



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA

ESTUDIOS DE PERMEACIÓN DE ACETAZOLAMIDA
DESDE UNA FORMULACIÓN LÍQUIDA DE
ADMINISTRACIÓN OFTÁLMICA

GONZALO CASTILLO PALMA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO

DOBLE GRADO EN FARMACIA Y ÓPTICA Y OPTOMETRÍA PROMOCIÓN 2011/2017

ESTUDIOS DE PERMEACIÓN DE ACETAZOLAMIDA

DESDE UNA FORMULACIÓN LÍQUIDA DE ADMINISTRACIÓN OFTÁLMICA

TRABAJO EXPERIMENTAL

GONZALO CASTILLO PALMA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

TUTELADO POR EL DOCTOR: JUAN MANUEL GINÉS DORADO

Lugar de presentación: Sala de Juntas

Fecha de presentación: 6 de Julio de 2017

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACZ: acetazolamida.

AEDT: ácido etilendiaminotetraacético.

BCS: Sistema de Clasificación Biofarmacéutica.

CDs: ciclodextrinas.

HP β CD: hidroxipropil-beta-ciclodextrina.

PIO: presión intraocular.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la ACZ.

Tabla 2. Composición de las diferentes formulaciones oftálmicas a ensayar.

Tabla 3. Parámetros del estudio de permeación para las 4 formulaciones ensayadas.

Tabla 4. Valores de Kc correspondiente al complejo ACZ-HP β CD.

Figura 1. Producción del humor acuoso en el globo ocular.

Figura 2. Estructura de la ACZ.

Figura 3. Representación de las partes del a) film lagrimal y b) córnea.

Figura 4. Esquema del proceso de permeación de un fármaco a través de la córnea.

Figura 5. Estructura química de las CDs naturales.

Figura 6. Esquema de la formación de un complejo de inclusión.

Figura 7. Estructura de la 2-HP β CD.

Figura 8. Esquema del proceso de absorción de un fármaco administrado vía ocular en forma de complejo de inclusión con CDs.

Figura 9. Esquema de una celda de Franz utilizada para los ensayos de permeación.

Figura 10. Equipo termostatzado para un estudio de permeación.

Figura 11. Porcentaje de ACZ permeado en función del tiempo para las 4 formulaciones ensayadas.

Figura 12. Perfiles de permeación para las formulaciones ensayadas.

Figura 13. Fotografía al microscopio electrónico de barrido de una membrana de nitrato de celulosa.

Figura 14. Perfiles de permeación para las formulaciones ensayadas hasta llegar al estado estacionario.

Figura 15. Perfiles de permeación de los tres ensayos realizados con las formulaciones 1 y 2.

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 muy poco soluble y poco permeable. Actualmente el grupo de investigación CTS 612 "Investigación y Desarrollo Farmacotécnico de Medicamentos" de la Junta de Andalucía, se encuentra desarrollando una formulación acuosa de administración oftálmica para este preparado utilizando ciclodextrinas (CDs), y más en concreto, con la hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP β CD) como excipiente solubilizante gracias a su poder complejante. Dicha formulación, además, incluye ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) como antioxidante/promotor de la absorción, cloruro de benzalconio como conservante, cloruro sódico como isotonzante y acético/fosfato como tampón.

El propósito del presente trabajo de investigación consiste en la evaluación biofarmacéutica de dicha formulación utilizando membranas sintéticas en celdas de Franz, mediante la determinación de los principales parámetros que cuantifican el proceso de permeación: porcentaje de fármaco permeado a las 24 horas, flujo de permeación en el estado estacionario y el coeficiente de permeabilidad.

Los resultados obtenidos mostraron que la incorporación de la HP β CD a la formulación lograba un efecto solubilizante, sin limitar el proceso de permeación, llegando a casi triplicar el porcentaje de fármaco permeado en 24 horas, respecto a la formulación tipo suspensión obtenida en ausencia de HP β CD. También se puso de manifiesto que el resto de excipientes de la formulación no ejercía efecto neto significativo en dicho proceso.

Palabras clave: glaucoma, acetazolamida, ciclodextrina, permeación, celda de Franz.

ABSTRAC

The acetazolamide is a carbonic anhydrase inhibitor used in the therapy against the glaucoma. This drug doesn't exist as liquid form to ocular administration because it isn't water-soluble and hasn't got permeability enough. Nowadays, the investigation group CTS 612 "Investigation and Pharmacological Development of Medication", which is led by Andalus Administration, is working in a water-soluble formulation with cyclodextrins specifically with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP β CD). This cyclodextrin improve the solubility thanks to complexes for. The new formulation contains AEDT, a powerful antioxidant which improve the absorption too, sodium chloride as a isotonzant and acetic/phosphate to adjust the pH.

The aim of the present investigation consists in the biopharmaceutical evaluation of the new formulation using syntethic membrane in Franz cells, by the determination of the mean parameters which quantify the permeation process: % permeation, steady-state flux and apparent permeability coefficient.

The results obtained showed that the incorporation of HP β CD into the formulation achieved a solubilizing effect, without limiting the permeation process, reaching almost triplicate the percentage of drug permeated in 24 hours, with respect to the suspension obtained in the absence of HP β CD. It was also revealed that the other excipients of the formulation had no significant net effect in said process.

Keywords: glaucoma, acetazolamide, cyclodextrin, permeation, Franz cell.

ÍNDICE

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1.1 | GLAUCOMA..... | 5 |
| 1.1.1 | CONCEPTO | 5 |
| 1.1.2 | FISIOPATOLOGÍA DEL GLAUCOMA | 5 |
| 1.1.3 | TRATAMIENTO DEL GLAUCOMA..... | 6 |
| 1.2 | ACETAZOLAMIDA (ACZ) | 6 |
| 1.2.1 | ANTECEDENTES | 7 |
| 1.2.2 | ESTRUCTURA QUÍMICA..... | 7 |
| 1.2.3 | MECANISMO DE ACCIÓN | 8 |
| 1.2.4 | CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y FARMACOCINÉTICAS..... | 8 |
| 1.3 | DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN LÍQUIDA DE ADMINISTRACIÓN OFTÁLMICA DE ACZ..... | 9 |
| 1.3.1 | FACTORES QUE INFLUYEN EN LOS MECANISMOS DE PERMEACIÓN DE LOS FÁRMACOS A TRAVÉS DE LA CórNEA | 9 |
| 1.3.1.1 | Factores derivados de la anatomía y fisiología ocular | 9 |
| 1.3.1.2 | Factores derivados de la naturaleza del fármaco | 11 |
| 1.3.1.3 | Factores que influyen en la retención del fármaco..... | 12 |
| 1.3.2 | ASPECTOS GALÉNICOS DE LA FORMULACIÓN | 14 |
| 1.3.2.1 | Vehículo..... | 14 |
| 1.3.2.2 | Corrector del pH..... | 14 |
| 1.3.2.3 | Isotonizante..... | 15 |
| 1.3.2.4 | Viscosizante..... | 15 |
| 1.3.2.5 | Conservante | 16 |
| 1.3.2.6 | Antioxidante / promotor de la absorción..... | 16 |
| 1.3.2.7 | Solubilizante | 17 |
| 1.4 | EVALUACIÓN BIOFARMACÉUTICA DE LAS FORMAS DE DOSIFICACIÓN OFTÁLMICAS | 19 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1.4.1 | ESTUDIOS DE PERMEACIÓN IN VITRO UTILIZANDO MEMBRANAS ARTIFICIALES..... | 20 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 21 |
| 3 | METODOLOGÍA..... | 22 |
| 3.1 | MATERIALES..... | 22 |
| 3.1.1 | FORMULACIÓN | 22 |
| 3.1.2 | FASE MÓVIL PARA HPLC | 23 |
| 3.1.3 | MEMBRANA PARA EL ENSAYO DE PERMEACIÓN | 23 |
| 3.2 | MÉTODOS | 23 |
| 3.2.1 | PREPARACIÓN DEL TAMPÓN CÍTRICO/FOSFATO..... | 23 |
| 3.2.2 | ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES OFTÁLMICAS A ENSAYAR | 24 |
| 3.2.3 | SOLUCIÓN COMPARTIMENTO RECEPTOR DE LA CELDA DE FRANZ Y SOLUCIÓN REPONEDORA..... | 25 |
| 3.2.4 | PERMEACIÓN IN VITRO MEDIANTE CELDAS DE FRANZ | 25 |
| 3.2.5 | CUANTIFICACIÓN DE ACZ | 26 |
| 4 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 27 |
| 4.1 | ESTUDIO DE PERMEACIÓN | 27 |
| 4.1.1 | INFLUENCIA DEL SISTEMA FISICOQUÍMICO..... | 31 |
| 4.1.2 | INFLUENCIA DEL pH | 33 |
| 4.1.3 | INFLUENCIA DEL RESTO DE COMPONENTES DE LA FORMULACIÓN | 34 |
| 5 | CONCLUSIONES..... | 35 |
| 6 | BIBLIOGRAFÍA..... | 36 |

1 INTRODUCCIÓN

1.1 GLAUCOMA

1.1.1 CONCEPTO

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

Si no se trata, la presión intraocular puede aumentar produciendo isquemia y degeneración del nervio óptico, lo que conduce a una ceguera progresiva. Constituye la segunda causa principal de ceguera en el mundo (Quigley y Broman, 2006). Se calcula que un millón de personas presentan glaucoma, de las cuales el 50% no se encuentran diagnosticadas debido a que esta enfermedad puede cursar de forma asintomática hasta estadios avanzados de la misma (Rieger y Rubio, 2013).

1.1.2 FISIOPATOLOGÍA DEL GLAUCOMA

La presión PIO es regulada sobre todo por el humor acuoso, que ocupa el segmento anterior del globo ocular (figura 1). Éste, proporciona nutrientes al cristalino y a la parte posterior de la córnea.

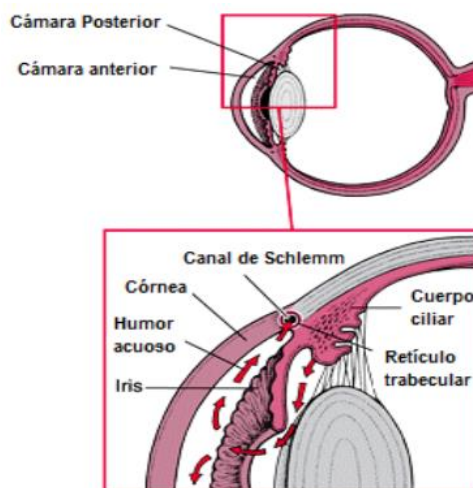


Figura 1. Producción del humor acuoso en el globo ocular.

