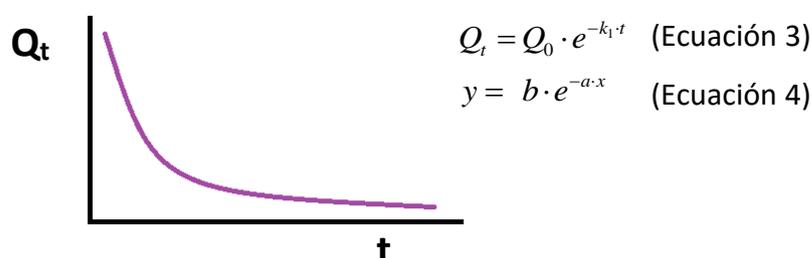


Figura 4. Representación de una ecuación de orden 1.

Para facilitar el tratamiento de los datos se tiende a trabajar con logaritmos neperianos en vez de con exponenciales para transformar la ecuación exponencial en la ecuación de una recta y tratar los datos mediante regresiones lineales.

- 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, por lo que se rigen y se representan en la siguiente figura:

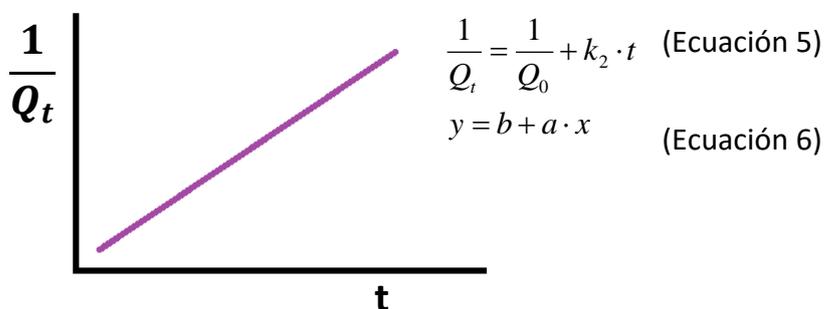


Figura 5. Representación de una ecuación de orden 2.

3.2.4.2 Cálculo de órdenes de reacción

El método de sustitución o de la representación gráfica de los datos es el método de elección, el cual se lleva a cabo por la representación, frente al tiempo, de los datos experimentales obtenidos mediante un método analítico validado. Los datos se ajustan a las diferentes cinéticas. La cinética final será 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 se observa 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. 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: $K = A \cdot e^{-E_a/RT}$ (Ecuación 7), donde:

A = factor de frecuencia (cte).

E_a = energía de activación (cal. mol⁻¹).

R = cte de los gases (1,987 cal K⁻¹·mol⁻¹).

T = temperatura en grados Kelvin.

Con esta ecuación podemos predecir cuál será el valor de la constante de degradación 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 los reactivos. La velocidad de una reacción es proporcional al número de colisiones por unidad de tiempo y este número aumenta conforme aumenta la temperatura.
- La energía de activación es la energía mínima necesaria para que se produzca una reacción química. Ésta energía se calcula mediante la representación del logaritmo neperiano de la ecuación de Arrhenius, siendo ésta la siguiente expresión:

$$\ln K = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} ; y = b - a \cdot x \text{ (Ecuación 8). Siendo la pendiente} = E_a/R$$

Una vez conocida la energía de activación de la reacción de degradación se puede calcular la velocidad de degradación a través de la ecuación de Arrhenius o mediante extrapolación gráfica de los datos.

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 éste 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).

Ésta expresión varía según la cinética del proceso sea de orden 0, 1 o 2 respectivamente.

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

(Ecuación 10); (Ecuación 11); (Ecuación 12)

- 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 o 2, se rige por las siguientes ecuaciones respectivamente.

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

(Ecuación 13); (Ecuación 14); (Ecuación 15)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

Los resultados obtenidos por este mismo grupo de investigación en el trabajo de fin de grado denominado “Estudios de complejación con timolol y acetazolamida con hidroxipropil-beta-ciclodextrina: aplicación al desarrollo de una formulación oftálmica” (pendiente de publicar) desarrollado por Sergio Portillo Vázquez y tutelado por el doctor José Ignacio Pérez Martínez, demostraron que si bien ACZ era capaz de formar un complejo de inclusión con HP- β -CD, la presencia de TIM no modificaba significativamente la constante de complejación de dicho complejo, hecho indicativo de la poca tendencia que tiene dicho fármaco a alojarse en la cavidad de la CD. Este hecho se corroboró mediante los métodos de Job plot y Benesi-Hildebrand.

