



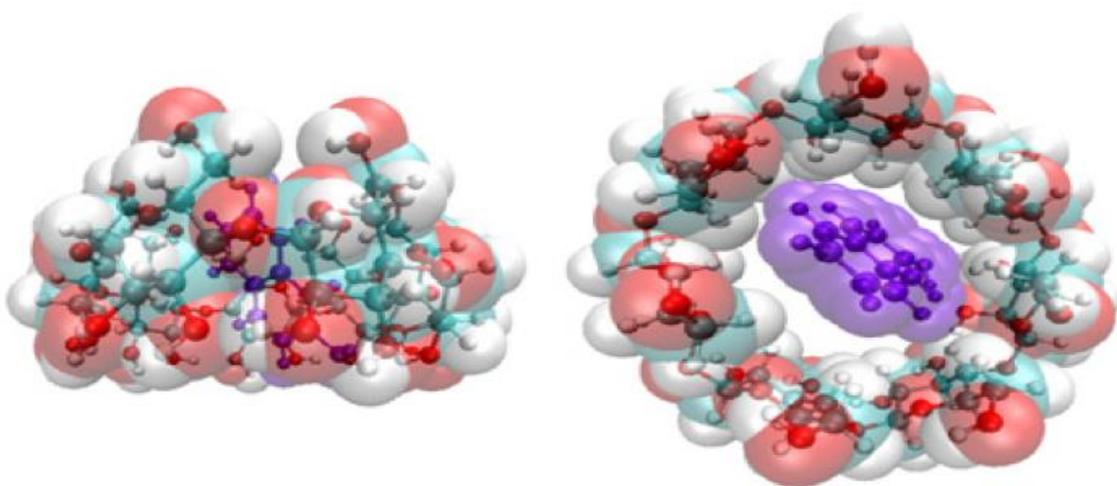
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA  
FARMACÉUTICA



# DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN OFTÁLMICA ACUOSA DE ACETAZOLAMIDA PARA EL TRATAMIENTO DEL GLAUCOMA



LUIS BLANCO MÁRQUEZ





**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA PROMOCIÓN 2012/2017

**DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN OFTÁLMICA ACUOSA DE ACETAZOLAMIDA  
PARA EL TRATAMIENTO DEL GLAUCOMA**

TRABAJO DE REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

LUIS BLANCO MÁRQUEZ

**DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA**

TUTELADO POR EL DOCTOR: JUAN MANUEL GINÉS DORADO

Fecha de presentación: 22 de septiembre de 2017



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**ACZ:** acetazolamida.

**AEMPS:** Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

**AEDT:** ácido etilendiaminotetraacético.

**CDs:** ciclodextrinas.

**c.s.p.:** cantidad suficiente para.

**HP $\beta$ CD:** hidroxipropil-beta-ciclodextrina.

**PIO:** presión intraocular.



## RESUMEN

La acetazolamida (ACZ), es un inhibidor de la anhidrasa carbónica utilizado en terapéutica contra el glaucoma de forma oral, pero del cual no existen formas líquidas de administración ocular en el mercado, al tratarse de un fármaco muy poco soluble y poco permeable. El objetivo de nuestro trabajo reside en plantear una formulación cuali-cuantitativa que permita la administración oftálmica de nuestro fármaco, reduciendo así los efectos adversos que conlleva la terapia oral con este fármaco.

La formulación propuesta se corresponde con un colirio tipo solución acuosa tipo multidosis, que incluye en su formulación los siguientes excipientes: agua purificada calidad inyectable, como vehículo, Hidroxipropil Beta Ciclodextrina (HP $\beta$ CD) al 16,5% p/v como agente solubilizante, cítrico/fosfato como medio tampón para pH 5,34, ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) al 0,1% p/v como antioxidante y promotor de la absorción, cloruro de benzalconio al 0,05% p/v como sustancia conservante.

La HP $\beta$ CD consigue la solubilización de nuestro fármaco mediante la formación de complejos de inclusión. El empleo de este excipiente encarece la formulación pero se hace imprescindible ya que los estudios bibliográficos muestran que los solubilizantes habituales compatibles con la vía oftálmica no muestran resultados efectivos para este fármaco.

La elección de un pH ácido de 5,34 unidades, viene condicionada por la estabilidad acuosa del fármaco que presenta un pH de máxima estabilidad alrededor de 5 unidades.

