




Universidad
de Sevilla

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA



¿Qué efecto tiene la inclusión de Hidroxi
-propil-beta-ciclodextrina (HPBCD) en la
formulación de liposomas de HPBCD-acetazolamida ?

Cayetano Navas Enamorado



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO DE FIN DE GRADO, GRADO EN FARMACIA

¿Qué efecto tiene la inclusión de Hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP β CD) en la formulación de liposomas de HP β CD-acetazolamida?

CAYETANO NAVAS ENAMORADO

Lugar de presentación: Aula Multimedia

Fecha de presentación: 8 de julio de 2016

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Tutora: María Luisa González Rodríguez

Tipología del proyecto: experimental

Resumen:

En el presente trabajo de investigación, se ha querido estudiar los efectos que tendría la inclusión de la hidroxipropil-beta-ciclodextrina en una formulación de liposomas de acetazolamida, un inhibidor de la anhidrasa carbónica utilizado para el tratamiento del glaucoma.

Acetazolamida es utilizada por vía oral en el tratamiento del glaucoma, presentando aceptables valores de disminución de presión intraocular. Sin embargo, requiere una posología compleja, y los estudios realizados en los últimos años han demostrado que la administración tópica ocular presenta mucho mejores resultados y una mejoría notable en esta patología.

El principal problema que presenta este tipo de formulaciones para este fármaco reside en su baja biodisponibilidad tras la administración tópica ocular, debido a su baja solubilidad acuosa y permeabilidad. En base a ello, se han empleado distintas estrategias solubilizantes que ayuden a mejorar estas propiedades. Entre éstas, se ha seleccionado el uso de ciclodextrinas, que son moléculas complejantes que aumentan la solubilidad acuosa del fármaco. A su vez, introducir este complejo en un sistema vesicular como son los liposomas, podría constituir una buena vía para mejorar la estabilidad del complejo, aumentar el tiempo de contacto de la formulación con la superficie ocular y mejorar las características de permeabilidad del fármaco.

ÍNDICE:

1	1. Introducción.	4
1.1	GLAUCOMA.	4
1.1.1	Concepto	4
1.1.2	Tratamiento farmacológico	4
1.2	ACETAZOLAMIDA	6
1.2.1	Antecedentes	6
1.2.2	Características fisicoquímicas y farmacocinéticas	7
1.3	CICLODEXTRINAS (CDs)	9
1.3.1	Derivados de ciclodextrinas	10
1.3.2	Complejación en medio líquido: diagramas de solubilidad	11
1.4	LIPOSOMAS	12
1.4.1	Tipos de liposomas	14
1.4.2	Composición de los liposomas	15
1.4.3	Liposomas para administración oftálmica	15
1.5	OBJETIVOS	16
2	2. Materiales y Métodos.	17
2.1	MATERIALES Y REACTIVOS	17
2.2	EQUIPOS E INSTRUMENTACIÓN	18
2.3	METODOLOGÍA	18
2.3.1	Búsqueda de información	18
2.3.2	Diagramas de solubilidad	19
2.3.3	Composición de los liposomas	20
2.3.4	Elaboración de los liposomas	21
2.3.5	Evaluación de la integridad de la membrana del liposoma: estudios de incubación	22
2.3.6	Caracterización fisicoquímica de liposomas	23
2.3.7	Determinación del porcentaje de encapsulación	25
3	3. Resultados y discusión.	27
3.1	SOLUBILIDAD DE FASE Y EFICACIA DE COMPLEJACIÓN DE ACZ EN HPβCD	27
3.2	INTEGRIDAD DE LOS LIPOSOMAS: ESTUDIOS DE INCUBACIÓN	28
3.3	INFLUENCIA DEL AGENTE DE CARGA EN LA INTEGRIDAD DE LOS LIPOSOMAS	29
3.4	INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE COLESTEROL EN LA INTEGRIDAD DE LOS LIPOSOMAS	32
3.5	DISCUSIÓN	33
4	4. Conclusiones.	35
5	5. Perspectivas de futuro.	35
6	6. Referencias bibliográficas.	36

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GLAUCOMA

1.1.1 Concepto

El glaucoma es una enfermedad que afecta al nervio óptico y que se encuentra definido por un patrón particular de daño progresivo de dicho nervio. Los pacientes que presentan esta patología son capaces de desarrollar una neuropatía óptica progresiva caracterizada por la atrofia del nervio óptico y una pérdida adquirida de células ganglionares retinianas. Si el glaucoma no se diagnostica ni se trata, puede tener como consecuencia un déficit importante de agudeza visual e incluso ceguera (Goodman y Gilman, 2006; Porth, 2007).

La enfermedad está generalmente, aunque no siempre, asociada con un incremento de la presión intraocular, la cual es la responsable de la degeneración del nervio óptico (Figura 1).

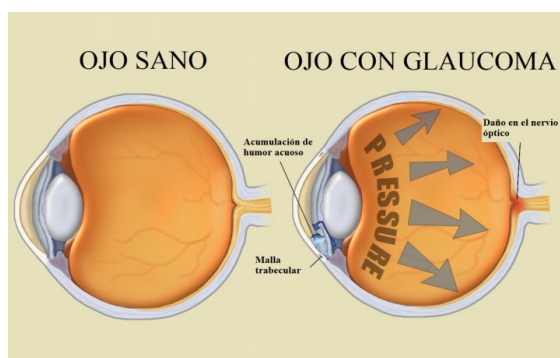


Figura 1. Comparación de ojo sano y ojo con glaucoma (<http://cocclinicaoftalmologica.blogspot.com.es/2012/07/glaucoma.html>).

Sin embargo, esta patología también puede manifestarse en presencia de valores normales de presión en el ojo. Se cree que esta forma de glaucoma es causada por la mala regulación del flujo sanguíneo en el nervio óptico (Acosta y cols., 2009).

1.1.2 Tratamiento farmacológico

Aunque el daño que provoca la enfermedad, generalmente, es difícil de recuperar, sin embargo, éste se puede controlar. Los tratamientos se centran básicamente en disminuir la presión intraocular normal, y prevenir o retardar así los daños provocados en el nervio óptico y la pérdida visual. Todos están basados en la reducción de la

producción de humor acuoso en el cuerpo ciliar, o bien aumentar la salida de éste por la malla trabecular (Benítez-Collante y cols., 2005).

1.1.2.1. Fármacos que reducen la producción de humor acuoso

Los β -bloqueantes son los fármacos más usados hoy día con este fin. Su efectividad parece estar más relacionada con su farmacocinética que con su afinidad por los diferentes subreceptores β . Aunque no se conoce con certeza, su mecanismo de acción consiste en disminuir la producción de humor acuoso y descender la presión intraocular. A este grupo pertenecen timolol, levobunolol, carteolol y metipranolol.

Los fármacos inhibidores de la anhidrasa carbónica reducen la producción de humor acuoso inhibiendo la enzima anhidrasa carbónica, que tiene un papel fundamental en la formación del humor acuoso (García, 2010). Fármacos que pertenecen a este grupo son dorzolamida y el fármaco estudiado en este trabajo, acetazolamida.

1.1.2.2. Fármacos que favorecen el drenaje del humor acuoso

Los análogos de las prostaglandinas tienen una estructura similar a las prostaglandinas endógenas y actúan aumentando el drenaje de fluido ocular. Estos fármacos, sin embargo, son propensos a causar enrojecimiento de los ojos, pudiendo llegar a causar inflamaciones en el interior del ojo (García, 2010). Los principios activos más relevantes dentro de este grupo son latanoprost, travoprost y bimatoprost.

1.1.2.3. Fármacos que reducen el volumen del humor vítreo

Los agentes osmóticos constituyen un grupo secundario de fármacos utilizados para tratar las formas agudas de la enfermedad, donde la presión del ojo sigue siendo muy alta, aun utilizando otros tratamientos. Su mecanismo de acción consiste en elevar la concentración de los fluidos extravasculares, de tal forma que se produce una diferencia osmótica entre el plasma y el humor vítreo (Tártara y cols., 2008), provocando así la salida de líquido intraocular.

1.1.2.4. Fármacos que reducen la producción y aumentan el drenaje del humor acuoso

Los fármacos agonistas adrenérgicos actúan de forma no selectiva en los receptores alfa y beta. Por tanto, actúan en la reducción de la producción de líquido mediante la vasoconstricción de las arteriolas del cuerpo ciliar, así como en el aumento del flujo de salida (drenaje). El fármaco agonista más representativo es brimonidina. Sin embargo,

presenta un alto riesgo de reacciones locales, sobre todo alérgicas. Otros son epinefrina y apraclonidina.

Los agentes parasimpaticomiméticos, conocidos como mióticos, aumentan la difusión del humor acuoso vía trabecular, actuando en la abertura sináptica del músculo ciliar y promoviendo la contracción del mismo. Algunos fármacos que pertenecen a este grupo son pilocarpina y demecario. Hoy día, la pilocarpina es el fármaco más usado en el tratamiento del glaucoma, puesto que los demás requieren una posología muy repetida y pueden provocar efectos secundarios (Tártara y cols., 2008).

1.2 ACETAZOLAMIDA

Acetazolamida (ACZ) es un fármaco inhibidor de la anhidrasa carbónica que se utiliza por vía oral para reducir la presión intraocular en pacientes que sufren glaucoma. Existen dos razones fundamentales por las que no se ha desarrollado una forma farmacéutica líquida de administración oftálmica de ACZ:

- 1) Su baja solubilidad acuosa (aproximadamente 1 mg/mL)
- 2) Su baja permeabilidad

1.2.1 Antecedentes

En 1940, Mann y Keilin observaron que cuando se administraba sulfanilamida como agente quimioterápico, uno de sus efectos secundarios era la acidosis metabólica. Esto llevó al estudio del proceso, tanto *in vitro* como *in vivo*, demostrando que la sulfanilamida inhibía la anhidrasa carbónica.

Posteriormente, en 1954, ACZ se empezó a utilizar en oftalmología, ya que se demostró su capacidad para disminuir la presión intraocular reduciendo la producción de humor acuoso en el cuerpo ciliar (Becker, 1954). Otras investigaciones también demostraron la eficacia del fármaco en pacientes con glaucoma, tras su administración oral (Gloster y Perkins, 1955). Con el tiempo, se han ido incorporando nuevos inhibidores de la anhidrasa carbónica y diferentes vehículos, que disminuyen la presión intraocular, como son dorzolamida, aminozolamida y MK-927.

Una característica común de estos fármacos es que no poseen propiedades fisicoquímicas compatibles con una penetración adecuada a través de la córnea. Se ha observado que la incapacidad de los inhibidores de la anhidrasa carbónica, administrados tópicamente, para reducir la presión intraocular, puede ser el resultado

de su penetración ocular limitada, causando una cantidad insuficiente del fármaco para alcanzar el cuerpo ciliar (Maren y cols., 1983).

La N-(5-sulfanoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-acetamida ó ACZ ($C_4H_6N_4O_3S_2$), es un fármaco inhibidor de la anhidrasa carbónica, cuya estructura química es la siguiente:

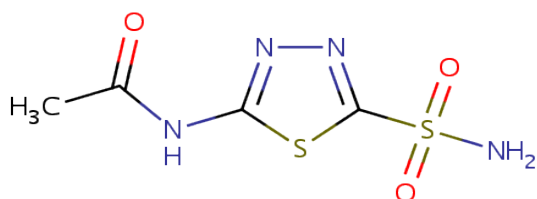
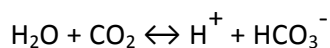


Figura 2. Estructura química de acetazolamida.