Si bien conocíamos la poca influencia que TIM ejercía en el equilibrio de complejación de ACZ, desconocíamos si afectaría a la estabilidad en solución de dicho fármaco. Algunos estudios publicados hacen referencia a la inestabilidad química de ACZ en solución, pero hay muy pocas referencias bibliográficas respecto a cómo afecta un excipiente como HB- β -CD y la presencia de otro fármaco como TIM a la misma.

Así, en la figura 6 se representa como varía el porcentaje de ACZ frente al tiempo en la formulación 1 (ausencia de CD).

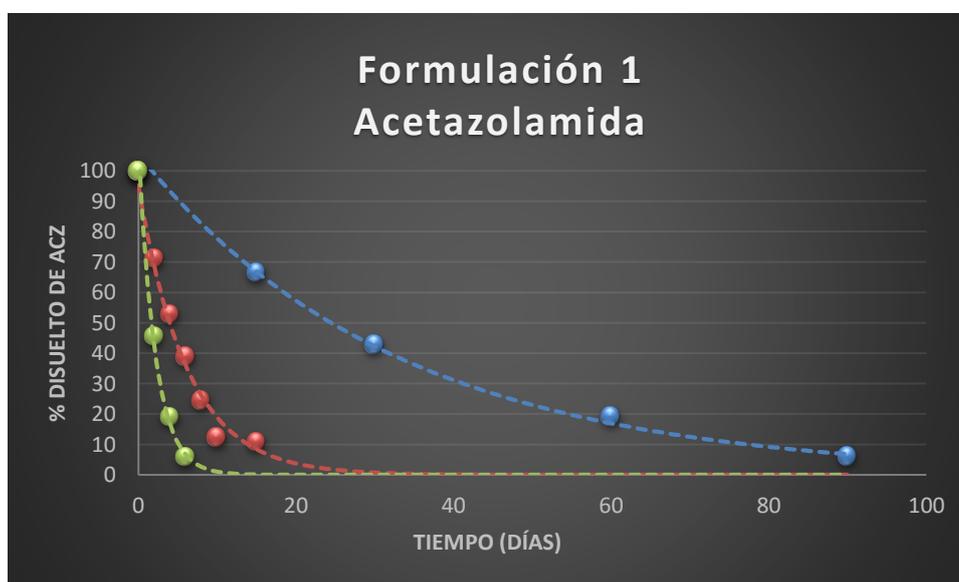


Figura 6. Degradación de ACZ en la formulación 1 (\circ) 30 °C, (\circ) 40 °C, (\circ) 50 °C.

Se observa como el porcentaje de ACZ disminuye drásticamente frente al tiempo, siendo mayor la velocidad de degradación cuanto mayor es la temperatura (del Pilar-Corena y cols., 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 10 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. De igual manera se incluyen los datos de las formulaciones de referencia cuya composición es idéntica a la que hemos estudiado en ausencia de TIM, lo que nos sirve para ver la influencia de este fármaco en la cinética de degradación de ACZ. Estos datos serán publicados en el trabajo de fin de grado de Farmacia cuyo título es “Estudios de estabilidad del complejo de inclusión acetazolamida-hidroxipropil-beta-ciclodextrina” y que será defendido por Francisco José Garrido Gamboa.

Tabla 10. Constantes de degradación de ACZ en la formulación 1 y formulación de referencia.

Formulación	Temperatura (°C)	K (días ⁻¹)	R ²
Formulación 1	30	0,031	0,9941
Referencia	30	0,033	0,9946
Formulación 1	40	0,189	0,9383
Referencia	40	0,162	0,9913
Formulación 1	50	0,491	0,9915
Referencia	50	0,502	0,9958

En la figura 7 se recogen las escasas variaciones del porcentaje de TIM frente al tiempo en la formulación 1 (ausencia de CD), a lo largo de los 6 meses de ensayo y a las tres temperaturas ensayadas.

