

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

2019

# ESTUDIO ACELERADO DE ESTABILIDAD A pH CONTROLADO DE UN COLIRIO SOLUCIÓN

**ARACELI FUERTES CRIADO**





**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA**

TRABAJO FIN DE GRADO DEL DOBLE GRADO EN FARMACIA, ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

TÍTULO: **ESTUDIO ACELERADO DE ESTABILIDAD A pH CONTROLADO DE UN COLIRIO**

**SOLUCIÓN**

TRABAJO DE CARÁCTER EXPERIMENTAL

ARACELI FUERTES CRIADO

TUTELADO POR EL DOCTOR: JOSÉ IGNACIO PÉREZ MARTÍNEZ

Lugar: Facultad de Farmacia

Fecha de presentación: febrero de 2019



## **RESUMEN:**

El alto impacto que posee el glaucoma actualmente la sitúa como una de las patologías oculares con mayor incidencia a nivel global. El efecto sinérgico de dos fármacos sobre la presión intraocular es la vía de elección en el mayor número de casos para el tratamiento de dicha enfermedad. La combinación de un  $\beta$ -bloqueante (timolol) y un inhibidor de la anhidrasa carbónica (acetazolamida) en una formulación oftálmica ha sido desarrollada por el grupo de investigación: Investigación y Desarrollo Farmacotécnico de Medicamentos (CTS612), en un proyecto de Tesis Doctoral iniciado en 2014, con el fin de aportar una opción diferente a lo ya existente en el mercado. Debido a los problemas de solubilidad y estabilidad presentados por la acetazolamida, se modificó la fórmula inicial elaborada a pH de 7,2 y se diseñó un estudio de estabilidad acelerado para dicha formulación a pH de 5,3. El presente trabajo se fija como objetivo evaluar la influencia de una disminución en el pH tanto en el equilibrio de complejación acetazolamida:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, como en los parámetros de degradación de acetazolamida, así como confirmar la viabilidad de la formulación diseñada. Los resultados pudieron confirmar una mejora en los parámetros de degradación de la acetazolamida, siendo esta mejora insuficiente.

**Palabras clave:** acetazolamida, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, glaucoma, estudio de estabilidad acelerado, colirios.

**ABSTRACT:**

The high impact of glaucoma currently places it as one of the ocular pathologies with the highest global incidence. The synergistic effect of two drugs on intraocular pressure is the route of choice in most of the cases for the treatment of this disease. The combination of a  $\beta$ -blocker (timolol) and a carbonic anhydrase inhibitor (acetazolamide) in an ophthalmic formulation has been developed by the research group Pharmaceutical Research and Development of Medicines (CTS612), in a Doctoral Thesis project initiated in 2014, to provide a different option from those already existing in the market. Due to the solubility and stability problems presented by acetazolamide, the initial elaborated formulation at pH of 7,2 was modified and an accelerated stability study was designed for the same formulation at pH of 5,3. The objective of this work is to evaluate the influence of a decrease in pH on both the acetazolamide complexation equilibrium: hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, and on the acetazolamide degradation parameters, as well as to confirm the viability of the designed formulation. The results confirmed an improvement in the acetazolamide degradation parameters, being this improvement insufficient.

**Keywords:** acetazolamide, hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, glaucoma, accelerated stability study, eye drops.

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN:</b>	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>GLAUCOMA</b>	<b>7</b>
1.1.1	Concepto:	7
1.1.2	Factores de riesgo:	8
1.1.3	Tratamiento:	9
<b>1.2</b>	<b>ACETAZOLAMIDA (ACZ)</b>	<b>10</b>
1.2.1	Antecedentes:	10
1.2.2	Mecanismo de acción:	10
1.2.3	Estructura química, características fisicoquímicas y farmacocinéticas:	11
<b>1.3</b>	<b>TIMOLOL MALEATO (TIM)</b>	<b>11</b>
1.3.1	Antecedentes:	12
1.3.2	Mecanismo de acción:	12
1.3.3	Estructura química, características fisicoquímicas y farmacocinéticas:	12
<b>1.4</b>	<b>CICLODEXTRINAS (CD)</b>	<b>12</b>
1.4.1	Antecedentes:	13
1.4.2	Solubilización mediante complejación con CD:	13
1.4.3	Derivados de las ciclodextrinas:	14
<b>1.5</b>	<b>COLIRIOS:</b>	<b>14</b>
1.5.1	Definición:	14
1.5.2	Componentes de los colirios:	14
<b>1.6</b>	<b>ESTUDIO DE ESTABILIDAD:</b>	<b>15</b>
1.6.1	Concepto:	15
1.6.2	Propósitos:	15
1.6.3	Estudio de estabilidad acelerado:	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS:</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGÍA:</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERIALES:</b>	<b>19</b>
<b>3.2</b>	<b>MÉTODOS:</b>	<b>19</b>
3.2.1	Valoración de ACZ y TIM mediante HPLC:	19
3.2.2	Estudio de solubilidad ACZ HP- $\beta$ -CD a pH 5,3:	20
3.2.3	Elaboración de las formulaciones de referencia:	21
3.2.4	Elaboración de la formulación oftálmica:	21
3.2.5	Diseño del estudio de estabilidad:	23

3.2.6	Cálculo de los parámetros de degradación. ....	23
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>25</b>
4.1	ESTUDIO DE SOLUBILIDAD ACZ:HP- $\beta$ -CD A pH 5,3. ....	25
4.2	INFLUENCIA DEL pH SOBRE EL PROCESO DE DEGRADACIÓN DE ACZ. ....	26
4.3	INFLUENCIA DE LA HP- $\beta$ -CD SOBRE EL PROCESO DE DEGRADACIÓN DE ACZ A pH 5,3.....	27
4.4	INFLUENCIA DE TIM SOBRE LA DEGRADACIÓN DE ACZ EN LA FORMULACIÓN FINAL A pH 5,3.....	29
4.5	PARÁMETROS DE DEGRADACIÓN. ....	30
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>35</b>



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- ACZ:** acetazolamida.  
**CA:** anhidrasa carbónica.  
**CAI:** inhibidor de la anhidrasa carbónica.  
**CD:** ciclodextrina.  
**HA:** humor acuoso.  
**HP-β-CD:** hidroxipropil-β-ciclodextrina.  
**PIO:** presión intraocular.  
**TIM:** timolol maleato.

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Grupos farmacológicos más importantes en el tratamiento del glaucoma. ....	9
<b>Tabla 2.</b> Características fisicoquímicas y farmacológicas de ACZ.....	11
<b>Tabla 3.</b> Características fisicoquímicas y farmacocinéticas de TIM. ....	12
<b>Tabla 4.</b> Ejemplos de colirios comercializados en España a pH ácido. ....	22
<b>Tabla 5.</b> Valores de la constante de complejación (k <sub>1:1</sub> ) y eficacias solubilizantes (Es) asumiendo complejo 1:1 a diferentes pH. ....	26
<b>Tabla 6.</b> Parámetros de degradación.....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química de las CD naturales.....	13
<b>Figura 2.</b> Esquema de la formulación de un complejo de inclusión. ....	14
<b>Figura 3.</b> Diagrama de solubilidad de ACZ en presencia de HP-β-CD a diferentes pH.....	25
<b>Figura 4.</b> Ecuación de Henderson-Hasselbalch para un ácido débil. ....	26
<b>Figura 5.</b> Cinética de degradación de ACZ a pH 5,3 (●) y a pH 7,2 (○). ....	27
<b>Figura 6.</b> Reacción de hidrólisis de ACZ.....	27
<b>Figura 7.</b> Cinética de degradación de ACZ en presencia de HP-β-CD a pH 5,3 (●) y a pH 7,2 (○).28	
<b>Figura 8.</b> Hidrólisis de ACZ y estructura del complejo ACZ:HP-β-CD. ....	28
<b>Figura 9.</b> Cinética de degradación de TIM en la formulación final a pH 5,3 (●) y a pH 7,2 (○). ...	29
<b>Figura 10.</b> Cinética de degradación de ACZ en la formulación final a pH 5,3 (●) y a pH 7,2 (○). .29	



## **1 INTRODUCCIÓN:**

### **1.1 GLAUCOMA**

#### **1.1.1 Concepto:**

El glaucoma es una enfermedad ocular crónica, neurodegenerativa e irreversible, caracterizada por cambios estructurales producidos en la cabeza del nervio óptico y por la muerte progresiva de las células ganglionares retinianas, que conduce a una pérdida de la visión y deterioro de la calidad de vida (Kalogerou et al., 2018; Saradhi y Babu, 2016). Se trata de la neuropatía óptica más común (Chiang et al., 2016), en la cual, la pérdida de axones en las células ganglionares de la retina interrumpe permanentemente la transmisión de la información visual desde la retina al cerebro. De esta manera los pacientes experimentan una pérdida de visión gradual e indolora desde la periferia, llegando a afectar a la zona central. Actualmente más de 60 millones de personas padecen esta enfermedad (Braunger et al., 2015) y se estima que para 2020 habrá cerca de 80 millones de afectados, siendo ciegos bilaterales por glaucoma más de 11 millones (Gupta y Chen, 2016).

La academia Americana de Oftalmología amplía la definición de glaucoma introduciendo como factor de riesgo el incremento de la presión intraocular (PIO) (Castañeda et al., 2014). La reducción de la PIO es el único factor de riesgo modificable, con el fin de prevenir la pérdida de visión consecuente al glaucoma (Chiang et al., 2016). Para poder disminuir esta PIO es necesario entender los mecanismos que intervienen y la fisiopatología del glaucoma.

La PIO esta mediada por el equilibrio entre la producción y la eliminación del humor acuoso (HA). El HA es un líquido claro que es secretado por el cuerpo ciliar, pasa a través de la pupila de la cámara posterior a la anterior y se elimina a través de dos vías, la vía trabecular, también conocida como convencional, o la vía uveoescleral, también llamada no convencional (Braunger et al., 2015). Se produce un aumento de la PIO al incrementarse la producción de HA o al reducirse su salida (Tártara et al., 2008).

