



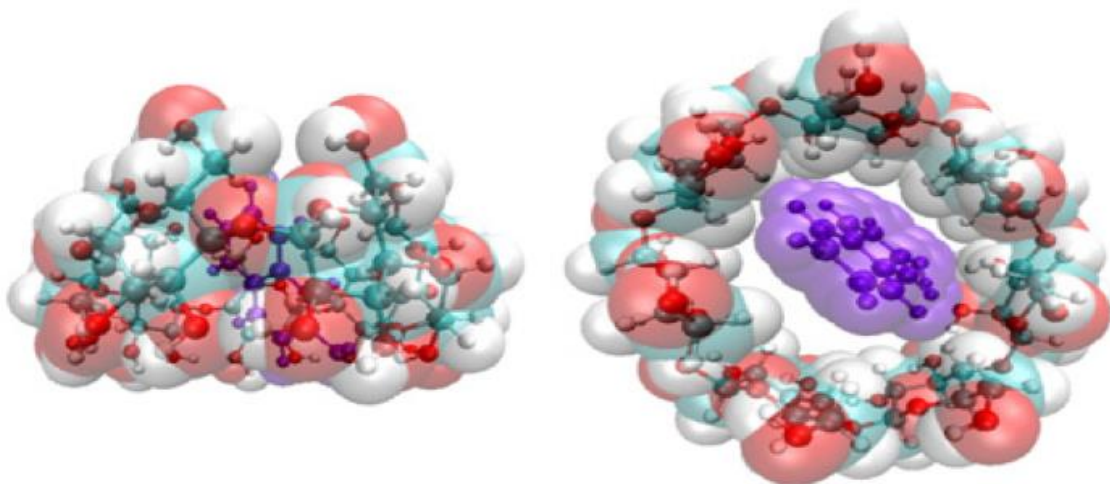
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA



DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

# INFLUENCIA DE DIFERENTES ANTIOXIDANTES EN EL EQUILIBRIO DE COMPLEJACIÓN ACZ-HP- $\beta$ -CD: APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN OFTÁLMICA



GERMÁN DOMÍNGUEZ BERRAQUERO



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

**INFLUENCIA DE DIFERENTES ANTIOXIDANTES EN EL EQUILIBRIO DE COMPLEJACIÓN  
ACZ-HP- $\beta$ -CD: APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN OFTÁLMICA**

**GERMÁN DOMÍNGUEZ BERRAQUERO**

Lugar de presentación: Aula 0.4

Fecha de presentación: 6 de Julio de 2016

**DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA**

TUTOR: JUAN MANUEL GINÉS DORADO

TIPOLOGÍA DEL PROYECTO: EXPERIMENTAL

## RESUMEN

La acetazolamida (ACZ), es un inhibidor de la anhidrasa carbónica utilizado en terapéutica contra el glaucoma del cual no existen formas líquidas de administración ocular en el mercado, al tratarse de un fármaco poco soluble. El desarrollo de una formulación oftálmica para este fármaco implicaría por tanto la mejora de la solubilidad acuosa de la ACZ, situación que se ha logrado de forma exitosa con su complejación con ciclodextrinas (CDs), y más en concreto, con la hidroxipropilbetaciclodextrina (HP- $\beta$ -CD). El desarrollo de una forma farmacéutica de administración ocular, salvo que sea administrada en forma de unidosis, requiere el uso de otros aditivos, entre los que destacan el uso de antioxidantes. Hay que señalar que dichas sustancias al encontrarse también en solución pueden ejercer influencia sobre la solubilidad del fármaco, ya sea de una forma directa o bien presentar afinidad por la cavidad de la CD, por lo que podrían desplazarlo. El propósito del presente trabajo de investigación es evaluar la influencia que el uso de antioxidantes habituales en formas oftálmicas (ácido ascórbico, ácido cítrico, metabisulfito sódico y EDTA) puede ejercer sobre el equilibrio de complejación de ACZ-HP- $\beta$ -CD, y por tanto sobre la solubilidad acuosa del fármaco. Para ello, se realizaron ensayos de solubilidad de ACZ en agua, empleando concentraciones crecientes de HP- $\beta$ -CD y una concentración fija de antioxidante. Los resultados se evaluaron mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). A partir de los datos obtenidos construimos los correspondientes diagramas de solubilidad, determinando la constante de complejación ACZ-HP- $\beta$ -CD en presencia y ausencia del antioxidante. Los resultados obtenidos mostraron que la presencia de estos aditivos, al menos a las concentraciones ensayadas no modifica de forma significativa el equilibrio de complejación fármaco-CD.

Palabras clave: acetazolamida, antioxidantes, ciclodextrinas, glaucoma, vía oftálmica.

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
1.1	GLAUCOMA	4
1.1.1	Concepto	4
1.1.2	Tratamiento del glaucoma	4
1.2	ACETAZOLAMIDA (ACZ)	5
1.2.1	Antecedentes	5
1.2.2	Estructura química	6
1.2.3	Mecanismo de acción	6
1.2.4	Características farmacocinéticas	6
1.3	DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN OFTÁLMICA DE ACZ	8
1.3.1	Vehículo	8
1.3.2	Ajuste de pH	8
1.3.3	Ajuste de isotonicidad	9
1.3.4	Agente viscosizante	10
1.3.5	Agente conservante	10
1.3.6	Agente antioxidante	11
1.3.6.1	EDTA	12
1.3.6.2	Ácido ascórbico	14
1.3.6.3	Ácido cítrico	15
1.3.6.4	Metabisulfito sódico	16
1.3.7	Solubilización de ACZ mediante su complejación con CDs	16
1.3.8	Influencia del antioxidante en el equilibrio de complejación	21
1.4	APLICACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CDs A LA ADMINISTRACIÓN OCULAR DE FARMACOS	22
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>23</b>
3.1	MATERIALES	23
3.1.1	Fármaco	24
3.1.2	Agente complejante	24
3.1.3	Antioxidantes	24
3.1.4	Reactivos para la fase móvil del HPLC	24
3.1.5	Instrumentación	25
3.2	MÉTODOS	25
3.2.1	Cuantificación de ACZ	25
3.2.2	Diagramas de solubilidad	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>27</b>
4.1	ESTUDIOS DE COMPLEJACIÓN: DIAGRAMAS DE SOLUBILIDAD DE FASES	27
4.1.1	Estudio del efecto de la concentración de HP- $\beta$ -CD en la solubilidad de ACZ	27
4.1.2	Estudio del efecto de la concentración de HP- $\beta$ -CD en la solubilidad de ACZ en presencia de los diferentes agentes antioxidantes	28
4.1.2.1	Influencia sobre el tipo de diagrama de solubilidad	28
4.1.2.2	Influencia sobre la Kc y eficacia solubilizante	31
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>34</b>

## **1 INTRODUCCIÓN**

### **1.1 GLAUCOMA**

#### **1.1.1 Concepto**

El glaucoma es una neuropatía óptica caracterizada por una reducción del tamaño de la papila óptica que adquiere forma de copa y ocasiona la pérdida progresiva del campo visual. Por lo general, se debe al aumento de la presión intraocular producido por un desequilibrio entre la producción y la salida del humor acuoso (Goodman y Gilman, 2006; Porth, 2007).

Si no se trata, la presión puede aumentar produciendo isquemia y degeneración del nervio óptico, lo que conduce a una ceguera progresiva. Se calcula que aproximadamente 60 millones de personas en todo el mundo tienen glaucoma en la actualidad. El trastorno suele ser asintomático y puede asociarse a una pérdida significativa de la visión periférica.

#### **1.1.2 Tratamiento del glaucoma**

Los métodos convencionales utilizados para el tratamiento del glaucoma incluyen: farmacoterapia (en la mayoría de los casos por vía tópica), tratamientos con diferentes tipos de láser y procedimientos quirúrgicos.

Actualmente, los agentes más usados para el tratamiento farmacológico del glaucoma están diseñados para disminuir la presión intraocular. Estos fármacos limitan la producción del humor acuoso en el cuerpo ciliar y/o mejoran el flujo de salida del humor acuoso a través de la malla trabecular o la vía uveoescleral. Algunos fármacos utilizados en el tratamiento a largo plazo de glaucoma incluyen: bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos, mióticos, agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, inhibidores de anhidrasa carbónica y análogos de las prostaglandinas entre otros.

Uno de los grupos más utilizados son los inhibidores de la anhidrasa carbónica, la cual tiene un papel importante en la formación del humor acuoso. Dentro de ellos destaca el uso de la ACZ.

En muchos casos son necesarios dos fármacos de grupos farmacológicos distintos para alcanzar las cifras de PIO deseadas, por lo que en los últimos años han aparecido asociaciones de distintos principios activos (INFAC, 2010).

## **1.2 ACETAZOLAMIDA (ACZ)**

La ACZ, es un inhibidor de la anhidrasa carbónica que se usa por vía oral para la reducción de presión intraocular en pacientes que sufren de glaucoma. Dos razones principales responsables de la falta de desarrollo de una formulación oftálmica líquida efectiva de ACZ son su baja solubilidad acuosa (aproximadamente 1 mg/ml) y su baja permeabilidad.

### **1.2.1 Antecedentes**

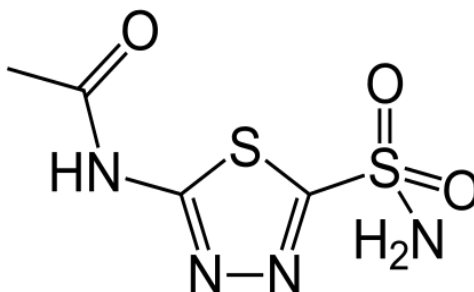
En 1940, Mann y Keilin observaron que cuando se administraba sulfanilamida como agente quimioterápico producía como efecto secundario acidosis metabólica. Esta observación condujo a una detallada evaluación, tanto *in vitro* como *in vivo* del proceso, demostrando que la sulfanilamida inhibía la anhidrasa carbónica.

En 1954, se introdujo su uso en oftalmología, ya que se demostró su capacidad de disminuir la presión intraocular reduciendo la producción de humor acuoso en el cuerpo ciliar (Becker, 1954). Otros investigadores también demostraron la eficacia del fármaco en pacientes con glaucoma, tras su administración oral (Gloster y Perkins, 1955). Recientemente han sido investigados nuevos inhibidores de la anhidrasa carbónica y diferentes vehículos, que disminuyen la presión intraocular como son dorzolamida, aminozolamida y MK-927.

Cabe resaltar el hecho de que ninguno de estos fármacos posee propiedades físico-químicas 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).

### 1.2.2 Estructura química

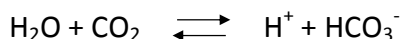
Su nombre químico es N-(5-sulfanoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-acetamida y su fórmula molecular es  $C_4H_6N_4O_3S_2$ . En la figura 1 se presenta su estructura.