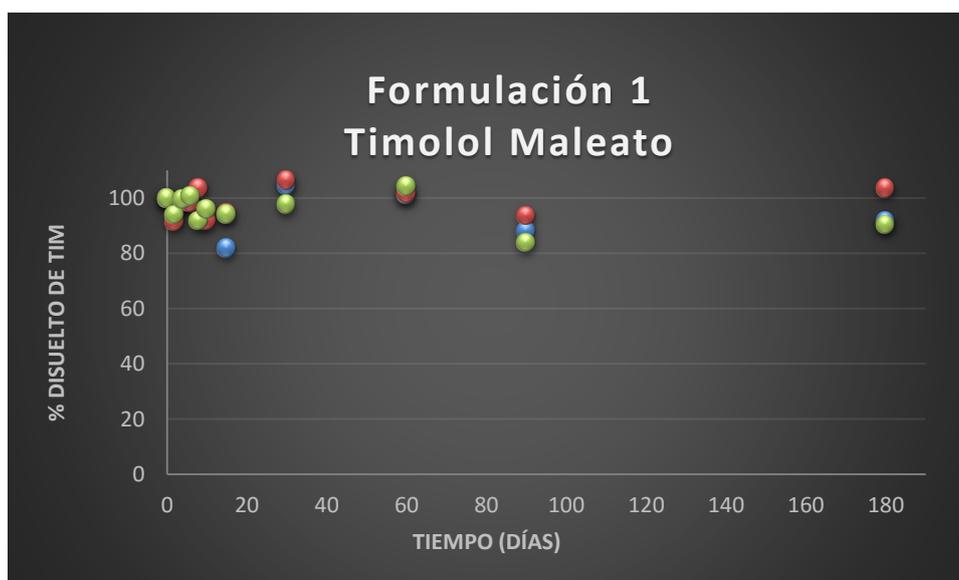


Figura 7. Degradación de TIM en la formulación 1 (●) 30 °C, (●) 40 °C, (●) 50 °C.

Como ha sido comentado por diferentes autores (Kuljaeni y Amin, 2000), TIM es bastante estable en solución, no observándose cambios significativos en la formulación, lo que hace indicar que la temperatura a los intervalos de tiempo estudiados no afecta a la degradación del principio activo, por lo que TIM es un buen candidato para formar parte de la formulación final gracias a su gran estabilidad y a su sinergismo de acción con ACZ.

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

En la figura 8 se muestra curva de degradación de los valores medios de la formulación 2 (con HP- β -CD) a las tres temperaturas ensayadas. Como era de esperar, al igual que en la anterior formulación, la degradación de ACZ sigue una cinética de primer orden, siendo reseñable cómo la presencia del agente complejante, 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 6 meses de 15,6 % comparado con la formulación 1, como se aprecia en la tabla 11.

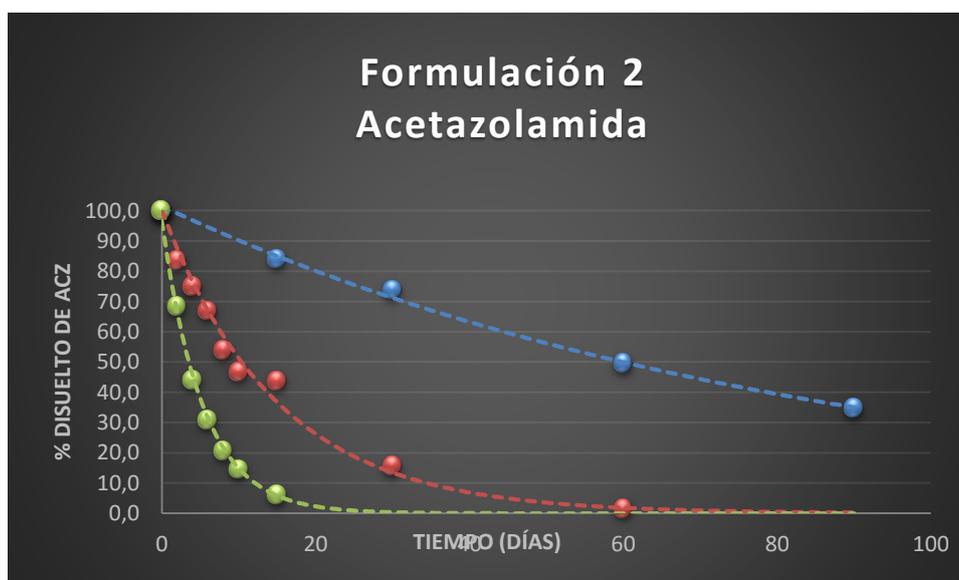


Figura 8. Degradación de ACZ en la formulación 2 (● 30 °C, (○) 40 °C, (○) 50 °C.