El ángulo iridocorneal, formado por la unión de la córnea y el iris, permite diferenciar entre las dos formas de glaucoma más comunes: glaucoma de ángulo abierto y de ángulo cerrado. Cuando el ángulo es abierto, el bloqueo de salida del HU no es completo, de forma que la PIO aumenta gradualmente, dificultando el diagnóstico. En cambio, cuando el ángulo es cerrado se obstruye por completo la salida del HU, provocando un aumento agudo de la PIO, lo que facilita el diagnóstico (Gupta y Chen, 2016; Tártara et al., 2008).

### 1.1.2 Factores de riesgo:

Existen numerosos factores de riesgo que aumentan la probabilidad de padecer glaucoma en la población mundial. A continuación, se presenta una relación de dichos factores (McMonnies, 2017):

- Edad y fragilidad: el glaucoma puede estar asociado a otras enfermedades asociadas con la edad, como la degeneración macular, las enfermedades vasculares, el síndrome de pseudoexfoliación o el síndrome de apnea obstructiva del sueño. Por otro lado, la fragilidad se refiere al estado inespecífico de vulnerabilidad ante un riesgo.
- Genética e historia familiar: una historia familiar de glaucoma conlleva un riesgo de padecerlo. Alrededor del 50% de todos los pacientes con glaucoma de ángulo abierto primario poseen antecedentes familiares positivos.
- Raza: la población afroamericana tiene una mayor prevalencia de glaucoma de ángulo abierto, a pesar de que en la población caucásica aumenta mas con la edad. Además, se ha visto una mayor prevalencia de glaucoma primario de ángulo cerrado en pacientes asiáticos que en los pacientes caucásicos.
- Miopía: al estar este error refractivo muy extendido en la población asiática, explica la mayor prevalencia. Por otro lado, el aumento de la longitud axial del ojo asociado a la miopía también supone un factor de riesgo de glaucoma.
- Hipotensión sistémica e hipertensión: diferentes estudios han señalado la relación que existe entre la presión diastólica baja, la disminución de la presión ocular y el incremento de la incidencia de glaucoma.
- Vasoespasmos: en estos casos el ojo suele estar involucrado en un síndrome vasoespástico con neuropatía óptica sistémica anterior y glaucoma.
- Migraña: esta relación solo es relevante para sujetos de 70 a 79 años de edad.
- Síndrome de dispersión pigmentaria: el glaucoma pigmentario se desarrolla en pacientes miopes jóvenes con este síndrome.
- Diabetes: parece que esta enfermedad puede aumentar el riesgo de padecer glaucoma, ya que la hiperglucemia produce una mayor sensibilidad a la PIO y al riesgo de lesión neuronal.
- Medicamentos que provocan un aumento de la PIO: por ejemplo, los midriáticos y ciclopléjicos.
- Fumar: los estudios que asocian el glaucoma con fumar son contradictorios. Aún así, el riesgo es mayor en hombres fumadores que en mujeres.

- La exposición a fluctuaciones y elevación de la PIO: existen actividades que pueden aumentar o modificar la PIO, como frotarse los ojos, usar gafas de natación, el esfuerzo muscular, posiciones invertidas del cuerpo, entre otras.

### 1.1.3 Tratamiento:

El principal objetivo del tratamiento del glaucoma es reducir la PIO entre un 20-50% desde el punto donde se produjo el daño. Existen tanto tratamientos farmacéuticos con gotas oculares y geles, así como tratamientos médicos con láser o cirugía. Ambos logran reducir la PIO, ya sea disminuyendo la producción de humor acuoso o mejorando su flujo de salida (Gooch et al., 2012).

Conseguir reducir el glaucoma en los primeros 3 meses desde su diagnóstico es muy significativo, puesto que el riesgo de que la enfermedad prosiga disminuye en un 11% por cada mm de Hg que se consiga reducir en este tiempo (Díaz-P, 2010).

Existen diferentes grupos farmacológicos que pueden usarse para disminuir la PIO, por lo tanto, según el paciente se pueden usar distintos tratamientos. En la tabla 1 destacamos los grupos farmacológicos más importantes para el tratamiento del glaucoma.

Además, hoy en día existen combinaciones fijas comercializadas que incluyen al timolol junto a otro de estos fármacos (Glaucoma Research Foundation, 2016). Su uso se debe a la sinergia de potenciación resultante, de forma que la eficacia de los dos fármacos combinados es superior a la de los mismos de forma aislada. De esta manera se pueden utilizar a menor dosis mejorando la tolerancia ocular (Córdoba y Hernández, 1998).

**Tabla 1.** Grupos farmacológicos más importantes en el tratamiento del glaucoma. (Glaucoma Research Foundation, 2016; Tártara et al., 2008; Díaz-P, 2010).

Fármacos que disminuyen la producción del HA		Fármacos que aumentan la eliminación del HA	Fármacos con doble acción	
<i>β-bloqueantes</i>	<i>Inhibidores de la anhidrasa carbónica</i>	<i>Análogos de prostaglandinas</i>	<i>Agonistas α-adrenérgicos</i>	<i>Colinérgicos (Mióticos)</i>
Timolol	Dorzolamida	Tavaprost	Apraclonidina	Pilocarpina
Betaxolol	Brinzolamida	Bimatoprost	Brimonidina	Carbacol
Levobunolol	Acetazolamida	Tafluprost		
Carteolol		Latanoprost		
Metipranolol				

## 1.2 ACETAZOLAMIDA (ACZ)

Acetazolamida (ACZ) es un fármaco que pertenece al grupo de inhibidores de la anhidrasa carbónica (CAI), por lo que reduce la producción de HA, disminuyendo la PIO. Al ser un conocido hipotensor, lleva usándose en el tratamiento del glaucoma durante más de 40 años. Pero su uso no es muy popular debido a que se administra por vía oral a dosis elevadas para conseguir el efecto buscado, provocando diversos efectos secundarios extraoculares (Kaur et al., 2002; Mora et al., 2015) tales como: diuresis, malestar general, depresión, pérdida de apetito, fatiga, pérdida de peso, parestesias, formación de cálculos renales y/o trastornos gastrointestinales (Pfeiffer, 1997).

### 1.2.1 Antecedentes

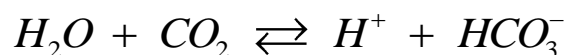
Mann y Keilin en 1940 detectaron que la sulfanilamida, al administrarse como quimioterápico, provocaba acidosis metabólica. Este hecho llevó a un estudio más detallado de este principio activo, *in vitro* e *in vivo*, lo que puso de manifiesto que la sulfanilamida era capaz de inhibir a la anhidrasa carbónica (CA) (Kaur et al., 2002; Keilin y Mann, 1940).

Más adelante, en 1954, se incorporó al mercado como el primer diurético oral. Ese mismo año se introdujo su aplicación oftalmológica, después de probar que su administración por vía oral conseguía reducir los valores de PIO al disminuir la formación de HA (Becker, 1954). Además, otros investigadores confirmaron que esta molécula era capaz de reducir la PIO en pacientes con glaucoma (Gloster y Perkins, 1955).

Actualmente existen diferentes CAI administrados por vía oftálmica como dorzolamida (en solución) y brinzolamida (en suspensión), o por vía oral como ACZ (Jansook et al., 2010), siendo esta última la más eficaz en el tratamiento del glaucoma (Kaur et al., 2000).

### 1.2.2 Mecanismo de acción:

La ACZ, como ya hemos comentado, es un fármaco que inhibe a la CA. La CA es una enzima presente en diferentes partes del organismo, entre ellas el ojo, capaz de catalizar de forma reversible la reacción que se da entre H<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub> para formar ácido carbónico y posteriormente el ion bicarbonato, como se muestra en la reacción:



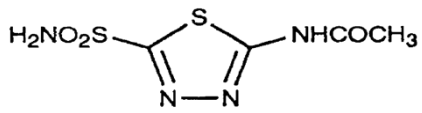
El ion bicarbonato es necesario para la producción del HA puesto que es el responsable de atraer al ion sodio al interior del ojo, que a su vez va a lograr la entrada de agua necesaria para la formación del HA. Por lo tanto, como consecuencia de la disminución del bicarbonato, la ACZ va a reducir la producción de HA y bajar los valores de PIO (Kaur et al., 2002).

### 1.2.3 Estructura química, características fisicoquímicas y farmacocinéticas

En la tabla 2 se presentan algunas de sus características fisicoquímicas y farmacocinéticas, así como su estructura química.

La ACZ pertenece a la Clase IV de los Sistemas de Clasificación Biofarmacéutica (BCS), puesto que tanto su solubilidad (0,72 mg/mL en agua a 25°C) como su permeabilidad son bajas (Mora et al., 2013). Por lo tanto, para poder administrarla en una formulación oftálmica de forma estable es necesario recurrir a técnicas que den una solución a los problemas de estabilidad y permeabilidad (Ghadi y Dand, 2017).

*Tabla 2. Características fisicoquímicas y farmacológicas de ACZ. (Drugbank Database; Kaur et al., 2002).*

ACETAZOLAMIDA	
Fórmula molecular	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>
Peso molecular	222,245 g/mol
Nombre químico	N-(5-sulfanoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-acetamida
Estructura	
Absorción AV máxima	261-265 nm
pKa	7,4
Solubilidad (25°C)	0,72 mg/mL

### 1.3 TIMOLOL MALEATO (TIM)

TIM es un principio activo antagonista no selectivo de los receptores β-bloqueantes simpaticomiméticos (Mohamed et al., 2014). Al bloquear los receptores β del cuerpo ciliar disminuye la producción de humor acuoso (Jung et al., 2013). Fue el primer β-bloqueante utilizado en el tratamiento del glaucoma, y no se ha demostrado que exista otro β-bloqueante más eficaz (Hassib et al., 2016; Wanare et al., 2012). Por lo tanto, se considera la primera línea de tratamiento del glaucoma (Mohamed et al., 2014). Es soluble en agua de forma estable, por lo que se administra a través de gotas oftálmicas, como la mayoría de los fármacos oftálmicos (Lavik et al., 2011; Jung et al., 2013). Si se absorbe a nivel sistémico provoca efectos secundarios a nivel cardiaco y pulmonar, al no ser selectivo (Goodman & Gilman, 2007).