(<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00819>)

La inhibición de la anhidrasa carbónica por fármacos como ACZ disminuye la concentración de HCO_3^- y, por tanto, el flujo de Na^+ y H_2O en la cámara posterior del globo ocular. Se recuerda que la función de esta enzima consiste en catalizar, de forma reversible, la reacción de H_2O y CO_2 para formar ácido carbónico y, posteriormente, el ión bicarbonato, como se muestra en la siguiente reacción:



El ión HCO_3^- es el encargado de transportar el Na^+ en el ojo, el cual es necesario para la producción del humor acuoso, ya que es este catión el que atrae al agua para formar el humor acuoso. Consecuencia de dicha inhibición es la reducción de la producción de humor acuoso y, por tanto, de la presión intraocular (Kaur y cols., 2002).

1.2.2 Características fisicoquímicas y farmacocinéticas

ACZ, que es 2-acetilamino-1,3,4-tiadiazol-5-sulfonamida ($C_4H_6N_4O_3S_2$), se presenta como un polvo muy fino cristalino blanco-amarillento y prácticamente inodoro. En la Tabla 1 se recogen algunas de las características fisicoquímicas más interesantes de esta molécula.

Desde el punto de vista farmacocinético, ACZ presenta una absorción adecuada en el tracto gastrointestinal, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas a las 2 - 4 h.

Característica	Valor
Peso molecular	222,25 g/mol
Solubilidad acuosa	980 mg/L
Log P	-0,45
pKa	7,2

Tabla 1. Algunas propiedades fisicoquímicas de ACZ

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acetazolamide#section=Top>)

Tras la administración de los comprimidos, se produce una reducción de la presión intraocular en 1 ó 2 horas, con una duración de acción de 8 a 12 horas. La vida media plasmática de aproximadamente 4 horas está estrechamente ligada a la anhidrasa carbónica y se acumula en los tejidos que contienen esta enzima, en particular los glóbulos rojos y en la corteza renal, aunque también se une a las proteínas plasmáticas. Por tanto, posee una eliminación bifásica, correspondiendo la primera fase con una vida media de 2 horas y la segunda fase coincidiendo con la salida de ACZ de los eritrocitos, en 13 horas. No sufre biotransformación, eliminándose por riñón, por secreción tubular y reabsorción tubular.

Uno de los principales problemas acerca de la utilización de este fármaco en formulaciones oftálmicas radica en su escasa solubilidad acuosa. Su coeficiente de reparto negativo, indicativo de su baja afinidad por los lípidos, limita su tránsito a través del epitelio corneal y el endotelio, mientras que la escasa solubilidad en agua impide el tránsito a través del estroma hidrofílico (Parasrampur y Gupta, 1989). Por tanto, el desarrollo de una formulación tópica de ACZ se convierte en un reto en investigación. Su puesta a punto podría conducir a la abolición total de los efectos secundarios sistémicos observados en su uso oral, como podrían ser adormecimiento y cosquilleo, aumento de la sensación de sed y de la necesidad de orinar, somnolencia y cefalea. En este sentido, los avances producidos en investigación han sido importantes y notables a pesar de los fracasos iniciales (Mishra y Jain, 2014).

El desarrollo de preparados líquidos en solución para administración oftálmica implica el uso de agentes solubilizantes en el caso de que el principio activo presente problemas de solubilidad, como es el caso de ACZ. Como es bien sabido, los mecanismos de solubilización son múltiples, siendo la capacidad anfifílica de determinadas sustancias (tensioactivos), la cosolvencia y la formación de complejos, algunos de ellos.

En el presente estudio, se va a utilizar la estrategia de formular complejos de inclusión

de ACZ con un tipo de ciclodextrina, HP β CD, un compuesto capaz de formar complejos con nuestro fármaco de estudio, hecho que sabemos debido a que ya se ha utilizado con anterioridad, demostrando un alto índice de éxito acompañando al fármaco de estudio (Loftsson y Jarvinen, 1999).

Con el fármaco complejado, se procederá a evaluar su efecto tras internalizar dicho complejo en formulaciones de liposomas para su posterior aplicación oftálmica. La relevancia de llevar a cabo el desarrollo de estas formulaciones radica en las características interesantes de los liposomas como estructuras anfífilas, que pueden contribuir a mantener el fármaco solubilizado, así como sus propiedades como mejoradores de la penetración a través de la membrana corneal, como ha quedado refrendado por diversos autores (Cortesi y cols., 2006).

1.3 CICLODEXTRINAS (CDs)

La primera investigación en la que se aisló una sustancia reconocida como ciclodextrina fue en 1981 por Villiers (Duchêne y cols., 1987). En este caso se aisló una pequeña cantidad de sustancia cristalina en un cultivo de la bacteria *Bacillus amylobacter*, denominado celulosina, por su similitud con la celulosa.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos constituidos por un número variable de unidades de glucosa unidas por enlaces α (1, 4). La característica más importante de estos compuestos es su conformación toroidal (Lindner y Saenger, 1980), que delimita una cavidad relativamente apolar, mientras que la parte exterior es hidrófila (Figura 3). Gracias a esta estructura, son capaces de formar complejos de inclusión, tanto en medio sólido como líquido (Szejtli, 1998; Varca y cols., 2010).

Las CDs más usuales son las de seis, siete y ocho unidades (α -, β - y γ -CD) y en su hueco ó cavidad, de carácter relativamente apolar (Kurkov y Loftsson, 2013), se pueden alojar moléculas formándose los denominados complejos de inclusión (Figura 4).

Las diversas ciclodextrinas presentan cavidades de distintas dimensiones (γ -> β -> α -), por lo que una buena acomodación de la molécula huésped al tamaño de la cavidad se traducirá en un mayor número de interacciones entre ambas moléculas, hecho que supondrá un valor más alto de estabilidad (Blanco y cols., 1991).

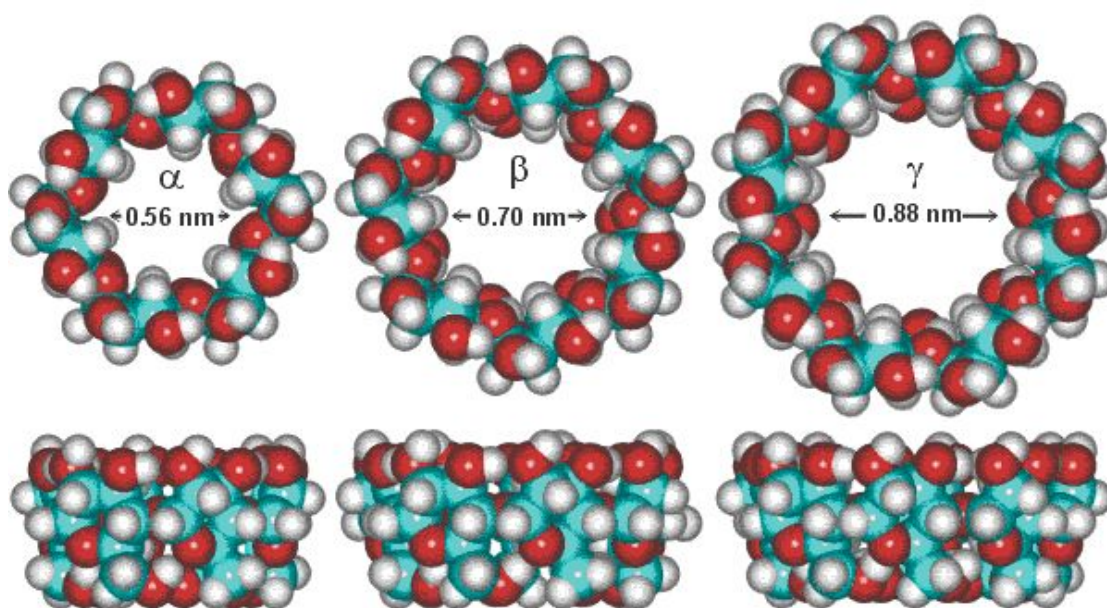


Figura 3. Estructura de las principales ciclodextrinas naturales.
 (<http://naukas.com/2012/05/21/encapsulando-a-niemann-pick/>)

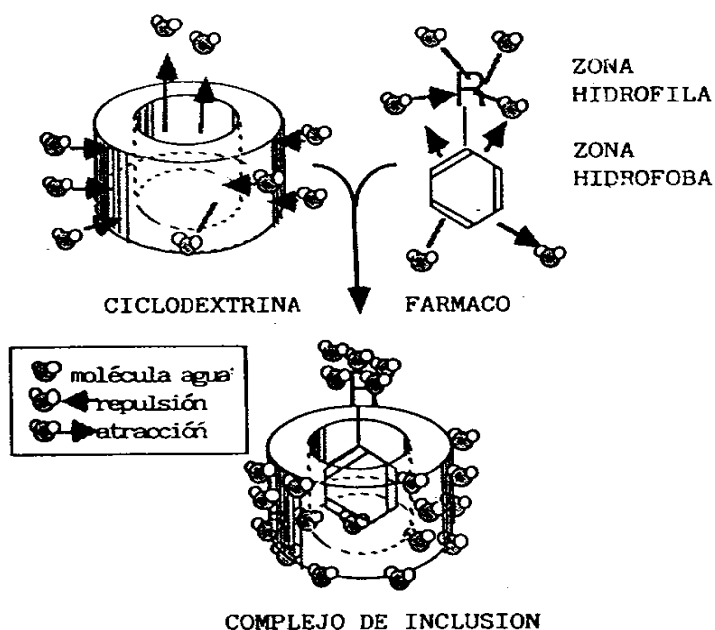


Figura 4. Reacción de formación de un complejo de inclusión (Moyano y cols., 1994).

1.3.1 Derivados de ciclodextrinas

La baja solubilidad relativa de las CDs naturales en agua, en especial en el caso de la β -CD, limita considerablemente las aplicaciones de estos compuestos.

Con el fin de mejorar estas deficiencias, se desarrollaron diferentes modificaciones sobre las CDs naturales. La adición de grupos funcionales a los grupos hidroxilos de las ciclodextrinas constituye el punto de partida para la modificación estructural. Según el radical insertado, habrá distintos tipos de derivados, siendo los más utilizados los derivados hidroxipropilados (HP). El objetivo principal de la hidroxipropilación ha sido aumentar la solubilidad acuosa del producto de partida, simultaneando las ventajas de un derivado hidrosoluble y una estructura amorfa (Pitha y Pitha, 1985).

La hidroxipropilación no es una reacción selectiva, sino que conduce a una mezcla con diferentes grados de sustitución. La capacidad de coexistir entre los diferentes compuestos hidroxipropilados en la mezcla final explica su incapacidad para cristalizar y, por tanto, la obtención de una sustancia amorfa (Irie y cols., 1988).

Por tanto, estos compuestos supondrían una buena opción para el estudio del aumento de solubilidad de la ACZ, como afirman algunos autores (Granero y cols., 2008; Kaur y cols., 2002; Loftsson y cols., 2005).

1.3.2 Complejación en medio líquido: diagramas de solubilidad

Constituyen el método más utilizado para el estudio de los complejos de inclusión en solución. Mediante estos, es posible determinar la composición del complejo de inclusión-sustrato, según el siguiente esquema:



El método fue descrito inicialmente por Higuchi y Connors (Higuchi y cols., 1965).

El ensayo se basa en la determinación de la variación de solubilidad del sustrato en función de la adición de un agente complejante. La molécula se adiciona en exceso a soluciones que contienen concentraciones crecientes de ciclodextrinas, bajo condiciones de agitación y temperatura constantes.

El comportamiento del fármaco en este estudio puede ser muy diverso. En la Figura 5 se recoge un esquema con las diferentes posibilidades.