Tabla 11. Resumen de los % remanentes de ACZ en las dos formulaciones ensayadas.

Temperatura	% Remanente de ACZ	1 MES	3 MESES	6 MESES
30 °C	Formulación 1	42,9 %	6,2 %	--
	Formulación 2	7,0 %	34,8 %	15,6 %
40 °C	Formulación 1	--	--	--
	Formulación 2	15,7 %	--	--
50 °C	Formulación 1	--	--	--
	Formulación 2	--	--	--

En la tabla 12 se recogen los valores medios de las diferentes constantes de degradación a las tres temperaturas ensayadas utilizando un intervalo de confianza del 95 % (ICH, 2016), así como los coeficientes de determinación de cada una de las funciones exponenciales que mejor se ajustan a los datos experimentales obtenidos. De igual manera se incluyen los datos de las formulaciones de referencia cuya composición es idéntica a la que hemos estudiado en ausencia de TIM, lo que nos sirve para ver la influencia de este fármaco en la cinética de degradación de ACZ. Al igual que en la formulación 1, éstos datos serán publicados en el trabajo de fin de grado de Francisco José Garrido Gamboa.

Tabla 12. Constantes de degradación de ACZ en la formulación 2 y formulación de referencia.

Formulación	Temperatura (°C)	K (días ⁻¹)	R ²
Formulación 2	30	0,010	0,9955
Referencia	30	0,014	0,9943
Formulación 2	40	0,058	0,9911
Referencia	40	0,082	0,9909
Formulación 2	50	0,186	0,996
Referencia	50	0,231	0,998

En la figura 9 se recogen las escasas variaciones del porcentaje de TIM frente al tiempo ensayado en la formulación 2 bajo las condiciones experimentales.

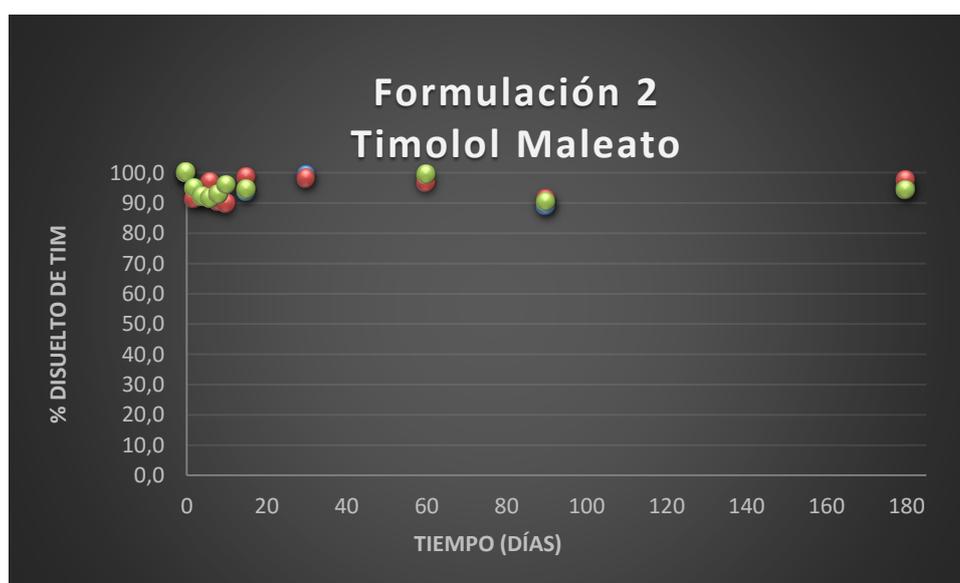


Figura 9. Degradación de TIM en la formulación 2 (●) 30 °C, (●) 40 °C, (●) 50 °C.

Como ocurría en la formulación 1 (ausencia de CD) TIM no sufre grandes fluctuaciones a lo largo de los 6 meses de ensayo y a las tres temperaturas ensayadas lo que hace pensar que es estable en solución al pH ensayado y a las temperaturas ensayadas al menos durante los 6 de ensayo (Kulkarni y Amin, 2000). Al ser las gráficas prácticamente superponibles de las formulaciones 1 y 2, se demuestra, como ya fue resaltado en el trabajo de fin de grado de Sergio Portillo Vázquez anteriormente citado, que éste fármaco no forma un complejo con HP- β -CD por lo que la presencia de este agente complejante no afecta a TIM.