**Figura 1.** Estructura 2D de la ACZ (IQB, 2014).

### 1.2.3 Mecanismo de acción

La anhidrasa carbónica es una enzima presente en el ojo que, de forma reversible, cataliza la reacción de  $H_2O$  y  $CO_2$  para formar ácido carbónico y, posteriormente, el ión bicarbonato, como se muestra en la siguiente reacción:



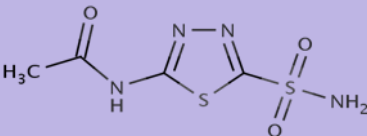
El ión  $HCO_3^-$  es responsable del movimiento de  $Na^+$  en el ojo y necesario para la producción del humor acuoso, ya que es el  $Na^+$  el que atrae al agua para formar el humor acuoso. La inhibición de la anhidrasa carbónica por fármacos tales como ACZ, metazolamida y diclorofenamida, disminuye la concentración de  $HCO_3^-$  y, por tanto, el flujo de  $Na^+$  y  $H_2O$  en la cámara posterior. Como consecuencia, disminuye la producción de humor acuoso reduciéndose así la presión intraocular (Kaur y cols., 2002).

### 1.2.4 Características farmacocinéticas

En la tabla 1 se recopilan algunas de las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de la ACZ.

La ACZ presenta una absorción adecuada en el tracto gastrointestinal, apareciendo la concentración plasmática máxima a las 2-4 horas tras su administración oral. Los niveles plasmáticos efectivos se mantienen durante 4-6 horas, y son paralelos al efecto

hipotensor. No sufre procesos de biotransformación, eliminándose por riñón siguiendo mecanismo de secreción tubular.

<b>Fórmula Molecular</b>	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>
<b>Peso Molecular</b>	222,245 g/mol
<b>Nombre químico</b>	N-(5-sulfanoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-acetamida
<b>Estructura</b>	
<b>Longitud de onda</b>	265 nm
<b>pKa</b>	7.4
<b>% Unión a proteínas plasmáticas</b>	95%
<b>% Porción no ionizada</b>	50%
<b>Comienzo efecto</b>	30-60 min
<b>Efecto máximo</b>	2-4 h
<b>Duración efecto</b>	4-6 h
<b>Solubilidad acuosa</b>	0,98 mg/ml

**Tabla 1.** Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de la ACZ (Drugbank, 2013).

La dificultad fundamental del uso de este fármaco por vía oral es la optimización del tratamiento, pues los niveles plasmáticos deben oscilar entre 5 y 20 µg/ml, y las concentraciones plasmáticas tras la ingestión oral de una misma dosis son variables. Por otra parte, el desarrollo de la formulación tópica de ACZ puede conducir a la abolición total de los efectos secundarios sistémicos observados sobre el uso oral de ACZ. Los intentos, en este sentido, han sido importantes y notables a pesar de los fracasos iniciales. Como ya hemos indicado, la ACZ es un fármaco poco soluble en agua y en lípidos. Su poca solubilidad en 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. Por otra parte, esta baja solubilidad acuosa dificulta la elaboración de una forma líquida de administración, por lo que no existen actualmente en el mercado este tipo de medicamento.



### **1.3 DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN OFTÁLMICA DE ACZ**

Para el desarrollo de un medicamento líquido de administración oftálmica han de ser tenidos en cuenta varios condicionantes, para lograr el desarrollo de una correcta formulación.

No debemos olvidar que el preparado desde el punto de vista fisicoquímico es recomendable que sea una solución, ya que la administración de partículas puede producir un efecto irritante sobre la córnea y además para que el fármaco pueda atravesarla es necesario que se encuentre disuelto. En nuestro caso y dadas las características de la ACZ anteriormente comentadas, su formulación oftálmica, implicaría la necesidad de incorporar a la formulación un agente solubilizante, que permita aumentar la solubilidad del fármaco sin afectar su lipofilia. Para solucionar esta problemática resulta especialmente interesante el empleo de CDs y más en concreto la HP- $\beta$ -CD, ensayada con éxito para este fármaco (Loftsson y Järvinen, 1999).

#### **1.3.1 Vehículo**

En primer lugar debemos realizar una correcta selección del vehículo. Para ello se suele emplear agua purificada estéril o de calidad inyectable, aunque hemos de señalar que el agua para uso oftálmico no tiene por qué estar despirogenizada. Cuando sea necesario se pueden añadir cosolventes para mejorar la solubilización del fármaco, tales como etanol, propilenglicol, polietilenglicol o glicerina.

En el caso de soluciones oleosas se usan como vehículo aceites vegetales (soja, ricino, sésamo u oliva) cuyo índice de acidez sea menor o igual al 0,05% o también ésteres sintéticos. En este caso no es necesario ajustar isotonía ni pH, ni tampoco añadir conservantes o viscosizantes. Sin embargo, son incómodos (sensación de untuosidad, alteración de la visión), su efecto es retardado y a menudo producen alergias por contacto e irritaciones.

#### **1.3.2 Ajuste de pH**

Es importante que los preparados oftálmicos presenten un pH adecuado, dado que las posibles diferencias de pH existentes entre la forma farmacéutica y las lágrimas pueden ocasionar efectos irritantes en el ojo, lo que conduce a un aumento del

lagrimeo y la consiguiente pérdida del medicamento por vía precorneal (Ludwig y Van Ooteghem, 1986). Para evitar que esto ocurra, el valor del pH deberá ser un compromiso entre el correspondiente al de máxima estabilidad de del fármaco, en nuestro caso la ACZ presenta una máxima estabilidad a pH 4 (Parasrampur y Das, 1989), y el requerido por el ojo ( $\text{pH}_{\text{lágrimas}} = 7,45$ ). Además, el pH ejerce influencia sobre la fracción ionizada y no ionizada de fármaco y por tanto en su solubilidad, por lo que hemos de tener en cuenta este factor. Por último, hemos de mencionar que una variación del mismo con respecto al pH fisiológico desencadena dolor e incluso daños en la superficie corneal (Echezarreta, 1998).

Este requerimiento se puede lograr adicionando correctores del pH tan habituales como HCl o NaOH a la formulación, pero lo más frecuente es emplear como vehículo cualquiera de los diferentes medios tampón, compatibles desde el punto de vista isotónico con la vía ocular. Entre otros destacan por su utilización la solución de ácido bórico/borato sódico, la solución tampón Sörensen, la solución tampón Hepes, o la solución tampón Tris.

### **1.3.3 Ajuste de isotonicidad**

Toda formulación oftálmica, debe ser inicialmente isotónica con las lágrimas con el fin de que su administración sea compatible con la presión osmótica del ojo y la patología ocular que se trate, aunque el ojo tolera concentraciones que oscilan entre el 0,7 y 2% p/v de NaCl (Vila-Jato y cols., 1997). Dentro de los isotonizantes destaca el cloruro sódico como sustancia más empleada, aunque no debemos olvidar que todos los componentes sólidos disueltos en el medio aportan tonicidad, por lo que el ajuste de este requisito se debe realizar como último paso del proceso de formulación, una vez conocidos todos los componentes y sus concentraciones en el medio de disolución.

Podemos señalar que algunas soluciones oftálmicas han de ser formuladas de forma hipertónica para mejorar la absorción o proporcionar suficiente concentración del fármaco para ejercer una acción efectiva. Dado que el volumen empleado de tales soluciones es pequeño y la dilución con el líquido lagrimal tiene lugar rápidamente, el malestar de la hipertonicidad es solo temporal (FCN, 2010).

#### **1.3.4 Agente viscosizante**

El incremento de la viscosidad en los colirios está destinado a prolongar el tiempo de contacto entre la preparación y la córnea, para incrementar la respuesta terapéutica. Sin embargo, la presencia de macromoléculas hidrófilas como la metilcelulosa puede frenar los procesos de difusión a través de las barreras biológicas, ya que se pueden formar complejos o asociaciones intermoleculares por puente de hidrógeno. Por ello es indispensable asegurarse de que el beneficio debido al aumento de la duración de contacto es superior al efecto inhibitor. La viscosidad óptima de una solución acuosa, que permite retener el principio activo y mantener la comodidad visual, se considera entre 15-25 centipoises (Faulí y cols., 1993).

Además de la metilcelulosa, se emplean otras sustancias para aumentar la viscosidad de las soluciones oftálmicas, como pueden ser la hidroxipropilmetilcelulosa, el alcohol polivinílico, los dextranos y el carbopol.

Aparte de problemas de tolerancia, son a menudo las exigencias tecnológicas las que dictan la elección del agente viscosizante (posibilidad de filtración, resistencia a la esterilización o compatibilidad con el resto de componentes de la formulación).

#### **1.3.5 Agente conservante**

Los conservantes se definen como aquellas sustancias que previenen o inhiben el crecimiento de microorganismos en los medicamentos.

Aunque no son necesarios en preparaciones unidosis, su uso tal y como se recoge en la Real Farmacopea Española, es necesario en el caso de formulaciones multidosis, ya que la contaminación bacteriana aparece con el empleo del envase, si bien debe hacerse en la menor cantidad posible para conseguir su objetivo. Por este motivo y con el fin de reducir al máximo la dosis de conservante utilizada se suelen emplear en la práctica mezclas de agentes conservantes, debido al efecto sinérgico de su combinación (RFE, 2007).

Se recomienda la utilización de los siguientes conservantes para uso oftálmico: cloruro de benzalconio al 0,01% p/v, nitrato o acetato de fenilmercurio al 0,002% p/v, clorobutanol al 0,5% p/v o alcohol fenil etílico al 0,5% p/v (Faulí y cols., 1993).

### 1.3.6 Agente antioxidante

Los antioxidantes se añaden a la formulación para evitar la oxidación de las sustancias activas o excipientes en el producto terminado y se dividen en varias categorías basándose en su mecanismo de acción (Nema y cols., 2002).

**Agentes secuestrantes de radicales libres:** actúan como terminadores de las reacciones en cadena de radicales libres. El proceso se inhibe por la formación de radicales libres antioxidantes relativamente no reactivos. La adición de este tipo de antioxidantes puede proporcionar protección contra reacciones de oxidación fotosensibilizantes del tipo I (radicales libres) y contra especies reactivas de oxígeno formados durante las reacciones de fotosensibilización.

**Agentes reductores:** son preferentemente oxidados debido a un potencial redox más bajo que los principios activos u otros excipientes en la formulación, protegiéndolos de esta forma de la oxidación.

**Antioxidantes sinergistas:** mejoran el efecto de otros antioxidantes. Los agentes quelantes son de los más usados y se añaden habitualmente para la administración parenteral. Pueden reducir el daño oxidativo mediante la formación de complejos con iones metálicos que actúan como catalizadores en las reacciones de oxidación.

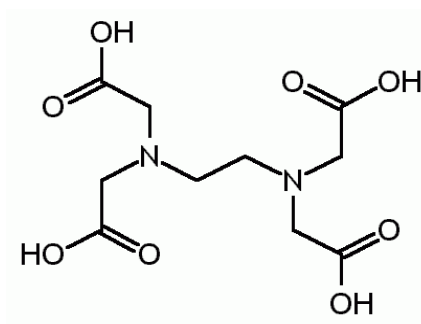
Entre los antioxidantes utilizados en la vía oftálmica destacan EDTA, metabisulfito sódico, ácido cítrico y ácido ascórbico (Rowe y cols., 2012). En la tabla 2, se recogen a modo de ejemplo, algunos preparados oftálmicos comercializados en España que incluyen estos antioxidantes y otros diferentes componentes de su formulación.