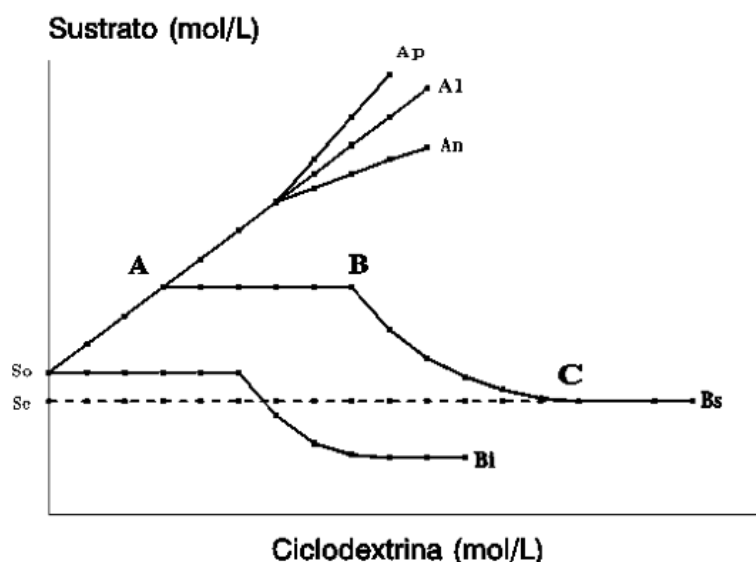


Figura 5. Gráfica con los diferentes diagramas de solubilidad (Martín del Valle, 2004).

- **Tipo A:** El diagrama obtenido es una línea recta. Este resultado indica la presencia de un compuesto de inclusión sin límite de solubilidad, al menos a las concentraciones de CD ensayadas. Dentro de este tipo, a su vez, pueden darse diferentes casos:
 - A_L : el complejo de inclusión posee estequiometría 1:1.
 - A_p : el complejo de inclusión posee una estequiometría superior a 1:1.
 - A_N : son curvas difíciles de interpretar cuantitativamente, pues las interacciones soluto/solvente o soluto/soluto complican el sistema.
- **Tipo B:** Se obtienen cuando el complejo de inclusión posee el límite de solubilidad por encima del cual precipita.

1.4 LIPOSOMAS

Como se ha referido en el apartado 1.2.2., la mayoría de las formulaciones tópicas oftálmicas se administran en forma de soluciones acuosas. Sin embargo, este tipo de formas farmacéuticas se caracterizan por tener baja eficacia ya que, aun con muchas aplicaciones diarias, resulta difícil conseguir niveles terapéuticos. Con el fin de mejorar la biodisponibilidad y aumentar el tiempo de contacto de la formulación con el ojo, se han desarrollado diferentes estrategias destinadas a la vía tópica ocular. Entre éstas cabe destacar el empleo de sistemas de liberación controlada del fármaco.

En este sentido, la idea consistiría en reemplazar las formas de administración convencionales por nuevos sistemas de administración de fármacos con propiedades

biofarmacéuticas mucho mejores y con capacidad para liberar el activo de una forma mucho más precisa y predecible. Entre estos nuevos sistemas, los sistemas coloidales como los liposomas están cobrando en la actualidad un enorme interés (Soriano, 2012).

Los liposomas son vesículas esféricas de tamaño micro o nanométrico constituidas por bicapas fosfolipídicas concéntricas que encierran un número igual de compartimentos acuosos, como se muestra en la figura 6.

Los componentes básicos de estas vesículas, al igual que las membranas celulares, son los fosfolípidos, los cuales tienen la propiedad de adoptar espontáneamente una configuración en bicapas cuando se encuentran en un medio acuoso. Esta propiedad se debe a que los fosfolípidos son moléculas anfipáticas o anfifílicas, es decir, poseen un extremo polar o hidrofílico que se orienta hacia la fase acuosa y un extremo no polar o hidrofóbico que rechaza la fase acuosa y se orienta hacia el interior de la bicapa (Villasmil, 2010).

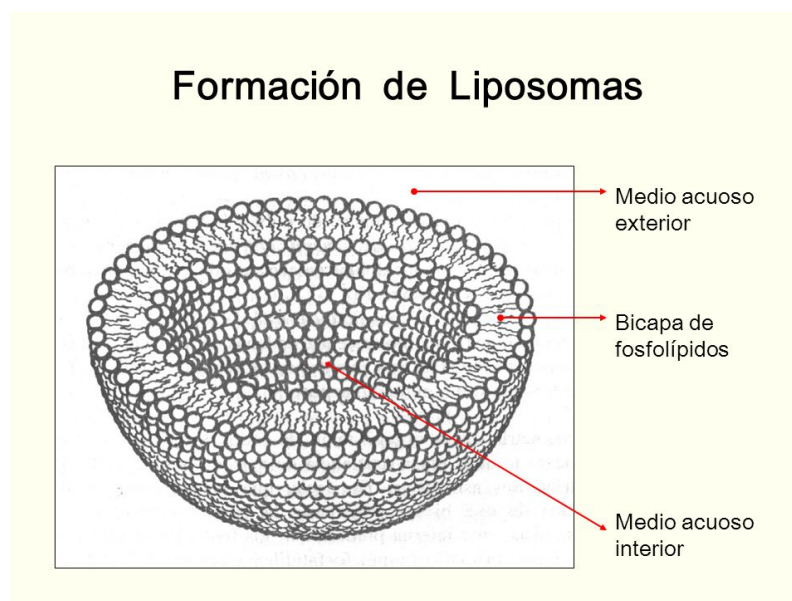


Figura 6. Estructura de un liposoma.
(<http://www.slideshare.net/swethaitha/liposomes-and-niosomes-15259272>)

Su composición, en la que se encuentra una importante cantidad de lípidos de la membrana celular, su capacidad de encapsular activos de naturaleza muy diversa, hidrófilos en la capa acuosa e hidrófobos en la bicapa lipídica, su biodegradabilidad y ausencia de toxicidad, junto a las posibilidades de vectorización de los fármacos, han

favorecido la difusión de su utilización y aparición continuada de nuevas aplicaciones (Muller y Landfester, 2015; Sonali y cols., 2016).

Sin embargo, las principales desventajas de estos vehículos radica en que deben mantener las condiciones de esterilidad y en su inestabilidad, que se intenta solventar mediante la adición de colesterol (Kaur y cols., 2002).

1.4.1 Tipos de liposomas

En función de su tamaño, número de compartimentos y modo de obtención, los liposomas se clasifican en:

- Vesículas unilaminares pequeñas (SUVs, "*small unilamellar vesicles*"). Debido a su pequeño tamaño, que oscila entre 20 y 100 nm, pueden ser usados en terapia sistémica, pero tienen baja capacidad de carga y una distribución heterogénea de los lípidos en la bicapa, lo que resulta en deformaciones estructurales, por lo que su uso es muy limitado (Ball, 1995).
- Vesículas unilaminares grandes (LUVs, "*large unilamellar vesicles*"). Presentan un tamaño superior a 100 nm y ofrecen numerosas ventajas frente a los SUVs en cuanto a su estabilidad y sobre todo, respecto a los MLVs. La importancia de estos liposomas reside en su capacidad de vehicular una cantidad más elevada de agua y, por consiguiente, de principio activo hidrosoluble (Ball, 1995).
- Vesículas multilaminares (MLVs, "*multilamellar vesicles*"). Estas vesículas se caracterizan porque poseen varios compartimentos acuosos concéntricos. Presentan menor capacidad de encapsulación que los liposomas LUVs, de tamaño semejante o incluso superiores. Este puede variar entre 100-1000 nm, dependiendo de las condiciones de fabricación, y son ideales para uso tópico (Bangham y cols., 1965; Fang y cols., 2001).
- Vesículas multivesiculares (MVVs, "*multivesicular vesicles*"). Los sistemas MVV se caracterizan por su estructura de múltiples cámaras acuosas no concéntricas rodeadas de una membrana. Estos sistemas pueden ser diferenciados de los liposomas convencionales, vesículas unilaminares (LUVs) y vesículas multilaminares (MLV) en dos aspectos importantes: tamaño y composición (Jain y cols., 2005).

1.4.2 Composición de los liposomas

Los liposomas pueden elaborarse a partir de una gran variedad de lípidos. Se utilizan distintos fosfolípidos como agentes principales y cantidades variables de colesterol, con la finalidad de aumentar la estabilidad del fármaco en la vesícula y mejorar la eficacia de encapsulación, ya que el colesterol disminuye la libertad de rotación de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos en el interior de las bicapas (Fang y cols., 2001).

Los fosfolípidos son compuestos de carácter anfipático que constan de una molécula de glicerol con tres grupos hidroxilos, dos de ellos esterificados con dos ácidos grasos, lo que constituye la región hidrofóbica; y uno esterificado con el ácido fosfórico, constituyendo la cabeza polar (Maestrelli y cols., 2005). Entre los fosfolípidos, el más utilizado en la formulación de liposomas es la fosfatidilcolina, que se obtiene de la lecitina del huevo o la soja, debido a su bajo coste de producción, su carga neutra y ser químicamente inerte (Abad, 2012). Es una molécula insoluble en agua, y su comportamiento está encaminado a minimizar las fuerzas repulsivas entre la fase acuosa y las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos.

El colesterol contiene el núcleo esteroide ciclopentanoperhidrofenantreno y un radical hidroxilo. Es insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos (Reilly, 1999). Condiciona la permeabilidad y la fluidez de la membrana, y por tanto, la estabilidad de los liposomas y la capacidad de encapsulación (Moribe y cols., 1999). Los fosfolípidos pueden incorporarlo hasta una concentración molar del 50%. Por encima de este valor, los liposomas son metaestables y las vesículas tienden agregarse y precipitar (Clares, 2003).

Por tanto, la estabilidad depende de distintas propiedades inherentes a las vesículas, como la carga superficial, el tamaño, la hidratación de la superficie y la fluidez de las bicapas lipídicas (González-Rodríguez y cols., 2007; Villasmil, 2010). Otros factores, como la incorporación de moléculas a encapsular, también pueden interaccionar con los componentes de los liposomas, pudiendo alterar su integridad y afectando, por tanto a la estabilidad (Maestrelli y cols., 2009).

1.4.3 Liposomas para administración oftálmica

Por lo que respecta a la vía oftálmica, se ha demostrado que los liposomas pueden mejorar la penetración de fármacos, ya que establecen un contacto íntimo con la

superficie córneo-conjuntival (Hathout y cols., 2007). Se ha demostrado que la carga superficial del liposoma influye en la penetración a través del epitelio corneal, siendo aquellos con carga positiva los más favorables, dada la interacción electrostática entre las cargas positivas de los liposomas y las negativas de los epitelios corneal y conjuntival (Rabinovich-Guilatt y cols., 2004). Sin embargo, a pesar de esta justificación, no siempre esta interacción es favorable a la acción de la formulación.

El fármaco encapsulado en los liposomas puede liberarse bien por difusión pasiva, o bien por erosión de las vesículas. Mediante difusión pasiva, las moléculas de fármaco tienden a penetrar a través de las capas lipídicas de los liposomas para alcanzar la capa vesicular adyacente, ya sea por mecanismo de difusión o convección. La velocidad de difusión depende del tamaño, la composición de lípidos, y las propiedades del fármaco en sí, como defienden (Mishra y cols., 2011).

Sin embargo, a pesar de las ventajas que aportan los liposomas como sistemas mejoradores de la penetración, los liposomas convencionales presentan ciertas dificultades para atravesar intactos determinadas capas de la mucosa, quedando el fármaco acumulado en el lugar de aplicación (Maestrelli y cols., 2006). Actualmente, se han diseñado diferentes tipos de vesículas introduciendo algún componente que modifican sus propiedades, como los niosomas, etosomas, transfersomas, entre otros, que proporcionan beneficios adicionales a los liposomas convencionales con el fin de facilitar el paso de fármacos a través de las mucosas (González-Rodríguez y Rabasco, 2011).