(www.merckmanuals.com/professional/eye_disorders/glaucoma/overview_of_glaucoma.html)

El cuerpo ciliar presente en la cámara posterior, produce el humor acuoso que fluye entre la superficie anterior del cristalino y la posterior del iris, a través de la pupila y en dirección a la cámara anterior. Sale del ojo a través del ángulo iridocorneal situado entre iris y córnea. En este sitio, el líquido se filtra a través del retículo trabecular e ingresa al canal de Schlemm para regresar a la circulación venosa. Así, la PIO se puede incrementar por el aumento de producción del humor acuoso, o bien, por una interferencia en la salida de este líquido de la cámara anterior; esta última es la causa más frecuente.

1.1.3 TRATAMIENTO DEL GLAUCOMA

Los métodos convencionales implantados para el tratamiento del glaucoma incluyen los de tipo: farmacológico, tratamientos con láser y procedimientos quirúrgicos.

El tratamiento farmacológico está dirigido a disminuir la producción de humor acuoso en el cuerpo ciliar y/o aumentar el flujo de salida a través del retículo trabecular y de la vía no convencional (vía uveoescleral) y así, disminuir la presión intraocular (Tártara y cols., 2008).

Algunos fármacos utilizados en el tratamiento a largo plazo de glaucoma incluyen: bloqueantes β -adrenérgicos, mióticos, agonistas α -adrenérgicos, análogos de las prostaglandinas e inhibidores de la anhidrasa carbónica entre otros. Estos últimos son de los más utilizados, ya que esta enzima tiene un papel importante en la formación del humor acuoso. Dentro de ellos se encuentra la acetazolamida (ACZ).

1.2 ACETAZOLAMIDA (ACZ)

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

A pesar de la alta biodisponibilidad oral se ha clasificado a ACZ en la clase IV del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS), lo cual indica la baja solubilidad (0,72 mg/mL en agua a 25 °C) y permeabilidad de este fármaco (Mora y cols., 2015). Estas dos razones, han limitado el desarrollo de una formulación oftálmica líquida efectiva de ACZ.

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, brinzolamida, aminozolamida y MK-927 (Petchimuthu y Narayanan, 2013).

Sin embargo, hay que señalar que sus propiedades fisicoquímicas siguen siendo una limitación a la hora de conseguir una penetración ocular adecuada a través de la córnea, por lo que la concentración de fármaco que alcanza el cuerpo ciliar no llega a ser suficiente para conseguir una disminución de la presión intraocular efectiva, es por esto que se debe recurrir a una terapia en combinación con otros fármacos (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 2 se recoge su estructura.

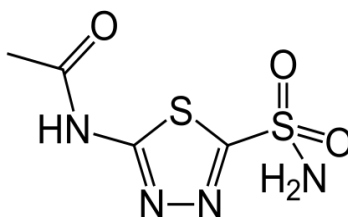
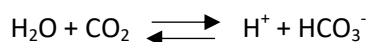


Figura 2. Estructura de la ACZ (IQB, 2014).

1.2.3 MECANISMO DE ACCIÓN

La anhidrasa carbónica es una enzima presente en el ojo que, de forma reversible, cataliza la reacción de H₂O y CO₂ para formar ácido carbónico y, posteriormente, el ión bicarbonato (HCO₃⁻), como se muestra en la siguiente reacción:



El ión HCO₃⁻ 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 HCO₃⁻ y, por tanto, el flujo de Na⁺ y H₂O 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 FISICOQUÍMICAS Y FARMACOCINÉTICAS

En la tabla 1 se recopilan algunas de las propiedades fisicoquímicas de nuestro fármaco en estudio.

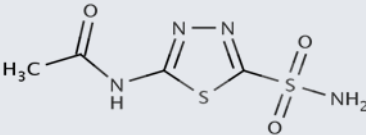
| | |
|---------------------------|--|
| Fórmula molecular | C ₄ H ₆ N ₄ O ₃ S ₂ |
| Peso molecular | 222,245 g/mol |
| Nombre químico | N-(5-sulfanoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-acetamida |
| Estructura |  |
| Longitud de onda | 265 nm |
| pK_a | 7,4 |
| Solubilidad acuosa | 0,72 mg/mL |

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

Este fármaco 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. 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y las concentraciones plasmáticas tras la ingestión oral de una misma dosis son variables.

Así, el desarrollo de la formulación tópica de ACZ puede conducir a la abolición total de los efectos secundarios sistémicos observados con el uso oral de ACZ. Los intentos, en este sentido, han sido notables, a pesar de los fracasos iniciales. Como ya hemos indicado, la principal dificultad reside en que 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.

1.3 DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN LÍQUIDA DE ADMINISTRACIÓN OFTÁLMICA DE ACZ

Debido a las peculiares características de la absorción ocular y a la inevitable pérdida de parte de la dosis administrada, son diversos los factores a tener en cuenta a la hora del desarrollo de una forma farmacéutica líquida de administración oftálmica con garantías de éxito.

1.3.1 FACTORES QUE INFLUYEN EN LOS MECANISMOS DE PERMEACIÓN DE LOS FÁRMACOS A TRAVÉS DE LA CórNEA

Son varios los factores que afectan al proceso de permeación ocular de un fármaco, ya sean derivados de la naturaleza ocular, del fármaco administrado, o de la retención del fármaco en la zona de absorción.

1.3.1.1 *Factores derivados de la anatomía y fisiología ocular*

Desde un punto de vista fisiológico existen cinco regiones en el ojo, que hemos de considerar a la hora de diseñar una forma farmacéutica de administración ocular: la córnea, las glándulas lagrimales, la conjuntiva, la esclerótica y el film lagrimal (Vercruyse y Córdoba, 2012).

El film lagrimal o área precorneal es una fina película que recubre al ojo. Desde un punto de vista fisiológico, mantiene la humedad del globo ocular, además de permitir el paso de oxígeno a la córnea. Está compuesto por 3 capas (figura 3a).

- Capa lipídica: tiene un espesor de aproximadamente 0,1 μm , y está compuesta de triglicéridos, ceras, colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos libres.

- Capa acuosa: constituye aproximadamente el 90% del film lagrimal. Contiene cadenas grandes y pequeñas de mucina que con la fricción se reorganizan para adaptarse a la viscosidad.
- Capa de mucina: posee un alto porcentaje de mucina, la cual es necesaria para facilitar su adhesión a la córnea y proporcionar extensibilidad a la película.

La córnea es un tejido transparente, de aproximadamente 0,5 mm de espesor en su parte central. Está formada por cinco capas de células bien diferenciadas (figura 3b).

- El epitelio: esta capa presenta un espesor de 50-90 μm y está formado por 5-6 capas sucesivas de células altamente unidas. Es la capa de la córnea que más contribuye a la resistencia al paso de fármacos, el cual puede realizarse por dos mecanismos diferentes: difusión transcelular (para fármacos lipídicos) o difusión paracelular (para fármacos hidrosolubles).

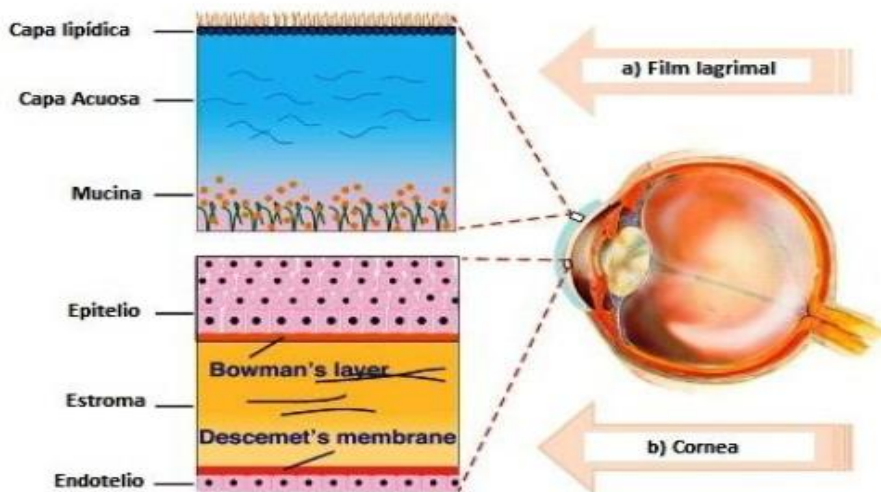


Figura 3. Representación de las partes del a) film lagrimal y b) córnea (Gan y cols., 2013).

- La membrana de Bowman: es un tejido transparente y robusto, de 8-14 μm de espesor, con una función meramente protectora.
- El estroma: esta capa supone el 90% del espesor de la córnea. Se trata de una estructura hidrofílica formada por 200-250 capas de microfibrillas de colágeno dispuestas de manera paralela a la superficie.
- El endotelio corneal: es un tejido conectivo formado por células aplanadas con amplios espacios entre ellas y se encuentra separado del estroma por la membrana de Descemet.

Por todo lo anteriormente expuesto, se puede afirmar que la permeabilidad corneal, y por lo tanto, la posibilidad del fármaco de alcanzar el humor acuoso, depende de su capacidad para atravesar el epitelio y el estroma. El epitelio será la principal barrera de absorción de moléculas hidrofílicas, mientras que el estroma lo será para las moléculas lipofílicas (Vercruysse y Córdoba, 2012).

Otro factor a considerar es la anatomía del saco conjuntival. Cuando instilamos un fármaco en el fondo del saco conjuntival, éste se mezcla inmediatamente con las lágrimas. Pero hemos tener en cuenta que la cantidad máxima de líquido que puede contener el saco conjuntival es de 30 μL y en condiciones normales contiene alrededor de 7-9 μL de fluido lagrimal que se renueva con una velocidad de 0.1-0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Como una gota de colirio contiene de 40 a 50 μL , al instilar la formulación, con el parpadeo se pierden aproximadamente 20 μL de formulación. El resto, drena por el conducto nasolagrimal hasta recuperar el volumen normal aproximado de 7 μL . Podemos considerar que, tras la instilación de una gota en el ojo, menos del 5% del fármaco aplicado atraviesa la córnea y alcanza tejidos intraoculares, mientras que la mayor parte del mismo es absorbida sistémicamente vía conjuntiva y conducto nasolagrimal (Lee y Robinson, 1979). Dado que esta vía de administración se utiliza preferentemente para tratar alteraciones patológicas oculares, en ningún caso, es deseable dicha incorporación. Por tanto, un volumen instilado de 5 a 10 μL , sería el idóneo para evitar la posible absorción sistémica, el problema está en disponer de dispositivos adecuados para administrar estos volúmenes.