### 1.3.1 Antecedentes

En 1967 se realizó un estudio con el objetivo de determinar el efecto específico de los  $\beta$ -bloqueantes adrenérgicos sobre la PIO (Phillips et al., 1967). Posteriormente, en 1979 el TIM se incluyó en el tratamiento del glaucoma al demostrarse que la PIO volvía a valores normales entre 1-3 días tras su administración (Lavik et al., 2011; Wilson et al., 1979).

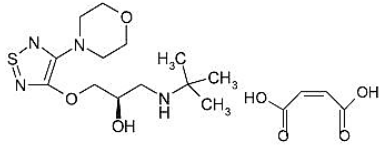
### 1.3.2 Mecanismo de acción

El TIM bloque tanto a los receptores  $\beta_1$  como  $\beta_2$ , no es selectivo, pero no se sabe con exactitud el mecanismo que sigue para reducir la PIO. Aparentemente, inhibe la producción de HA al bloquear los receptores  $\beta$  que modulan una vía de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) proteinquinasa A. El bloqueo de estos receptores disminuye la actividad simpaticomimética de esta vía, evitando la estimulación de los receptores  $\beta$  por catecolaminas, reduciendo el AMPc intracelular. Otra teoría dice que los antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos, al disminuir el flujo sanguíneo en el ojo reducen la ultrafiltración necesaria para producir HA (Goodman & Gilman, 2007).

### 1.3.3 Estructura química, características fisicoquímicas y farmacocinéticas

En la siguiente tabla se presentan algunas las características fisicoquímicas y farmacocinéticas de TIM.

**Tabla 3.** Características fisicoquímicas y farmacocinéticas de TIM.  
(Drugbank Database; Mohamed et al., 2014).

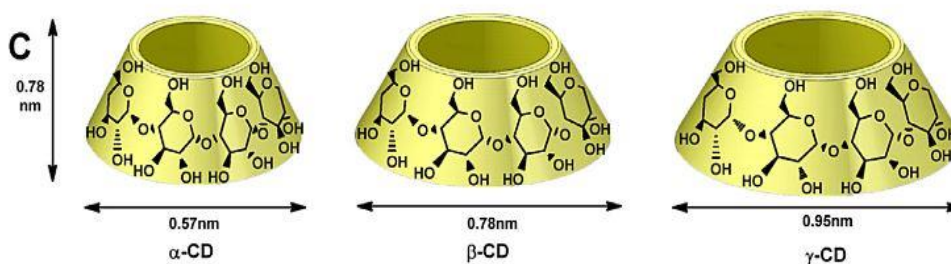
TIMOLOL MALEATO	
Fórmula molecular	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S
Peso molecular	432,49 g/mol
Nombre químico	(Monomaleato de (S) -3- [3- (terc-butilamino) -2-hidroxiopropoxi] -4-morfolino-1,2,5-tiadiazol
Estructura	
Absorción AV máxima	294 nm
Solubilidad (25°C)	Muy soluble en agua

## 1.4 CICLODEXTRINAS (CD)

Las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos cíclicos. Se obtienen a partir del almidón debido a la transglucosilación intramolecular que cataliza la ciclodextrina glucosiltransferasa. Están



formados por 6 ( $\alpha$ -CD), 7 ( $\beta$ -CD) u 8 ( $\gamma$ -CD) unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -(1-4) glicosídicos. La característica más importante de estos oligosacáridos macrocíclicos es su disposición espacial. Tienen una estructura molecular cilíndrica hueca, presentando una superficie exterior polar y una cavidad apolar (Loh et al., 2016; Mora et al., 2015; Schöffner et al. 2017).



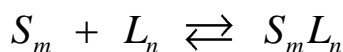
**Figura 1.** Estructura química de las CD naturales. (Liu et al., 2017).

#### 1.4.1 Antecedentes

Los primeros datos publicados sobre las CD constan de 1891, recogidos por A. Villiers, quien aisló 3 gramos de sustancia cristalina desde 1000 g de almidón, tras la digestión bacteriana. Detectó tanto la  $\alpha$ -CD como la  $\beta$ -CD. Posteriormente, en 1935, Freudenberg and Jacob descubrieron la  $\gamma$ -CD (Loftsson y Dùchene, 2007).

#### 1.4.2 Solubilización mediante complejación con CD

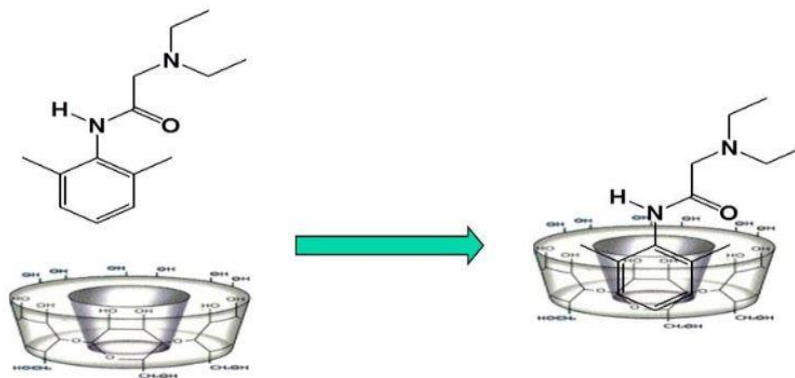
Las CD, gracias a su estructura, pueden formar complejos de inclusión, por interacción molecular débil. Estos complejos son dinámicos, puesto que la molécula huésped está continuamente en asociación y disociación con la CD. De forma que  $m$  moléculas de sustrato (S) se unen a  $n$  moléculas de ligando (L), dando lugar al complejo ( $S_mL_n$ ) que resulta ser más soluble (Kurkov y Loftsson, 2013).



Siendo la constante de estabilidad del complejo formado (K):

$$K = \frac{[S_mL_n]}{[S]^m \cdot [L]^n}$$

En la siguiente imagen (Figura 2) se muestra el esquema de formación de un complejo de inclusión fármaco-ligando, quedando el ligando o fármaco en la cavidad apolar de la CD.



**Figura 2.** Esquema de la formulación de un complejo de inclusión.  
(Abou-Okeil et al., 2018).

La capacidad de formar complejos, actuando como un contenedor molecular, tiene diferentes aplicaciones en la industria farmacéutica. Por ejemplo, las CD mejoran la solubilidad de aquellas moléculas poco solubles (Jambhekar y Breen, 2016).

#### 1.4.3 Derivados de las ciclodextrinas

Las CD naturales presentan una solubilidad limitada, sobre todo la  $\beta$ -ciclodextrina. La baja solubilidad de la CD naturales se atribuye a la presencia de hidrógenos intermoleculares relativamente fuertes en el estado cristalino. La sustitución de uno de los enlaces hidroxilos que forman los enlaces de hidrogeno provoca una mejora dramática de su solubilidad. Dentro de estos derivados se incluyen los  $\beta$ -hidroxipropílicos y  $\gamma$ -ciclodextrinas, las  $\beta$ -ciclodextrinas metiladas, los sulfobutiléter  $\beta$ -ciclodextrina y las ciclodextrinas ramificadas (Jambhekar y Breen, 2016).

### 1.5 COLIRIOS

#### 1.5.1 Definición

Los colirios son preparados oftálmicos. La Real Farmacopea Española define a los preparados oftálmicos como formulaciones estériles líquidas, semisólidas o sólidas, destinados a ser administrados en el globo ocular o en la conjuntiva, o bien a ser introducidos en el saco conjuntival. En concreto los colirios son disoluciones (acuosas u oleosas) o suspensiones estériles que pueden portar uno o más principios activos, para su administración en el ojo, debiendo cumplir los ensayos de esterilidad y tamaño de partícula (Real Farmacopea Española, 5ª Ed., 2015).

#### 1.5.2 Componentes de los colirios

Los colirios poseen 3 componentes: principio o principios activos, vehículo y excipientes. Los excipientes van a permitir determinar diferentes características de los colirios:

Ajuste de la tonicidad: son usados cloruro sódico (NaCl), manitol o sorbitol. Se considera un colirio 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®.

Estabilización del pH: hay diferencia entre baja escala o gran escala. Se emplean disoluciones muy diluidas de hidróxido sódico (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) para el ajuste de pH a baja escala, así como tampones si es a gran escala.

Incremento de la solubilidad del principio activo o estabilizar la preparación: para lograrlo se usan tensioactivos a baja concentración, que pueden ser no iónicos o catiónicos.

Esterilidad: Los conservantes más usados en los colirios son: cloruro de benzalconio, nitrato de fenilmercurio, acetato de fenilmercurio, clorambutol y acetato de clorhexidina. Los colirios en forma de disolución son límpidos y están prácticamente exentos de partículas cuando se examinan con una luz adecuada. Los colirios en suspensión pueden presentar un sedimento que se redispersa fácilmente por agitación, proporcionando una suspensión lo suficientemente estable para permitir administrar la dosis correcta (González y Esteban, 2011; Real Farmacopea Española, 5ª Ed., 2015).

## **1.6 ESTUDIO DE ESTABILIDAD**

### **1.6.1 Concepto**

Los estudios de estabilidad son aquellos estudios o serie de ensayos, que proporcionan los resultados necesarios para establecer el periodo de validez de un medicamento en su envase original y en las condiciones de almacenamiento indicadas en él. Se entiende estabilidad como la capacidad que posee un producto o un principio activo de mantener, por un tiempo determinado, sus propiedades originales (físicas, químicas, biológicas y microbiológicas) dentro de las especificaciones de calidad establecidas (Real Farmacopea Española, 5ª Ed., 2015).

### **1.6.2 Propósitos**

El propósito de las pruebas de estabilidad es proporcionar evidencia sobre cómo la calidad de una sustancia farmacéutica o producto farmacéutico varía con el tiempo bajo la influencia de una variedad de factores ambientales como la temperatura, la humedad y la luz, y establecer un período de reexamen para la sustancia del fármaco o la vida útil del medicamento y las condiciones de almacenamiento recomendadas (ICH, 2018).