4.3. APLICACIÓN DE LA ECUACIÓN DE ARRHENIUS PARA DETERMINAR LA ESTABILIDAD DE LA FORMULACIÓN OFTÁLMICA

Como ya se mencionó anteriormente, la ecuación de Arrhenius es el método de elección para reproducir los resultados obtenidos en los ensayos de estabilidad y poder calcular el periodo de validez de un medicamento (Patterson y cols., 2015).

En la figura 10 se muestra como se ajustan nuestros valores experimentales a la ecuación de Arrhenius, cuando se representan los logaritmos neperianos de las constantes de degradación a las tres temperaturas ensayadas frente a la inversa de la temperatura en grados Kelvin, para la formulación 1.

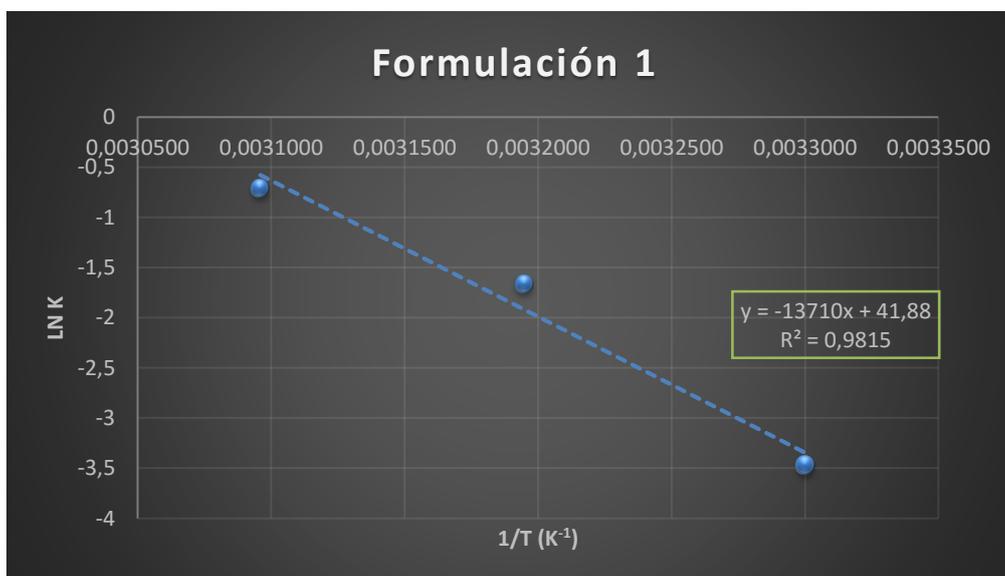


Figura 10. Representación de los logaritmos neperianos de las constantes de degradación de ACZ frente a la inversa de la temperatura para la formulación 1.

De la ecuación de la recta (ecuación 8) se obtiene el valor de la energía de activación y la constante A. A partir de estos valores podemos calcularla constante de degradación a 25 °C mediante extrapolación de los datos. Aplicando las ecuaciones 11 y 14 se obtienen el periodo

de validez y la semivida de degradación de ACZ respectivamente para la formulación 1. Todos estos datos se recogen en la tabla 13.

Tabla 13. Parámetros obtenidos a partir de la ecuación de Arrhenius para ACZ en la formulación 1.

Parámetros	Formulación 1
E_a (Kcal/mol)	27,24
$K_{25\text{ °C}}$ (días ⁻¹)	0,016
t_{50} (días)	42,96
t_{90} (días)	6,51

Análogamente, en la figura 11 se recoge el ajuste a la ecuación de Arrhenius para ACZ en la formulación 2.