1.3.1.2 Factores derivados de la naturaleza del fármaco

- Solubilidad, lipofilia, grado de ionización y tamaño molecular

Como ya hemos comentado, para que un fármaco pueda ejercer su acción a nivel intraocular, debe atravesar la película de fluido precorneal y la córnea. Este paso a través de barreras hidrófilas y lipófilas se va a ver condicionado por su tamaño molecular y pKa, ya que este último y su relación con el pH del medio determinan la fracción ionizada (polar) y no ionizada (apolar).

En la figura 4, se esquematiza el proceso de permeación de un fármaco a través de la córnea en el que se pone de manifiesto que una vez administrado éste, requiere una cierta hidrosolubilidad para disolverse o mezclarse en la capa acuosa de la película de fluido lagrimal y una vez disuelto será la fracción no ionizada la que atravesará con facilidad el epitelio de la

córnea y accederá al estroma desde donde la forma ionizada difundirá fácilmente hasta alcanzar el endotelio. De nuevo, será la fracción no ionizada la que atravesará con mayor facilidad endotelio y alcanzará el humor acuoso (Doménech y cols., 2013).

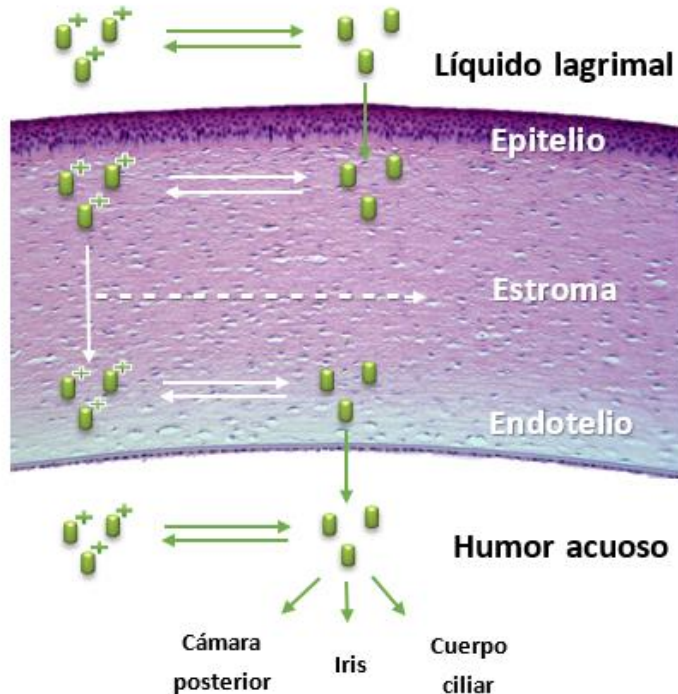


Figura 4. Esquema del proceso de permeación de un fármaco a través de la córnea.

- **Fijación a proteínas plasmáticas**

Las lágrimas poseen un contenido proteico alrededor del 2% que puede verse aumentado en ciertos estados patológicos. Sus componentes principales son albúmina, globulinas y lisozima. Este hecho, puede ser un factor que condicione el proceso de absorción, ya que la fracción de fármaco unido a proteínas no puede atravesar la córnea (Doménech y cols., 2013).

1.3.1.3 Factores que influyen en la retención del fármaco

- **Osmolaridad de las lágrimas**

Cuando una formulación oftálmica se instila en el ojo, la presión osmótica del líquido resultante dependerá de la osmolaridad de las lágrimas y de la osmolaridad de la formulación. Hay que tener en cuenta que formulaciones hipertónicas o hipotónicas promueven el lagrimeo, y por tanto, reducen el tiempo de permanencia ocular de la formulación. Dado que el volumen instilado es pequeño y la dilución con el líquido lagrimal tiene lugar rápidamente, la

osmolaridad original se restablece en unos minutos después de la instilación oftálmica (FCN, 2010).

- **pH del medio**

Hay que señalar que el pH de las lágrimas oscila entre 7 y 7,4 y que valores de pH por debajo de 6,6 y por encima de 9 se acompañan de irritación. Las diferencias existentes entre el pH de la formulación y el de las lágrimas pueden ocasionar efectos irritantes en el ojo, produciendo un aumento del lagrimeo y parpadeo con la consiguiente pérdida del medicamento por vía precorneal (Ludwig y Van Ooteghem, 1986), dolor e incluso daños en la superficie corneal (Echezarreta, 1998).

Dado que el fluido de las lágrimas no posee capacidad amortiguadora, el pH de la formulación condicionará el pH resultante de la mezcla del producto instilado con las lágrimas (Ahmed y Patton, 1984).

- **Viscosidad del medio**

La viscosidad de las lágrimas viene condicionada por la disolución de proteínas en el fluido lagrimal. Un aumento en la viscosidad de las soluciones oftálmicas, incrementa la retención de los principios activos en la superficie corneal aunque se corre el riesgo de provocar irritación ocular e inducir el lagrimeo, con lo que se puede producir el efecto contrario al deseado (Doménech y cols., 2013).

- **Componentes de la formulación**

Hay que tener en cuenta la influencia que los componentes de la formulación pueden ejercer sobre el proceso de retención del fármaco sobre la córnea. Así, podemos señalar el efecto que ejercen los viscosizantes (comentado en el apartado anterior), o los conservantes, que a menudo pueden ejercer un efecto irritante que puede inducir al lagrimeo (Doménech y cols., 2013).

1.3.2 ASPECTOS GALÉNICOS DE LA FORMULACIÓN

Desde el punto de vista galénico, existen diferentes tipos de preparados para uso oftálmico recogidos en la Real Farmacopea Española 5ª ed.: colirios, preparaciones oftálmicas semisólidas, baños oftálmicos e insertos oftálmicos.

Ésta, además, define los colirios como disoluciones, emulsiones o suspensiones acuosas u oleosas, estériles, de uno o más principios activos, destinados a su instilación en el ojo.

El preparado oftálmico de ACZ seleccionado para su evaluación, es un colirio tipo solución cuya formulación completa pasamos a describir seguidamente.

1.3.2.1 Vehículo

En primer lugar, debemos realizar una correcta selección del vehículo, que, en el caso de un preparado oftálmico en forma líquida de naturaleza acuosa, tal y como recomienda la Real Farmacopea Española 5ª ed., debe ser agua purificada o de calidad inyectable. Es importante señalar que el agua para uso oftálmico, a diferencia de la utilizada para los preparados inyectables no tiene por qué ser apirógena (Real Farmacopea Española 5ª ed., 2015).

En el caso de soluciones oleosas, se establece usar como vehículo aceites o esteres sintéticos. Empleando estos se logra un mayor tiempo de contacto del preparado con la córnea, pero presentan problemas de aceptación por parte del paciente asociados a una mayor dificultad en su administración y visión borrosa (Real Farmacopea Española 5ª ed., 2015).

En nuestro caso, la formulación sometida a estudio ha empleado como vehículo agua ultrapura obtenida en un equipo MilliQ®.

1.3.2.2 Corrector del pH

Como ya hemos señalado, a priori el pH de un preparado oftálmico debe ser lo más similar posible al de la lágrima. Pero si tenemos en cuenta la influencia que ejerce el pH sobre la estabilidad acuosa de un fármaco, así como respecto a la fracción ionizada y no ionizada de fármaco, y sus repercusiones en su solubilidad y permeabilidad, resulta evidente que el valor del pH de una formulación oftálmica puede diferir ligeramente del de la lágrima. En efecto, el pH elegido suele ser un compromiso entre todos los factores indicados anteriormente.

El control del pH de una formulación oftálmica se puede lograr adicionando correctores del pH tan habituales como HCl o NaOH, pero lo más frecuente es emplear como vehículo cualquiera

de los diferentes medios tampón compatibles con la vía oftálmica. Entre otros, destacan por su utilización la solución tampón Sörensen, la solución tampón Hepes, la solución tampón Tris, la solución de ácido bórico/borato sódico, o la solución cítrico/fosfato, que es la que se ha seleccionado para la formulación bajo estudio y que aporta un pH aproximado de 5,34 a la formulación. La elección de este pH ácido para la formulación va en sintonía con el utilizado por otros autores (Loftsson y cols., 1996) y está condicionado por la estabilidad en medio líquido de nuestro fármaco, que presenta su máxima estabilidad acuosa a un pH de 4,5 (Petchimuthu y Narayanan, 2013).

1.3.2.3 Isotonizante

Aunque el ojo tolera concentraciones que oscilan entre el 0,7 y 2% p/v de NaCl (Vila-Jato y cols., 1997), como ya hemos indicado, las formulaciones oftálmicas deben ser isotónicas con las lágrimas con el fin de evitar el lagrimeo. Sin embargo, algunas soluciones oftálmicas pueden ser formuladas de forma hipertónica para mejorar la absorción o proporcionar suficiente concentración del principio activo para ejercer una acción efectiva.

En nuestra formulación se ha empleado cloruro sódico como isotonizante, aunque no debemos olvidar que todos los componentes sólidos disueltos en el medio aportan tonicidad.

1.3.2.4 Viscosizante

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).

Pero el empleo de excipientes viscosizantes en la formulación, no siempre es necesaria. En algunas ocasiones, como ya hemos comentado, un exceso de viscosidad induce al lagrimeo, en otras, la presencia de macromoléculas hidrófilas utilizadas como viscosizantes, puede frenar los procesos de difusión a través de las barreras biológicas por formación de complejos o asociaciones intermoleculares por puente de hidrógeno. Además, el empleo de un viscosizante puede condicionar determinados procesos tecnológicos del proceso de elaboración (posibilidad de filtración, resistencia a la esterilización o compatibilidad con el resto de componentes de la formulación).

Por todo lo comentado anteriormente, es indispensable asegurarse de que el beneficio de utilizar un viscosizante en la formulación es superior a los posibles efectos perjudiciales. Es frecuente encontrar formulaciones oftálmicas que carecen de un viscosizante específico,

mucho más si tenemos en cuenta que puede no ser necesario ya que el resto de componentes de la formulación pueden aportar una viscosidad adecuada para su correcta administración sin necesidad de ellos.

En nuestro caso la formulación bajo estudio no emplea ningún viscosizante específico ya que presenta una viscosidad compatible con su administración oftálmica.

1.3.2.5 *Conservante*

Todo preparado oftálmico debe prepararse en condiciones de esterilidad y mantenerlas durante el periodo de utilización por parte del paciente. Sin embargo, el uso de conservantes sólo es necesario en el caso de formulaciones multidosis, ya que la contaminación bacteriana puede aparecer 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, debido al efecto sinérgico de su combinación (Real Farmacopea Española 5ª ed., 2015).