### **1.6.3 Estudio de estabilidad acelerado**

Un estudio de estabilidad acelerado es aquel estudio de estabilidad diseñado con el fin de aumentar la velocidad de degradación química o los cambios físicos de un principio activo o producto farmacéutico. Para ello se establecen condiciones de almacenamiento extremas de

temperatura y humedad (condiciones de estrés), como parte de un programa de almacenamiento formal o definitivo (Real Farmacopea Española, 5ª 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 (ICH, 2018). Obteniendo así un periodo de validez provisional. El poder predictivo de los datos obtenidos en este estudio acelerado se basa 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.

## 2 OBJETIVOS:

En este apartado es necesario aclarar que los resultados obtenidos en este estudio son una continuación de un proyecto iniciado por este mismo grupo el cual culminará con la publicación de la tesis doctoral de D. Cesáreo José Jiménez de los Santos este mismo año. Por lo tanto dichos resultados serán comparados con valores registrados en trabajos anteriores tales como el “Estudio de degradación de timolol maleato, acetazolamida e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina: aplicación para la formulación de un colirio disolución”, [TFG defendido por Alba Díaz Ríos en Julio de 2016], donde se estableció la cinética de degradación por hidrólisis de ACZ, así como su constante de degradación y periodo de validez para una fórmula definitiva ajustada a un pH de 7,2. Con el fin de mejorar los resultados obtenidos en este estudio previo, se ha rediseñado la fórmula inicial ajustando a un pH de 5,3. Con ello se pretende mejorar la estabilidad de ACZ frente a la hidrólisis permaneciendo dentro de los límites de tolerancia del ojo humano. Para ello, este grupo se marca los siguientes objetivos:

- 1- Establecer la influencia que una disminución de pH del entorno ejerce sobre la constante de complejación de este fármaco con la ciclodextrina.
- 2- Valorar el nuevo periodo de validez en las condiciones ensayadas, con el fin de establecer una formulación definitiva.



### 3 METODOLOGÍA:

#### 3.1 MATERIALES:

En la realización de este trabajo han sido utilizados los siguientes productos:

- ✓ Acetazolamida (ACZ): se presenta como un polvo blanco cristalino e inodoro (Acofarma, Barcelona).
- ✓ Timolol maleato (TIM): se encuentra como un polvo blanco cristalino, muy soluble en agua y en etanol al 96%. (Acofarma, Barcelona).
- ✓ Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD): se trata de un polvo blanco cristalino, que posee un grado de sustitución de 0,6 y un peso molecular es de 1380 g/mol (Fluka, Japón).
- ✓ Cloruro de benzalconio: se presenta como un líquido incoloro o amarillento ligeramente viscoso, su peso molecular es de 370 g/mol y con una riqueza del 50% (Acofarma, Barcelona).
- ✓ Cloruro sódico (NaCl): se trata de un sólido blanco cristalino con un peso molecular de 58,44 g/mol (Panreac, Barcelona).
- ✓ Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA): se encuentra como un polvo blanco cristalino. Su peso molecular es de 372,24 g/mol y posee una riqueza del 99,2% (Fagron, Barcelona).
- ✓ Tampón Cítrico/Fosfato (pH= 5,3): ácido cítrico 1-hidrato y Di-Sodio Hidrógeno Fosfato 2-Hidratado.
  - Ácido cítrico 1- Hidrato: se trata de un polvo blanco cristalino y con un peso molecular de 210,14 g/mol (Panreac, Barcelona).
  - Di-Sodio Hidrógeno Fosfato 2-Hidratado: se encuentra en forma de polvo blanco cristalino y con un peso molecular de 177,99 g/mol (Panreac, Barcelona).
- ✓ Agua Milli-Q<sup>®</sup>: agua destilada ultra depurada que se obtiene a través de un sistema Milli-Q<sup>®</sup>.

#### 3.2 MÉTODOS:

##### 3.2.1 Valoración de ACZ y TIM mediante HPLC:

El método analítico empleado ha sido la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), el cual había sido 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 sistema cromatográfico utilizado para la técnica analítica a desarrollar se encuentra constituido por:

- Columna Merck, RP-18 LichroCART® de 125x4 mm.
- Longitud de onda: 265 nm para la cuantificación de ACZ y 295 nm para la cuantificación de TIM.
- Fase móvil: solución de acetato sódico 0,05 M ajustado a pH de 4,02 y acetonitrilo en una proporción 90/10 v/v respectivamente.
- Velocidad de flujo: 1,5 mL/min.
- Volumen de inyección: 10 µL.
- 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 los componentes de las muestras. 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 Estudio de solubilidad ACZ HP-β-CD a pH 5,3.

Los estudios de solubilidad se llevaron a cabo de acuerdo con el método propuesto por Higuchi y Connors (1965). Para ello se emplearon concentraciones variables de HP-β-CD (0 - 0,1 M), y un exceso de 30 mg de ACZ por mL de solución tampón cítrico/fosfato de pH 5,3 empleado. Un total de tres lotes de muestras fueron mantenidos en agitación (agitador ACS 360 TS-K 412) a 25°C durante una semana. Este tiempo es considerado como suficiente para alcanzar el equilibrio de la reacción en base a un estudio preliminar. Por último, las muestras fueron filtradas a través de un filtro Millipore® de 0,22 µm y diluidas aplicando un factor de dilución de 10. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado mediante HPLC obteniendo seis mediciones de cada muestra. A partir del diagrama de solubilidad se puede calcular la eficacia solubilizante ( $E_s$ ) de la CD, que se define como el aumento de solubilidad relativa del fármaco observado a una determinada concentración de CD, a partir de la siguiente ecuación:

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

donde  $S_{CD}$  representa la solubilidad del fármaco a dicha concentración de CD y  $S_0$  representa la solubilidad del fármaco en ausencia de CD. Este parámetro da idea del número de veces que se



incrementa la solubilidad de un fármaco en presencia de CD. Del mismo modo a partir de la ecuación de la regresión lineal se puede calcular la constante de complejación asumiendo un complejo de estequiometría 1:1. Una expresión simplificada para el caso específico en el que se forme un complejo 1:1 para la constante de estabilidad vendrá dada por la ecuación (Higuchi y Connors, 1965):

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

### 3.2.3 Elaboración de las formulaciones de referencia.

Con el fin de determinar las posibles variables con influencia en el estudio de estabilidad han sido elaboradas dos formulaciones de referencia de 50 ml por lote:

1. Solución de ACZ: con el fin de determinar la influencia de la temperatura en el proceso de degradación se elaboró una solución de ACZ, de manera que 25 mg de ACZ fueron añadidos a un vaso de precipitados para disolverlo en el vehículo preparado con el tampón cítrico fosfato y el resto de los excipientes. Para conseguir la isotonicidad del preparado fueron añadidos 460 mg de NaCl.
2. Solución de ACZ + HP-β-CD: con el fin de determinar la influencia que la CD ejerce en el proceso de degradación al pH estudiado de 5,3; 250 mg de ACZ fueron añadidos a un vaso de precipitado con el vehículo preparado con el tampón cítrico fosfato y el resto de los excipientes y una cantidad ya pesada de 6,9 g de HP-β-CD para la formación del complejo. La cantidad pesada de NaCl para garantizar la isotonicidad del preparado fue de 110 mg.
3. Solución de TIM: para comprobar que TIM no se degrada al pH estudiado de 5,3; 340 mg de TIM fueron añadidos a un vaso de precipitado con el vehículo preparado con el tampón cítrico fosfato y el resto de los excipientes y una cantidad ya pesada de 6,9 g de HP-β-CD con el fin de simular las condiciones de la solución de referencia 2. La cantidad pesada de NaCl para garantizar la isotonicidad del preparado fue de 460 mg.

### 3.2.4 Elaboración de la formulación oftálmica.

Cabe destacar que todo el proceso de elaboración de la formulación diseñada es realizado en una campana de flujo laminar. Como se indicó anteriormente, el tampón está compuesto por dos tipos de reactivos, ambos disueltos en un vehículo acuoso, en este caso se empleó agua Milli-Q®. Para ello, se disuelven 17,8 g de Di-Sodio Hidrógeno Fosfato 2-Hidrato en un matraz aforado de 500 mL. Seguidamente se disuelven 10,5 g de ácido cítrico 1-hidrato en un matraz aforado de 500 mL. Cuando se tienen ambas disoluciones preparadas, se toman 270 mL de la

solución de fosfato 2-Hidrato y 230 mL de la solución de ácido cítrico y se llevan a un matraz de 500 mL, mezclándolas bien y obteniendo la disolución tampón final.

A continuación, se le añade al tampón 100 µL de cloruro de benzalconio y 250 mg de EDTA para finalizar la elaboración del vehículo. Se mide el pH con un pH-metro CRISON GLP21 y se obtiene un pH de 5,3. Se pesan 250 mg de ACZ, 6,9 g de HP-β-CD y 340 mg de TIM. Se añade el agente complejante (HP-β-CD) a un vaso de precipitados para disolverlo en el vehículo preparado. Posteriormente se añade el TIM y la ACZ para disolverlos, comenzando por el TIM, debido a su alta solubilidad acuosa. Una vez disueltos se llevan a un matraz de 50 mL. 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 62 mg de NaCl para alcanzar la isotonicidad.

A la hora de formular un colirio, el pH debe ajustarse teniendo en cuenta tanto la compatibilidad con la superficie ocular como la estabilidad química del fármaco, por lo que se precisa encontrar un valor intermedio que cumpla estas exigencias (García-Valdecabres et al., 2004; González y Esteban, 2011).

El rango de pH mejor tolerado por la superficie del ojo está entorno al pH lagrimal (7,4) (Herrero-Vanrell, 2007; González y Esteban, 2011). A pesar de ello, en la bibliografía está recogido que la superficie ocular es capaz de neutralizar valores de pH comprendidos entre 3,5 y 10,5 (Bilbao, 2018; González y Esteban, 2011; SEFH, 2019). Además, se encuentran diferentes colirios comercializados a pH ácido (García-Valdecabres et al., 2004; Lim et al., 2014). En la tabla 4 se muestran algunos ejemplos de colirios comercializados en España a pH ácido.