1.5 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo consiste en analizar las características fisicoquímicas y de atrapamiento del complejo HP β CD-ACZ en liposomas convencionales y evaluar su integridad. Con este estudio se pretende avanzar en la obtención de una formulación adecuada y estable para su posterior adición de maleato de timolol como fármaco sinérgico en el tratamiento del glaucoma y proceder a su evaluación in vivo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES Y REACTIVOS

A continuación, se presentan los distintos materiales que han sido utilizados para la realización de este trabajo experimental.

- Acetazolamida (ACZ)
- Agua Milli-Q® (*Milli-Q® Advantage, Millipore*).
- Hidroxipropilbetaciclodextrina (HPBCD): se presenta como un polvo cristalino blanco, inodoro y ligeramente dulce y con un peso molecular de 1375.36 g/mol (<http://es.cydextrin.com/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin>).
- Cloroformo: triclorometano estabilizado con etanol. Fórmula empírica: CHCl_3 . Calidad analítica.
- Cloruro de sodio: Cristales translúcidos blancos. Muy soluble en agua, de peso molecular 58,44 g/mol.
- Colesterol (CH): Se presenta como polvo blanco con fórmula empírica $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$, nombre químico 3- β -hidroxi-5-colesteno, peso molecular de 386,67 g/mol y con un punto de fusión de 148,5 °C. Se conserva a temperatura ambiente.
- Estearilamina (EA): Octadecilamina. Su fórmula empírica es $\text{C}_{18}\text{H}_{39}\text{N}$ y su peso molecular 269,52 g/mol. Se trata de un polvo blanco, insoluble en agua, que se conserva a temperatura ambiente.
- Fosfatidilcolina de huevo (EPC). Es el fosfolípido responsable de la actividad interfacial del surfactante, ya que sus dos cadenas de acilo saturadas le permiten formar una monocapa altamente empaquetada. Se conserva a 4 °C.
- Lauril sulfato sódico (LSS): de fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$, se presenta como un polvo fino blanco, con débil olor característico. Su peso molecular es 288,38 g/mol.
- Metanol: de fórmula molecular CH_3OH y peso molecular de 32,0 g/mol. Calidad analítica.

- Tampón Hepes: ácido 2-[4(2-hidroxiethyl)-1-piperacini] etanosulfónico (Hepes) de fórmula molecular $C_8H_{18}N_2O_4S$ y peso molecular 238,30 g/mol. El tampón se estabilizó a pH= 7,4 con NaOH.
- Bromuro de didecil dimetil amonio (DDAB): su fórmula empírica es $C_{26}H_{56}BrN$ y su peso molecular es 462,6 g/mol. Se trata de un polvo cristalino blanco, que se conserva a temperatura ambiente.
- Acetato sódico: polvo cristalino con fórmula molecular CH_3COONa . Su solubilidad en agua es 0,47 g/mL y su peso molecular 82,04 g/mol.

2.2 EQUIPOS E INSTRUMENTACIÓN

El equipamiento necesario para realizar este trabajo se cita a continuación:

- Balanza analítica de precisión (*Explorer[®] Pro*).
- Rotavapor (*Büchi Rotavapor R-210 con Büchi Heating Bath B-491*).
- Equipo de agitación (*Atom Atomixer*).
- Baño termostático (*Raypa ICI-200*).
- *Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)*.
- Centrífuga (*Eppendorf Centrifuge 5804 R*).
- HPLC (*Hitachi HPLC Elite Lachrom*).
- Espectrofotómetro (*Agilent 8453*).
- Baño de ultrasonidos (*VWR Ultrasonic cleaner*).
- Bomba de vacío (*Millipore*).

2.3 METODOLOGÍA

2.3.1 Búsqueda de información

Para la realización del presente trabajo, la búsqueda de información se basó en la continuación de una de las líneas de investigación iniciadas por el grupo de investigación. Fundamentalmente se utilizaron manuales y bibliografía revisada con anterioridad por los investigadores del grupo, así como actualizaciones y revisiones más actuales, con el fin de tener los datos más actuales respecto al tema.

Además realizamos búsquedas en bases de datos de publicaciones científicas para la contrastación de los ensayos realizados y los resultados obtenidos, tales como Pubmed, vademécum, medline, AEMPS, entre otras.

2.3.2 Diagramas de solubilidad

Estos ensayos de solubilidad de fase se diseñaron de acuerdo con la metodología propuesta por Higuchi y Connors, con el fin de confirmar la constante de estabilidad aparente ($K_{1:1}$) y determinar la eficacia de complejación.

Se programaron tres diagramas de solubilidad diferentes durante la realización de este trabajo. En el primero, se reprodujo un estudio ya iniciado por el grupo de investigación, que tenía como finalidad poner de manifiesto la influencia que ejercían concentraciones crecientes de HP β CD en la solubilidad de la ACZ. Para ello, sobre frascos de vidrio que contenían 5 mL de Hepes a temperatura ambiente, se adicionó una concentración variable de HP β CD (0,01 – 0,1 M) y un exceso de fármaco correspondiente a unos 30 mg del mismo. Con el fin de evitar toda posible interacción en estado sólido de los componentes, la adición del principio activo se realizó tras la solubilización total del vehículo. Estos frascos así preparados se mantuvieron cerrados y en agitación (ACS 360 TS-K 412) durante 7 días hasta alcanzar el equilibrio total del sistema. A continuación, se procedió a su valoración por HPLC previa filtración de las muestras con objeto de eliminar la fase sólida presente. Esta se realizó mediante jeringa y filtros de nitrocelulosa (Millipore®) de 0,45 μ m de diámetro de poro. Igualmente, se realizaron diluciones adecuadas de las soluciones obtenidas (1:10), con el fin de conseguir la concentración apropiada del fármaco para proceder a su valoración. Los ensayos se realizaron por triplicado.

El segundo estudio fue similar al primero, al cual se le adicionó una cantidad fija de colesterol (20 mg). Con esta modificación se crea un sistema ternario y la finalidad fue estudiar la interacción entre la HP β CD y el colesterol presente en los liposomas, como consecuencia de un desplazamiento de la ACZ complejada.

El tercer estudio se programó una vez obtenidos los resultados del segundo diagrama, y habiéndose observado que efectivamente existía interacción entre la ciclodextrina y el colesterol. En este caso, se realizó un nuevo diagrama pero sustituyendo el colesterol por el derivado hemisuccinato de colesterol, esperando que no ocurrieran interacciones y secuestro por parte de éste sobre la HP β CD.

Los datos de solubilidad de ACZ se representaron gráficamente frente a la concentración molar de HP β CD mediante regresión lineal. Asumiendo la relación estequiométrica 1:1, se procedió al cálculo de la $K_{1:1}$ mediante la relación entre la concentración molar de ACZ

en la solución frente a la concentración molar de HPβCD, según la siguiente ecuación:

$$K_{1:1} = \frac{Pendiente}{S_0(1 - Pendiente)}$$

Donde S_0 es la solubilidad de ACZ en ausencia de HPβCD.

En los sistemas ternarios donde la S_0 se puede ver influenciada por la presencia del aditivo, resulta más interesante contemplar el parámetro eficiencia de complejación (EC). Este parámetro a partir de los datos de la curva de solubilidad de fases, mediante la siguiente expresión (Loftsson y cols., 2005):

$$EC = \frac{Pendiente}{1 - Pendiente}$$

Otro parámetro a evaluar sería la eficacia solubilizante (ES) que ejerce la CD y que se define como el aumento de la solubilidad relativa del fármaco obtenida a una determinada concentración de CD, según la siguiente ecuación:

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

Donde S_{CD} representa la solubilidad del fármaco a dicha concentración de CD y S_0 la solubilidad en ausencia de CD.

2.3.3 Composición de los liposomas

Como se mencionó anteriormente, la elaboración de los liposomas se llevó a cabo partiendo de fosfatidilcolina como agente principal y colesterol en la formulación, así como otros componentes, dependiendo de las características que requiera la formulación o del fin para el que se estén formulando (López-Pinto y cols., 2005). En la tabla 2 se recoge la composición de las formulaciones empleadas en este estudio, atendiendo a si los componentes se incluyeron en la fase lipídica o fase acuosa de los liposomas.

COMPONENTE	Fase lipídica	Fase acuosa
EPC	0,0954 mmol	-
Colesterol	0,0812 mmol	-
Cloroformo	4 mL	-
Metanol	3,8 mL	-
HPβCD	-	0,318 g/10 mL*
Inductor carga positiva: EA ó DDAB	Cantidades variables para comprobar estabilidad	
Hepes pH 7.4 + EDTA 0.1 mM	-	10mL*
ACZ		5mg/mL en fase acuosa*

Tabla 2. Composición de los liposoma. EPC: fosfatidilcolina; EA: estearilamina; DDAB: bromuro de didecil dimetil amonio; ACZ: acetazolamida.

(*)→ se utilizarán 10 mL de Hepes junto con la ACZ y la HP β CD, después se usarán 3mL de esta solución como fase acuosa.

La función del Hepes a pH 7,4 radica en mantener los liposomas a un pH similar al del ojo y EDTA, agente quelante que interviene en mantener la estabilidad (Yáñez, 2010).

Una vez establecida la composición de la fase lipídica y la fase acuosa de los sistemas vesiculares, se procedió a la elaboración de los liposomas. Como han postulado diversos autores, el método de elección para elaborarlos depende fundamentalmente del tipo de sistema vesicular que sea necesario obtener (Glogard y cols., 2002). En nuestro caso, el estudio se iniciará con la elaboración de MLVs, los cuales, en una etapa posterior, serán extruidos para dar lugar a LUVs.

2.3.4 Elaboración de los liposomas

La elaboración de los liposomas se llevó a cabo utilizando la técnica de evaporación en capa fina, Bangham o TLE (*Thin Layer Evaporation*) con el fin de obtener una elevada eficacia de encapsulación del complejo [ACZ + HP β CD] así como adecuadas características físicas de las vesículas.

Aprovechando las características de solubilidad de los fosfolípidos en diferentes disolventes orgánicos (Lehninger, 2001), en primer lugar, se procedió a la formación de una película constituida por los materiales lipídicos. Para ello, en el interior de un matraz de fondo redondo, se pesó directamente la mezcla lipídica de fosfatidilcolina y colesterol, disolviéndolos en 4 mL de cloroformo.

Al contenido del matraz se le añadió el resto de los materiales (en los casos necesarios, estearilamina ó DDAB según lote), previamente disueltos en 3,2 mL de metanol.

A continuación, se procedió a la evaporación de los disolventes en un rotavapor (*Büchi Rotavapor R-210 con Büchi Heating Bath B-491*) a 58 °C, temperatura superior a la de transición de fase de la mezcla de los lípidos formadores, hasta crear una fina película lipídica. En esta fase, es importante considerar que el disolvente ha de eliminarse de forma homogénea en toda la superficie de la película, con el fin de evitar cristalizaciones de los componentes y la formación de burbujas.

Una vez formada la película lipídica, ésta se hidrató con 3 mL de una disolución preparada de Hepes con EDTA (1 mM) a la que se añadió el complejo [ACZ + HP β CD] (en los lotes que fue necesario). Dicha fase acuosa se atemperó durante 5 minutos antes de ser añadida a la película lipídica, con el fin de que ambas fases se encontrasen a la misma temperatura.