Entre los más utilizados en la vía oftálmica destaca el cloruro de benzalconio, que ha sido el conservante empleado en nuestra formulación (Herrero, 2007).

1.3.2.6 *Antioxidante / promotor de la absorción*

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 (Nema y cols., 2002) basándose en su mecanismo de acción (secuestrantes, reductores o quelantes). Entre estos últimos destaca el ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) y el ácido cítrico (Rowe y cols., 2012).

En nuestra formulación, se ha seleccionado el AEDT, porque además de su efecto antioxidante, aparece recogido en la bibliografía que su combinación con cloruro de benzalconio presenta un efecto sinérgico contra *Pseudomonas aeruginosa* (Moliere y Rojas, 2007) y también puede ejercer un efecto promotor de la permeación oftálmica, ya que es capaz de alterar la estructura de las membranas celulares de la córnea facilitando el transporte paracelular de las moléculas de fármaco (Hochman y Artrusson, 1994).

1.3.2.7 Solubilizante

Las características fisicoquímicas de nuestro fármaco, anteriormente comentadas, implicarían que para obtener una formulación tipo solución tengamos que utilizar un agente solubilizante, que permita aumentar la solubilidad del fármaco sin afectar su lipofilia.

Aunque son numerosos los solubilizantes compatibles con la vía oftálmica, Tween 20 y 80®, Cremophor EL®, Labrazol®, etc. (Morsi y cols., 2014), su utilización no ha logrado una mejora significativa en la solubilidad acuosa de la ACZ.

Por este motivo, fue necesario la búsqueda de un solubilizante efectivo y en este sentido resulta especialmente interesante el empleo de ciclodextrinas (CDs) y, más en concreto, la HP β CD, ensayada con éxito para este fármaco por diferentes autores (Pérez-Barrales y cols., 1995; Loftsson y Järvinen, 1999).

1.3.2.7.1 Solubilización mediante complejación con CDs

Las CDs naturales son oligosacáridos cíclicos constituidas por un número variable de unidades de glucosa unidas por enlaces $\alpha \rightarrow (1,4)$. Se las denomina mediante letras griegas: α -CD, β -CD y γ -CD, según tengan 6, 7 u 8 unidades respectivamente de α -D-glucopiranososa. El número de unidades de α -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). Sus estructuras se recogen en la figura 5.

Su característica estructural más importante, es su conformación toroidal, que delimita una cavidad interior apolar, siendo su exterior de naturaleza hidrofílica. Gracias a esta conformación las CDs son capaces de formar compuestos de inclusión con otros productos, tanto en medio líquido como en estado sólido (Saenger, 1980).

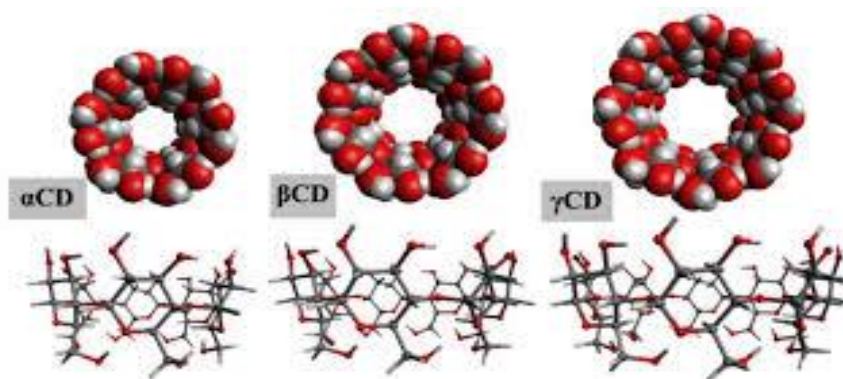
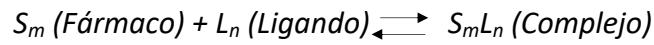


Figura 5. Estructura química de las CDs naturales (Torralba, 2014).

Un complejo es la asociación reversible de m moléculas de sustrato (principio activo) con n moléculas de ligando (sustancia complejante) para dar lugar a una nueva especie que puede presentar una mayor solubilidad y velocidad de disolución. La constante de asociación del complejo (K) viene dada por la siguiente expresión (Kurkov y Loftsson, 2013):



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

El proceso global se ve esquematizado en la figura 6.

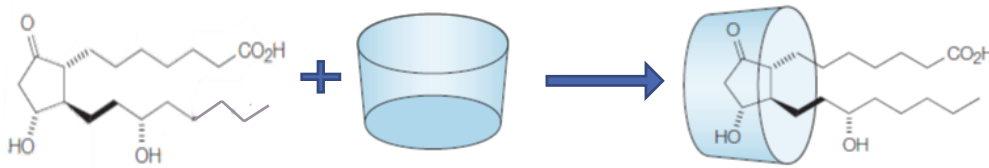


Figura 6. Esquema de la formación de un complejo de inclusión (Davis y Brewster, 2015).

Con el objetivo de incrementar la baja solubilidad de las CDs naturales, en especial la β -CD, existe la posibilidad de hidroxialquilación de sus grupos hidroxilos, obteniéndose así derivados, siendo la 2-HP β CD (figura 7), la más utilizada. La hidroxipropilación 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 (Szejtli, 1984).

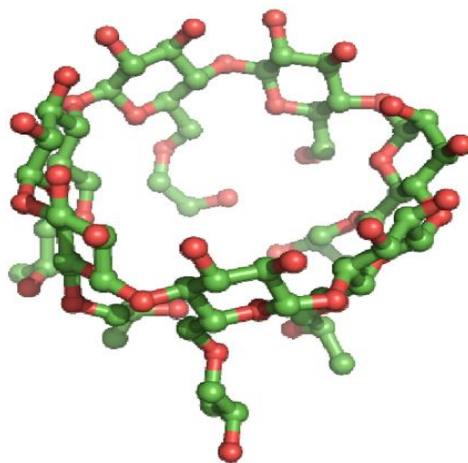


Figura 7. Estructura de la 2-HP β CD (Danciu y cols., 2014).

Un aspecto interesante a considerar es la influencia que puede ejercer la formación del complejo de inclusión fármaco-CD en el proceso de absorción. La estructura química de las CDs y el complejo de inclusión (naturaleza hidrofílica externa), su peso molecular (mayor de 970 daltons) y su bajo coeficiente de partición octanol/agua son características que impiden su posible absorción corneal (Frömmingh y Szejtli, 1994; Lipinski y cols., 2001), por lo que sólo la fracción libre del fármaco puede atravesar la córnea (figura 8).

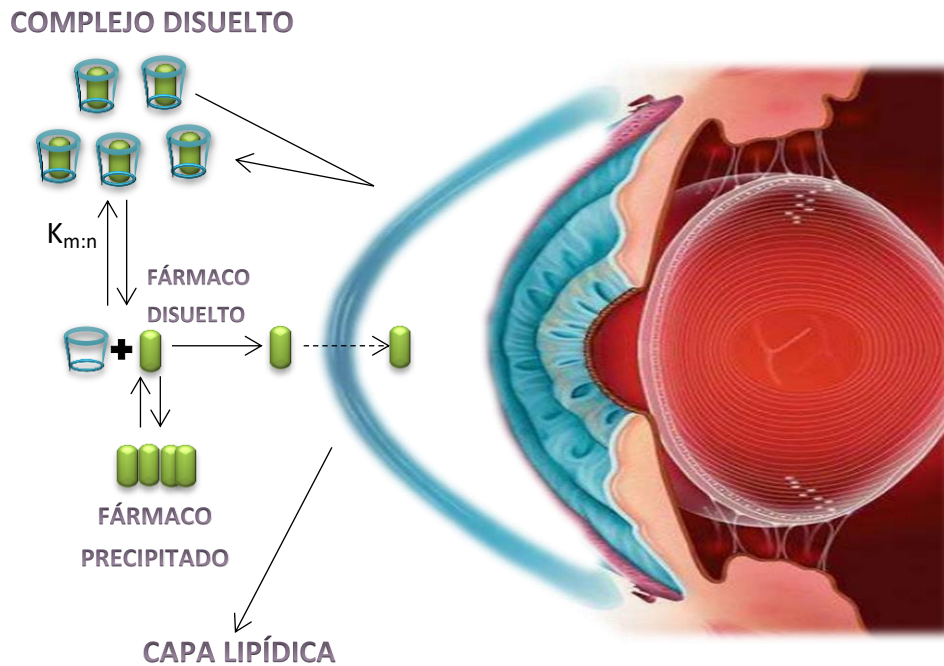


Figura 8. Esquema del proceso de absorción de un fármaco administrado vía ocular en forma de complejo de inclusión con CDs.

1.4 EVALUACIÓN BIOFARMACÉUTICA DE LAS FORMAS DE DOSIFICACIÓN OFTÁLMICAS

La evaluación farmacéutica de las formas de dosificación oftálmica puede realizarse mediante dos tipos de técnicas.

Las técnicas “*in vitro*” están encaminadas a determinar la liberación y permeación del fármaco, y entre ellas podemos citar las técnicas de difusión en agar (para preparados semisólidos), o a través de membranas sintéticas o córneas aisladas de humanos o animales (buey, cabra, cerdo, conejo, etc.), montadas en dispositivos adecuados como la celda de difusión denominada celda de Franz (para preparados líquidos y semisólidos). Estos estudios dan información sobre los efectos que la naturaleza del fármaco (lipofilia/hidrofilia), tamaño molecular, grado de ionización, o componentes de la formulación, ejercen en la permeación ocular. No obstante, al

no incluir los procesos de pérdida tras aplicar la formulación en el ojo, no pueden predecir con absoluta fiabilidad la biodisponibilidad *in vivo* de medicamentos administrados tópicamente (Loftsson y Järvinen, 1999).

Los estudios mediante técnicas "*in vivo*", son mucho más complejos y requieren la determinación de los niveles plasmáticos de fármaco en el humor acuoso. En otras ocasiones cuando los fármacos presentan una actividad terapéutica fácilmente medible con objetividad puede utilizarse la respuesta terapéutica como sistema de evaluación "*in vivo*" de la formulación diseñada. Este es el caso de los principios activos que modifican el diámetro pupilar o los que reducen la presión intraocular como la ACZ (Doménech y cols., 2013).