**Tabla 4.** Ejemplos de colirios comercializados en España a pH ácido.  
(García-Valdecabres et al., 2004).

Soluciones oftálmicas	pH
Cusimolol <sup>®</sup>	6,92
Vistafrim <sup>®</sup>	6,89
Xalatan <sup>®</sup>	6,77
Elebloc <sup>®</sup>	6,69
Gentamicina <sup>®</sup>	6,61
Poly-Pred <sup>®</sup>	6,44
Oftalmotrim <sup>®</sup>	5,79
Cortoftal <sup>®</sup>	5,25
Atropina <sup>®</sup>	5,18
Alomide <sup>®</sup>	5,09
Anestésico <sup>®</sup>	4,70
Pilocarpina <sup>®</sup>	3,72
Ciclopléjico <sup>®</sup>	3,55

Como se puede observar existen colirios en el mercado con un pH cercano al de la formulación propuesta en este estudio (pH 5,3). Incluso podemos encontrar colirios con un pH inferior. No obstante, no se plantea la posibilidad de disminuir el pH puesto que la administración continuada de colirios con pH ácido puede generar daños en la superficie del ojo, como la aparición de queratitis (Gonnering et.al., 1979).

### **3.2.5 Diseño del estudio de estabilidad.**

#### **3.2.5.1 Selección de lotes:**

Fueron elaborados tres lotes de la formulación final que se mantuvieron a una temperatura seleccionada de 40 °C en estufa Indelab IDL-AI80, manteniendo estables las condiciones de humedad relativa. Se realizaron 12 análisis para determinar la desviación estándar, así como el coeficiente de variación.

#### **3.2.5.2 Condiciones.**

Las variables a controlar dentro del diseño de este estudio según norma Q1A(R2) de la International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), serán (ICH, 2018):

- ✓ Temperatura: se trabajará a una temperatura de 40°C constante en la estufa.
- ✓ Humedad: se trabajará a una humedad relativa en la estufa menor a 25 %.
- ✓ Se usarán viales topacio para evitar la posible fotodegradación de ACZ (Valencia et al., 2013).

#### **3.2.5.3 Frecuencia de muestreo.**

La frecuencia de muestro seguirá un calendario preestablecido de 6 meses, de forma que las muestras se tomarán a 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 20, 30, 60, 90 y 180 días.

### **3.2.6 Cálculo de los parámetros de degradación.**

A partir de los datos obtenidos de los estudios de estabilidad, conociendo la cinética de degradación del principio activo se puede establecer su constante de degradación, así como el periodo de validez. 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 en un corto periodo de tiempo (Gil-Alegre et al., 2001). Algunos de los parámetros que afectan en mayor medida a la estabilidad de un medicamento son la temperatura, la luz y la humedad relativa (Liu et al., 2016). Siendo el efecto que ejerce la temperatura el más relevante. Por lo tanto, la ecuación de Arrhenius sólo tiene en cuenta este parámetro de degradación.

Ecuación de Arrhenius:

$$K = A \cdot e^{-E_a/RT}$$

en la cual:

- K es la constante de degradación.
- A es el factor de frecuencia (cte.).
- E<sub>a</sub> es la energía de activación (cal·mol<sup>-1</sup>).
- R es la constante de los gases (1,987 cal·k<sup>-1</sup>·mol<sup>-1</sup>).
- T es la temperatura en grados Kelvin.

Esta ecuación permite predecir la constante de degradación a temperatura ordinaria, a partir de datos obtenidos a altas temperaturas, lo que es la base de los estudios de estabilidad acelerados.

$$\ln \frac{K_{T1}}{K_{T2}} = \frac{E_a}{1,987 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}} \cdot \left( \frac{1}{T2} - \frac{1}{T1} \right)$$

Para ello es necesario conocer la energía de activación (E<sub>a</sub>) de la reacción de degradación. La energía de activación es la energía mínima necesaria para que se produzca una reacción química. En el estudio previo “Estudio de degradación de timolol maleato, acetazolamida e hidroxipropil-β-ciclodextrina: aplicación para la formulación de un colirio disolución”, [TFG defendido por Alba Díaz Ríos en Julio de 2016], hemos calculado la E<sub>a</sub> para la reacción de hidrólisis de ACZ, obteniendo un valor medio de 27,45±0,8 kcal/mol.

Periodo de validez o de vida útil (T90): Parámetro imprescindible para conocer la fecha de caducidad de un medicamento. Se define como el tiempo durante el cual el medicamento conserva su potencia en los límites establecidos por la legislación vigente (90-110 %) y se corresponde con el tiempo que transcurre hasta que se ha degradado el 10 % de la cantidad inicial de fármaco presente en un medicamento (ICH, 2018). La expresión que lo define para una cinética de primer orden es:

$$T90 = \frac{0,105}{k_{25^{\circ}C}}$$

Semivida de degradación del producto (t50): es el tiempo necesario para que la cantidad o concentración de fármaco presente en un medicamento se reduzca a la mitad. La expresión que lo define para una cinética de primer orden es:

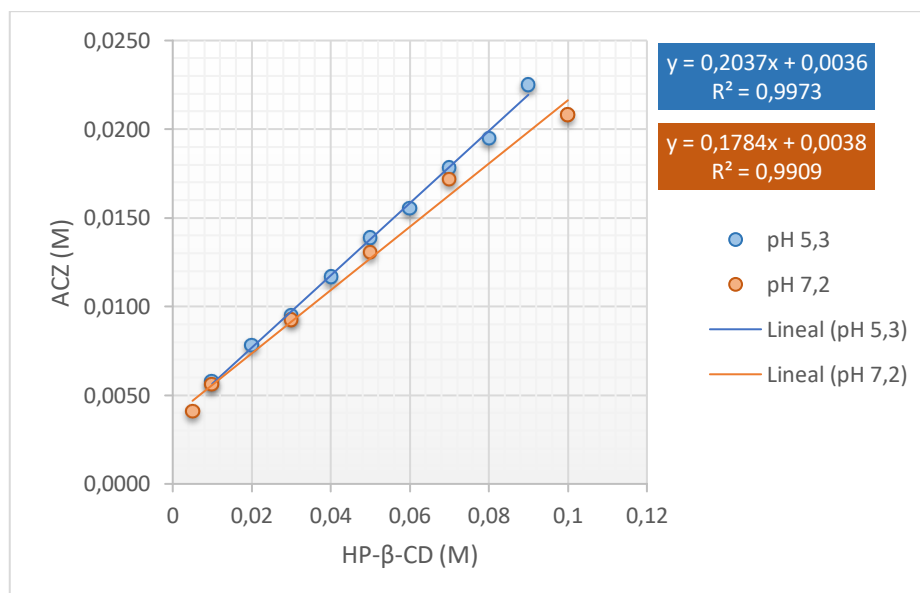
$$t50 = \frac{0,693}{k_{25^{\circ}C}}$$

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 ESTUDIO DE SOLUBILIDAD ACZ:HP-β-CD A pH 5,3.

En un estudio anterior realizado por el grupo de investigación CTS-612 para este mismo proyecto se analizó el proceso de complejación entre ACZ con HP-β-CD en presencia de TIM a pH 7,2. En dicho estudio se determinó que la presencia de un fármaco muy soluble como TIM no ejercía ninguna influencia significativa sobre el equilibrio de complejación entre ACZ y HP-β-CD. El diagrama de solubilidad obtenido de ACZ en presencia de HP-β-CD era del tipo A<sub>L</sub> de Higuchi, por lo que la estequiometría del complejo ACZ:HP-β-CD obtenido era 1:1. Se determinó la constante de complejación  $K_{1:1}$  obteniéndose un valor de 57,1 M<sup>-1</sup> y la eficacia solubilizante en el rango de concentraciones ensayadas de 0 a 0,1 M mostró un valor de 5,5. Todos los resultados citados vienen recogidos en el trabajo fin de grado titulado “Estudios de complejación de timolol y acetazolamida con hidroxipropilbeta ciclodextrina: aplicación al desarrollo de una formulación oftálmica” defendido por Sergio Portillo Vázquez en junio de 2015, siguiendo el desarrollo de este proyecto de investigación.

Para determinar la influencia del pH en el equilibrio de complejación se han determinado nuevamente estos parámetros al pH fijado de 5,3 en tampón. En la figura 3 se presenta el diagrama de solubilidad de ACZ en presencia de HP-β-CD a diferentes pH.



**Figura 3.** Diagrama de solubilidad de ACZ en presencia de HP-β-CD a diferentes pH.

Los resultados mostraron nuevamente que la solubilidad del fármaco a pH 5,3 aumenta linealmente con la concentración de HP-β-CD, por lo que su diagrama de solubilidad es del tipo A<sub>L</sub> de Higuchi y se asume una estequiometría del complejo 1:1. En la tabla 5 se muestran los valores de la constante de complejación y eficacias solubilizantes calculados a ambos pH.

**Tabla 5.** Valores de la constante de complejación ( $k_{1:1}$ ) y eficacias solubilizantes ( $E_s$ ) asumiendo complejo 1:1 a diferentes pH.

Rango de [HP-β-CD] ensayadas	pH	$E_s$	$K_{1:1}$ ( $M^{-1}$ )
0 – 0,1 Molar	7,2	5,5	57,1
0 – 0,09 Molar	5,3	7,8	71,6

Si bien ambos diagramas de solubilidad son similares, se observa un aumento en los valores de la eficacia solubilizante y de la constante de complejación a pH 5,3. Este hecho es completamente lógico debido al carácter ácido débil de ACZ, cuyo valor de  $pK_a$  es de 7,4. Al disminuir el pH, la relación entre la fracción ionizada (I) y la no ionizada (NI) se modifica en función de la ecuación de Henderson-Hasselbalch (figura 4). En este caso concreto la ACZ pasó de una relación  $7,4(NI)/(I)$  a pH 7,2 a  $72(NI)/(I)$  a pH 5,3. Recordemos que la fracción NI es la potencialmente complejable.