Medicamento (Principio activo)	Antioxidante	Otros aditivos	Referencias
<b>Azarga® (Brinzolamida)</b>	EDTA	Cloruro de benzalconio, Cloruro de sodio	(AEMPS, 2016)
<b>Dexafree® (Fosfato de dexametasona)</b>	EDTA	Hidrogenofosfato de disodio dodecahidrato, Cloruro de sodio	(AEMPS, 2016)
<b>Nevanac® (Nepafenaco)</b>	EDTA	Cloruro de sodio, Tiloxapol, Cloruro de benzalconio	(Vademecum, 2016)
<b>Betagan® (levobunolol clorhidrato)</b>	Metabisulfito sódico	Cloruro de benzalconio, Alcohol polivinílico, cloruro de sodio	(AEMPS, 2016)
<b>Alphagan® (tartrato de brimonidina)</b>	Ácido cítrico	cloruro de benzalconio, alcohol vinílico, cloruro de sodio	(Vademecum, 2016)

**Tabla 2.** Formulaciones oftálmicas que contienen los antioxidantes ensayados.

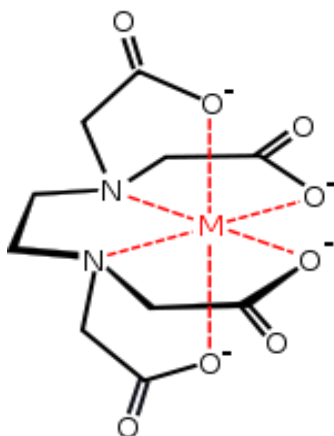
### 1.3.6.1 EDTA

Su nombre químico es ácido etilendiaminotetraacético. En la figura 2 se presenta su estructura.



**Figura 2.** Estructura química del EDTA (Farmacología ocular, 2009).

Se le puede catalogar como un agente quelante, ya que coordina metales pesados de forma reversible por sus cuatro posiciones acetato y dos amino, lo que lo convierte en un ligando hexadentado (figura 3).



**Figura 3.** Estructura del complejo formado por EDTA con un metal (Quimitube, 2015).

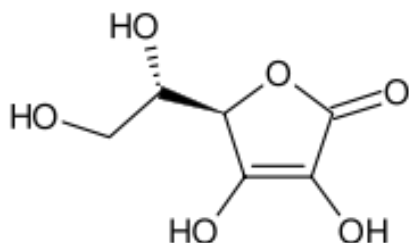
Se utiliza principalmente como antioxidante sinergista, secuestrando trazas de iones metálicos, en particular cobre, hierro y manganeso, que de otro modo podrían catalizar reacciones de autooxidación.

Este antioxidante posee cierta actividad antimicrobiana contra microorganismos Gram-negativos, como *Pseudomonas aeruginosa*, algunas levaduras y hongos, aunque esta actividad es insuficiente para ser utilizado con eficacia como un agente antimicrobiano por sí solo. Sin embargo, cuando se utiliza con algunos conservantes, demuestra un marcado efecto sinérgico en su actividad antimicrobiana. Este es el caso de su combinación con cloruro de benzalconio, asociación muy utilizada frente a *Pseudomonas aeruginosa* por su efecto sinérgico (Rowe y cols., 2012). Un claro ejemplo de esta combinación lo podemos encontrar en el medicamento Diclofenaco Lepori®, que presenta dicha combinación.

El EDTA se puede usar solo o en combinación con otros antioxidantes y se suele utilizar a una concentración comprendida entre el 0,005 y 0,1% p/v (Rowe y cols., 2012).

### 1.3.6.2 Ácido ascórbico

El ácido ascórbico (vitamina C), presenta una estructura que se recoge en la figura 4.



**Figura 4.** Estructura química del ácido ascórbico (Sings of the times, 2013).

El ácido ascórbico ha demostrado ser un antioxidante eficaz. Puede actuar tanto de forma directa, mediante la reacción con radicales de peróxido acuosos como indirectamente, mediante la restauración de las propiedades antioxidantes de la vitamina E. La consecuencia general de estas actividades antioxidantes es el control beneficioso de la peroxidación lipídica de las membranas celulares (Bendich y cols., 1986).

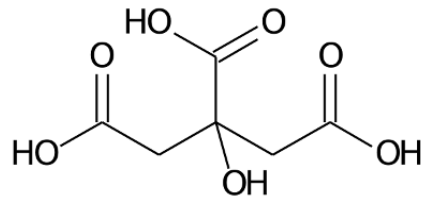
Debido a que el  $pK_a$  del ácido ascórbico es 4,25, el anión ascorbato es la forma predominante a pH fisiológico. El papel antioxidante del anión ascorbato radica en su capacidad para reaccionar directamente con el radical superóxido, el radical hidroxilo y diversos hidroperóxidos. Cuando el ascorbato reduce estos radicales libres, se convierte en dehidroascorbato que es una molécula inestable y se puede romper en una ruta compleja que lleva a la producción de los ácidos oxálico y L-treónico

Otra función importante de este ácido, como se ha mencionado anteriormente, es la de restaurar las propiedades antioxidantes de la vitamina E. En este caso, el ascorbato se oxida al reducir los radicales tocoferilos originados en las reacciones de la vitamina E con los radicales libres (Gil y Sánchez, 2010).

Este antioxidante se emplea en formulaciones acuosas en un intervalo de concentración del 0,01 al 0,2% p/v (Rowe y cols., 2012).

### 1.3.6.3 Ácido cítrico

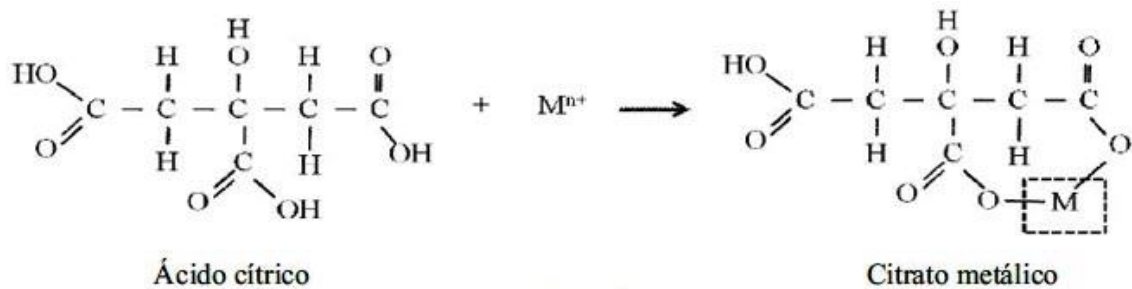
Su nombre químico es ácido 2-hidroxiopropano-1,2,3-tricarboxílico. En la figura 5 se recoge su estructura química.



**Figura 5.** Estructura química del ácido cítrico (Nortem, 2015).

El ácido cítrico es ampliamente utilizado en las formulaciones farmacéuticas para ajustar el pH de preparados líquidos, pero también se puede utilizar como un agente secuestrante sinérgico de antioxidantes.

Su mecanismo de acción se basa en formar complejo con los metales que catalizan las reacciones de oxidación (figura 6) y como agente complejante su utiliza en en intervalo de concentraciones de 0,3-2% p/v (Rowe y cols., 2012).

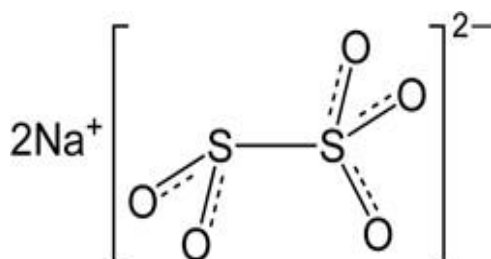


**Figura 6.** Mecanismo de complejación del ácido cítrico (Lázaro y Rosa, 2013).



#### 1.3.6.4 Metabisulfito sódico

El metabisulfito sódico, también denominado disulfito sódico, presenta cierta actividad antimicrobiana, que es mayor a pH ácido. En la figura 7 se recoge su estructura química.



**Figura 7.** Estructura química del metabisulfito sódico (Hablemos claro, 2013).

A pesar de que se utiliza ampliamente en una gran variedad de preparaciones, se han descrito en la bibliografía casos de incompatibilidad y toxicidad (Munson y cols., 1977; Enever y cols., 1977). Son por lo general reacciones de hipersensibilidad que incluyen broncoespasmo y anafilaxia. La alergia a los antioxidantes de sulfito se estima que ocurre en el 5-10% de los asmáticos, aunque también pueden producirse reacciones adversas en los no asmáticos sin antecedentes de alergia.

Actúa como agente reductor oxidándose preferiblemente en lugar del principio activo o el excipiente. En forma de sal sulfito, bisulfito y metabisulfito sódico son eliminadores de oxígeno y presentan una alta solubilidad acuosa (Hjorth, 2004). Se utiliza como antioxidante a concentraciones entre el 0,01 y 1% p/v (Rowe y cols., 2012).

#### 1.3.7 Solubilización de ACZ mediante su complejación con CDs

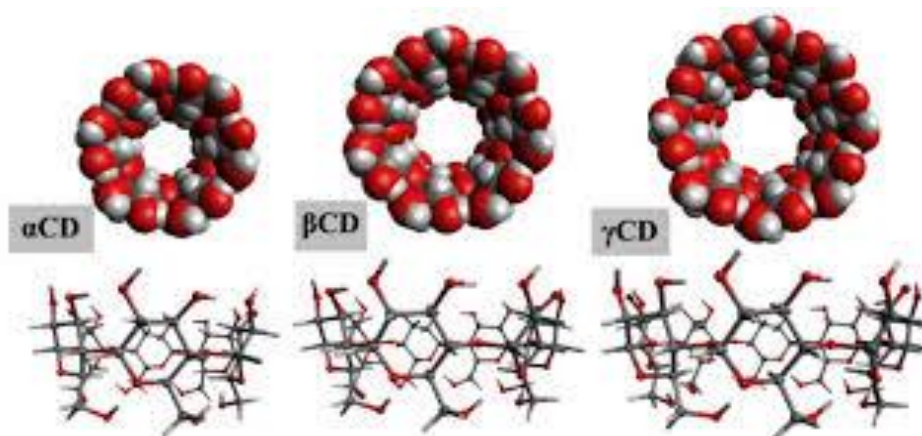
Un complejo es la asociación reversible de  $m$  moléculas de substrato (principio activo) con  $n$  moléculas de ligando (sustancia complejante) para dar lugar a una nueva especie que puede presentar una mayor solubilidad y velocidad de disolución. La constante de asociación o estabilidad del complejo ( $K$ ) viene dada por la siguiente expresión:



$$K_{m:n} = (S_m L_n) / (S)^m (L)^n$$

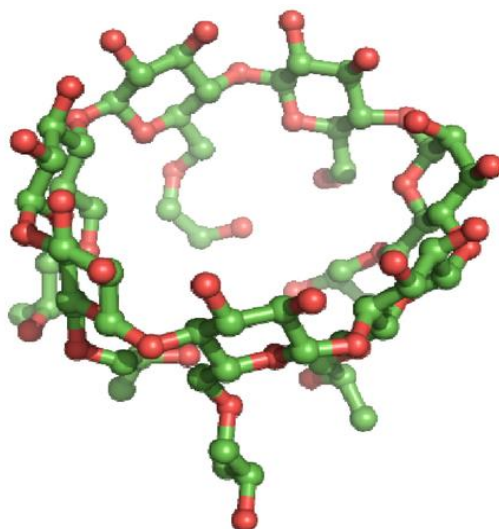
Existe una gran variedad de sustancias complejantes entre las que destacan las CDs. Estas son un grupo de oligosacáridos cíclicos procedentes de la degradación del almidón, formadas por acción del enzima ciclodextrin-glucosil-transferasa (CGTasa). Los productos primarios obtenidos de la ruptura de las uniones glucosídicas de la cadena del almidón, experimentan, mediante un proceso no hidrolítico, una reacción intramolecular que da lugar a la formación de las mismas. Están constituidas por un número variable de unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha \rightarrow (1,4)$ . Se las denomina mediante letras griegas:  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD, según tengan 6, 7 u 8 unidades respectivamente de  $\alpha$ -D-glucopiranososa. El número de unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranososa determina el tamaño de la cavidad ( $\gamma > \beta > \alpha$ ), y por tanto el grado de interacción con la molécula huésped (Moyano y cols, 1994).