1.4.1 ESTUDIOS DE PERMEACIÓN IN VITRO UTILIZANDO MEMBRANAS ARTIFICIALES

Las celdas de Franz representan, desde su desarrollo en 1975, uno de los principales métodos utilizados para evaluar la permeación transepitelial de biomoléculas (Villarino y Landoni, 2006). Estas celdas tal y como se recoge en la figura 9, están constituidas por un sistema compuesto por dos cámaras, una donadora y otra receptora, separadas por una membrana de origen humana, animal o sintética que permite evaluar la difusión de fármacos de una cámara a otra (Chattaraj y cols., 2005). En el compartimento superior se adiciona una solución o dispersión que contiene el principio activo. La difusión del fármaco desde el producto a evaluar a través de la membrana, se controla mediante la recogida secuencial de muestras del fluido receptor, que puede estar automatizada (Baena y cols., 2011).



Figura 9. Esquema de una celda de Franz utilizada para los ensayos de permeación.

(<http://www.permegear.com/franz.htm>)

Entre los parámetros que influyen en la difusión de dicho compuesto, están la temperatura, la velocidad de agitación, el tipo y naturaleza de la membrana y el medio del compartimento receptor (Estévez y cols., 2000), que han de estar previamente fijados. Estas celdas están dispuestas en un equipo de permeación, como el que se muestra en la figura 10, que permite controlar la temperatura y mantener en agitación las muestras.



Figura 10. Equipo termostatzado para un estudio de permeación.

(www.permegear.com/franz.htm)

Sin embargo, hay que señalar que, dado que no aparecen recogidas en las Farmacopeas normativas específicas en relación al desarrollo de celdas de liberación in vitro, y a que las celdas de Franz presentan limitaciones de tipo hidrodinámico, hay investigadores que desarrollan sus propios sistemas para este tipo de estudios (Estévez y cols., 2000; Bosman y cols., 1992; Friend, 1993).

2 OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo de investigación consiste en la evaluación biofarmacéutica de un preparado oftálmico acuoso de ACZ utilizado en el tratamiento del glaucoma, mediante la utilización de membranas sintéticas en celda de Franz. Para ello determinaremos los principales parámetros que cuantifican el proceso de permeación: porcentaje de fármaco permeado a las 24 horas, flujo de permeación en el estado estacionario y el coeficiente de permeabilidad y pondremos de manifiesto la influencia que sobre ellos ejercen diversos factores, como son el sistema fisicoquímico elegido para la formulación, pH del medio y excipientes de la formulación.

3 METODOLOGÍA

3.1 MATERIALES

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

3.1.1 FORMULACIÓN

La elección de los diferentes excipientes utilizados en la formulación oftálmica de ACZ, se han realizado en base a los requisitos que presenta una formulación oftálmica acuosa descrita en el apartado de introducción y a su no interferencia con el proceso de complejación fármaco-CD. Dicha selección ha sido realizada por miembros del grupo de investigación CTS 612 “Investigación y Desarrollo Farmacotécnico de Medicamentos”, y nos hemos limitado a reproducirla para nuestro estudio.

- *Acetazolamida (ACZ)*: su nombre químico es N-(5-(aminosulfonil)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-acetamida. Se presenta como un polvo cristalino blanco, prácticamente inodoro, con fórmula molecular $C_4H_6N_4O_3S_2$ y con un peso molecular de 222,24 g/mol (Acofarma, Barcelona).
- *Hidroxiopropil-beta-ciclodextrina (HP β CD)*: se presenta como un polvo blanco, con un grado de sustitución de 0,6 y peso molecular de 1380 g/mol (Fluka, Japón).
- *Cloruro de benzalconio*: se presenta como un polvo blanco, con fórmula molecular $C_{21}H_{38}NCl$ y peso molecular de 340,02 g/mol (Guinama, Valencia).
- *Ácido etilendiaminotetraacético (AEDT)*: se presenta como polvo blanco cristalino, su fórmula molecular es $C_{10}H_{16}N_2O_8$, con peso molecular de 327,24 g/mol y posee una riqueza del 99,2% (Fargon, Barcelona).
- *Cloruro sódico*: se presenta como un sólido blanco cristalino, cuya fórmula molecular es NaCl, y su peso molecular de 58,44 g/mol (Panreac, Barcelona).
- *Ácido cítrico 1-hidrato*: se presenta como un polvo blanco cristalino, con fórmula molecular $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ y con un peso molecular de 210,14 g/mol (Panreac, Barcelona).
- *Di-sodio hidrógeno fosfato 2-hidrato*: se presenta como polvo blanco cristalino, con fórmula molecular $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ y un peso molecular de 177,99 g/mol (Panreac, Barcelona).
- *Agua Milli-Q[®]*: agua destilada ultrapura obtenida con un sistema Milli-Q[®] Advantage, Millipore[®].

3.1.2 FASE MÓVIL PARA HPLC

- *Acetato sódico*: se encuentra como polvo blanco cristalino, con fórmula molecular CH_3COONa . Su peso molecular es 82,04 g/mol y su solubilidad en agua es 0,47 g/mL (VWR Prolabo, Bélgica).
- *Acetonitrilo*: de calidad HPLC, se encuentra como líquido incoloro, de olor característico. Su fórmula molecular es CH_3CN y con peso molecular de 41,05 g/mol (Sigma-Aldrich, USA).
- *Agua Milli-Q*[®]: descrita anteriormente.
- *Filtro*: Millipore[®] de 0,45 μm .

3.1.3 MEMBRANA PARA EL ENSAYO DE PERMEACIÓN

- *Membrana de nitrato de celulosa*: Whatman[®] 0,2 μm
- *Gelatina*: es una mezcla de proteínas solubles en agua derivadas principalmente del colágeno, principal constituyente proteico natural del tejido conectivo (Acofarma, Barcelona).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 PREPARACIÓN DEL TAMPÓN CÍTRICO/FOSFATO

Como se mencionó anteriormente, el tampón está compuesto por dos tipos de reactivos disueltos en un vehículo acuoso (agua ultrapura). En primer lugar, se prepara una solución de di-sodio hidrógeno fosfato 2-hidrato. 36,5 g de este compuesto se disuelven en un vaso de precipitado y la solución se lleva a un matraz aforado y se enrasa hasta 1000 mL con agua destilada ultrapura, seguidamente se realiza el mismo procedimiento con 21,0 g de ácido cítrico 1-hidrato. Una vez están preparadas ambas disoluciones se toman 130,5 mL de la solución de ácido cítrico y 869,5 mL de la solución de fosfato 2-Hidrato, y se llevan a un matraz de 1000 mL. Mezclando bien ambas soluciones, obtendremos la disolución tampón final que presenta un pH en torno a 5,34 medido en un pH-metro CRISON GLP21. Posteriormente el producto obtenido necesita ser filtrado antes de su uso en la formulación por un filtro.

3.2.2 ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES OFTÁLMICAS A ENSAYAR

Como ya indicamos en el apartado de objetivos, con este trabajo pretendemos estudiar la influencia de algunos factores en el proceso de permeación de la ACZ. Para ello se han preparado cuatro formulaciones cuya composición se recoge en la tabla 2.

| MUESTRAS | VOLUMEN DE MEDIO | % p/v ACZ | % p/v HP β CD | % p/v OTROS COMPONENTES |
|---------------|------------------------|-----------|---------------------|---|
| FORMULACIÓN 1 | 10 mL H ₂ O | 0,5 | - | - |
| FORMULACIÓN 2 | 10 mL H ₂ O | 0,5 | 16,5 | - |
| FORMULACIÓN 3 | 10 mL tampón | 0,5 | 16,5 | - |
| FORMULACIÓN 4 | 10 mL tampón | 0,5 | 16,5 | Cloruro de benzalconio 0,01 AEDT 0,05 NaCl 0,0037 |

Tabla 2. Composición de las diferentes formulaciones oftálmicas a ensayar.

Seguidamente procedemos a describir su proceso de elaboración.

- **Formulación 1:** suspensión acuosa de ACZ.

La muestra requiere 10 mL a preparar, para ello se añade a un vaso de precipitado con 5 mL de agua ultrapura, 0,05 g de ACZ. Una vez homogeneizado el producto, se lleva a un matraz aforado de vidrio de 10 mL y se enrasa con agua ultrapura tras lavar el vaso de precipitado. Se obtiene así, una suspensión al 0,5% p/v de ACZ en agua.

- **Formulación 2:** solución acuosa de ACZ.

Se procede de forma similar a la formulación 1 con la diferencia que los 5 mL de agua ultrapura iniciales contienen 1,656 g de HP β CD. La utilización de esta cantidad de agente solubilizante nos asegura la completa solubilización del fármaco (Loftsson y Stefánsson, 2008).

Una vez preparada la formulación, ésta se filtra con filtros RephiQuik de Nylon de 0,22 μ m. Se obtiene así, una solución al 0,5% p/v de ACZ y 16,56% p/v de HP β CD en agua.

- **Formulación 3: solución de ACZ en medio tampón.**

El procedimiento seguido es similar al descrito en la formulación 2, sólo que utilizamos medio tampón en lugar de agua ultrapura.

- **Formulación 4: solución acuosa de ACZ en medio tampón y otros excipientes.**

El procedimiento seguido es similar al descrito en la formulación 2, sólo que el medio tampón utilizado lleva disueltos el resto de excipientes de la formulación: cloruro de benzalconio, AEDT y NaCl.

3.2.3 SOLUCIÓN COMPARTIMENTO RECEPTOR DE LA CELDA DE FRANZ Y SOLUCIÓN REPONEDORA

Esta solución consiste en el mismo medio utilizado en la formulación (agua ultrapura para las formulaciones 1 y 2 o bien medio tampón para las formulaciones 3 y 4 adicionado de un 5% p/v de HP β CD, para asegurarnos de que se mantienen las condiciones *sink* durante el ensayo.

En efecto, la presencia de HP β CD en el compartimento receptor asegura que el fármaco, una vez que permea al compartimento receptor forme un complejo soluble con la HP β CD adicionada asegurando que la concentración disuelta no supere el 10% de la solubilidad del fármaco y por tanto mantener las condiciones *sink*.

3.2.4 PERMEACIÓN IN VITRO MEDIANTE CELDAS DE FRANZ

Los estudios de permeación se llevaron a cabo utilizando celdas de difusión de Franz dispuestas en un equipo de permeación (SES EmbH Analyesysteme, Alemania). Cada celda de Franz está compuesta por un compartimento receptor y un compartimento donador separados por una membrana de celulosa (Whatman® 0,2 μ m), a la cual se le adicionaron 220 μ L de una solución de gelatina al 12% p/v, con el fin de simular las condiciones de la córnea (recordemos que la córnea está compuesta en un 90% por el estroma corneal y que éste, a su vez, está formado por un 71% de colágeno).