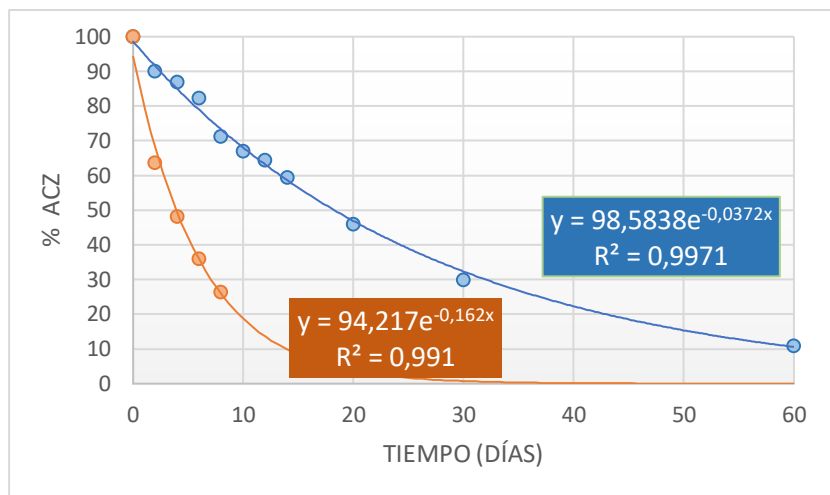
$$pK_a - pH = \log \frac{NI}{I}$$

**Figura 4.** Ecuación de Henderson-Hasselbalch para un ácido débil. (Hasselbalch, 1917; Henderson, 1908; Story, 2004).

#### 4.2 INFLUENCIA DEL pH SOBRE EL PROCESO DE DEGRADACIÓN DE ACZ.

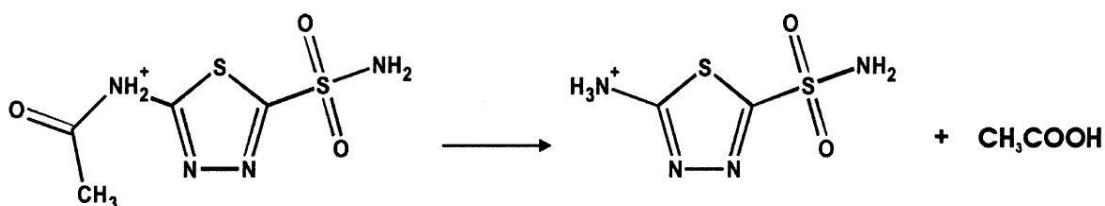
En este apartado es necesario aclarar que los resultados obtenidos en este estudio serán comparados con los valores registrados en el trabajo fin de grado denominado “Estudio de degradación de timolol maleato, acetazolamida e hidroxipropil-β-ciclodextrina: aplicación para la formulación de un colirio disolución”, desarrollado por Alba Díaz Ríos, donde todos los ensayos fueron realizados a un pH fijado de 7,2.

Es interesante señalar que la ACZ sigue una cinética de degradación de primer orden, es decir, la cantidad o porcentaje de fármaco presente en la formulación disminuye de forma exponencial decreciente frente al tiempo (El-Kimary y El-Yazbi, 2016), como se observa en la figura 5. En la misma figura, se puede comparar la tendencia que sigue la ACZ cuando se degrada a pH 5,3 y a pH 7,2.



**Figura 5.** Cinética de degradación de ACZ a pH 5,3 (●) y a pH 7,2 (○).

El mecanismo de degradación de ACZ está fundamentado en un proceso de hidrólisis tal como se describe en la bibliografía. La hidrólisis ocurre sobre el grupo acetamida de la molécula de ACZ, desencadenándose la siguiente reacción (de Pilar-Corena et al., 2006; Srinivasu et al., 2010).

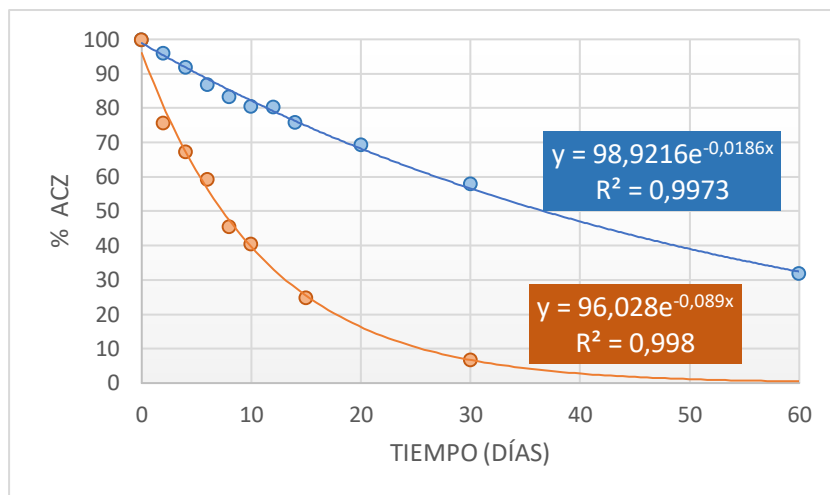


**Figura 6.** Reacción de hidrólisis de ACZ.  
(de Pilar-Corena, 2006).

Como se observa en la figura 5 el porcentaje de ACZ presente en la fórmula disminuye a una mayor velocidad cuando se encuentra en un medio con pH 7,2. Esto se debe a que la ACZ es un ácido débil, por lo tanto, cuanto más ácido es el medio de disolución mayor será la fracción de fármaco no ionizado, y por tanto más estable frente a la hidrólisis (Parasrampur y Gupta, 1989). Resultados muy similares fueron reportados por Sigurdsson en el estudio de la complejación de dorzolamida con ciclodextrinas (Sigurdsson et al., 2005), donde dicho fármaco se comporta de forma muy similar al nuestro.

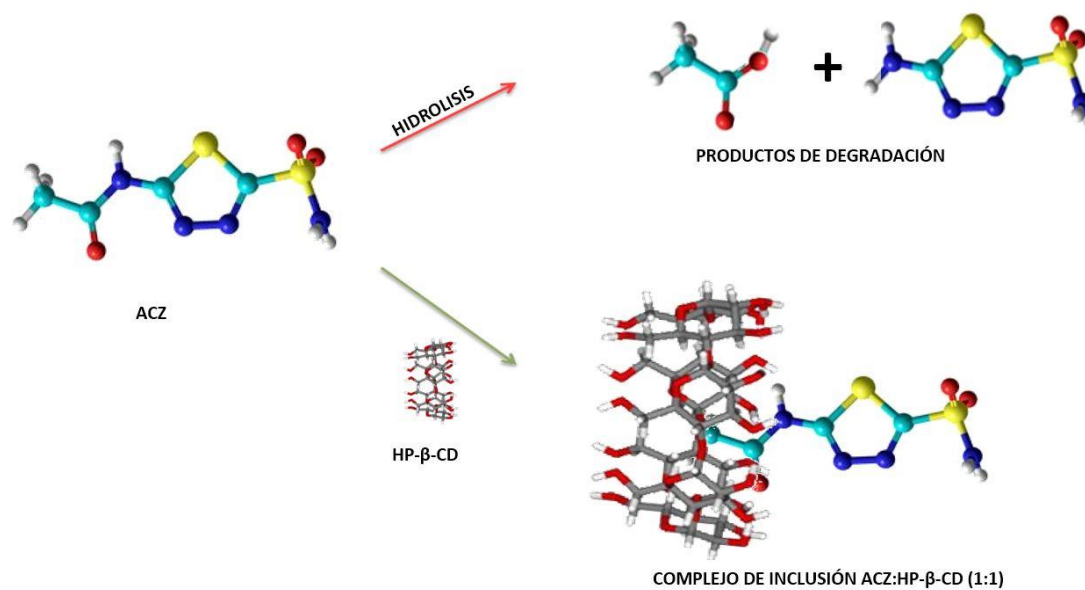
#### 4.3 INFLUENCIA DE LA HP-β-CD SOBRE EL PROCESO DE DEGRADACIÓN DE ACZ A pH 5,3.

En la figura 7 se observa que la formación del complejo ligando-fármaco reduce la degradación de ACZ (Loftsson et al., 2005) tanto a pH 7,2 como a pH 5,3, si comparamos con el fármaco solo en solución (figura 5).



**Figura 7.** Cinética de degradación de ACZ en presencia de HP-β-CD a pH 5,3 (●) y a pH 7,2 (○).

Como se ha comentado, la hidrólisis que sufre ACZ en el grupo acetamida es la causa de su degradación. El hecho de que la degradación de ACZ disminuya en presencia de HP-β-CD indica que el radical involucrado en la hidrólisis interviene en la formación del complejo ligando-fármaco, quedando protegido por la CD (Másson et al., 1999). Para verificar este hecho se ha realizado un estudio de la complejación por resonancia magnética nuclear de protones (<sup>1</sup>H RMN), el cual manifestó que el grupo acetamida, que es el susceptible de ser hidrolizado, se incorpora a la cavidad apolar de la CD por su metilo al formarse el complejo de inclusión con estequiometría 1:1, impidiendo la hidrólisis del fármaco. Estos resultados han sido presentados en el XI Foro Internacional CISDEM en el pasado mes de octubre de 2018 en Pamplona (pendiente de publicación).