Seguidamente, la película hidratada se sometió a cinco ciclos de agitación en *vortex* durante un tiempo de un minuto cada ciclo, intercalados con cinco minutos en baño termostático a 58 °C hasta la obtención de un preparado de color blanco opalescente en el que se encontraban dispersos los liposomas. La dispersión coloidal así obtenida, una vez alcanzada la temperatura ambiente, se conservó en nevera a 4 °C.

2.3.5 Evaluación de la integridad de la membrana del liposoma: estudios de incubación

Este estudio se llevó a cabo tras mantener en incubación las formulaciones de liposomas. El procedimiento seguido puede resumirse del siguiente modo. Una vez obtenidos los liposomas, se tomó una alícuota de la formulación y se caracterizó desde el punto de vista fisicoquímico, para tener los datos a tiempo cero. Seguidamente, se separaron volúmenes de 1,2 mL de cada formulación, por duplicado, para proceder al ensayo, que consistió en añadir al primer grupo de muestras 1,2 mL de solución tampón Hepes, agitarlo y mantener en nevera a 4 °C. Alternativamente, al otro grupo de muestras se añadió 1,2 mL de una solución de tampón Hepes con HP β CD-ACZ.

Transcurridos cinco días de incubación, las diferentes muestras se caracterizaron en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas de tamaño vesicular, índice de polidispersión y carga superficial.

Este ensayo se llevó a cabo por triplicado.

2.3.6 Caracterización fisicoquímica de liposomas

En la Tabla 3 se recoge información sobre la totalidad de los lotes analizados en este estudio.

LOTE	EPC (mmol)	Colesterol (mmol)	EA (mmol)	DDAB (mmol)
1	0,1838			
2	0,0954	0,0812		
4	0,0954	0,0812	0,01484	
4	0,0954	0,0812	0,02968	
5	0,0954	0,0812	0,04453	
3	0,0954	0,0812		0,01484
7	0,0954	0,0812		0,02968
8	0,0954	0,0812		0,04453

Tabla 3. Composición de los lotes elaborados para el estudio de incubación.

Para realizar 1.2 mL de una solución de Hepes o en una solución de Hepes en presencia de HP β CD-ACZ (0,1M). Se siguió la metodología propuesta por Hatzi y cols. (Hatzi et al., 2007) con algunas modificaciones.

2.3.6.1. Análisis dimensional

En la estabilidad y el comportamiento físico de los liposomas adquiere gran importancia la distribución de los tamaños de los mismos. Como es bien conocido, el tamaño de las vesículas influye notablemente en la estabilidad de los sistemas. En general, se considera que a mayor tamaño, los liposomas son más estables.

Por otra parte, el índice de polidispersión (IP) es un parámetro que hace referencia a la homogeneidad/ heterogeneidad de la muestra analizada, con respecto a sus dimensiones. Representa una medida de la diferencia del tamaño que suele tener la mayoría de los liposomas analizados en función de su diámetro medio. En la práctica, cuanto mayor es el IP, mayor será la diferencia entre el tamaño medio de la población de liposomas analizada y, por tanto, más heterogéneas serán las vesículas. Así, un valor elevado de IP (0,8 - 1) es indicativo de una muestra heterogénea, mientras que un valor bajo de IP (< 0,2) indicará una elevada homogeneidad de las vesículas en cuanto a sus dimensiones.

La espectroscopía de correlación fotónica, también denominada *Dynamic Light Scattering*, permite calcular el índice de polidispersión de una muestra así como sus dimensiones, lo cual es indicativo de la distribución de tamaños en la misma.

El equipo utilizado para determinar ambos parámetros es el *Zetasizer Nano ZS* (Figura 7).



Figura 7. Imagen del equipo Zetasizer Nano ZS utilizado en el trabajo de investigación.

Este aparato mide la difusión de un haz de luz a través de un sistema disperso, que en nuestro caso, es la dispersión de los liposomas. Emite luz láser, que incide sobre la muestra, la cual es introducida en una cubeta de plástico y la intensidad de luz láser dispersada es detectada por un fotomultiplicador a un ángulo de 90° y dirigida a un correlador óptico digital que caracterizará la intensidad de la señal traduciéndola como tamaño de partícula (Puzi y cols., 1999; Foerter-Barth y Teipel, 2000). Esta técnica resulta muy útil para medir partículas de un diámetro entre 1 nm y $5 \mu\text{m}$ en muy poco tiempo.

El equipo, además, está unido a un ordenador con el programa DTS nano, que es el encargado de transcribir las señales y darles formato para realizar las lecturas y la obtención de los datos.

2.3.6.2. Carga superficial

La carga superficial de los liposomas crea un campo eléctrico que afecta a la estructura de la bicapa, a su fluidez y al transporte de moléculas a través de la membrana (Sabín, 2007). Además, esta carga juega un papel trascendental en la estabilidad coloidal de los liposomas, ya que los procesos de agregación y fusión de liposomas están controlados, en gran parte, por la repulsión o atracción de sus superficies lipídicas (Ramos y cols., 2010).

La aparición de una superficie cargada en los liposomas depende fundamentalmente de la composición fosfolipídica de la bicapa. Además, la agregación de liposomas es un

fenómeno natural e inevitable para membranas sin carga, y el camino para vencerla es la introducción de cargas en la mezcla de lípidos. La repulsión electrostática es suficiente para estabilizar liposomas *in vitro*. Las propiedades eléctricas de la superficie de los liposomas pueden tener gran influencia sobre la estabilidad física de la dispersión coloidal, durante su almacenamiento y en su posterior interacción con las células (Abad, 2012).

El potencial zeta (ζ) es una medida de la carga que rodea a las partículas en suspensión. La movilidad electroforética refleja el grado de movimiento de coloides en dispersión bajo la influencia de un potencial eléctrico aplicado a través de ella y expresa la carga neta efectiva sobre la superficie de las vesículas. Este parámetro resulta de especial interés en los preparados coloidales, ya que constituyen un importante indicador de la estabilidad física de la dispersión. Según la teoría DLVO, un sistema será estable en una solución electrolítica simple cuando las fuerzas de repulsión entre dos partículas sean mayores a sus fuerzas de atracción de Van der Waals.

Para determinar la carga superficial de los liposomas, se introdujeron 200 μ L de la dispersión liposomal, diluida con 3,8 mL de Hepes (dilución 1:20), en un equipo *Zetasizer Nano ZS*, donde se calculó el potencial zeta. Todos los cálculos se realizaron por triplicado, calculándose la media de todos los datos y determinándose este parámetro.

2.3.7 Determinación del porcentaje de encapsulación

Con objeto de evaluar el porcentaje de fármaco retenido en los liposomas, se eligió un método por centrifugación para separar la fracción de fármaco encapsulada de la no encapsulada, y posteriormente cuantificar el complejo [ACZ + HP β CD] por HPLC.

La elección del método se basó en estudios realizados acerca de la eficacia de encapsulación realizados por el grupo de investigación, que concluyeron que el método de extracción por centrifugación confiere mejores resultados que el método tradicional de extracción en fase sólida (González-Rodríguez y cols., 2016).

Este método consistió en centrifugar la dispersión de los liposomas (*Eppendorf Centrifuge 5804 R*) a una velocidad apropiada (8000 r.p.m), durante un tiempo determinado (60 minutos) y a una temperatura adecuada de 4 °C (Chimanuka y cols., 2002; Fang y cols., 2008; Abad, 2012).

Tras someter las muestras a estas condiciones, se separó el sobrenadante del precipitado y las dos fracciones se sometieron a distintos tratamientos previos a su cuantificación por HPLC:

1. El sobrenadante se filtró y se cuantificó directamente por HPLC, determinando así la cantidad de ACZ no encapsulada.
2. Al precipitado se le añadió 1 mL de una solución de lauril sulfato sódico (LSS) 0,5% p/v para facilitar la destrucción de las vesículas (Bhardwaj and Burgess, 2010), agitándose en *vortex* y sonicando la muestra durante 5 minutos. El proceso se repitió 3 veces y finalmente se filtró y se determinó la cantidad de fármaco encapsulado por HPLC.

Para cuantificar de forma exacta y precisa el fármaco, el método analítico de elección fue la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La identificación, se llevó a cabo por HPLC de fase reversa mediante un cromatógrafo (*Hitachi HPLC Elite Lachrom*) compuesto de bomba L-2130, inyector automático de muestras L-2200, detector DAD L-2455 y horno L-2350 (Figura 8).



Figura 8. Imagen del equipo HPLC utilizado en el laboratorio.

El equipo está conectado a un ordenador, con el programa EZChrom para almacenar los resultados.

El sistema cromatográfico utilizado se encuentra constituido por un cartucho (*Merck, RP-18 LichroCART*®) de 125 mm de longitud y 4 mm de diámetro, relleno de partículas de silicagel enlazadas con partículas de octadecilsilano de 5 µm de diámetro.

La cuantificación de ACZ se llevó a cabo a una longitud de onda de 265 nm. Con estas condiciones se asegura una adecuada separación entre los picos de la molécula activa y las distintas interferencias que pudieran aparecer en las muestras. Una vez ajustada la técnica cromatográfica, se determinó la linealidad del método y su límite de cuantificación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se aprecia en la Figura 8, el diagrama de solubilidad de fase en tampón Hepes de ACZ en presencia de diferentes concentraciones de HP β CD, se corresponde con una representación tipo A_L , obteniéndose la siguiente ecuación de regresión (r^2 : 0.9942):

$$[ACZ]_{Hepes} = 0,1552 \cdot [HP\beta CD] + 0,0034$$

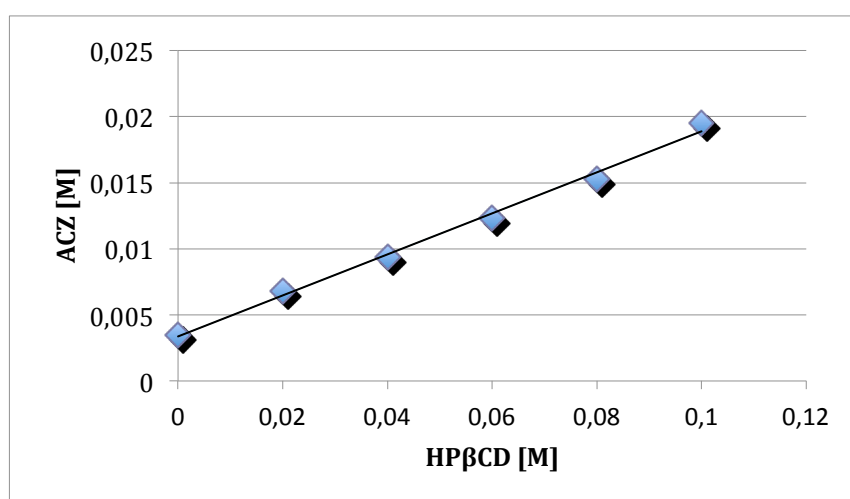


Figura 8. Curva de solubilidad de fase de ACZ en HP β CD.

En la Tabla 5 se recopila la información correspondiente al estudio de los complejos elaborados.

Sistema	Pendiente	S_0 (mM)	$K_{1:1}$ (M^{-1})	EC	ES1	ES2
ACZ-HP β CD	0,1552	3,49	52,64	0,18371	5,5983	5,5983
ACZ-HP β CD + colesterol	0,0988	2,55	42,99	0,10963	4,8060	3,5115
ACZ-HP β CD + CHEMS	0,1952	5,11	33,24	0,16986	3,8199	5,5929

Tabla 5. Características del proceso de complejación HP β CD-ACZ.

La constante de solubilidad de ACZ en la solución acuosa de la ciclodextrina, a temperatura ambiente fue de $52,64 \text{ M}^{-1}$, en concordancia con lo obtenido por otros autores (Pérez-Barrales y cols., 1995; Loftsson y cols., 2005).