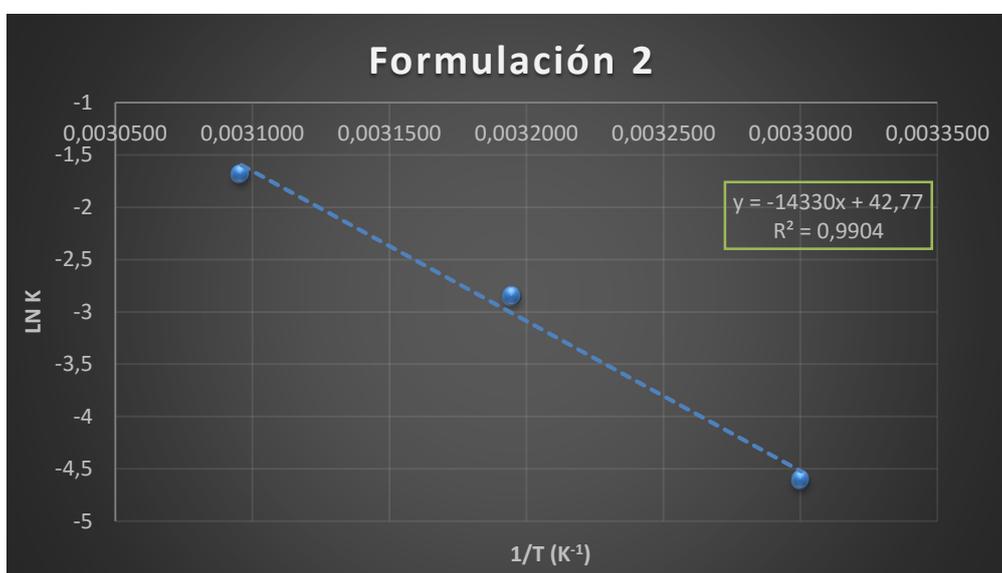


Figura 11. Representación de los logaritmos neperianos de las constantes de degradación de ACZ frente a la inversa de la temperatura para la formulación 2.

Al igual que con la formulación 1 se recogen los mismos parámetros para la formulación 2, que están recogidos en la tabla 14.

Tabla 14. Parámetros obtenidos a partir de la ecuación de Arrhenius para ACZ en la formulación 2.

Parámetros	Formulación 2
E_a (Kcal/mol)	27,54
$K_{25\text{ °C}}$ (días ⁻¹)	0,005
t_{50} (días)	127,00
t_{90} (días)	19,24

Como se observa, el periodo de validez de la formulación 2 es hasta tres veces mayor que el de la formulación 1, este hecho significativo confirma que la complejación del fármaco con HP- β -CD tiene lugar en grupos radicales involucrados en el proceso de degradación mediante hidrolisis del fármaco, reacción producida en el grupo radical amida $\text{CH}_3\text{-CO-NH-R}$, lo que justifica que la presencia de HP- β -CD sea la responsable del aumento de estabilidad de ACZ tal como aparece reflejado en la bibliografía (Másson y cols., 1999).

Este tratamiento de los datos no sería necesario para TIM, ya que se ha demostrado que es una sustancia que a los intervalos de tiempo y temperatura estudiados no se aprecia degradación. Esto indica que el fármaco limitante en la degradación del producto farmacéutico y por tanto responsable de su estabilidad es ACZ.

5. CONCLUSIONES

1. Hidroxipropil- β -ciclodextrina ejerce un efecto sobre el fármaco acetazolamida, este efecto se traduce en una disminución de la constante de degradación del fármaco, como se ha demostrado en este trabajo, por lo que podemos concluir que hidroxipropil- β -ciclodextrina es un agente complejante que disminuye la degradación de acetazolamida mediante un mecanismo de complejación entre ambos.

2. La degradación de timolol maleato no es significativa, y su presencia no modifica significativamente la degradación de acetazolamida.

3. La formulación oftálmica que contiene hidroxipropil- β -ciclodextrina sometida a ensayo, tiene un periodo de validez demasiado corto incluso estando acetazolamida formando parte del complejo de inclusión con hidroxipropil- β -ciclodextrina. Para poder comercializar una formulación de composición similar habría que aumentar el periodo de validez. Para solucionar este problema nuestro grupo de investigación ya está barajando diferentes posibilidades para aumentar la estabilidad de la forma farmacéutica y así poder comercializar el preparado oftálmico.

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. Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios. CIMA: Centro de Información Online de Medicamentos de la AEMPS. [en línea]. [Consultado en marzo 2016]. Disponible en:
<http://www.aemps.gob.es/cima/fichasTecnicas.do?metodo=detalleForm>.
3. Banerjee S, Chattopadhyay P, Ghosh A, Bhattacharya S, Kundu A, Veer V. 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. Becker B. Decrease in intraocular pressure in man by a carbonic anhydrase inhibitor. *Diamox Am J Ophthalmol.* 1954; 37: 13-15.
5. 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.
6. Bucolo C, Salomone S, Drago F, Reibaldi M, Longo A, Uva MG. Pharmacological management of ocular hypertension: current approaches and future prospective. *Curr Opin Pharmacol.* 2013; 13 (1): 50-55.
7. Cabanzo L. Desarrollo de una formulación de transfesomas de acetazolamida y timolol para administración oftálmica. Trabajo fin de máster, CITURME. Universidad de Sevilla. Sevilla. 2013.
8. 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.
9. Chiang B, Kim YC, Doty AC, Grossniklaus HE, Schwendeman SP, Prausnitz MR. Sustained reduction of intraocular pressure by supraciliary delivery of brimonidine-loaded poly (lactic acid) microspheres for the treatment of glaucoma. *J Control Rel.* 2016; 228: 48-57.
10. del Pilar-Corena M, van den Hurk P, Zhong H, Brock C, Mowery R, Johnson JV, Linser PJ. Degradation and effects of the potential mosquito larvicides methazolamide and acetazolamide in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2006; 64 (3): 369-376.