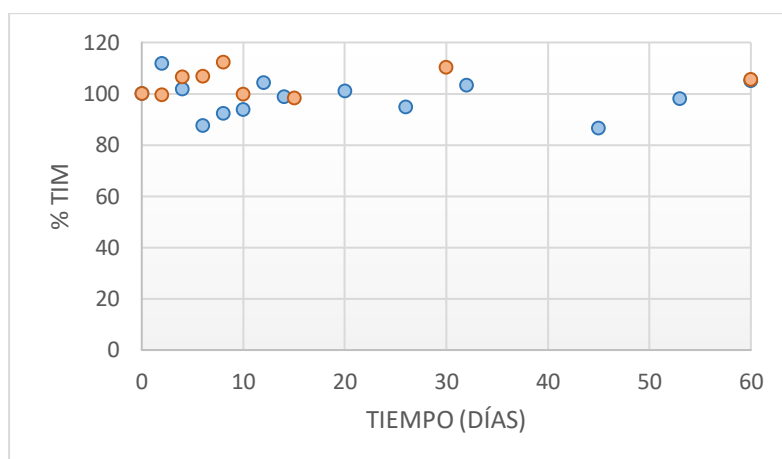


**Figura 8.** Hidrólisis de ACZ y estructura del complejo ACZ:HP-β-CD.



#### 4.4 INFLUENCIA DE TIM SOBRE LA DEGRADACIÓN DE ACZ EN LA FORMULACIÓN FINAL A pH 5,3.

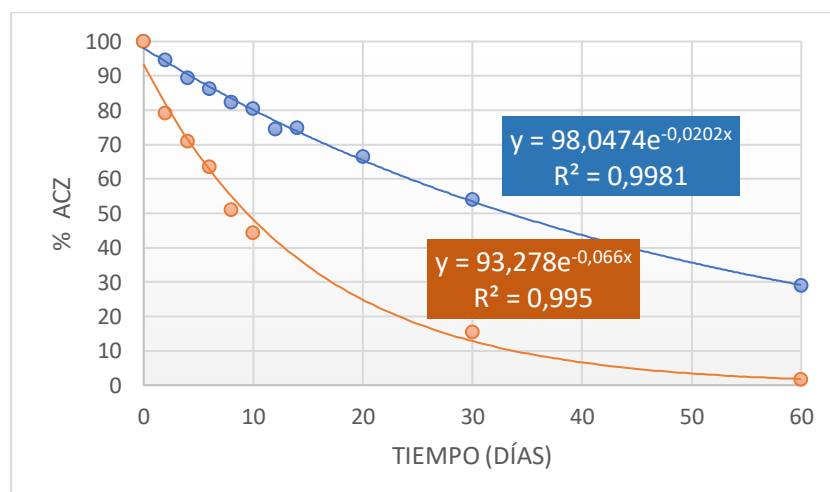
Para comprobar la influencia que puede ejercer TIM sobre la degradación de ACZ en solución, hemos de comprobar primero la estabilidad de este segundo fármaco bajo las condiciones ensayadas en el estudio de estabilidad. En la figura 9 se muestran las modificaciones que sufre el TIM a lo largo del tiempo, a ambos pH estudiados.



**Figura 9.** Cinética de degradación de TIM en la formulación final a pH 5,3 (●) y a pH 7,2 (●).

Como puede observarse TIM no sufre grandes fluctuaciones a lo largo del período de tiempo ensayado lo que hace pensar que es bastante estable en solución a ambos pH (Kulkarni y Amin, 2000).

En la figura 10 se observa la tendencia que sigue la degradación de ACZ en la formulación final.



**Figura 10.** Cinética de degradación de ACZ en la formulación final a pH 5,3 (●) y a pH 7,2 (●).

El proceso de degradación que sigue la ACZ en la formulación oftálmica final no presenta una diferencia notable con respecto a la solución con HP- $\beta$ -CD (Figura 7), entendiéndose que el TIM no altera la formación del complejo de inclusión formado por la ACZ y HP- $\beta$ -CD y no modifica

por tanto la cinética de degradación de ACZ. La escasa influencia que TIM ejerce sobre el equilibrio de complejación ACZ: HP- $\beta$ -CD, ha sido previamente estudiada 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” desarrollado por Sergio Portillo Vázquez en junio de 2015. En dicho trabajo se evidenció que el TIM no alteraba de manera relevante la constante de complejación del complejo integrado por ACZ y HP- $\beta$ -CD, lo que indica que no tiende a alojarse en el interior de la cavidad de la CD. Este hecho unido a la estabilidad que presenta TIM en solución (Lavik et al., 2011) y al efecto sinérgico que provoca junto a la ACZ (Berson y Epstein, 1981) lo hacen un candidato interesante para la formulación oftálmica final.

#### 4.5 PARÁMETROS DE DEGRADACIÓN.

En la tabla 6 se recoge un resumen de los parámetros de degradación calculados a partir de las curvas de degradación de ACZ, el complejo formado con HP- $\beta$ -CD y la formulación final a pH 5,3 comparados con los obtenidos previamente a pH 7,2.

*Tabla 6. Parámetros de degradación.*

FORMULACIÓN	pH	K <sub>40</sub> (d <sup>-1</sup> )	K <sub>25</sub> (d <sup>-1</sup> )	T90 (días)	t50 (días)
Solución ACZ	7,2	0,162	0,017	6	41
<b>Solución ACZ</b>	<b>5,3</b>	<b>0,037</b>	<b>0,004</b>	<b>24</b>	<b>161</b>
Solución ACZ + HP- $\beta$ -CD	7,2	0,089	0,007	14	95
<b>Solución ACZ + HP-<math>\beta</math>-CD</b>	<b>5,3</b>	<b>0,019</b>	<b>0,002</b>	<b>53</b>	<b>347</b>
Formulación final	7,2	0,066	0,005	21	141
<b>Formulación final</b>	<b>5,3</b>	<b>0,020</b>	<b>0,002</b>	<b>53</b>	<b>347</b>

Como se puede observar en la tabla 6, el pH influye notablemente sobre los diferentes parámetros de degradación. De esta manera tanto las constantes de degradación a 40°C como a 25°C disminuyen a pH 5,3 mientras que el T90 y t50 aumentan, en todas las soluciones estudiadas. Esto indica que a pH 5,3 nuestro fármaco es más estable, puesto que es menos susceptible de ser hidrolizado al no estar ionizado (Parasrampur y Gupta, 1989).

Además, al evaluar la influencia de la CD (comparando las soluciones ACZ con ACZ + HP- $\beta$ -CD a ambos pH) las constantes de degradación a 25°C disminuyen (de 0,017 a 0,007 días<sup>-1</sup> a pH 7,2 y de 0,004 a 0,002 días<sup>-1</sup> a pH 5,3) puesto que la presencia del agente complejante aumenta la estabilidad de ACZ al proteger la zona de la molécula que se hidroliza, como se ha comentado anteriormente (Másson et al., 1999). Como consecuencia, los valores del periodo de validez y la semivida de degradación obtenidos aumentan (de 6 a 14 días a pH 7,2 y de 24 a 53 días a pH 5,3

para el parámetro T90; y de 41 a 95 días a pH 7,2 y de 161 a 347 días a pH 5,3 para el parámetro t50).

Al examinar los datos obtenidos para la formulación final con respecto a la solución de ACZ + HP- $\beta$ -CD se observan variaciones significativas en los valores de la constante de degradación a 25°C únicamente a pH 7,2 (de 0,007 varía a 0,005 días<sup>-1</sup>), por lo tanto, solo serán relevantes a altas velocidades de degradación, siendo prácticamente inapreciables a bajas velocidades de degradación (pH 5,3). De igual manera ocurre con el periodo de validez y semivida de degradación de la fórmula final, aumentando a pH 7,2 de 14 a 21 días y de 95 a 141 días respectivamente.

Para comparar el efecto que ejerce el pH respecto al que ejerce la CD en la degradación de ACZ utilizaremos el período de validez (T90) como parámetro más representativo. Se observa que el T90 aumenta de 6 a 24 días en la solución de ACZ por el efecto del pH, de 6 a 14 días por el efecto de la CD a pH 7,2 y de 24 a 53 días por el efecto de la CD a pH 5,3; o expresado en porcentaje, aumenta un 300 % al disminuir el pH mientras que se incrementa en un 133 % a pH 7,2 y 121 % a pH 5,3, debido a la presencia de CD. Por lo tanto, el efecto que ejerce el pH en el proceso de hidrólisis de ACZ es más significativo que el que ejerce la CD, en las condiciones ensayadas.



## 5 CONCLUSIONES

1. Se ha comprobado que la presencia de HP- $\beta$ -CD en la formulación provoca la disminución de la constante de degradación de ACZ a todos los pH ensayados. Por lo tanto, HP- $\beta$ -CD es un agente complejante que protege a la ACZ de ser hidrolizada al formar un complejo fármaco-ligando con estequiometría 1:1.
2. La velocidad de degradación de ACZ a pH 5,3 ha disminuido con respecto a pH 7,2 en todos los casos estudiados, por lo que se puede concluir que la ACZ se degrada a menor velocidad cuando menor es el pH.
3. Entre la solución de ACZ + HP- $\beta$ -CD y la formulación final se observan variaciones significativas en los parámetros de degradación a altas velocidades de degradación (pH 7,2) siendo prácticamente inapreciables a bajas velocidades de degradación (pH 5,3).
4. El efecto que ejerce el pH en el proceso de hidrólisis de ACZ es más significativo que el que ejerce la ciclodextrina.
5. A pesar de haberse incrementado el periodo de validez en la formulación oftálmica ensaya, este es insuficiente para comercializarlo en solución. Para solucionar este problema cabe pensar en una alternativa como una preparación extemporánea ya que los valores de T90 a pH 5,3 si permiten la utilización del colirio reconstruido durante al menos un mes permaneciendo dentro de los límites legales exigidos por la administración.



## 6 BIBLIOGRAFÍA

Abad N. Liposomas ultradeformables de acetazolamida para su administración oftálmica: Diseño y estudios de caracterización. Trabajo fin de máster, CITURME. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2012.

Abou-Okeil A, Rehan M, El-Sawy SM, El-bisi MK, Ahmed-Farid OA, Abdel-Mohdy FA. Lidocaine/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex as drug delivery system. *Eur Polym J*. 2018; 108: 304-310.

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Real Farmacopea Española. 5ª ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 2015.

Becker B. Decrease in intraocular pressure in man by a carbonic anhydrase inhibitor, Diamox: A Preliminary Report. *Am J Ophthalmol*. 1954; 37 (1): 13-15.

Berson FG, Epstein DL. Separate and Combined Effects of Timolol Maleate and Acetazolamide in Open-Angle Glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 1981; 92 (6): 788-791.