A partir de los datos recopilados en la Tabla 4, se desprende que la presencia de HP β CD a 0,1 M, prácticamente quintuplica la solubilidad de ACZ en una solución acuosa tamponada.

3.2 INTEGRIDAD DE LOS LIPOSOMAS: ESTUDIOS DE INCUBACIÓN

Con este ensayo, lo que se pretendió fue monitorizar los cambios sufridos en las membranas de las vesículas cuando éstas fueron sometidas a un período de incubación en presencia del complejo ACZ-HP β CD (solución del complejo en Hepes), tomando como control las formulaciones antes de incubarse y como control negativo una solución de Hepes. Los resultados del estudio se recogen en la Tabla 4.

Un efecto común observado en todos los lotes ensayados fue la reducción en las dimensiones de las vesículas tras el período de incubación, como consecuencia del adecuado empaquetamiento de los componentes de la bicapa durante los cinco días del almacenamiento. Este fenómeno ha sido demostrado por numerosos autores (Lindblom y Oradd, 2009).

Lote	Composición lipídica	Medio de incubación	Diámetro (nm) (\pm DE) [IP]	Potencial zeta (mV)
1	EPC	-	1017 (\pm 62,07) [0,181]	-12,3 (\pm 0,72)
		Hepes	826,87 (\pm 55,86) [0,23]	-17,17 (\pm 3,20)
		Hepes + ACZ-HP β CD	724,27 (\pm 34,76) [0,18]	-8,71 (\pm 0,51)
2	EPC + Colesterol	-	973,6 (\pm 23,03) [0,406]	-15,0 (\pm 0,70)
		Hepes	806,70 (\pm 43,31) [0,37]	-13,13 (\pm 0,49)
		Hepes + ACZ-HP β CD	641,53 (\pm 53,08) [0,23]	-14,60 (\pm 0,98)
3	EPC + Colesterol + DDAB	-	1125 (\pm 26,29) [0,302]	+38,3 (\pm 2,71)
		Hepes	904,63 (\pm 32,51) [0,21]	+43,30 (\pm 0,92)
		Hepes + ACZ-HP β CD	792,4 (\pm 99,82) [0,13]	+46,27 (\pm 0,98)
4	EPC + Colesterol + EA	-	1577 (\pm 95,22) [0,409]	+12,8 (\pm 0,82)
		Hepes	1248,67 (\pm 24,54) [0,21]	+13,50 (\pm 0,95)
		Hepes + ACZ-HP β CD	1107,33 (\pm 96,91) [0,11]	-11,18 (\pm 1,68)

Tabla 3. Estudio de incubación de los lotes en distintos medios.

Igualmente, esta reducción en el tamaño vesicular se constató en aquellos lotes incubados en presencia del complejo de inclusión comparados con los incubados en solución Hepes, llegando a reducir las dimensiones en un 10 – 15 %.

Analizando los valores obtenidos del potencial zeta, no se aprecian diferencias significativas, salvo en el **Lote 4**, en el cual se obtuvo una inversión del signo correspondiente a la carga superficial de las vesículas cuando éstas fueron incubadas en presencia del complejo de inclusión. Una hipótesis que se planteó, y que estuvo apoyada por referentes bibliográficos, fue que el complejo fuera capaz de extraer la EA de la bicapa por interacción con ella, devolviéndola a la formulación la carga negativa original. La reacción de complejación ocurre con la contribución de uniones electrostáticas, de Van de Waals, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. La estearilamina es una amina alifática que es insoluble en agua debido a su larga cadena hidrofóbica (Figura 9). Sin embargo, sus características de solubilidad se han visto incrementadas tras su inclusión con β -CD, formando complejos estables mediante un efecto inductor de la polaridad de la CD tras la formación de puentes de hidrógeno (Fan y cols., 2014).

Otros trabajos pusieron de manifiesto la interacción producida entre aminas primarias, como estearilamina con α y γ -ciclodextrinas. En este caso, el grupo $-NH_2$ podría ubicarse en el extremo de la ciclodextrina, con la cadena alquílica en la región apolar y de escasa densidad electrónica de la cavidad (Jara y cols., 2004). Dado que la γ -ciclodextrina posee propiedades de solubilidad parecidas a la HP β CD, es posible que se presente el mismo comportamiento sobre la amina. No obstante, este efecto será dilucidado en próximos estudios.

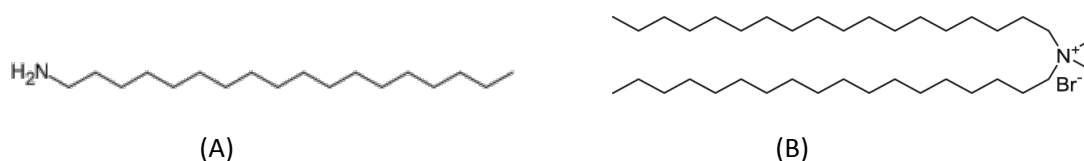


Figura 9. Estructura química de A) Estearilamina. B) DDAB

3.3. INFLUENCIA DEL AGENTE DE CARGA EN LA INTEGRIDAD DE LOS LIPOSOMAS

Una vez analizado el efecto de la HP β CD sobre la estructura externa de la bicapa, cargada positivamente, y particularmente sobre la EA y no sobre el DDAB, que también ofrece carga positiva a la bicapa, se decidió realizar un estudio con estos dos compuestos e incrementando su concentración en la bicapa. En este caso, el complejo

de inclusión se incorpora en la etapa correspondiente durante el proceso de elaboración de los liposomas. Este momento es en la fase de hidratación de la película lipídica con la solución reguladora de Hepes, en la cual se encuentra disuelto el complejo.

La Tabla 4 muestra los resultados de caracterización de estas formulaciones, junto con lotes elaborados sin el fármaco, como control.

Lote	Diámetro medio (\pm DE) [IP]	Potencial zeta (mV)	PDE (%)
4 _B	2003,33 (\pm 462,92) [1,00]	5,14 (\pm 1,13)	
4	1010,30 (\pm 95,71) [1,00]	11,23 (\pm 0,25)	46,98 (\pm 3,12)
5 _B	1310,00 (\pm 180,58) [0,49]	18,83 (\pm 0,98)	
5	1055,07 (\pm 82,34) [1,00]	19,50 (\pm 0,04)	25,45 (\pm 3,18)
6 _B	1210,00 (\pm 138,69) [0,72]	20,67 (\pm 0,57)	
6	1700,34 (\pm 105,41) [1,00]	31,27 (\pm 0,12)	35,76 (\pm 3,24)
3 _B	858,33 (\pm 126,13) [0,62]	9,80 (\pm 0,79)	
3	3398,33 (\pm 647,26) [0,30]	6,87 (\pm 0,75)	24,99 (\pm 2,98)
8 _B	764,0 (\pm 103,85) [0,96]	14,93 (\pm 0,31)	
8	1557,33 (\pm 208,70) [0,46]	17,13 (\pm 0,12)	38,68 (\pm 4,03)
9 _B	933,33 (\pm 91,96) [0,21]	21,37 (\pm 1,33)	
9	1333,67 (\pm 125,51) [1,00]	21,60 (\pm 1,13)	41,65 (\pm 4,05)

Tabla 4. Datos de caracterización de los lotes elaborados con diferentes concentraciones de SA y DDAB. El subíndice B indica lote blanco.

Analizando la carga superficial, se obtiene, como cabría esperar, una relación lineal del parámetro potencial zeta con el incremento de la concentración empleada (Villasmil-Sánchez y cols., 2010).

Respecto a los parámetros que definen la distribución de los tamaños, se obtiene una relación inversa en los lotes elaborados con DDAB, de forma que a medida que aumenta la concentración de DDAB, disminuye el diámetro medio, algo que no ocurre de forma tan patente en presencia de EA. Estos valores se sustentan también con los datos de IP, los cuales son menores en el caso de DDAB, lo cual es indicativo de la obtención de poblaciones de vesículas más homogéneas.

Además, comparando los resultados obtenidos con las formulaciones sin fármaco, se extrajeron las siguientes consideraciones.

- **DDAB:** incremento del diámetro medio en las formulaciones que contenían HP β CD-ACZ. No se apreciaron alteraciones significativas en los valores de potencial zeta ni del IP, lo cual demostraba que se trataba de formulaciones estables.
- **EA:** disminución del diámetro medio en las formulaciones cargadas con HP β CD-ACZ. En cuanto al potencial zeta, la tendencia fue aumentar la carga superficial en aquellas vesículas que contenían el fármaco, como consecuencia de una posible redistribución de los componentes de la bicapa. En cuanto al IP presentaron un valor de 1, indicativo de una elevada heterogeneidad de las muestras.

Según estos resultados, y como confirman otros autores (Manosroi y cols., 2011; Saengkrit y cols., 2014), el DDAB da lugar a bicapas más estables cuando se incorpora el complejo de inclusión en la formulación. El incremento del tamaño vesicular en las formulaciones cargadas coincide con el incremento de complejo atrapado en el compartimento acuoso, lo que ocasiona un mayor volumen ocupado en el interior del liposoma (lotes 3, 7 y 8).

En cambio, cuando se incorpora EA en las bicapas, existen diversos acontecimientos que apuntan a una posible interacción con la ciclodextrina. En primer lugar, la evolución de los tamaños respecto a los lotes blancos. Esta disminución de los tamaños con el complejo incluido en el interior (eficacias de encapsulación de 46,98, 25,45 y 35,76 % para los lotes 4, 5 y 6 respectivamente), hace pensar en una posible interacción producida durante el proceso de hidratación de la película lipídica. Sin embargo, dado que los valores del potencial zeta en todas las formulaciones se mantuvieron con valores positivos, y que el estado de la EA durante el proceso de hidratación se encontraba en un cambio de transición de fases (punto de fusión: 52,9 °C), se puede intuir que otros componentes de la bicapa están afectando a la integridad de la misma.

Es por ello que se decidió realizar un estudio sobre un componente común en las formulaciones, y del que existe en la bibliografía constancia de su interacción con determinadas ciclodextrinas: el colesterol.

3.4 INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE COLESTEROL EN LA INTEGRIDAD DE LOS LIPOSOMAS

Teniendo en cuenta que en la bibliografía aparece recogida la posibilidad de que el colesterol sufra un proceso de complejación en la cavidad de determinadas CDs, y que este proceso pudiera afectar a la solubilización de la ACZ, se planteó la necesidad de evaluar esta posible interacción (Williams y cols., 1998; López y cols., 2011).

Se decidió realizar los ensayos de solubilidad de ACZ y HP β CD en presencia de colesterol comparándolos con los resultados obtenidos en ausencia del mismo. En la Figura 10 se recogen los resultados obtenidos. Se aprecia que la presencia de colesterol, aunque no modifica el tipo de diagrama, sí disminuye tanto la constante de complejación ACZ-HPBCD ($42,99 \text{ M}^{-1}$) como la S_0 del fármaco (2,55 mM).

Esto se puede interpretar como que la presencia de colesterol, molécula de naturaleza hidrofóbica, compite con el fármaco por ocupar la cavidad de la CD. Situaciones similares de compuestos ternarios han sido descritas en la bibliografía (Wang y cols., 2013).