En el compartimento donador, se colocan 2 mL de la muestra en estudio (diferentes formulaciones); y en el compartimento receptor, sometido a 500 rpm, 10 mL de solución receptora. Ambas soluciones están sometidas a una agitación y la temperatura de las celdas se mantiene a 33 °C con ayuda de un baño de agua termostatzado (Baena y cols., 2011). La

superficie de la membrana expuesta al proceso de permeación en las celdas de Franz utilizada es de 3,14 cm².

Para realizar el ensayo se toman muestras de 0,5 mL del compartimiento receptor a intervalos de tiempo predeterminados (0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h y 24 h). La extracción de cada alícuota se realizó cuidadosamente para no generar burbujas en el medio, reponiendo inmediatamente el volumen con el mismo medio existente en el compartimiento receptor. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Los parámetros calculados para comparar todos los perfiles de permeación fueron los siguientes:

- **Porcentaje permeado (%P)**: relación entre la cantidad total de fármaco en el compartimiento donador y la cantidad permeada medida en el receptor, expresada en % tras 24 horas de ensayo.

- **Flujo en estado estacionario (J_{ss})**: cantidad de fármaco permeado por unidad de superficie y unidad de tiempo. Se calcula a partir del cociente entre la cantidad de fármaco permeado por unidad de área en el estado estacionario (asíntota de la curva) y el tiempo necesario para alcanzar dicha asíntota, según viene definido por siguiente relación (Attama y cols., 2008):

$$J = \frac{dQ}{A dt}$$

Donde Q indica la cantidad de fármaco permeada (mg), A es el área de difusión (cm²), y t es el tiempo de exposición (h).

- **Coefficiente de permeación (P)**: se define como la relación entre el flujo y la concentración de partida en el compartimiento donador, sus unidades son (cm/s) y se calcula según la siguiente ecuación (Suhonen y cols., 1991):

$$P = \frac{J}{C_0 \times 60 \times 60}$$

Donde C₀ es la concentración de fármaco en el medio donador en (mg/cm³).

3.2.5 CUANTIFICACIÓN DE ACZ

La cuantificación de ACZ de forma exacta y precisa se realiza por el método analítico de elección, siendo este la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Este método ha sido puesto a punto por el grupo de investigación CTS 214 "Sistemas de Liberación Controlada de

Medicamentos” de forma previa (Cabanzo, 2013; Abad, 2012). La determinación, se llevó a cabo por HPLC de fase reversa mediante un cromatógrafo (Hitachi HPLC Elite Lachrom) compuesto de:

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

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

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

En estas condiciones, una vez ajustada la técnica cromatográfica, se determinó la linealidad del método demostrando la capacidad del método para obtener resultados linealmente proporcionales.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ESTUDIO DE PERMEACIÓN

Este estudio se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el apartado de materiales y métodos de la presente memoria.

En la figura 11, se muestra el porcentaje de fármaco permeado frente al tiempo para las 4 formulaciones ensayadas.

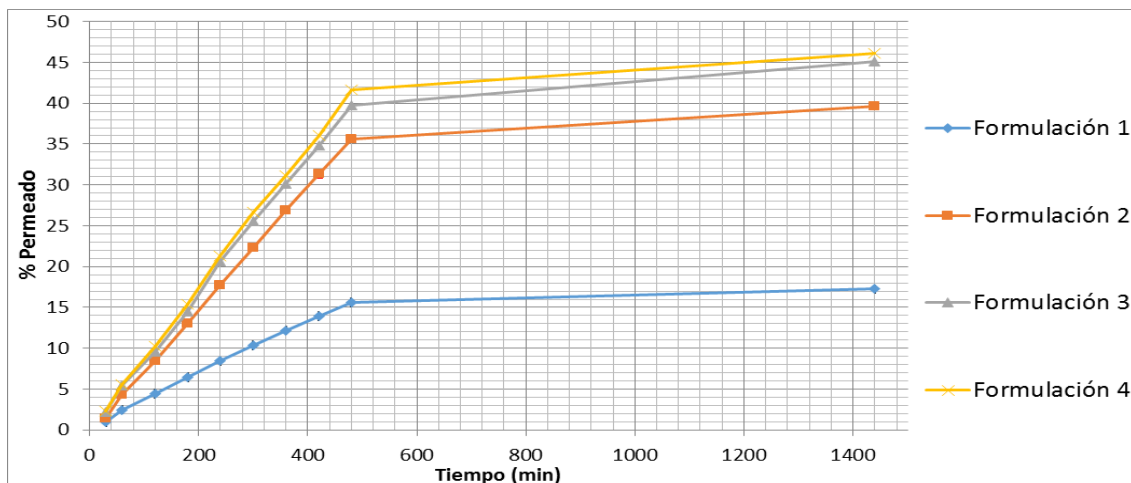


Figura 11. Porcentaje de ACZ permeado en función del tiempo para las 4 formulaciones ensayadas.

En primer lugar, observamos que, al cuantificar la primera muestra, tomada a los 30 minutos, ya podemos detectar fármaco permeado, por lo que podemos concluir que el tiempo de retardo de todas las formulaciones ensayadas es menor a 30 minutos.

En segundo lugar, podemos señalar que las 4 formulaciones presentan un comportamiento similar en lo referente a los perfiles de permeación del fármaco, así el porcentaje permeado se incrementa de una forma lineal respecto al tiempo en las primeras 8 horas, a partir de este momento se obtiene un perfil prácticamente asintótico, ya que el paso neto de fármaco a través de la membrana es mínimo y pudiendo concluir que el estado estacionario del proceso se alcanza alrededor de las 8 horas.

En cuanto al porcentaje permeado, los resultados obtenidos muestran la siguiente secuencia:

$$\text{Formulación 4} \approx \text{Formulación 3} > \text{Formulación 2} \gg \text{Formulación 1}$$

Así, mientras que en las formulaciones 3 y 4 se alcanza casi el 50% de fármaco permeado tras 24 horas de ensayo, en la formulación 2 apenas se alcanza el 40%. y en la formulación 1, no se llega ni al 20% de fármaco permeado.

Puesto que el porcentaje de fármaco permeado depende del área de la membrana utilizada, resulta más interesante para caracterizar los procesos de permeación determinar el flujo, para ello, representamos la cantidad de fármaco acumulado en el compartimiento receptor por unidad de área (mg/cm^2) frente al tiempo (figura 12). Evidentemente obtenemos el mismo comportamiento cualitativo para las 4 formulaciones.

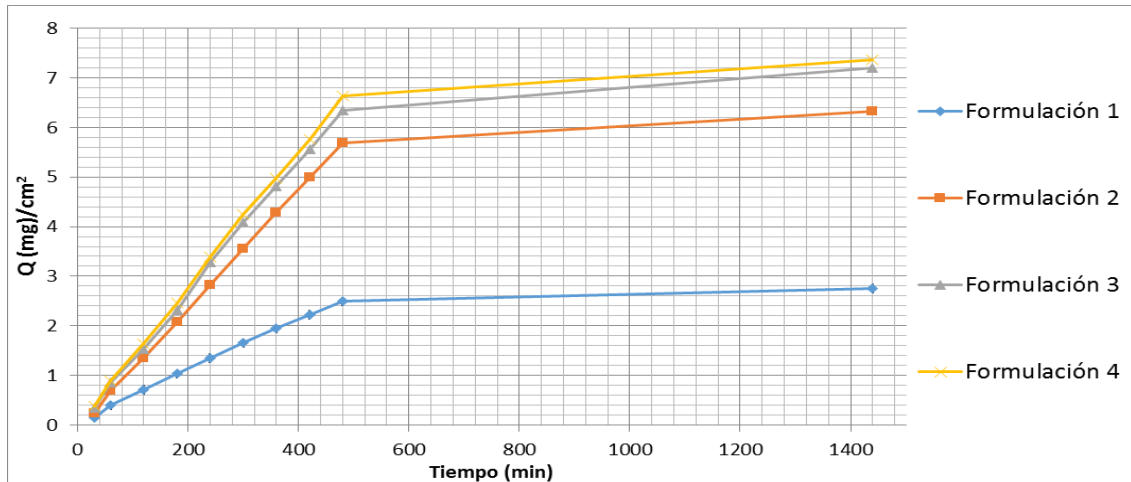


Figura 12. Perfiles de permeación para las formulaciones ensayadas.

Los resultados parecen indicar que la velocidad a la que transcurre el proceso de permeación, es decir, el flujo, es un parámetro constante, independiente de la concentración de fármaco remanente en el compartimiento donador. Para justificar estos resultados debemos tener en cuenta las características estructurales de la membrana empleada.

La membrana de nitrato de celulosa es un sistema poroso de naturaleza hidrófila (para simular la capa de estroma de la córnea) pero tratada con un material lipófilo, gelatina (para simular la naturaleza lipófila del epitelio y endotelio corneal). Esta porosidad se traduce en que será el tamaño del poro el que controle el paso a través de la misma. La cinética del proceso de permeación va a depender de la concentración de fármaco en el compartimiento donador de la celda de Franz, sería una cinética tipo Michaelis Menten, donde a bajas concentraciones de fármaco el proceso no sufre saturación comportándose como un primer orden, mientras que a concentraciones altas, tal y como han sido nuestros ensayos, se manifiesta como un orden cero, es decir sería un proceso que transcurre a velocidad constante, lo cual justifica los perfiles lineales obtenidos.

Esta situación es bastante probable, dado que la concentración de fármaco disuelta en el compartimento donador es muy elevada, cercana a la saturación y la superficie de membrana a través de la que tiene que difundir el fármaco, muy reducida ($3,14 \text{ cm}^2$).

En la figura 13 se muestra una fotografía al microscopio electrónico de barrido en el que se aprecia la estructura porosa de este tipo de membranas.

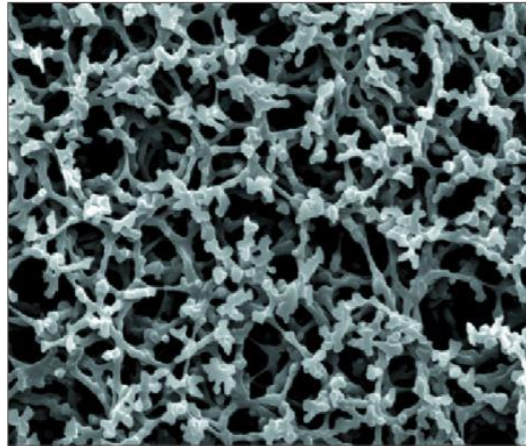


Figura 13. Fotografía al microscopio electrónico de barrido de una membrana de nitrato de celulosa.