Bilbao A. Colirios. *Panorama Actual Med*. 2018; 42 (414): 602-608.

Braunger BM, Fuchshofer R, Tamm ER. The aqueous humor outflow pathways in glaucoma: A unifying concept of disease mechanisms and causative treatment. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015; 95 (Part B): 173-181.

Cabanzo L. Desarrollo de una formulación de transfesomas de acetazolamida y timolol para administración oftálmica. Trabajo fin de máster, CITURME. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2013.

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.

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 Release*. 2016; 228: 48-57.

Córdoba R, Hernández A. Utilidad de las asociaciones farmacológicas a dosis fijas. *Aten Primaria*. 1998; 21 (4): 186-255.

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.

Díaz A. Estudio de degradación de timolol maleato, acetazolamida e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina: aplicación para la formulación de un colirio disolución. Trabajo fin de grado. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2016.

Díaz-P JM. Prevención y tratamiento actual del glaucoma. Rev Med Clin Condes. 2010; 21 (6): 891-900.

Drugbank Database. Drug. Acetazolamide [en línea]. [Consultado en diciembre 2018]. Disponible en: <https://www.drugbank.ca/>

Drugbank Database. Drug. Timolol [en línea]. [Consultado en diciembre 2018]. Disponible en: <https://www.drugbank.ca/>

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.

García-Valldecabres M, López-Alemán A, Refojo MF. pH stability of ophthalmic solutions. Optometry. 2004; 75 (3): 161-168.

Ghadi R, Dand N. BCS class IV drugs: Highly notorious candidates for formulation development. J Control Release. 2017; 248: 71-95.

Gil-Alegre ME, Bernabeu JA, Camacho MA, Torres-Suarez AI. Statistical evaluation for stability studies under stress storage conditions. Farmaco. 2001; 56 (11): 877-883.

Glaucoma Research Foundation. Care and treatment. Medication guide. 2016 [en línea]. [Consultado en octubre 2018]. Disponible en: <http://www.glaucoma.org/treatment/medication-guide.php>.

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.

Gonnering R, Edelhauser HF, Van Horn DL, Durant W. The pH tolerance of rabbit and human corneal endothelium. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1979; 18(4): 373-390.

González M, Esteban H. Formulación magistral en Oftalmología. En: Piñeiro-Corrales G, coordinadora. Aspectos prácticos de la farmacotecnia en un servicio de farmacia. Situación actual. 1ª edición. Madrid: Master Line & Prodigio, S.L.; 2011. p.245-274.

Gooch N, Molokhia SA, Condie R, Burr RM, Archer B, Ambati BK et al. Ocular Drug Delivery for Glaucoma Management. Pharmaceutics. 2012; 4 (1): 197-211.

Goodman, Gilman. Farmacología ocular. En: Brunton LL, editor. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11ª ed. México: Mc Graw Hill; 2007. p. 1707-1737.

Gupta D, Chen PP. Glaucoma. Am Fam Physician. 2016; 93 (8): 668-674.



Hasselbalch KA. Die Berechnung der Wasserstoffzahl des Blutes aus der freien und gebundenen Kohlenäure desselben, und die Sauerstoffbindung des Blutes als Funktion der Wasserstoffzahl. *Biochem Z.* 1917; 78: 112-144.

Hassib ST, Elkady EF, Sayed RM. Simultaneous determination of timolol maleate in combination with some other anti-glaucoma drugs in rabbit aqueous humor by high performance liquid chromatography–tandem mass spectroscopy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016; 1022: 109-117.

Henderson LJ. Concerning the relationship between the strength of acids and their capacity to preserve neutrality. *Am J Physiol.* 1908; 21 (2): 173-179.

Herrero-Vanrell R. Aspectos biofarmacéuticos y farmacocinéticos en oftalmología. Formas farmacéuticas oftálmicas. Nuevas formulaciones de administración ocular. En: *Farmacología Ocular.* 2007 [en línea]. [Consultado en Enero 2019]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/329905962/Cap-02-Aspectos-Biofarmaceuticos-y-Farmacocineticos-en-Oftalmologia-Formas-Farmaceuticas-Oftalmicas-Nuevas-Formulaciones-de-Administracion-Ocular>

Higuchi T, Connors KA. Phase Solubility Techniques. *Adv Anal Chem Instrum.* 1965; 4: 117-212.

ICH. ICH Quality Guidelines Stability [en línea]. [Consultado en noviembre 2018]. Disponible en: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.

Jambhekar SS, Breen P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. *Drug Discov Today.* 2016; 21 (2): 356-362

Jansook P, 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.

Jung HJ, Abou-Jaoude M, Carbia BE, Plummer C, Chauhan A. Glaucoma therapy by extended release of timolol from nanoparticle loaded silicone-hydrogel contact lenses. *J Control Release.* 2013; 165 (1): 82-89.

Kaur IP, Singh M, Kanwar M. Formulation and evaluation of ophthalmic preparations of acetazolamide. *Int J Pharm.* 2000; 199 (2): 119-127.

Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutic. *Int J Pharm.* 2002; 248 (1-2): 1-14.

Kalogerou M, Kolovos P, Prokopiou E, Papagregoriou G, Deltas C, Malas S et al. Omega-3 fatty acids protect retinal neurons in the DBA/2J hereditary glaucoma mouse model. *Exp Eye Res.* 2018; 167: 128-139.

Keilin D, Mann T. Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem J.* 1940; 34 (8-9): 1163-1176.

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.

Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins. *Int J Pharm.* 2013; 453 (1): 167-180.

Lavik E, Kuehn MH, Kwon YH. Novel drug delivery systems for glaucoma. *Eye.* 2011; 25: 578-586.

Lim LT, Ah-kee EY, Collins CE. Common eye drops and their implications for pH measurements in the management of chemical eye injuries. *Int J Ophthalmol.* 2014; 7 (6): 1067-1068.

Liu F, Majeed H, Antoniou J, Li Y, Ma Y, Yokoyama W, et al. pH and temperature stability of (-)-epigallocatechin-3-gallate- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex-loaded chitosan nanoparticles. *Carbohydr Polym.* 2016; 149: 340-347.

Liu DD, Guo YF, Zhang JQ, Yang ZK, Li X, Yang B et al. Inclusion of lycorine with natural cyclodextrins ( $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -CD): Experimental and in vitro evaluation. *J Mol Struct.* 2017; 1130: 669-676.

Loftsson T, Duchêne D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* 2007; 329 (1-2): 1-11.

Loftsson T, Jarho P, Måsson M, Järvinen T. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2005; 2 (2): 335-351.

Loh G, Tan Y, Peh K. Enhancement of norfloxacin solubility via inclusion complexation with  $\beta$ -cyclodextrin and its derivative hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Asian J Pharm.* 2016; 11 (4): 536-546.

Måsson 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.

McMonnies CW. Glaucoma history and risk factors. *J Optom.* 2017; 10 (2): 71-78.

Mohamed AM, Abdel-Wadood HM, Mousa HS. Simultaneous determination of dorzolamide and timolol in aqueous humor: A novel salting out liquid-liquid microextraction combined with HPLC. *Talanta.* 2014; 130: 495-505.

Mora MJ, Petiti JP, Longhi MR, Torres AI, Granero GE. Intestinal uptake and toxicity evaluation of acetazolamide and its multicomponent complexes hydroxypropyl- $\beta$ - cyclodextrin in rats. *Int J Pharm.* 2015; 478 (1): 258-267.

Mora MJ, Tártara LI, Onnainty R, Palma SD, Longhi MR, Granero GE. Characterization, dissolution and in vivo evaluation of solid acetazolamide complexes. *Carbohydr Polym.* 2013; 98 (1): 380-390.

Pfeiffer N. Dorzolamide: Development and Clinical Application of a Topical Carbonic Anhydrase Inhibitor. *Surv Ophthalmol.* 1997; 42 (2): 137-151.

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.

Phillips CI, Howitt G, Rowlands DJ. Propranolol as ocular hypotensive agent. *Br J Ophthalmol.* 1967; 51 (4): 222-226.

Portillo S. Estudios de complejación con timolol y acetazolamida con hidroxipropil-beta-ciclodextrina: aplicación al desarrollo de una formulación oftálmica. Trabajo fin de grado. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2015.

Tártara I, Kairuz AJ, Allemandi DA, Palma SD. Uso racional de tecnologías sanitarias: tratamiento del glaucoma. *Lat Am J Pharm.* 2008; 27 (2): 297-302.

Saradhi P, Babu G. Segmentation of optic disk and optic cup from digital fundus images for the assessment of glaucoma. *Biomed Signal Process Control.* 2016; 24: 34-46.

Schöffner JDN, Matte CR, Charqueiro DS, de Menezes EW, Costa TMH, Benvenutti EV et al. Effects of immobilization, pH and reaction time in the modulation of  $\alpha$ -,  $\beta$ - or  $\gamma$ -cyclodextrins production by cyclodextrin glycosyltransferase: Batch and continuous process. *Carbohydr Polym.* 2017; 169: 41-49.

Sigursoon HH, Stefánsson E, Gudmundsdóttir E, 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.

Sociedad Española de farmacia hospitalaria (SEFH). Controles de calidad en la preparación de colirios antiinfecciosos extemporáneos preparados en un servicio de farmacia [en línea]. [Consultado en Enero 2019]. Disponible en: <https://www.sefh.es/54congresoInfo/documentos/ponencias/103.pdf>.

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.

Story D. Bench-to-bedside review: A brief history of clinical acid–base. *Crit Care.* 2004; 8 (4): 253-258.

Valencia C, Tobón E, Castaño C. Acetazolamide as a singlet molecular oxygen quencher. *J Photochem Photobiol.* 2013; 251: 113-117.

Wanare RS, Kabra AO, Deshmukh A, Aher N. Simultaneous estimation of dorzolamide hydrochloride and timolol maleate in eye drops by a RP-HPLC method. *Pharmacie Globale.* 2012; 3 (2): 1-4.

Wilson RP, Kanal N, Spaeth GL. Timolol: Its effectiveness in different types of glaucoma. *Ophthalmology.* 1979; 86 (1): 43-50.