El empleo de un agente conservante frente a los sistemas ABAK que no lo necesitan está justificada en base a su menor coste y al efecto antibacteriano que muestra el cloruro de benzalconio frente a *Pseudomonas aeruginosa*, patógeno habitual de la flora ocular. De hecho esta es la opción elegida por la mayoría de las formulaciones oftálmicas en el mercado.

Se ha decidido no incluir ningún excipiente viscosizante específico ya su presencia puede dificultar el proceso de permeación ocular del fármaco y además el resto de la formulación en especial la HP $\beta$ CD al 16,5% p/v puede aportar una viscosidad adecuada para su administración. Además los viscosizantes más habituales utilizados en vía oftálmica, como son los derivados celulósicos suelen ser insolubles en medio acuoso, por lo que su utilización sería incompatible con la obtención de una solución.

Por último, una vez establecida la composición cuantitativa de todos los componentes se procedió al ajuste isotónico de la formulación para determinar, en el caso de que fuera

hipotónica, la concentración de NaCl a adicionar. Los resultados mostraron que al ser ligeramente hipertónica no es necesaria la adición de ningún isotonzante específico.

Palabras clave: glaucoma, acetazolamida, colirio, HP $\beta$ CD, solubilidad.

## ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	5
<b>1.1</b>	<b>GLAUCOMA.....</b>	<b>5</b>
1.1.1	CONCEPTO.....	5
1.1.2	FISIOPATOLOGÍA DEL GLAUCOMA.....	5
1.1.3	TRATAMIENTO DEL GLAUCOMA.....	5
<b>1.2</b>	<b>ACETAZOLAMIDA (ACZ) .....</b>	<b>5</b>
1.2.1	ANTECEDENTES.....	6
1.2.2	ESTRUCTURA QUÍMICA.....	6
1.2.3	MECANISMO DE ACCIÓN.....	7
1.2.4	CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y FARMACOCINÉTICAS.....	7
<b>1.3</b>	<b>FACTORES A TENER EN CUENTA EN EL DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN LÍQUIDA DE ADMINISTRACIÓN OFTÁLMICA .....</b>	<b>8</b>
1.3.1	FACTORES DERIVADOS DE LA ANATOMÍA Y FISOLOGÍA OCULAR.....	8
1.3.2	FACTORES DERIVADOS DE LA NATURALEZA DEL FÁRMACO.....	9
1.3.3	FACTORES DERIVADOS DE LA NATURALEZA DE LAS LÁGRIMAS.....	10
2	OBJETIVOS.....	11
3	METODOLOGÍA.....	11
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
<b>4.1</b>	<b>ASPECTOS TECNOFARMACÉUTICOS DE LA FORMULACIÓN: EXCIPIENTES A EMPLEAR.....</b>	<b>13</b>
4.1.1	VEHÍCULO.....	13
4.1.2	CORRECTOR DEL PH.....	14
4.1.3	SOLUBILIZANTE.....	15
4.1.4	PROMOTOR DE LA ABSORCIÓN / ANTIOXIDANTE.....	18

4.1.5	VISCOSIZANTE.....	19
4.1.6	CONSERVANTE.....	19
4.1.7	ISOTONIANTE .....	20
<b>4.2</b>	<b>FORMULACIÓN FINAL CUALI / CUANTITATIVA .....</b>	<b>23</b>
5	CONCLUSIONES.....	26
6	BIBLIOGRAFÍA.....	27

## **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 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  $\beta$ -adrenérgicos, mióticos, agonistas  $\alpha$ -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 de forma oral. La administración oral de ACZ disminuye la cantidad de humor acuoso producido por el epitelio ciliar. A pesar de su potente efecto hipotensor ocular su uso está limitado debido a las grandes dosis orales que se necesitan para disminuir la PIO, causando por lo general una multitud de efectos secundarios sistémicos.

El desarrollo de una formulación oftálmica efectiva que utilice como principio activo ACZ es un objetivo ampliamente investigado pero aún no logrado, ya que en la actualidad no existe comercializada ninguna formulación tópica para este fármaco. La causa puede residir en la baja solubilidad tanto en agua como en lípidos, ésta última 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 (Mora y cols., 2015).