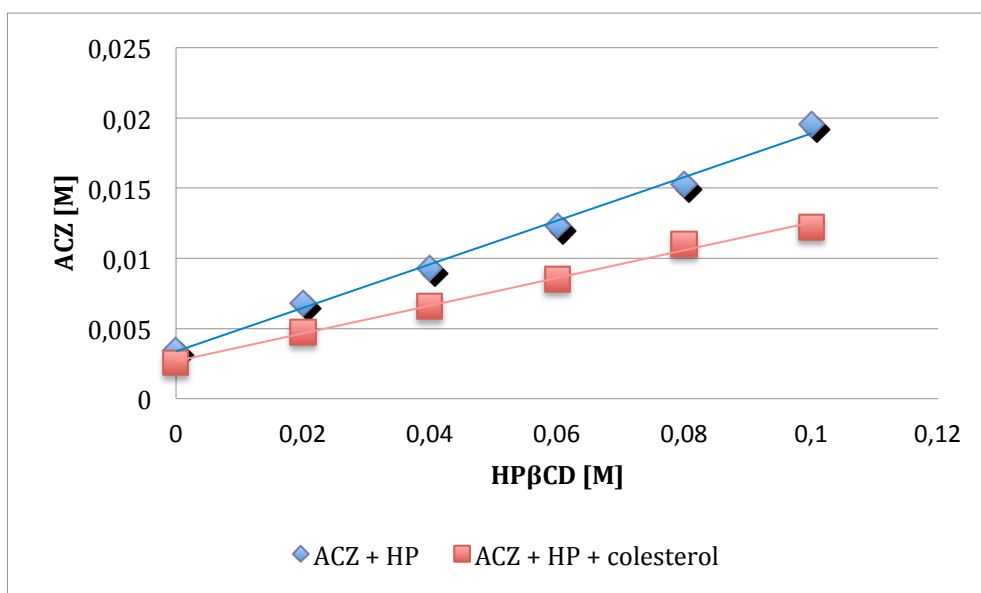


Figura 10. Diagrama de solubilidad del ensayo ACZ-HP y ACZ-HP + colesterol.

Los resultados anteriores nos plantearon la necesidad de buscar un derivado alternativo al colesterol que no ejerciera este efecto competitivo y que fuera compatible con la

formulación de nuestros liposomas. Para ello, se seleccionó el derivado colesterol hemisuccinato (CHEMS), que en base a su mayor polaridad, debería presentar menor tendencia a ser complejado. Además, no existen referencias en la literatura acerca de la existencia de interacción con ciclodextrinas.

Los resultados (Figura 11) mostraron que el uso de este derivado no dificultaba el proceso de complejación del fármaco, sino todo lo contrario, incluso ejercía un efecto solubilizante sobre la ACZ, como se observa en los datos de S_0 obtenidos.

Una vez puesto de manifiesto este aspecto, en un futuro habrá que poner de manifiesto que el uso de este derivado no afecte a la integridad de los liposomas formulados.

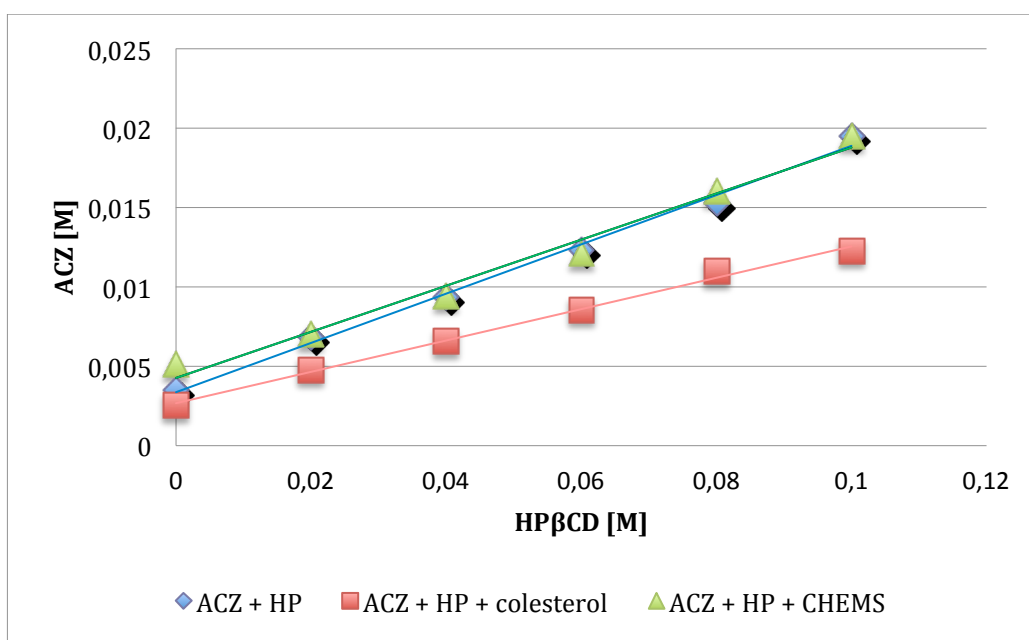


Figura 11. Diagrama de solubilidad del ensayo ACZ-HP y ACZ-HP + CHEMS

3.5. DISCUSIÓN

Una vez obtenidos los resultados del estudio, se procederá a la discusión de los mismos, intentando justificarlos dividiendo la sección en: efecto del complejo de inclusión en la superficie de liposomas ya elaborados y efecto del complejo de inclusión durante el proceso de elaboración.

Respecto al análisis desde la superficie de la vesícula, el efecto de la presencia de carga positiva en la superficie de los liposomas, aportada por EA o DDAB, sobre la integridad de los liposomas en presencia de HPβCD-ACZ ha sido diferente, de forma que podría

producirse una reacción de desplazamiento de la ACZ del complejo, a favor de la complejación de EA. Este efecto no ocurriría con el DDAB. Las diferencias de las características fisicoquímicas entre ambos agentes, tanto en peso molecular, como estructural y de solubilidad, podrían contribuir a dicho efecto.

Cuando se analizó el comportamiento del complejo cuando éste se incorporó durante la elaboración de las vesículas, se apreció un importante efecto estabilizador del DDAB en las bicapas, a diferencia de la EA. Este efecto ha sido demostrado por algunos investigadores (Angelini y cols., 2011). La disposición de la estructura de la EA en la bicapa, así como su estado líquido y fluido a la temperatura de elaboración de los liposomas, hacen que no exista la afinidad por la CD encontrada en la superficie del liposoma.

Por tanto, y en base a los datos de solubilidad de fase de ACZ en presencia de colesterol, se puede deducir que existe una interacción entre la ciclodextrina y el lípido, de manera que se produce un desplazamiento de la ACZ complejada. Cuando esto tiene lugar, las formulaciones que contienen EA, debido a la naturaleza lipófila de esta sustancia, la ACZ precipita, desestabiliza al liposoma y se obtienen valores de IP de 1. En cambio, los lotes formulados con DDAB, debido al carácter tensioactivo de esta molécula, puede ejercer propiedades solubilizantes sobre ACZ, que contribuye a la permanencia del fármaco en el interior de las vesículas. Ello queda reflejado en valores inferiores de IP.

Esta interpretación justificaría así los valores obtenidos de fármaco encapsulado en las distintas formulaciones, de manera que en el caso del DDAB, se obtiene una relación ascendente a medida que se incrementa la concentración de este tensioactivo, mientras que las formulaciones con EA, no siguen una relación concreta.

Una vez llegados a este punto, se decidió elaborar un nuevo lote con mayor cantidad de DDAB (27,5 mg), para corroborar que el DDAB mejora las propiedades de los liposomas como parece en principio, con el objetivo de respaldar definitivamente esta hipótesis. Los resultados obtenidos (diámetro medio: 552,47 nm; IP: 0,25; potencial zeta: 21,00 mV; eficacia de encapsulación: 51,10%) confirman los beneficios de emplear este agente de carga para sucesivos estudios de formulación con HP β CD.

4. CONCLUSIONES

En vista de los resultados obtenidos, podemos afirmar que la adición de la HPBCD en la formulación de liposomas de colesterol no ha resultado beneficiosa, puesto que la ciclodextrina tiene afinidad por el colesterol, lo que provoca la desestructuración de la membrana, y la disminución de la solubilización del fármaco por parte de la ciclodextrina.

Este hecho hace que la formulación de una solución oftálmica de liposomas de colesterol para la administración de acetazolamida no sea viable, pero, dejamos la puerta abierta a la posibilidad de que la investigación continúe, puesto que también hemos demostrado como el hemisuccinato de colesterol no presenta estas interacciones y podría utilizarse como base para futuros experimentos.

También destacar el papel estabilizante que ha tenido el DDAB en la formulación, puesto que ha favorecido tanto la estabilidad de las vesículas, como la solubilización del complejo dentro del liposoma, además de mantener la carga positiva de la membrana lipídica, de tal manera que aumenta mucho las posibilidades de obtener una buena biodisponibilidad y absorción, vía tópica ocular.

5. PERSPECTIVAS DE FUTURO

1. Estudiar las posibles propiedades estabilizadoras del DDAB en la fórmula, puesto que al ser un tensioactivo, puede presentar interesantes propiedades para la formulación de fármacos poco solubles en agua incorporados en liposomas como complejos de inclusión.
2. Analizar el efecto de EA, a diferentes temperaturas (por encima y por debajo de su punto de fusión) sobre las características de complejación con HP β CD.
3. Sustituir en la formulación de liposomas el colesterol por su derivado hemisuccinato, puesto que ya hemos visto que su interferencia con la HP β CD es mínima, gracias a los estudios realizados.
4. Corroborar que los parámetros fundamentales de los liposomas (tamaño, IP y potencial Z) son estables y se mantienen constantes tras el desarrollo de la fórmula optimizada.

5. Incorporar timolol maleato en la formulación, analizar el efecto de su presencia en la bicapa sobre la estabilidad de la misma, con el fin de proceder a realizar el estudio in vivo de la actividad antiglaucomatosa.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad N. Liposomas ultradeformables de acetazolamida para su administración oftálmica: diseño y estudios de caracterización. Trabajo Fin de Máster, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla (2012).
- Acosta J, Figuera M. Conocimiento del glaucoma en estudiantes de medicina de la Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Escuela de Ciencias de la Salud, Departamento de cirugía, Barcelona (2009).
- Agencia Española del Medicamento 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>.
- Angelini G, Chiarini M, De Maria P, Fontana A, Gasbarri C, Siani G and Velluto D (2011). Characterization of cationic liposomes. Influence of the bilayer composition on the kinetics of the liposome breakdown. *Chem Phys Lipids* **164**:680-687.
- Ball, E. Liposomas en Dermatología. *Dermatología Venezolana*, 33: 15-23 (1995).
- Bangham AD, Standish MM and Watkins JC (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* **13**:238-252.
- Becker B (1954) Decrease in intraocular pressure in man by a carbonic anhydrase inhibitor, diamox; a preliminary report. *Am J Ophthalmol* **37**:13-15.
- Benítez-Collante C, Benítez-Collante LM, Arigossi CR, Benítez-Collante AE (2005). Tratamiento médico del glaucoma crónico simple: Revisión. *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina* **141**: 1-3.
- Bhardwaj U, Burgess DJ (2010) Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. *Int J Pharm* **388**:181-189.
- Blanco-Méndez J, Vila-Jato JL, Otero-Espinar FJ y Anguiano-Igea S (1991). Influence of method of preparation on inclusion complexes of naproxen with different cyclodextrins. *Drug Dev Ind Pharm* **17**: 943-957.
- Cavalcanti IM, Mendonca EA, Lira MC, Honrato SB, Camara CA, Amorim RV, Mendes Filho J, Rabello MM, Hernandez MZ, Ayala AP and Santos-Magalhaes NS (2011). The encapsulation of beta-lapachone in 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex into liposomes: a physicochemical evaluation and molecular modeling approach. *Eur J Pharm Sci* **44**:332-340.
- Chimanuka B, Gabriels M, Detaevernier MR and Plaizier-Vercammen JA (2002) Preparation of beta-artemether liposomes, their HPLC-UV evaluation and relevance for clearing recrudescent parasitaemia in Plasmodium chabaudi malaria-infected mice. *J Pharm Biomed Anal* **28**:13-22.