Las estructuras de las CDs naturales se recogen en la figura 8.



**Figura 8.** Estructura química de las CDs naturales (Torralba, 2014).

Con el objetivo de incrementar la baja solubilidad de las CDs naturales, en especial la  $\beta$ -CD, existe la posibilidad de hidroxilalquilación de sus grupos hidroxilos, obteniéndose así derivados de CDs, siendo la 2-HP- $\beta$ -CD (figura 9), la más utilizada. La hidroxipropilación de las CDs no es una reacción selectiva, sino que conduce a una combinación de productos con diferentes grados de sustitución. La coexistencia de varios tipos de hidroxipropil-CDs en la mezcla final explica su incapacidad para cristalizar y, en consecuencia, la obtención de un producto amorfo (Pitha, 1988).



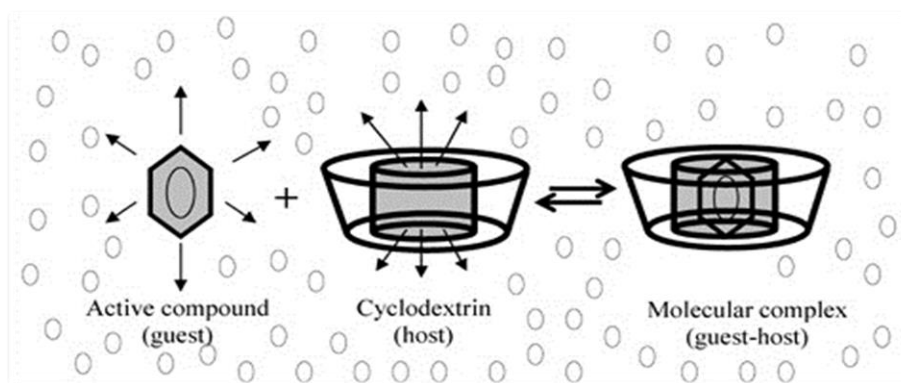
**Figura 9.** Estructura de la 2-HP- $\beta$ -CD (Danciu y cols., 2014).

Los complejos de inclusión son compuestos moleculares en el cual la molécula hospedadora envuelve espacialmente a otra. El compuesto encerrado (la molécula huésped), se encuentra situado en la cavidad del hospedador, sin que su estructura se afecte de forma significativa. Aparte de una leve deformación, un hecho característico es que el tamaño y la forma de la cavidad disponible permanecen prácticamente inalterados.

La formación de los compuestos de inclusión se puede dividir en 6 etapas:

1. Aproximación de la molécula huésped hacia la CD.
2. Ruptura del agua de estructura del interior de la cavidad de la CD con eliminación de algunas moléculas de agua fuera del anillo.
3. Desordenación de la estructura del agua alrededor de la molécula que va a ser incluida y transporte de algunas moléculas de agua hacia la solución.
4. Interacción de la molécula del sustrato o de algún sustituyente con grupos del borde o del interior de la cavidad de la CD.
5. Formación de posibles puentes de hidrógeno entre el sustrato y la CD
6. Restablecimiento de la estructura del agua alrededor de la parte exterior de la molécula después de la inclusión.

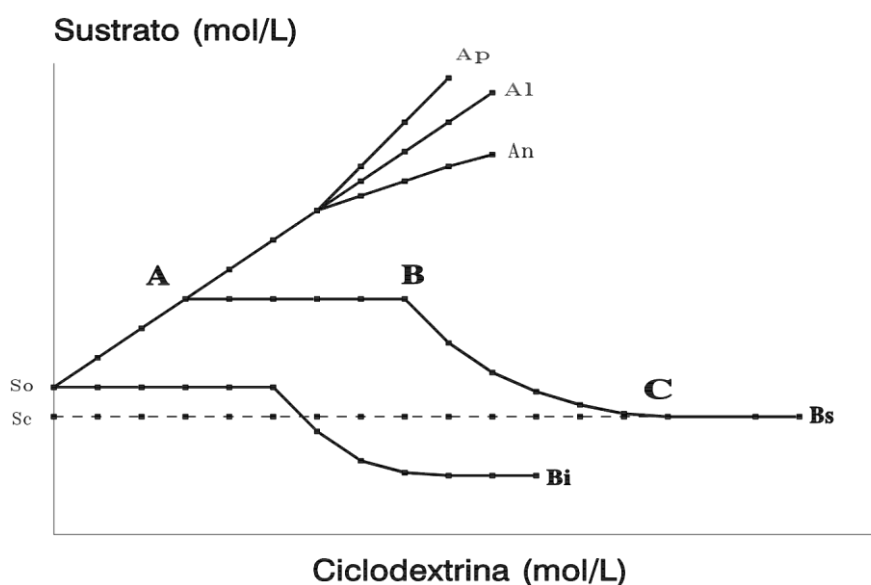
El proceso global se ve esquematizado en la figura 10.



**Figura 10.** Esquema de la formación de un complejo de inclusión (Ayala y cols., 2008).

Aunque en principio, no es necesario ningún tipo de disolvente para que se pueda formar un compuesto de inclusión el proceso de complejación se ve mejorado en presencia de agua. La formación de complejos en solución es un proceso muy rápido, sin embargo, por regla general, las sustancias que posean buena solubilidad se complejan sólo débilmente. En cambio, las moléculas que presenten una buena complejación suelen presentar baja solubilidad en agua.

Cuando las CDs interaccionan en medio líquido con una molécula de sustrato, podemos representar la concentración molar del sustrato disuelto ( $S$ ), en función de la concentración molar de ligante añadido ( $L$ ), obteniendo los denominados diagramas de solubilidad (figura 11).



**Figura 11.** Representación de los distintos tipos de diagramas de solubilidad (Moyano y cols., 1994).

A la hora de interpretar estos diagramas hemos de señalar que el los de tipo A el complejo obtenido no presenta límite de solubilidad al menos a las concentraciones ensayadas. Este aumento de la solubilidad puede experimentar desviaciones positivas o negativas de la linealidad dando lugar a los denominados diagramas  $A_p$  y  $A_n$  respectivamente. Si el diagrama es tipo  $A_L$ , podemos concluir que se obtiene un complejo de primer orden respecto al ligante. Si es de orden superior a uno respecto al ligante, entonces el diagrama corresponderá a un diagrama tipo  $A_p$ . En cambio, si corresponde a un diagrama del tipo  $A_n$ , puede corresponder a una alteración en la naturaleza del solvente en la presencia de altas concentraciones de ligante, o sencillamente que el ligante se asocie consigo mismo a concentraciones altas.

Existe una segunda posibilidad, son los diagramas tipo B que se obtienen cuando se forma un complejo de solubilidad limitada. Con un incremento inicial de la solubilidad ( $B_s$ ), o sin dicho incremento ( $B_l$ ).

Con los diagramas de solubilidad se puede calcular la eficacia solubilizante de la CD, que se corresponde al aumento de solubilidad relativa del fármaco a una determinada concentración de CD, por lo que se puede calcular a partir del cociente  $S_{CD}/S_o$ , donde  $S_{CD}$  representa la solubilidad de la ACZ a dicha concentración de CD y  $S_o$  representa la solubilidad de ACZ en ausencia de CD.

Estos diagramas también permiten la determinación de la constante de complejación  $K$ , cuya expresión matemática será:

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

Las concentraciones pueden ser expresadas en términos de cantidades conocidas:

$$(S) = S_o$$

$$(S_m L_n) = \frac{S_t - S_o}{m}$$

$$(L) = L_t - n (S_m L_n)$$

Donde  $S_0$  es la solubilidad en el equilibrio en ausencia de L,  $S_t$  es la concentración total de S disuelta y  $L_t$  es la cantidad total de L agregada. Con las ecuaciones anteriores se puede obtener una expresión para K en términos de concentraciones conocidas y los valores de  $m$  y  $n$ . Un caso especial es cuando  $n = 1$  se obtiene la siguiente expresión:

$$S_t = S_0 + \frac{K_{11} S_0 L_t}{1 + K_{11} S_0}$$

Al representar  $S_t$  frente  $L_t$ , para la formación de un complejo soluble  $S_m L$ , obtendremos una línea recta (diagrama  $A_L$ ), cuyo con el eje corresponde a  $S_0$  y la pendiente vendrá dada por:

$$Pendiente = \frac{K_{11} S_0}{1 + K_{11} S_0}$$

Para el caso que  $m$  sea conocido, esta ecuación proporciona la base para el cálculo de la pendiente de un diagrama  $A_L$ . Para el caso que  $m = 1$ , la ecuación quedaría:

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

### 1.3.8 Influencia del antioxidante en el equilibrio de complejación

La incorporación de agentes antioxidantes a una formulación en la cual se utilicen CDs como agentes solubilizantes implica el riesgo de que dichos aditivos entren en competición con el fármaco por la cavidad de la CD, lo que se puede traducir en una disminución en la solubilidad efectiva del fármaco. Esta posibilidad se ve claramente acentuada si los aditivos presentan una estructura bencénica (Chao y cols., 2013; Chan y cols., 2000) ya que aparece frecuentemente descrita en la bibliografía este tipo de complejación (Xinzhen y cols., 2006; Lehner y cols., 1993).