11. Díaz-P JM. Prevención y tratamiento actual del glaucoma. Rev Med Clin Condes. 2010; 21 (6): 891-900.
12. El-Kimary El, 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.
13. Glaucoma Research Fundation. Care and treatment. Medication guide. 2015 [en línea]. [Consultado en marzo 2016]. Disponible en:
<http://www.glaucoma.org/treatment/medication-guide.php>.
14. 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.
15. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11ª ed. México: Mc Graw Hill. 2007; p. 1707-1724.
16. 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. 2016; 1022: 109-117.
17. ICH. ICH Quality Guidelines Stability. [en línea] [Consultado en mayo 2016]. Disponible en: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.
18. 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.
19. Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutic. Int J Pharm. 2002; 248: 1-14.
20. Keilin D, Mann T. Purification and nature of the enzyme. Biochem J. 1940; 34 (8-9): 1163-1176.
21. 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.
22. Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins. Int J Pharm. 2013; 453: 167-180.
23. Lavik E, Kuehn MH, Kwon YH. Novel drug delivery systems for glaucoma. Eye. 2011; 25: 578-586.

24. Másson M, Pitha J, Loftsson T. Synthesis of Cyclic Glycerol Ether Cyclodextrin Derivatives and Investigation of their Binding Properties with Drugs. *J Inclusion Phenom Mol.* 1999; 33: 459-467.
25. Molier-Lemus T, Rojas-Hernández NM. Evaluación de la actividad antibacteriana de los preservos industriales. *CENIC Ciencias Biológicas.* 2007; 38 (1): 45-48.
26. 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.
27. Muñoz-Negrete FJ, González-Martín-Moro J, Casas-Llera P, Urcelay-Segura JL, Rebolleda G, Ussa F, Güerri-Monclús N, Méndez-Hernández C, Moreno-Montañés J, Villegas-Pérez MP, Pablo LE, García-Feijó J. Guía terapéutica del glaucoma crónico por cierre angular primario. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2015; 90 (3): 119-138.
28. 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.
29. 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.
30. Piñeiro-Corrales G. Aspectos prácticos de la farmacotecnia en un servicio de farmacia. Situación actual. Primera edición. Madrid. Master Line & Prodigio, S.L. 2011.
31. Portillo-Vázquez S. Estudios de complejación con timolol y acetazolamida con hidroxipropil-beta-ciclodextrina: aplicación al desarrollo de una formulación oftálmica. Trabajo fin de grado. Universidad de Sevilla. Sevilla. 2015.
32. Real academia española. Estable. 2016 [en línea]. [consultado en abril 2016]. Disponible en: <http://dle.rae.es/?id=GikXRGw>.
33. Real Farmacopea Española (2015). 5ª Ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.
34. 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.
35. Shihui Y, Qi-Ming W, Xin W, Dandan L, Wenji Z, Tiantian Y, Xinggang Y, Weisan P. Liposome incorporated ion sensitive in situ gels for ophthalmic delivery of timolol maleate. *Int J Pharm.* 2015; 480: 128-136.
36. Szejtli J. Cyclodextrins and their inclusion complexes. (Ed.). Budapest: Académiai Kiadó; 1982.

37. Valencia C, Tobón E, Castaño C. Acetazolamide as a singlet molecular oxygen quencher. *J Photochem Photobiol, A*. 2013; 251: 113-117.
38. World Health Organization. Who expert committee on specifications for pharmaceuticals preparations. 2009 [en línea]. [Consultado en mayo 2016]. Disponible en:
http://www.who.int/medicines/publications/pharmprep/pdf_trs953.pdf?ua=1#page=101.