- Clares, B. Sistemas de transporte y liberación de fármacos de aplicación tópica: liposomas multilaminares portadores de acetónido de triamcinolona. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada (2003)
- Cortesi R, Argnani R, Esposito E, Dalpiaz A, Scatturin A, Bortolotti F, Lufino M, Guerrini R, Cavicchioni G, Incorvaia C, Menegatti E and Manservigi R (2006) Cationic liposomes as potential carriers for ocular administration of peptides with anti-herpetic activity. *Int J Pharm* **317**:90-100.
- Drugbank Database. Open Data Drug & Drug Target Database: Acetazolamide. 2013. [En línea]. [Consultado en Mayo 2016]. Disponible en <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00819>
- Fang JY, Hong CT, Chiu WT and Wang YY (2001) Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin. *Int J Pharm* **219**:61-72.
- Fang YP, Tsai YH, Wu PC and Huang YB (2008) Comparison of 5-aminolevulinic acid-encapsulated liposome versus ethosome for skin delivery for photodynamic therapy. *Int J Pharm* **356**:144-152.
- Foerter-Barth U, Teipel U (2000). Characterization of particles by means of laser light diffraction and dynamic light scattering. Developments in mineral processing, *Proceedings of the XXI International Mineral Processing Congress*, p. 13.
- Glogard C, Stensrud G, Hovland R, Fossheim SL and Klaveness J (2002) Liposomes as carriers of amphiphilic gadolinium chelates: the effect of membrane composition on incorporation efficacy and in vitro relaxivity. *Int J Pharm* **233**:131-140.
- Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica, 11 ed. Mc Graw Hill, Mexico, pp. 1707-1724 (2006).
- González-Rodríguez ML, Barros LB, Palma J, González-R P, Rabasco AM (2007). Application of statistical experimental design to study the formulation variables influencing the coating process of lidocaine liposomes. *Int J Pharm* **337**:336-345
- González-Rodríguez ML, Arroyo CM, Cózar-Bernal MJ, González-R P, León JM, Calle M, Canca D and Rabasco AM (2016) Deformability properties of timolol-loaded transfersomes based on the extrusion mechanism. Statistical optimization of the process. *Drug Dev Ind Pharm*:1-12.
- González-Rodríguez ML, Rabasco AM (2011) Charged liposomes as carriers to enhance the permeation through the skin. *Expert Opin Drug Deliv* **8**:857-871.
- Granero GE, Maitre MM, Garnero C and Longhi MR (2008) Synthesis, characterization and in vitro release studies of a new acetazolamide-HP-beta-CD-TEA inclusion complex. *Eur J Med Chem* **43**:464-470.
- Hathout RM, Mansour S, Mortada ND and Guinedi AS (2007) Liposomes as an ocular delivery system for acetazolamide: in vitro and in vivo studies. *AAPS PharmSciTech* **8**:1.
- Hatzi P, Mourtas S, Klepetsanis PG and Antimisiaris SG (2007) Integrity of liposomes in presence of cyclodextrins: effect of liposome type and lipid composition. *Int J Pharm* **333**:167-176.
- Higuchi T, Connors KA 1965. Phase-solubility techniques. *Adv Anal Chem Instr* **4**: 117-212.

- Instituto Químico Biológico. Diccionario ilustrado de términos médicos: Acetazolamida. 2014 [En línea]. [Consultado en Abril 2016]. Disponible en <http://www.iqb.es/diccio/a/ac1.htm>
- Irie T, Fukunaga K, Yoshida A, Uekama K, Fales HM and Pitha J (1988) Amorphous water-soluble cyclodextrin derivatives: 2-hydroxyethyl, 3-hydroxypropyl, 2-hydroxyisobutyl, and carboxamidomethyl derivatives of beta-cyclodextrin. *Pharm Res* **5**:713-717.
- Jain SK, Jain RK, Chourasia MK, Jain AK, Chalasani KB, Soni V, Jain A (2005) Design and development of multivesicular liposomal depot delivery system for controlled systemic delivery of acyclovir sodium. *AAPS PharmSciTech* **6**:E35-41.
- Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M (2002) Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. *Int J Pharm* **248**:1-14.
- Kurkov SV, Loftsson T (2013) Cyclodextrins. *Int J Pharm* **453**:167-180.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox ML (2001) Principios de Bioquímica (2ª y 3ª edición), Ediciones Omega, New York.
- Lindblom G, Oradd G (2009) Lipid lateral diffusion and membrane heterogeneity. *Biochim Biophys Acta* **1788**:234-244.
- Lindner K, Saenger W (1980) Crystal structure of the gamma-cyclodextrin n-propanol inclusion complex; correlation of alpha-, beta-, gamma- cyclodextrin geometries. *Biochem Biophys Res Commun* **92**:933-938.
- Loftsson T, Hreinsdottir D and Masson M (2005) Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int J Pharm* **302**:18-28.
- Loftsson T, Jarvinen T (1999) Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **36**:59-79.
- López CA, de Vries AH, Marrink SJ (2011) Molecular mechanism of cyclodextrin mediated cholesterol extraction. *PLoS Comput Biol*. **7**: e1002020. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002020
- López-Pinto JM. Diseño, elaboración y caracterización de sistemas vesiculares de minoxidilo para su administración tópica. Optimización y estudio de permeabilidad *in vitro*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla (2004).
- Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Mura P (2005) Preparation and characterisation of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery. *Int J Pharm* **298**:55-67.
- Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Mura P (2006) Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. *Int J Pharm* **312**:53-60.
- Maestrelli F, Capasso G, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Ghelardini C, Mura P (2009). Effect of preparation technique on the properties and in vivo efficacy of benzocaine-loaded ethosomes. *J Liposome Res* **19**:253-260.
- Manosroi A, Khositsuntiwong N, Komno C, Manosroi W, Werner RG, Manosoi J (2011). Chemical stability and cytotoxicity of human insulin loaded in cationic DPPC/CTA/DDAB liposomes. *J Biomed Nanotechnol* **7**:308-316.
- Maren TH, Jankowska L, Sanyal G, Edelhauser HF (1983) The transcorneal permeability of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors and their effect on aqueous humor secretion. *Exp Eye Res* **36**:457-479.

- Martín del Valle EM (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem* **39**:1033-1046.
- Mishra GP, Bagui M, Tamboli V, Mitra AK (2011) Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *J Drug Deliv* **2011**:863734.
- Mishra V, Jain NK (2014) Acetazolamide encapsulated dendritic nano-architectures for effective glaucoma management in rabbits. *Int J Pharm* **461**:380-390.
- Moyano JR, Ginés JM, Arias MJ, Rabasco AM (1994). Utilidad de ciclodextrinas y derivados en el campo farmacéutico (I). *Industria Farmacéutica, Investigación y Tecnología* **9**(5): 71-76.
- Moribe K, Maruyama K, Iwatsuru M (1999) Encapsulation characteristics of nystatin in liposomes: effects of cholesterol and polyethylene glycol derivatives. *Int J Pharm* **188**:193-202.
- Muller LK, Landfester K (2015) Natural liposomes and synthetic polymeric structures for biomedical applications. *Biochem Biophys Res Commun* **468**:411-418.
- Parasrampur J, Gupta VD (1989) Preformulation studies of acetazolamide: effect of pH, two buffer species, ionic strength, and temperature on its stability. *J Pharm Sci* **78**:855-857.
- Pérez-Barrales MJ, Díaz-Estévez F, Ginés JM, Moyano JR, Arias MJ, Rabasco AM (1995). Inclusion compound of acetazolamide with different cyclodextrins in liquid and solid state. Proceedings 7th International Conference on Pharmaceutical Technology. Budapest, pp. 613-614.
- Pitha J, Pitha J (1985) Amorphous water-soluble derivatives of cyclodextrins: nontoxic dissolution enhancing excipients. *J Pharm Sci* **74**:987-990.
- Porth CM (2007) Fisiopatología, salud-enfermedad: un enfoque conceptual. 7^a edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, pp 1295-1329.
- Puzi A, Matynia T, Gawdzik B, Poddubnaya O (1999). Use of CONTIN for calculation of adsorption energy distribution. *Langmuir* **15**: 6016-6025.
- Rabinovich-Guilatt L, Couvreur P, Lambert G, Dubernet C (2004) Cationic vectors in ocular drug delivery. *J Drug Targeting* **12**:623-633.
- Ramos G, Ramírez-Amador S, Esquivel M, Loría A, Vega-Baudrit J, Sibaja M, Madrigal-Carballo S (2010). Estudio a nanoescala de las interacciones entre liposomas recubiertos con biopolímeros y superficies sólidas de biomateriales. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **11**(7):596-606.
- Reilly W. Productos farmacéuticos de primera necesidad. En: (Genaro, A. Ed.) Remington Farmacia. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, p. 2139 (1999).
- Sabín JD. Estabilidad coloidal de nanoestructuras liposómicas. Tesis doctoral en Física (2007).
- Saengkrit N, Saesoo S, Srinuanchai W, Phunpee S, Rungsardthong U (2014). Influence of curcumin-loaded cationic liposome on anticancer activity for cervical cancer therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces* **114**:349-356.
- Sonali, RP, Singh N, Sharma G, Vijayakumar MR, Koch B, Singh S, Singh U, Dash D, Pandey BL, Muthu MS (2016) Transferrin liposomes of docetaxel for brain-targeted cancer applications: formulation and brain theranostics. *Drug Deliv* **23**:1261-1271.
- Soriano L. Estudio *in vitro* de la funcionalidad de formulaciones liposomales de acetato de medroxiprogesterona para la terapia tópica ocular. Trabajo fin de

- máster, instituto universitario de oftalmología aplicada Universidad de Valladolid, pp 11-18 (2012).
- Szejtli J (1998) Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem Rev* **98**:1743-1754.
- Tártara I, Jiménez A, Allemanni DA, Palma SD 2008. Uso Racional de Tecnologías Sanitarias: Tratamiento del Glaucoma. *Lat Am J Pharm* **27**(2):297-302.
- Vademecum. Madrid, España. [En línea]. [Consultado en Abril 2016]. Disponible en http://www.vademecum.es/medicamentos-a_1.
- Varca GH, Andreo-Filho N, Lopes PS and Ferraz HG (2010) Cyclodextrins: an overview of the complexation of pharmaceutical proteins. *Curr Protein Pept Sci* **11**:255-263.
- Villasmil S. Desarrollo de formulaciones de liposomas en micropartículas (LEMs) conteniendo succinato de sumatriptán para su administración tópica. Tesis doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla (2010).
- Villasmil-Sánchez S, Drhimeur W, Ospino SC, Rabasco AM, González-Rodríguez ML (2010) Positively and negatively charged liposomes as carriers for transdermal delivery of sumatriptan: in vitro characterization. *Drug Dev Ind Pharm* **36**:666-675.
- Wang D, Li H, Gu J, Guo T, Yang S, Guo Z, Zhang X, Zhu W, Zhang J (2013). Ternary system of dihydroartemisinin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and lecithin: Simultaneous enhancement of drug solubility and stability in aqueous solutions. *J Pharm Biomed Anal* **83**: 141–148.
- Williams RO, Mahaguna V, Sriwongjanya M (1998). Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm* **46**:355-360.
- Yáñez F. Lentes de contacto y sistemas trampa sintetizados por moldeado molecular para captura selectiva y liberación controlada de moléculas activas. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Santiago de Compostela (2010).