(<http://www.laboaragon.com/docs/marcas/whatman/Whatman%20Catalogo%20General.pdf>)

En la figura 14, se muestra la porción lineal de los perfiles de permeación, que nos permitirán establecer los parámetros más representativos del proceso: flujo en estado estacionario y coeficiente de permeabilidad, definidos en metodología, y recogidos en la tabla 3.

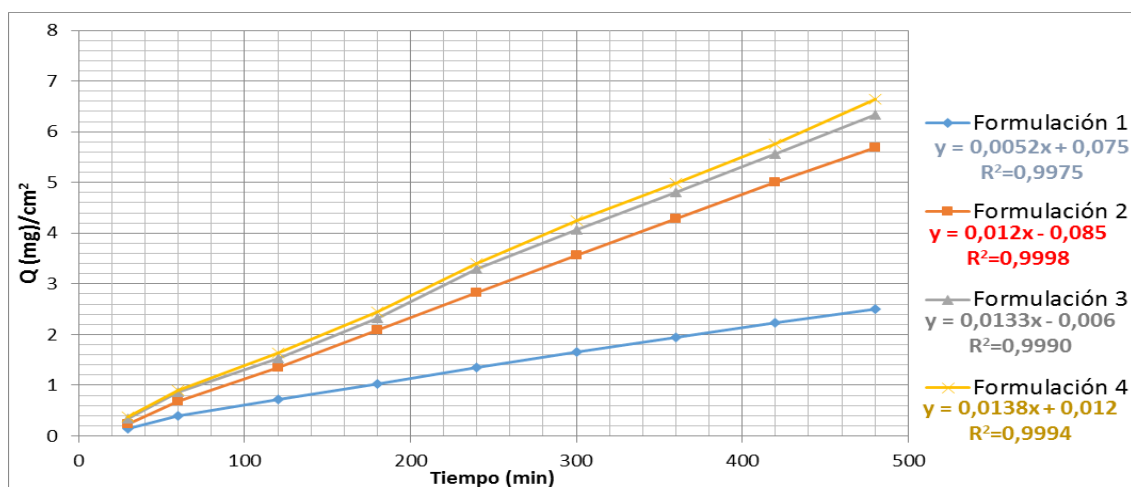


Figura 14. Perfiles de permeación para las formulaciones ensayadas hasta llegar al estado estacionario.

| ENSAYOS | % P | J_{ss} ($\text{mg}/\text{cm}^2 \times \text{min}$) | P (cm/s) |
|---------------|-------|---|-------------------------------|
| FORMULACIÓN 1 | 17,24 | 0,0052 | $3,84 \times 10^{-6}$ |
| FORMUALCIÓN 2 | 39,67 | 0,0120 | $8,86 \times 10^{-6}$ |
| FORMULACIÓN 3 | 45,18 | 0,0133 | $9,83 \times 10^{-6}$ |
| FORMULACIÓN 4 | 46,15 | 0,0138 | $1,01 \times 10^{-5}$ |

Tabla 3. Parámetros del estudio de permeación para las 4 formulaciones ensayadas.

Seguidamente pasamos a estudiar de forma comparada, las diferentes formulaciones de tal forma que podamos responder a los objetivos planteados inicialmente en nuestro trabajo.

4.1.1 INFLUENCIA DEL SISTEMA FISICOQUÍMICO

El primer aspecto a estudiar en nuestro trabajo, es poner de manifiesto la influencia que ejerce el sistema fisicoquímico elegido para nuestra formulación sobre la permeación de nuestro fármaco. Para ello, en la figura 15, se recogen los perfiles de permeación realizados para la formulación 1 (fármaco en suspensión) y la formulación 2 (fármaco en solución) incluyendo las correspondientes desviaciones estándar.

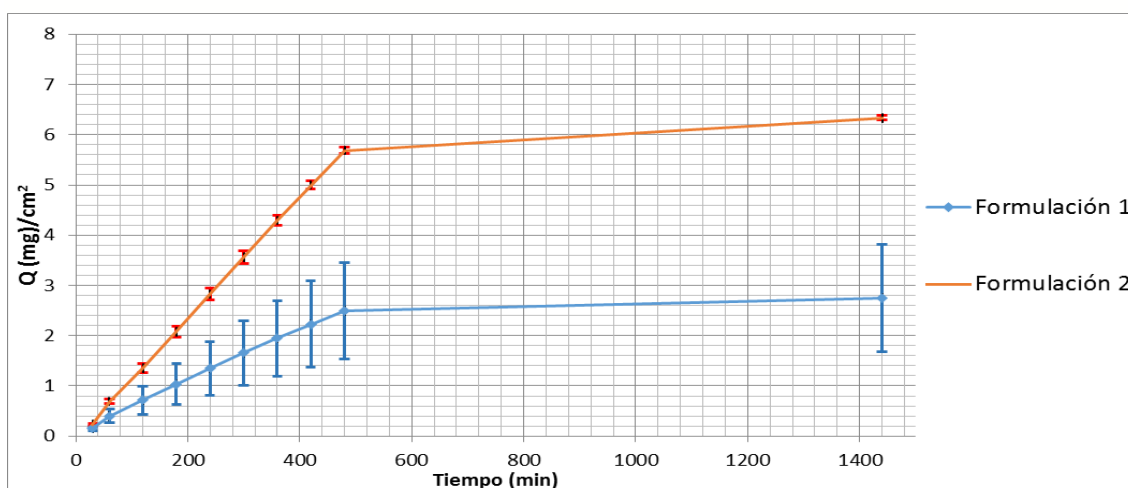


Figura 15. Perfiles de permeación de los tres ensayos realizados con las formulaciones 1 y 2.

Podemos observar que al realizar el ensayo con la formulación 1 (fármaco en suspensión), los resultados muestran una gran variabilidad, es decir, son poco reproducibles, lo que indica que el sistema, debido a su naturaleza fisicoquímica, no se comporta de forma homogénea durante su estudio en la celda de Franz. Sin embargo, cuando realizamos el ensayo utilizando la formulación 2 (fármaco en solución), las gráficas son prácticamente superponibles.

Además, pese a que ambas formulaciones contienen la misma cantidad de ACZ, el porcentaje permeado, en la solución, casi duplica a la de la suspensión a las 8 horas de ensayo, igualmente ocurre con el flujo y el coeficiente de permeación (tabla 3).

El sistema solución mejora notablemente el proceso, aunque era previsible, puesto que el proceso de difusión a través de una membrana implica que el fármaco esté previamente disuelto, necesitábamos confirmarlo ya que cuando se eligió la complejación con CDs y más en concreto con HP β CD, se corría el riesgo de que el proceso de complejación pudiera ser un factor limitante en la permeación. Debemos señalar que como aparece recogido en la bibliografía y comentado en la presente memoria el complejo fármaco-CD debido a su alto peso molecular y características hidrofílicas, difícilmente podría permear (Frömmingh y Szejtli, 1994; Lipinski y cols., 2001).

Los resultados muestran que el efecto positivo que en el proceso de permeación ejerce la CD al solubilizar el fármaco es muy superior a la limitación que supone que dicho complejo no pueda permear. Hay que tener en cuenta, como aparece en la bibliografía, que 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).

También nos planteamos si la baja constante de complejación del sistema ACZ-HP β CD podría ser un factor limitante del proceso de permeación. Así, aparece recogido por algunos autores que complejos con bajos valores de constantes de complejación, al ser administrados, tienden a una rápida liberación del fármaco, pudiendo llegar a la concentración de saturación y en caso de superarla, llegar a precipitar. Por el contrario, si la constante de formación del complejo es alta, la velocidad de liberación del fármaco tiende a ser lenta y la concentración de fármaco libre en las proximidades del área donde se produce la absorción, tiende a ser baja. En vista de

todo ello, se ha establecido como intervalo óptimo de constante de complejación el comprendido entre 200 y 5000 M⁻¹ (Blanco y cols., 1991).

En nuestro caso, y tras consultar la bibliografía al respecto, recogida en la tabla 4, cabía la posibilidad de que la baja constante de complejación pudiera condicionar el proceso de permeación, ya que para el complejo ACZ-HPBCD aparece referenciada por todos los autores consultados, una constante de complejación inferior a 200 M⁻¹.

| ACZ-HPβCD | Kc (M ⁻¹) |
|--------------------------------|-----------------------|
| (Pérez-Barrales y cols., 1995) | 24,64 |
| (Loftsson y cols., 2005) | 85,00 |
| (Granero y cols., 2008) | 66,67 |
| (Domínguez G, 2016) | 58,63 |

Tabla 4. Valores de Kc correspondiente al complejo ACZ-HPβCD.

Sin embargo, en base a los resultados experimentales obtenidos (tabla 3), descartamos esta posibilidad puesto que todos los ensayos que incluyen el complejo ACZ-HPβCD (formulaciones 2,3 y 4) conducen a una mejora notable en los parámetros de permeación de nuestro fármaco.

El coeficiente de permeabilidad obtenido para nuestro fármaco en solución con 16,5% p/p de HPβCD es de 8,86 x10⁻⁶ cm/s del mismo orden de magnitud al obtenido por otros autores como Petchimuthu y Narayanan que publican un valor de coeficiente de permeabilidad de 4,069 x10⁻⁶ cm/s para ACZ, si bien hemos de señalar que nuestra formulación contiene mayor porcentaje de HPβCD y su formulación contiene otros excipientes, lo que podría justificar las diferencias en dicho parámetro (Petchimuthu y Narayanan, 2013).

4.1.2 INFLUENCIA DEL pH

Con este segundo ensayo pretendemos poner de manifiesto la influencia que puede ejercer el pH del medio elegido para nuestra formulación en el proceso de permeación. Para ello comparamos los perfiles de permeación de la formulación 2 (fármaco en solución a pH 7,2) con la formulación 3 (fármaco en solución en medio tampón a pH 5,34). Recordemos que se ha elegido este pH, condicionado por la estabilidad acuosa del fármaco.

Los resultados de la tabla 2 indican, como cabía esperar, que una disminución del pH favorece ligeramente el proceso de permeación, ya que para un fármaco ácido como se trata de la ACZ, al disminuir el pH, según la ecuación de Henderson-Hasselbach, se incrementa la fracción no ionizada, que al ser poco polar, ve favorecida su proceso de permeación. Esta situación se traduce en un ligero aumento del porcentaje de fármaco permeado, flujo y coeficiente de permeabilidad, tal y como se muestra en la tabla 3.