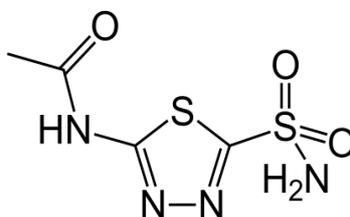
### 1.2.1 ANTECEDENTES

En 1940, Mann y Keilin observaron que cuando se administraba sulfanilamida como agente quimioterápico, producía como efecto secundario acidosis metabólica, 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 tras su administración oral (Becker, 1954; Gloster y Perkins, 1955). Recientemente han sido investigados nuevos inhibidores de la anhidrasa carbónica como son dorzolamida, brinzolamida o, aminozolamida (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, 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 1 se recoge su estructura.



**Figura 1.** 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  $H_2O$  y  $CO_2$  para formar ácido carbónico y, posteriormente, el ión bicarbonato ( $HCO_3^-$ ), como se muestra en la siguiente reacción:

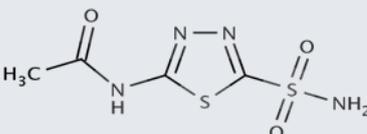


El ión  $\text{HCO}_3^-$  es responsable del movimiento de  $\text{Na}^+$  en el ojo y necesario para la producción del humor acuoso, ya que es el  $\text{Na}^+$  el que atrae al agua para formar el humor acuoso. La inhibición de la anhidrasa carbónica por fármacos, tales como ACZ, metazolamida y diclorofenamida, disminuye la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  y, por tanto, el flujo de  $\text{Na}^+$  y  $\text{H}_2\text{O}$  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.

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

<b>Fórmula molecular</b>	$\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2$
<b>Peso molecular</b>	222,24 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>pK<sub>a</sub></b>	7,4
<b>Solubilidad acuosa</b>	0,72 mg/mL

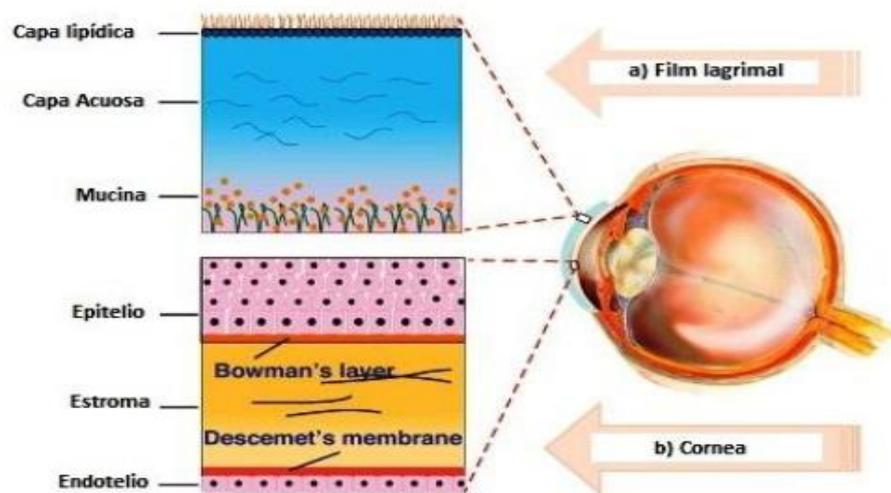
Este fármaco presenta una absorción adecuada en el tracto gastrointestinal, apareciendo la concentración plasmática máxima a las 2-4 horas tras su administración oral. Los niveles plasmáticos efectivos se mantienen durante 4-6 horas, y son paralelos al efecto hipotensor. La dificultad fundamental del 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. 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 se presenta como una alternativa a alcanzar.

### 1.3 FACTORES A TENER EN CUENTA EN EL DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN LÍQUIDA DE ADMINISTRACIÓN OFTÁLMICA

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 DERIVADOS DE LA ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA OCULAR

Desde un punto de vista fisiológico existen cinco regiones en el ojo a considerar a la hora de diseñar una forma farmacéutica de administración ocular (figura 2): la córnea, las glándulas lagrimales, la conjuntiva, la esclerótica y el film lagrimal (Vercruysse y Córdoba, 2012).