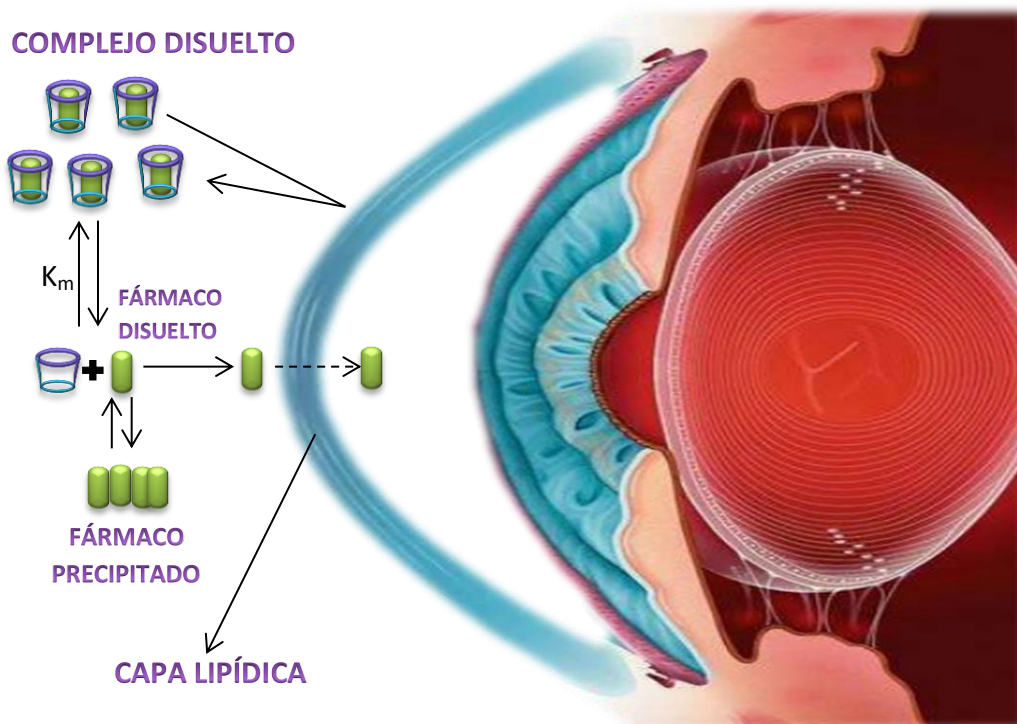
#### 1.4 APLICACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CDs A LA ADMINISTRACIÓN OCULAR DE FARMACOS

La aplicación de las CDs para uso oftálmico, no ha recibido especial interés hasta hace unos años debido, posiblemente, a la baja frecuencia con que se emplean las formas oculares en comparación con las formas orales. No obstante, las reducidas dosis de medicamento administradas por vía ocular y la baja toxicidad de estos oligosacáridos hacen que su utilización represente una alternativa adecuada para la mejora de eficacia de las formulaciones oftálmicas (Van-Doorne, 1993), así como de la biodisponibilidad de los principios activos que formulan con ellas (Loftsson y Stefánsson, 1997).

La constitución de los complejos de inclusión es un proceso dinámico durante el cual, no se originan uniones covalentes ni iónicas entre las dos especies. La formación y disociación del complejo son procesos muy rápidos, por esta razón, aunque el complejo habitualmente se representa como una única especie, éste se debería considerar como un sistema dinámico entre CD libre, principio activo libre y complejo de inclusión, que coexisten en solución (Stella y Rajewski, 1997).

Una de las propiedades de las CDs es su capacidad para mejorar la administración de fármacos a través de membranas biológicas. Desde este punto de vista, es sencillo comprender las mejoras que plantea la administración de un principio activo por vía extravascular como complejo de inclusión, ya que durante el proceso de formación/disociación se posibilita la disposición del mismo en el lugar de absorción, absorbiéndose únicamente, las moléculas de principio activo susceptibles de atravesar las membranas biológicas (Szejtli, 1982; Loftsson y Stefánsson, 1997; Loftsson y Järvinen, 1999). La CD y el complejo de inclusión, por tamaño y naturaleza hidrofílica en su superficie exterior sólo difundirán a través de las membranas biológicas con considerable dificultad (Frömming y Szejtli, 1994).

En la figura 12, se observa un esquema del proceso de absorción de un fármaco administrado vía ocular, en forma de complejo de inclusión con CDs. Solo la fracción libre del fármaco puede atravesar la membrana. Empleando CDs se pueden conseguir concentraciones muy altas de fármaco en los epitelios de absorción.



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

## 2 OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo consiste en evaluar la influencia que ejercen cuatro antioxidantes de uso habitual en formulaciones oftálmicas (ácido ascórbico, ácido cítrico, metabisulfito sódico y EDTA), en el equilibrio de complejación ACZ-HP- $\beta$ -CD, fármaco inhibidor de la anhidrasa carbónica, utilizado en el tratamiento del glaucoma con problemas de solubilización. Los resultados nos permitirán seleccionar el antioxidante más idóneo para ser incorporado al desarrollo de una formulación oftálmica acuosa de dicho fármaco que incluye HP- $\beta$ -CD como agente solubilizante.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 MATERIALES

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



### 3.1.1 Fármaco

**Acetazolamida (ACZ):** Su nombre químico es, N-(5-(aminosulfonil)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-acetamida. Se presenta como un polvo cristalino blanco, inodoro, cuya fórmula molecular es  $C_4H_6N_4O_3S_2$  y con un peso molecular de 222,24 g/mol (Acofarma, Barcelona).

### 3.1.2 Agente complejante

**HP- $\beta$ -CD:** se presenta como un polvo cristalino blanco, con un grado de sustitución de 0,6 y con un peso molecular de 1380 g/mol (Fluka, Japón).

### 3.1.3 Antioxidantes

**Ácido ascórbico:** se presenta como polvo cristalino blanco, su fórmula molecular es  $C_6H_8O$  y su peso molecular es 176,12 g/mol (Acofarma, Barcelona).

**Ácido cítrico:** se presenta como polvo cristalino blanco, como cristales incoloros o como gránulos. Su fórmula molecular es  $C_6H_8O_7$  y su peso molecular es 210,14 g/mol (Acofarma, Barcelona).

**EDTA:** se presenta como polvo cristalino blanco cuya fórmula molecular es  $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$  y su peso molecular es 372,24 g/mol (Acofarma, Barcelona).

**Metabisulfito sódico:** se presenta como polvo cristalino blanco o como cristales incoloros cuya fórmula molecular es  $Na_2S_2O_5$  y su peso molecular es 190,11 g/mol (Acofarma, Barcelona).

### 3.1.4 Reactivos para la fase móvil del HPLC

**Acetato sódico:** Se presenta como polvo cristalino, con fórmula molecular  $CH_3COONa$ . Su solubilidad en agua es 0,47 g/ml y su peso molecular 82,04 g/mol (VWR Prolabo, Bélgica).

**Acetonitrilo:** de calidad HPLC, se trata de un líquido incoloro, de olor característico. Su fórmula molecular es  $CH_3CN$  y presenta un peso molecular de 41,05 g/mol (Sigma-Aldrich, USA).

**Agua Milli-Q<sup>®</sup>:** agua destilada de alta calidad (agua ultrapura) obtenida a través de un sistema Milli-Q<sup>®</sup> Advantage, Millipore<sup>®</sup>.

### 3.1.5 Instrumentación

Agitador magnético (ACS 360 TS-K 412)

Balanza de precisión (OHAUS Explorer Pro)

Cromatógrafo de líquidos-HPLC (Hitachi Elite Lachrom)

pH-metro (CRISON GLP21)

## 3.2 METODOS

### 3.2.1 Cuantificación de ACZ

Para cuantificar el fármaco objeto de estudio, se seleccionó como método analítico la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), anteriormente puesta a punto por el grupo de investigación CTS-240 (Cabanzo, 2013; Abad, 2012).

La determinación se llevó a cabo mediante el desarrollo de un método analítico en fase reversa. Se utilizó un cromatógrafo (HITACHI ELITE LACHROM), el cual se compone de cuatro unidades: bomba L-2130, inyector automático de muestras L-2200, detector DAD L-2455, horno L-2350. El equipo se encuentra conectado a un ordenador, con el programa EZChrom para procesar los resultados.

El sistema cromatográfico utilizado para la técnica analítica a desarrollar se encuentra constituido por un cartucho (Merck, RP-18 LichroCART<sup>®</sup>) de 125 mm de longitud y 4 mm de diámetro, relleno de partículas de silicagel enlazadas con partículas de octadecilsilano de 5 µm de diámetro.

La cuantificación de ACZ se llevó a cabo a una longitud de onda de 265 nm. Se desarrolló un método analítico isocrático, cuya fase móvil está compuesta por el componente A: solución de acetato sódico 0,05 M ajustado a pH de 4,02 y el componente B: acetonitrilo. Los componentes de la fase móvil irían en una proporción 90/10 v/v respectivamente. La velocidad de flujo se fijó en 1,5 ml/min, el volumen de inyección fue de 10 µL y la temperatura del horno de 45 ± 1°C.

Estas condiciones aseguran una adecuada separación entre el pico del fármaco y el resto de componentes de las muestras. Una vez ajustada la técnica cromatográfica, se

determinó la linealidad del método y su límite de cuantificación. Para determinar la linealidad del método se realizó una recta de calibrado, de la que se integrarán las áreas registradas en el espectro para cuantificar la cantidad de fármaco presente en nuestra muestra (Oswaldo, 2013).

### 3.2.2 Diagramas de solubilidad

Se realizaron dos tipos de diagramas de solubilidad.

En el primero, se reprodujo un estudio ya recogido en la bibliografía, y tenía como finalidad poner de manifiesto la influencia que ejercían concentraciones crecientes HP- $\beta$ -CD en la solubilidad de la ACZ. Para ello sobre frascos de vidrio de 5 ml se adicionó una concentración variable de HP- $\beta$ -CD (0,01–0,1 M), y un exceso de fármaco correspondiente a unos 30 mg del mismo. 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  $\mu$ m de diámetro de poro. Igualmente, se realizaron diluciones adecuadas de las soluciones obtenidas, con el fin de conseguir la concentración apropiada del fármaco para proceder a su valoración. Los ensayos se realizaron por triplicado.

El segundo tipo tiene como objetivo poner de manifiesto el efecto que una concentración fija de cada tipo de antioxidante ejerce sobre el equilibrio de solubilidad HP- $\beta$ -CD-ACZ. Para lo cual se determina la solubilidad del fármaco en función de cantidades crecientes de HP- $\beta$ -CD, a una concentración fija de antioxidante, en concreto, ácido ascórbico al 0,2% p/v, EDTA al 0,05% p/v, metabisulfito sódico al 0,01% p/v, ácido cítrico al 1% p/v y un exceso de fármaco de 30 mg. El ensayo se realizó de forma similar al anteriormente descrito.