4.1.3 INFLUENCIA DEL RESTO DE COMPONENTES DE LA FORMULACIÓN

Con este último ensayo pretendemos poner de manifiesto si el resto de componentes de la formulación pueden ejercer algún tipo de efecto sobre la permeación del fármaco, comparamos los perfiles de la formulación 3 (sin excipientes adicionales) y la formulación 4 (con conservante, antioxidante e isotonzante). Recordemos que ambas formulaciones son sistemas tipo solución y están formuladas a pH 5,34.

Los resultados recogidos en la figura 12 y tabla 3 revelan que prácticamente ambas formulaciones conducen a perfiles de permeación superponibles, pudiendo así concluir que dichos componentes, prácticamente, no ejercen ninguna influencia significativa en el proceso.

Por otra parte, y como se recoge en la presente memoria, el AEDT, sustancia utilizada como antioxidante en la formulación, también puede presentar un efecto promotor de la absorción de la ACZ (Hochman y Artrusson, 1994; Petchimuthu y Narayanan, 2013). Esta situación, al menos, en nuestro estudio, no se pone de manifiesto de forma significativa. Hay que señalar, que los estudios de permeación a los que nos hemos referido anteriormente han sido realizados sobre córnea de animal, y más en concreto, córnea de cerdo, por lo que es posible que las diferencias se deban a este hecho. Así, cuando se utiliza un órgano aislado, el AEDT ejerce un efecto promotor más significativo que cuando se utiliza una membrana artificial, a pesar de estar tratada ésta con glicerina.

Alternativamente, podría ocurrir que el AEDT manifestara el efecto promotor de la absorción, pero que éste se viera contrarrestado por una modificación del equilibrio de complejación ACZ-HP β CD por lo que no observaríamos modificación apreciable en el proceso de permeación, ya que como aparece en la bibliografía la adición de componentes ternarios puedan alojarse en la cavidad de la CD modificando así la constante del equilibrio de complejación ACZ-HP β CD, y por tanto, modificar la concentración de fármaco libre, susceptible de permear (Loftsson y Stefánsson, 2008) .

5 CONCLUSIONES

- 1.- Tenemos que descartar una formulación tipo suspensión para administrar ACZ a nivel oftálmico debido a su pobre reproductibilidad y limitado proceso de permeación, que implica la necesidad de una previa disolución del fármaco.
- 2.- La baja constante de complejación del sistema ACZ-HP β CD no supone ningún factor limitante del proceso de permeación, así, la incorporación de este excipiente solubilizante conduce a una mejora notable en los parámetros estudiados.
- 3.- El proceso de permeación, responde a una cinética tipo Michaelis Menten, situación que podemos atribuir a un fenómeno de saturación de la membrana porosa de nitrato de celulosa elegida para nuestro ensayo.
- 4.- La elección del pH 5,34 para la formulación final, condicionada por la estabilidad de la ACZ, supone además, una ligera mejora en los perfiles de permeación, atribuible a una mayor proporción de fármaco no ionizado en el medio.
- 5.- La inclusión del resto de excipientes de la formulación, AEDT, cloruro de benzalconio y cloruro sódico, no ejercen influencia neta en el proceso de permeación.

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.

Ahmed I, Patton T F. Effect of pH and buffer on the precorneal disposition and ocular penetration of pilocarpine in rabbits. *Int J Pharm.* 1984; 19(2): 215–227.

Attama AA, Reichl S, Müller-Goymann CC. Diclofenac sodium delivery to the eye: in vitro evaluation of novel solid lipid nanoparticle formulation using human cornea construct. *Int J Pharm.* 2008; 355(1): 307-313.

Baena Y, Dallos J Leidy, Manzo RH, Ponce D'León LF. Estandarización de celdas de Franz para la realización de ensayos de liberación de fármacos a partir de complejos con polielectrolitos. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2011; 40(2): 174-188.

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

Blanco J, Vila-jato JL, Otero F, Anguiano S. Influence of method of preparation on inclusion complexes of naproxen with different cyclodextrins. *Drug Dev Ind Pharm.* 1991; 17(7): 943-957.

Bosman IJ, Lawant AL, Avegaart SR, Ensing K. Novel diffusion cell for in vitro transdermal permeation, compatible with automatec dynamic sampling. *J Pharm Sci.* 1992; 81: 1153–1156.

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

Chattaraj S, Swarbrick J, Kanfer I. A simple diffusion cell to monitor drug release from semi-solid dosage forms. *Int. J. Pharm.* 2005; 120: 119-124.

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.

Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrinbased pharmaceuticals: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3(12): 1023-1035.

Doménech J, Martínez J, Peraire C. Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética. 1ª ed. Madrid: Síntesis; 2013.

Domínguez G. Influencia de diferentes antioxidantes en el equilibrio de complejación ACZ-HP β CD: aplicación al desarrollo de una formulación oftálmica. Trabajo fin de grado. Universidad de Sevilla. Sevilla. Julio 2016.

Drugbank Database. Open Data Drug & Drug Target Database: Acetazolamide. 2013. [Consultado en Marzo 2017]. 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.

Estévez T, Aguilera A, Sáez A, Hardy E. Diseño y validación de una celda de difusión para estudios de liberación in vitro de biomoléculas. Biotecnología Aplicada. 2000; 17(3): 187-190.

Facultad de ciencias naturales. Universidad nacional de la Patagonia. Mucosa ocular. 2010 [en línea]. [Consultado en Marzo 2017]. Disponible en: <http://fcn.unp.edu.ar/sitio/tecnofarma/wp-content/uploads/2010/10/Mucosa-ocular.pdf>

Faulí C, Aroztegui M, Azemar N, Barbe C, Bel E, Muñoz A et al. Tratado de Farmacia Galénica. 1ª ed. Madrid: Luzán; 1993.

Friend DR. In vitro skin penetration techniques. Int J Pharm. 1993; 94: 23–30

Frömming KH, Szejtli J. Cyclodextrins in Pharmacy. 5ª ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1994.

Gan L, Wang J, Jiang M, Bartlett H, Ouyang D, Eperjesi F, et al. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. Drug Discov Today. 2013; 18(5): 290-297.

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.

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.

Henderer Jeffrey D. y Rapuano Christopher J.. Farmacología Ocular. En: Laurence L. Brunton, John S. Lazo, Keith L. Parker. Goodman Ls, Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11ª Edit. Colombia: McGraw Hill; 2006. 1721-1724.

Herrero Vanrell R. Generalidades de los conservantes en las formulaciones oftálmicas. Arch Soc Esp Oftalmol. 2007; 82(9): 531-532.

Hochman J, Artrusson P. Mechanism of absorption enhancement and tight junction regulation, J. Control. Release. 1994; 29: 253-267.

Instituto Químico Biológico. Diccionario ilustrado de términos médicos: Acetazolamida. 2014 [en línea]. [Consultado en Marzo 2017]. Disponible en: <http://www.iqb.es/diccio/a/ac1.htm>.

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.

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

Laboaragón, S.L. Filtros de papel y membranas. Membranas de celulosa [en línea]. [Consultado en Junio 2017]. Disponible en:

<http://www.laboaragon.com/docs/marcas/whatman/Whatman%20Catalogo%20General.pdf>.

Lee VL, Robinson JR. Mechanistic and quantitative evaluation of precorneal pilocarpine disposition in albino rabbits. J Pharm Sci. 1979; 68(6): 673-684.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv Drug Deliv Rev. 2001; 46(1-3): 3-26.

Loftsson T, Guðmundsdóttir T K, Friðriksdóttir H. The Influence of Water-soluble Polymers and pH on Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Complexation of Drugs. Drug Develop. Ind. Pharm. 1996; 22(5): 401-405.

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 Deliv Rev. 1999; 36(1): 59-79.

Loftsson T, Stefánsson E. Effect of the cyclodextrins on topical drug delivery to the eye. Drug Develop. Ind. Pharm. 2008; 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.

Merck Manual. Overview of Glaucoma. 2007 [en línea]. [Consultado en marzo 2017]. Disponible en: <http://www.merckmanuals.com/professional/eye-disorders/glaucoma/overview-of-glaucoma>.

Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Farmacopea Española. [en línea]. 5ª ed. Madrid: 2015 [Consultado en Mayo 2017]. Disponible en: <https://extranet.boe.es/index.php>

Molier Lemus T, Rojas Hernández N M, Evaluación de la actividad antibacteriana de preservos industriales. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas.* 2007; 38(1); 45-48. [en línea] [Consultado en marzo 2017] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181221557005>.

Morsi NM, Mohamed MI, Refai H, Sorogy HM. Nanoemulsion as a novel ophthalmic delivery system for acetazolamide. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014; 6(11): 227-236.

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.

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. pp. 1164–1187.

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 7th International Conference on Pharmaceutical Technology, Budapest, Mayo 1995;* 613-614.

Permegear. Franz cells. Hellertown. [en línea]. [Consultado en Abril 2014]. Disponible en: <http://www.permegear.com/franz.htm>

Petchimuthu S., Narayanan N. Future Perspective un Carbonic Anhydrase Inhibitors and its Drugs. *IJPRS.* 2013; 2(3): 83-97.

Porth CM. *Fisiopatología, salud-enfermedad: un enfoque conceptual.* 7ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2007.

Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol.* 2006; 90 (3): 262-267.

Rieger C, Rubio F. Glaucoma: implicaciones farmacológicas. *Semergen.* 2013; 39(1): 26-33.

Rowe R, Sheskey P, Cook W, Fenton, M. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 7^a ed. London: Pharmaceutical Press; 2012.

Saenger, W. Cyclodextrin Inclusion Compounds in Research and Industry. Angew. Chem. Int. Edn. Engl. 1980; 19 (5): 344-362.

Stella VJ, Rajewski RA. Cyclodextrins: Their future in drug formulation and delivery. Pharm. Resh. 1997; 14(5): 556-567.

Suhonen P, Jarrinen T, Peura P and Urtti A. Permeability of pilocarpic acid diesters across albino rabbit cornea in vitro, Int. J. Pharm. 1991; 74(2-3): 221–228.

Szejtli J. Highly soluble β -cyclodextrin derivates. Starch. 1984; 36(12): 429-432.

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

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.

Vercruysse J, Córdoba D. Formas de administración ocular. En: Lozano M, Córdoba D, Córdoba M. Manual de tecnología farmacéutica. Barcelona: Elsevier; 2012. pp. 393-399.

Vila-Jato JL, Alonso AC, Irache JM, Ballesteros P, Lacasa C, Frutos P et al. Tecnología farmacéutica Vol. II Formas Farmacéuticas. 1^a ed. Madrid: Síntesis; 1997.

Villarino N, Landoni M. Administración transdérmica de fármacos: Una alternativa terapéutica, Analecta Vet. 2006; 26(1): 28-37 (2006).