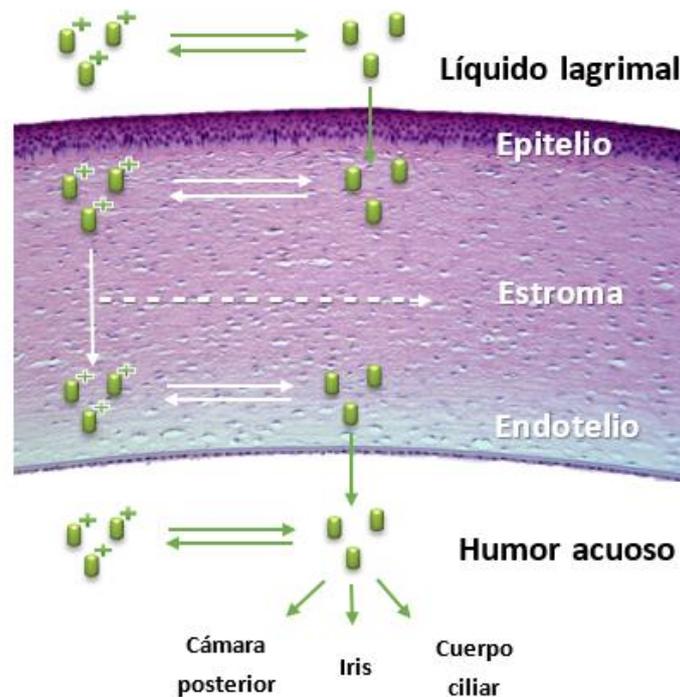
**Figura 2.** Representación de las partes del a) film lagrimal y b) córnea (Gan y cols., 2013).

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)

#### 1.3.2 FACTORES DERIVADOS DE LA NATURALEZA DEL FÁRMACO

El 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 3, 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 3.** Esquema del proceso de permeación de un fármaco a través de la córnea.

Además, hemos de señalar que 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).

### 1.3.3 FACTORES DERIVADOS DE LA NATURALEZA DE LAS LÁGRIMAS

Hemos de señalar que cuando una formulación oftálmica se instila en el ojo, su primer contacto es con la película lagrimal por lo que la naturaleza de ésta (osmolaridad, pH y viscosidad) son factores a tener a la hora de garantizar el éxito de una formulación oftálmica.

Así, 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).

En cuanto al pH de las lágrimas éste oscila entre 7 y 7,4 y es importante conocer 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).

Por último, hay que comentar que 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).

## 2 OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es doble.

En primer lugar trataremos de identificar las limitaciones que presenta la ACZ, fármaco utilizado en la terapia frente al glaucoma que dificultan su formulación como preparado oftálmico de administración tópica.

En segundo lugar, proponer de forma razonada en base a la revisión bibliográfica realizada sobre el tema, una formulación cuali-cuantitativa que incorpore los recursos tecnofarmacéuticos adecuados para permitir la administración tópica de dicho fármaco.

### 3 METODOLOGÍA

Para establecer los requisitos que debía cumplir una forma de administración oftálmica, y los recursos tecnofarmacéuticos disponibles para solucionar dicha problemática, se han consultado diferentes libros de texto y la Real Farmacopea Española 5ª ed.

Seguidamente se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica cuya finalidad es resumir los resultados de los estudios existentes en la literatura científica sobre el tema utilizado páginas web como pubmed, science direct y como palabras clave acetazolamida, administración tópica, estabilidad, solubilidad y permeabilidad tanto en español como en inglés.

Así mismo de forma puntual se ha consultado en la agencia española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS) para un aspecto muy concreto de la memoria, en concreto identificar si los colirios empleados en la terapia frente al glaucoma existentes en el mercado utilizaban cloruro de benzalconio como conservante o sistemas ABAK.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1.1 ASPECTOS TECNOFARMACÉUTICOS DE LA FORMULACIÓN: EXCIPIENTES A EMPLEAR

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.

Puesto que el objetivo de nuestro trabajo es el desarrollo de una formulación oftálmica acuosa para el tratamiento del glaucoma, se trata por tanto de un colirio. La Real Farmacopea 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.