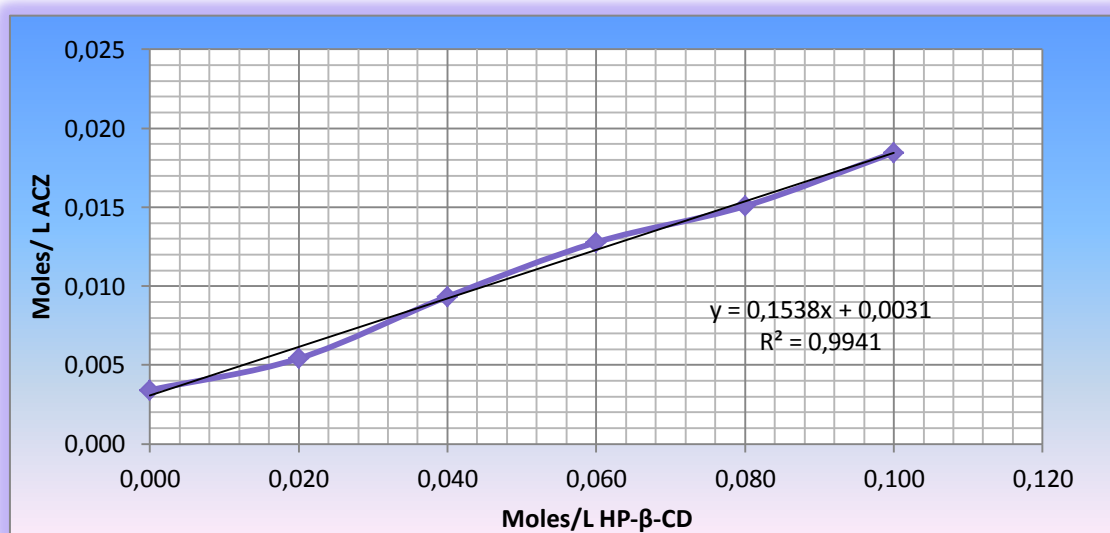
## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 ESTUDIOS DE COMPLEJACIÓN: DIAGRAMAS DE SOLUBILIDAD DE FASES

#### 4.1.1 Estudio del efecto de la concentración de HP- $\beta$ -CD en la solubilidad de ACZ

En la figura 13, se recoge el diagrama de solubilidad de la ACZ en función de cantidades crecientes de HP- $\beta$ -CD. Aunque dicho estudio aparece recogido en la bibliografía (Pérez-Barrales y cols., 1995; Loftsson y cols., 2005; Granero y cols., 2008), resulta evidente la necesidad de realizarlo de nuevo, dado que el objetivo de nuestro trabajo de investigación requiere realizar un estudio comparativo para poner en evidencia si dicho equilibrio se ve modificado por la presencia de un tercer componente.

Los resultados muestran que la solubilidad del fármaco aumenta linealmente con la concentración de HP- $\beta$ -CD, pudiendo clasificar inicialmente este diagrama de solubilidad como tipo  $A_L$  de Higuchi (Higuchi y Connors, 1965). En efecto, el coeficiente de correlación de 0,994 indica la buena linealidad que presentan los puntos experimentales, pudiendo concluir que el complejo formado no presenta un límite de solubilidad definido al menos en el intervalo de concentraciones ensayadas.



**Figura 13.** Diagrama de solubilidad de ACZ en presencia de concentraciones crecientes de HP- $\beta$ -CD.

Los valores de la  $K_c$  del sistema ACZ-HP- $\beta$ -CD y su eficacia solubilizante para una concentración 0,1 M de HP- $\beta$ -CD, tal y como se describe en el apartado de materiales y

métodos, se recogen en la tabla 3. Además en esta tabla se incluyen los resultados obtenidos para este mismo sistema, obtenidos por otros autores, y recogidos en la bibliografía. En todos ellos, el cálculo de la constante de complejación fue obtenido considerando un diagrama del tipo  $A_L$ .

ACZ-HP- $\beta$ -CD	Eficacia solubilizante 0.1 M HP- $\beta$ -CD	Kc ( $M^{-1}$ )
<b>Obtenida por nosotros</b>	5,81	58,63
<b>(Pérez-Barrales y cols., 1995)</b>	5,30	24,64
<b>(Loftsson y cols., 2005)</b>	8,33	85,00
<b>(Granero y cols., 2008)</b>	7,02	66,67
<b>(Ruiz, 2014)</b>	4,80	48,24

**Tabla 3.** Valores de eficacia solubilizante y Kc correspondientes al equilibrio de complejación ACZ-HP- $\beta$ -CD.

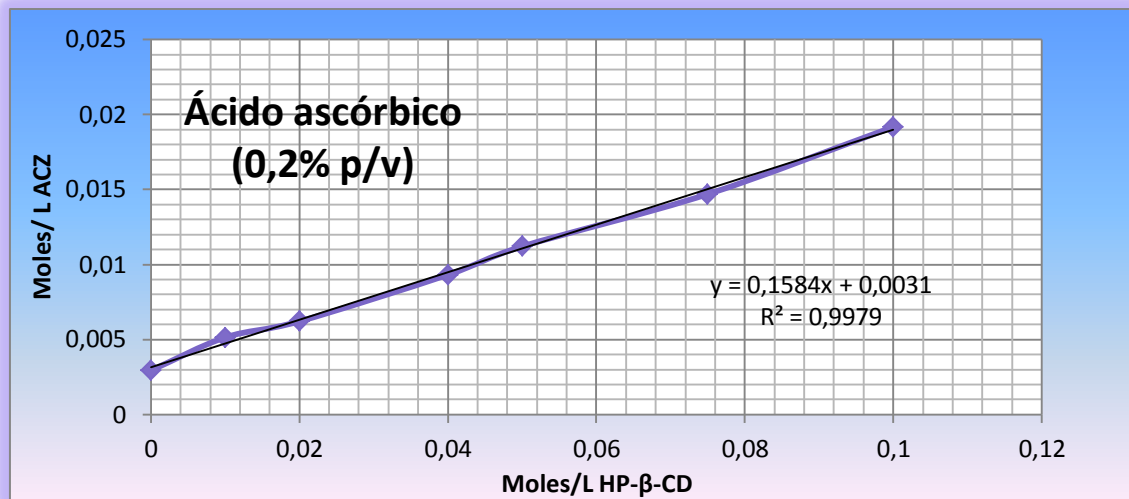
Los resultados en general, muestran una buena concordancia, obteniéndose valores de eficacias solubilizantes y constantes de complejación del mismo orden.

#### 4.1.2 Estudio del efecto de la concentración de HP- $\beta$ -CD en la solubilidad de ACZ en presencia de los diferentes agentes antioxidantes

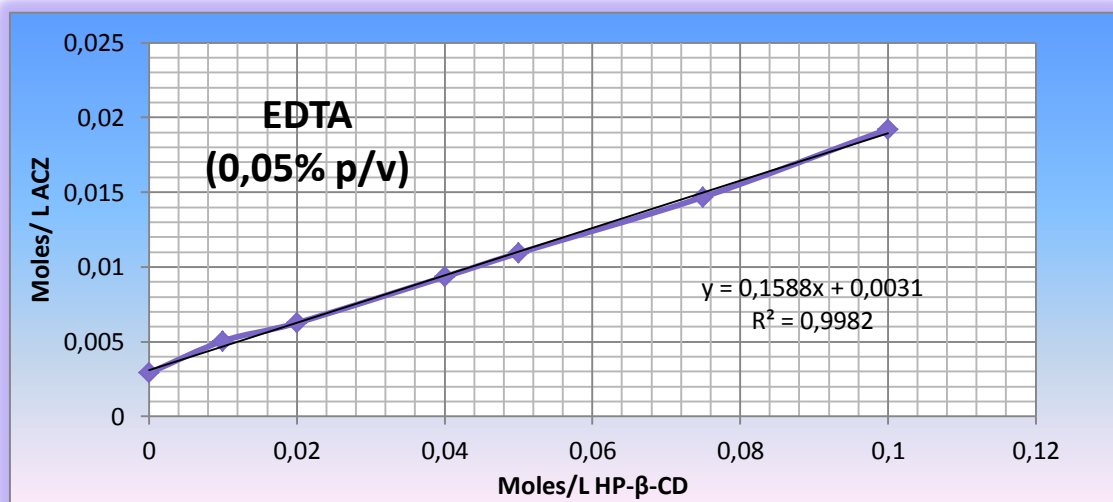
##### 4.1.2.1 Influencia sobre el tipo de diagrama de solubilidad

En las figuras 14, 15, 16 y 17 se recogen los diagramas de solubilidad de fases en agua de ACZ con HP- $\beta$ -CD en presencia de una concentración fija de agente antioxidante que varía en función de su concentración recomendada para las formulaciones oftálmicas (0,2% p/v de ácido ascórbico, 0,05% p/v de EDTA, 0,01% p/v de metabisulfito sódico y 1% p/v de ácido cítrico).

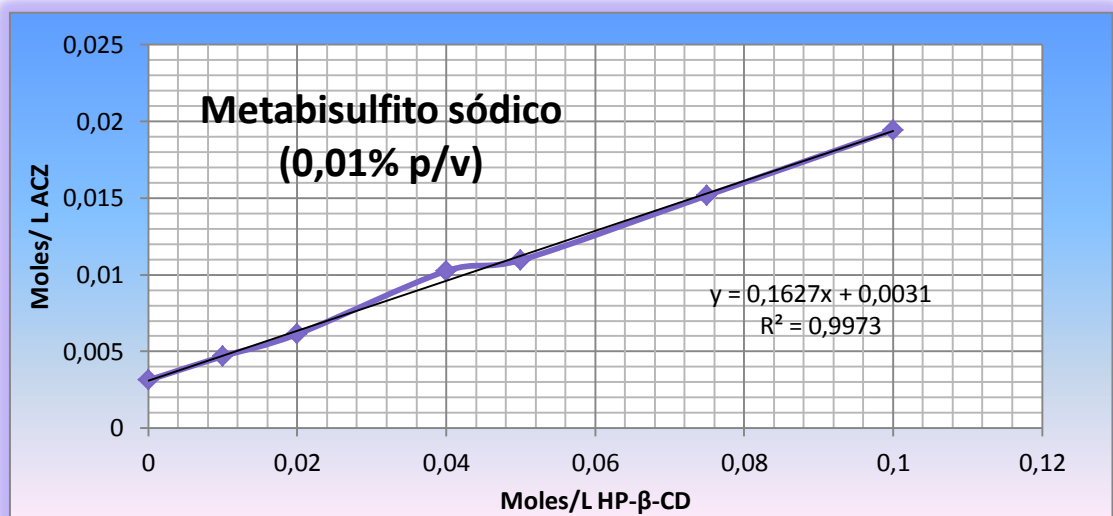
Los resultados muestran que la incorporación de los antioxidantes no modifica el tipo de diagrama de solubilidad obtenido, en los cuatro casos siguen siendo de tipo  $A_L$ , es decir, el complejo formado no presenta un límite de solubilidad al menos en el intervalo de concentraciones ensayado. Estos resultados serían indicativos de que los antioxidantes estudiados no ejercen una influencia significativa en el equilibrio de complejación ACZ-HP- $\beta$ -CD.



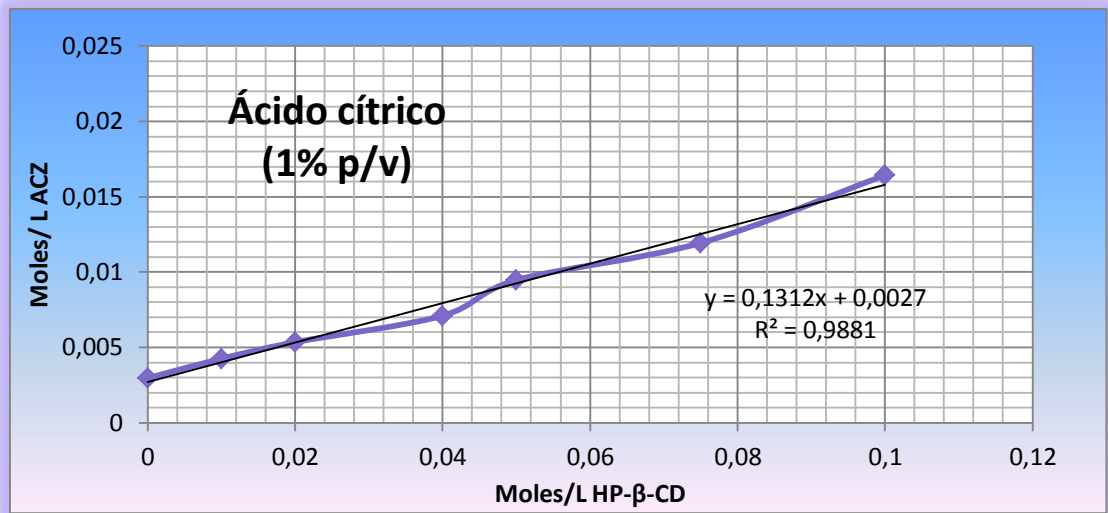
**Figura 14.** Diagrama de solubilidad ACZ en presencia de HP-β-CD y ácido ascórbico.



**Figura 15.** Diagrama de solubilidad ACZ en presencia de HP-β-CD y EDTA.



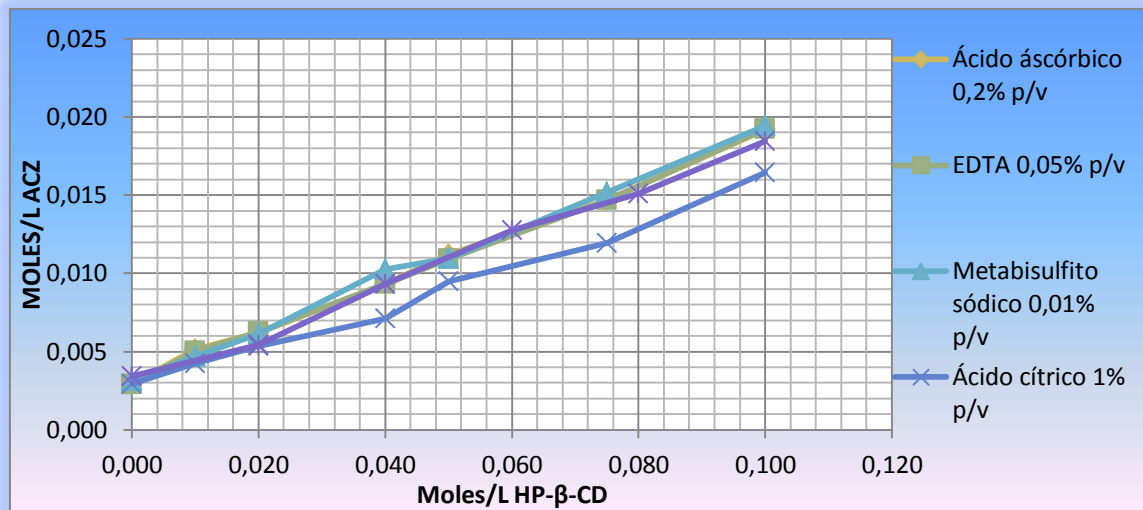
**Figura 16.** Diagrama de solubilidad ACZ en presencia de HP-β-CD y metabisulfito sódico



**Figura 17.** Diagrama de solubilidad ACZ en presencia de HP-β-CD y ácido cítrico.

Cuando superponemos de forma conjunta los resultados de los 5 ensayos de solubilidad realizados (figura 18), se observa que los perfiles obtenidos para el EDTA, el metabisulfito sódico y el ácido ascórbico son prácticamente superponibles entre sí y respecto al que se obtiene en ausencia de antioxidante. Esto coincide con antecedentes bibliográficos de sistemas ternarios, en los que se pone de manifiesto que la incorporación de un tercer componente al sistema no modifica el tipo de diagrama obtenido (Jansook y Loftsson, 2009).

Sin embargo, cuando se utiliza ácido cítrico, los resultados obtenidos muestran un leve descenso en la solubilidad del fármaco, más acentuado cuanto mayor es la concentración de HP-β-CD. Estos resultados parecen indicar que al incorporar el ácido cítrico al sistema binario ACZ-HP-β-CD se produce un efecto competitivo de este aditivo por ocupar la cavidad de la HP-β-CD, lo que se traduciría en una menor complejación efectiva del fármaco en la cavidad de la HP-β-CD y por tanto un descenso en los valores de solubilidad.



**Figura 18.** Diagramas de solubilidad de la ACZ en presencia de HP-β-CD y los antioxidantes ensayados.

#### 4.1.2.2 Influencia sobre la Kc y eficacia solubilizante

Otro aspecto a tener en cuenta sería la posible modificación en la solubilidad del fármaco, que podría ejercer el propio antioxidante. En efecto, aparece en recogido en la bibliografía que en los sistemas ternarios como es nuestro caso, la presencia de un tercer componente a veces puede modificar el valor de solubilidad del fármaco ( $S_0$ ), produciendo tanto un incremento como un descenso (Ono y cols., 2001; Mura y cols., 2003; Pinakin y cols., 2015). De hecho estudios realizados con ACZ, muestran que la presencia de un agente conservante como el Nipagín sódico, a una concentración del 0,1% p/v, mejora la solubilidad acuosa de la ACZ (Ruiz, 2014). Resulta evidente que en caso de producirse una modificación en la solubilidad acuosa del fármaco por la presencia exclusiva del aditivo, esta modificación tal y como se comentó en el apartado de introducción, podría modificar los valores de constante de complejación y eficacia solubilizante de los sistemas en estudio, por lo que es necesario poner en evidencia este aspecto antes de proceder a la determinación de estos parámetros. Nuestros resultados, indican que no se produce modificación significativa en la solubilidad acuosa del fármaco, por la presencia del agente antioxidante, con lo cual este aspecto, no va a afectar al cálculo de ambos parámetros.



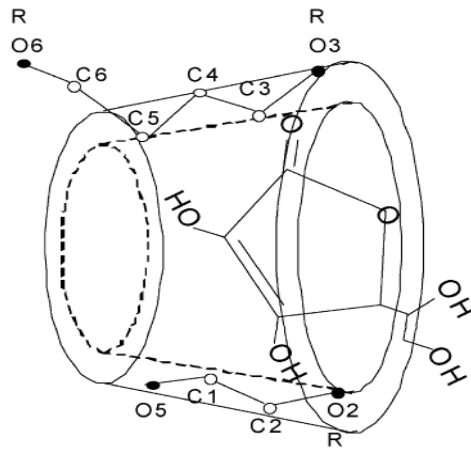
Las eficacias solubilizantes a una concentración 0,1 M de HP- $\beta$ -CD, las  $K_c$  y la solubilidad intrínseca del fármaco ( $S_0$ ) en presencia y ausencia de agente antioxidante calculadas tal y como se indicó el apartado de introducción aparecen recogidas en la tabla 4.

Antioxidante	Eficacia solubilizante 0.1 M HP- $\beta$ -CD	$K_c$ ( $M^{-1}$ )	$S_0$ (mM)
<b>Sin antioxidante</b>	5,81	58,63	3,01
<b>Ácido ascórbico</b>	6,53	64,02	2,93
<b>EDTA</b>	6,62	64,99	2,90
<b>Metabisulfito sódico</b>	6,21	62,10	3,05
<b>Ácido cítrico</b>	5,56	51,09	2,95

**Tabla 4.** Valores de Eficacia solubilizante,  $K_c$  y  $S_0$  correspondiente al equilibrio de complejación ACZ-HP- $\beta$ -CD.

Si bien es cierto que con el ácido cítrico se obtienen los menores valores de eficacia solubilizante y de  $K_c$ , hemos de señalar que dichas diferencias no son significativas. Similares resultados se han obtenido con carvedilol al utilizar ácido cítrico y  $\beta$ -CD (Pokharkar y cols., 2009).

Parece extraño, que ninguno de los agentes antioxidantes, sufra un proceso de complejación significativo en la cavidad de la CD, a pesar de tener una estructura muy adecuada para ello como ocurre con el ácido ascórbico, y estar recogida en la bibliografía dicho proceso de complejación (Garnero y Longhi, 2007). Así, en la figura 19, se esquematiza la posible estructura del complejo de inclusión del ácido ascórbico en la cavidad de la HP- $\beta$ -CD establecida mediante estudios de RMN. Además estos autores calcularon una constante de complejación de  $82,87 M^{-1}$  para dicho complejo a partir de su constante de degradación, utilizando para ello una concentración de ácido ascórbico de 1,1% p/v. En nuestro caso, la ausencia de complejación puede ser debida a la baja concentración a la que se utilizan los agentes antioxidantes que en el caso del ácido ascórbico es 5 veces menos que la que emplean estos autores. Esto hace que el proceso de complejación se produzca en una menor extensión y no se modifique de forma significativa ni la constante de complejación ni la eficacia solubilizante.



**Figura 19.** Complejación del ácido ascórbico en la cavidad de la HP-β-CD  
(Garnero y Longhi, 2007)

## 5 CONCLUSIONES

1. El estudio de complejación ACZ-HP-β-CD en medio acuoso mediante diagramas de solubilidad mostró un diagrama tipo  $A_L$  de Higuchi con una constante de complejación de  $58,63 \text{ M}^{-1}$  y una eficacia solubilizante a 0,1 M de CD de 5,81, concordantes con los recogidos en la bibliografía para dicho fármaco.
2. La incorporación de EDTA, ácido ascórbico, ácido cítrico o metabisulfito sódico no modifica el tipo de diagrama, es decir el complejo obtenido es del tipo  $A_L$  lo que indica que no presenta un límite de solubilidad, al menos en las concentraciones ensayadas.
3. Los aditivos empleados, no ejercen influencia significativa sobre la solubilidad acuosa del fármaco en ausencia de HP-β-CD, oscilando estos valores entre 2,90 y 3,05 mM.
4. A pesar de la posibilidad de que los antioxidantes utilizados puedan ser complejados en el interior de la cavidad de la CD, su adición a la formulación, no modifica el equilibrio de complejación ACZ-HP-β-CD ( $K_c$  y eficacia solubilizante) de forma significativa, situación que podemos atribuir a las bajas concentraciones ensayadas para dichos aditivos.
5. En base a estos resultados podemos concluir que cualquiera de los antioxidantes ensayados pues ser utilizado en el desarrollo de una formulación acuosa de ACZ, sin que modifique de forma significativa el proceso de complejación fármaco-CD, aunque en base a los resultados el empleo del ácido cítrico sería el menos adecuado.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

- Abad N. Liposomas ultradeformables de acetazolamida para su administración oftálmica: Diseño y estudios de caracterización. Trabajo fin de master, CITURME. Universidad de Sevilla. Sevilla. 2012.
- Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. CIMA: Centro de Información Online de Medicamentos de la AEMPS [en línea]. [Consultado en Abril 2016]. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/fichasTecnicas.do?metodo=detalleForm>.
- Ayala JF, Del-Toro L, Alvarez E, González GA. High Relative Humidity In-Package of Fresh-Cut Fruits and Vegetables: Advantage or Disadvantage Considering Microbiological Problems and Antimicrobial Delivering Systems?. J. Food Sci. 2008; 73 (4): 41-47.
- Becker B. Decrease in intraocular pressure in man by a carbonic anhydrase inhibitor, Diamox. Am J Ophthalmol. 1954; 37 (1): 13-15.
- Bendich A, Machlin LJ, Scandurra O, Burton GW, Wayner DDM. The antioxidant role of vitamin C. Adv. Free Rad. Bio. & Med. 1986; 2 (2): 419-444.
- Cabanzo L. Desarrollo de una formulación de transfesomas de acetazolamida y timolol para administración oftálmica. Trabajo fin de master, CITURME. Universidad de Sevilla. Sevilla. Junio 2013.
- Chan LW, Kurup TR, Muthaiah A, Thenmozhiyal JC. Interaction of p-hydroxybenzoic esters with beta-cyclodextrin. Int J Pharm, 2000; 195 (1-2): 71-79.
- Chao Y, Zhifang L, Zhengyu J. Characterization of an Inclusion Complex of Ethyl Benzoate with Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin. Food Chem. 2013; 152: 140-145.
- Danciu C, Soica C, Oltean M, Avram S, Borcan F, Csanyi E et al. Genistein in 1:1 Inclusion Complexes with Ramified Cyclodextrins: Theoretical, Physicochemical and Biological Evaluation. Int. J. Mol. Sci. 2014; 15 (2): 1962-1982.
- Drugbank Database. Open Data Drug & Drug Target Database: Acetazolamide. 2013. [Consultado en Marzo 2016]. Disponible en: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00819>

- Echezarreta MM. Utilidad de las ciclodextrinas en la resolución de problemas de incompatibilidad de fármacos. Aplicaciones en el desarrollo de formas de administración oftálmica. Tesis doctoral, departamento de Farmacia y Tecnología Farmaceutica. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. 1998.
- Enever RP, Li Wan A, Shotton E. Factors influencing decomposition rate of amytriptyline hydrochloride in aqueous solution. J. Pharm. Sci. 1977; 66 (8): 1087–1089.
- Facultad de ciencias naturales (FCN). Universidad nacional de la Patagonia. Mucosa ocular. 2010. [Consultado en Marzo 2016]. Disponible en: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/tecnofarma/wpcontent/uploads/2010/10/Mu cosa-ocular.pdf>
- Farmacologia oculare. Tossicità dei conservanti tradizionali: altri conservanti. 2009. [Consultado en Marzo 2016]. Disponible en <http://www.farmacologiaoculare.com/2009/05/26/tossicita-dei-conservanti-tradizionali-altri-conservanti/>
- Faulí C, Aroztegui M, Azemar N, Barbe C, Bel E, Muñoz A et al. Tratado de Farmacia Galénica. 1ª ed. Madrid: Luzán; 1993.
- Frömming KH, Szejtli J. Cyclodextrins in Pharmacy. 5ª ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1994.
- Garnero C, Longhi M. Study of ascorbic acid interaction with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and triethanolamine, separately and in combination. J. Pharm Biomed. Anal. 2007; 45 (4): 536-545.
- Gil A, Sánchez F. Tratado de nutrición, bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. 2ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2010.
- 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.
- Goodman LS, Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11 ed. Mexico: McGraw Hill; 2006.

- Granero G, Maitre M, Garnero C, Longhi M. Synthesis, characterization and in vitro release studies of a new acz- hpb- tea inclusion complex. Eur J Med Chem. 2008; 43(3): 464-470.
- Hablemos claro. Metabisulfito de sodio, aspectos técnicos. 2013. [Consultado en Mayo 2016]. Disponible en: <http://www.hablemosclaro.org/ingreperia/metabisulfito-de-sodio.aspx#.V2CFPdmLTIU>
- Higuchi T, Connors KA. Phase-solubility techniques. Adv. Anal. Chem. Instr. 1965; 4: 117- 212.
- Hjorth H. Photostability of drugs and drugs formulation. 2ª ed. Florida: CRC Press LLC; 2004.
- INFAC Información farmacoterapéutica de la comarca. Tratamiento farmacológico del glaucoma primario de ángulo Abierto. Boletín de información farmacoterapéutica. 2010; 18 (7): 33-36.
- Instituto Químico Biológico. Diccionario ilustrado de términos médicos: Acetazolamida. 2014. [Consultado en Marzo 2016]. Disponible en: <http://www.iqb.es/diccio/a/ac1.htm>.
- Jansook P, Loftsson T. CDs as solubilizers: Effects of excipients and competing drugs. Int J Pharm. 2009; 379 (1): 32-40.
- Kaur IP, Smitha R, D. Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutic, Int. J. Pharm. 2002; 248 (1-2): 1-14.
- Lázaro PS, Rosa A. Evaluación de electrodos basados en SnO<sub>2</sub> dopados con Sb, Ru y TiO<sub>2</sub>, fabricados por la técnica Pechini. Rev. Soc. Quím. Perú. 2013; 79 (2): 150-161.
- Lehner SJ, Müller BW, Seydel JK. Interactions between p-hydroxybenzoic acid esters and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and their antimicrobial effect against Candida albicans. Int J Pharm. 1993; 93 (1-3): 201-208.
- Loftsson T, Hreinsdóttir D, Másson M. Evaluation of Cyclodextrin Solubilization of Drugs. Int J Pharm. 2005; 302 (1-2): 18-28.
- Loftsson T, Järvinen T. Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery. Adv Drug Deliver Rev. 1999; 36 (1): 59-79.

- Loftsson T, Stefánsson E. Effect of the cyclodextrins as topical drug delivery to the eye. *Drug Develop. Ind. Pharm.* 1997; 23 (5): 473-481.
- Ludwig A, Van Ooteghem M. The study of the precorneal dynamics of ophthalmic solutions by fluorophotometry. *Pharm acta Helv.* 1986; 61 (8): 236-240.
- Maren TH, Jankowska L, Sanyal G, Edelhauser HF. The transcorneal permeability of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors and their effect on aqueous humor secretion. *Exp. Eye Res.* 1983; 36 (4): 457-479.
- Moyano JR, Ginés JM, Arias MJ, Rabasco AM. Utilidad de Ciclodextrinas y Derivados en el Campo Farmacéutico (I): Industria Farmacéutica, Investigación y tecnología. 1994; 9 (5): 71-76.
- Munson JW, Hussain A, Bilous R. Precautionary note for use of bisulfite in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Sci.* 1977; 66 (12): 1775–1776.
- Mura P, Maestrelli F, Cirri M. Ternary systems of naproxen with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and aminoacids. *Int. J. Pharm.* 2003; 260 (2): 293-302.
- Nema S, Brendel RJ, Washkuhn RJ. Excipients - their role in parenteral dosage forms. En: Swarbrick J/editor. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 3ª ed. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002. p. 1164–1187.
- Nortem biotechnology. Ficha Técnica Ácido Cítrico Líquido. 2015. [Consultado en Abril 2016]. Disponible en: <http://www.nortemchem.com/ficha-tecnica-acido-citrico-liquido/>
- Ono N, Hirayama F, Arima H, Uekama K. Analysis of the phase solubility diagram of a phenacetin/competitor/beta-cyclodextrin ternary system, involving competitive inclusion complexation. *Chem. Pharm. Bull.* 2001; 49 (1): 78-81.
- Oswaldo C. Desarrollo y validación de un método analítico por HPLC para la cuantificación de acetazolamida y timolol en transetosomas. Aplicación del *quality by desing* al diseño y desarrollo de una formulación optimizada. Trabajo fin de master. Universidad de Sevilla. Sevilla. 2013.

- Parasrampur J, Das V. 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.
- Pérez-Barrales MJ, Díaz-Stévez F, Ginés JM, Moyano JR, Arias MJ, Rabasco AM. Inclusion Compound of Acetazolamide with Different Cyclodextrins in Liquid and Solid State, Proceedings 7<sup>th</sup> International Conference on Pharmaceutical Technology, Budapest, Mayo 1995, p. 613-614.
- Pinakin P, Narendra P, Sachin S, Manish K. Formulation and characterization of ternary complex of poorly soluble duloxetine hydrochloride. *J. App. Pharm. Sci.* 2015; 5 (6): 88-96.
- Pokharkar V, Khanna A, Venkatpurwar V, Dhar S, Mandpe L. Ternary complexation of carvedilol,  $\beta$ -cyclodextrin and citric acid for mouth-dissolving tablet formulation. *Acta Pharm.* 2009; 59 (2): 121-132.
- Porth CM. *Fisiopatología, salud-enfermedad: un enfoque conceptual*. 7<sup>a</sup> ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2007.
- Quimitube. ¿Qué es la dureza del agua y cómo se determina en el laboratorio?. 2015. [Consultado en Abril 2016]. Disponible en <http://www.quimitube.com/dureza-del-agua>
- Real Farmacopea Española. III ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 2007.
- Rowe R, Sheskey P, Quinn M. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6<sup>a</sup> ed. London: Pharmaceutical Press; 2009.
- Ruiz J. Influencia de diferentes conservantes en equilibrio de complejación ACZ-HP-  $\beta$ -CD: Aplicación al desarrollo de una formulación oftálmica. Trabajo fin de grado. Universidad de Sevilla. Sevilla. 2014.
- Sings of the times. La verdad sobre la vitamina C y el cáncer. 2013. [Consultado en Abril 2016]. Disponible en: <https://es.sott.net/article/19930-La-verdad-sobre-la-vitamina-C-y-el-cancer>
- Stella VJ, Rajewski RA. Cyclodextrins: Their future in drug formulation and delivery. *Pharm. Resh.* 1997; 14 (5): 556.

- Szejtli J. Cyclodextrins and their inclusion complexes. 2ª Ed. Budapest: Akademiai Kiado; 1982.
- Torralba A. Obtención y análisis termodinámico de los complejos de inclusión ácido ferúlico-ciclodextrinas. Trabajo fin de master. Universidad tecnológica de la mixteca. México. 2014.
- Vademecum. Madrid, España. [en línea]. [Consultado en Abril 2016]. Disponible en: [http://www.vademecum.es/medicamentos-a\\_1](http://www.vademecum.es/medicamentos-a_1).
- Van-Doorne H. Interaction between cyclodextrins and ophthalmic drugs. Eur. J Pharm. Biopharm. 1993; 39 (4): 133–139.
- Vila-Jato JL, Alonso AC, Irache JM, Ballesteros P, Lacasa C, Frutos P et al. Tecnología farmacéutica Vol. II Formas Farmacéuticas. 1ª ed. Madrid: Síntesis; 1997.
- Xinzhen D, Rong Z, Xiaojuan T, Fangping W, Hui C. A Study of Cage-type Inclusion Complexes of Modified  $\beta$ -cyclodextrins with 2'-ethylhexyl-4-(N,N-dimethylamino)-benzoate. Acta Phys.-Chim. Sin. 2006; 22 (9): 1065-1070.