A priori formular un colirio tipo solución parece lo más recomendable ya que al estar el fármaco disuelto el proceso de absorción se va a ver favorecido. Hay que tener en cuenta que obtener una solución va a depender de la dosis de fármaco empleada, y de su solubilidad y estabilidad en el vehículo elegido, en nuestro caso agua. Así, cuando el fármaco es inestable en solución o se emplea a elevadas dosis debe ser formulado como una suspensión, pero en este caso para que el fármaco pueda ser absorbido necesita previamente disolverse, por lo que presentará menor biodisponibilidad en velocidad.

En cuanto a la dosis elegida para nuestra formulación encontramos la primera limitación, dado que no existe una formulación oftálmica de aplicación tópica de ACZ comercializada, no podemos utilizar este dato como referencia. Por ello ha sido necesario buscar a nivel de nivel de investigación, que dosis se está actualmente ensayando con este fármaco para que resulte efectiva su administración. En este sentido hemos encontrado que una dosis de 5mg/mL muestra una disminución en la PIO (Petchimuthu y Narayanan, 2013).

Como colirio tipo solución, vamos a seleccionar de una forma justificada los excipientes necesarios y adecuados que proporcionen las mayores garantías de éxito para la administración oftálmica del fármaco en estudio.

### 4.1.2 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).

Su empleo en la formulación se hará en cantidad suficiente para el volumen deseado, que en nuestro caso a la hora de simplificar los cálculos del apartado cuantitativo será de 100 mL.

#### 4.1.3 CORRECTOR DEL PH

Formular un colirio tipo solución requiere que el fármaco presente una estabilidad adecuada en el medio elegido, por lo que el primer aspecto a investigar es la estabilidad acuosa de la ACZ. Los artículos consultados a este respecto indican que la ACZ presenta su máxima estabilidad acuosa a un pH de 4,5 (Petchimuthu y Narayanan, 2013).

Por tanto, podremos formular un colirio tipo solución para este fármaco siempre que usemos un pH ácido. Esto aunque a priori no es lo más adecuado ya que provocaría irritación y facilitaría el lagrimeo, no es un impedimento total, ya que el ojo tolera variaciones de pH que oscilan entre 3 y 9 unidades (Ahmed y Patton, 1984).

Además, el pH ejerce influencia sobre la proporción de forma ionizada y no ionizada y sus repercusiones en su solubilidad y permeabilidad. Recordemos que según la ecuación de Herdenson-Hasselbach cuanto menor sea el pH mayor es la proporción de forma no ionizada y por tanto disminuye su solubilidad acuosa aunque se favorece su paso a través de barreras lipídicas.

Por todo lo comentado anteriormente, el pH de una formulación oftálmica suele ser un compromiso entre el pH de máxima estabilidad del fármaco y el de la lágrima, y los requerimientos de solubilización y permeación del fármaco.

La regulación del pH de una formulación oftálmica se puede lograr adicionando correctores de 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 como hemos comentado por la estabilidad en medio líquido de nuestro fármaco.

La Real Farmacopea Española 5ª ed. describe la preparación de dicho tampón, que para pH 5,34 requiere la utilización de 0,27 mg de ácido cítrico 1-hidrato y 3,17 mg di-sodio hidrógeno fosfato 2-hidrato, para preparar 100 mL de tampón.

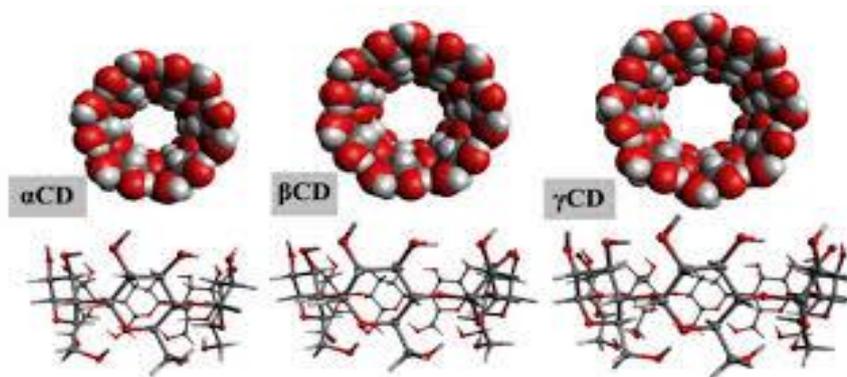
#### 4.1.4 SOLUBILIZANTE

La baja solubilidad acuosa de nuestro fármaco, anteriormente comentada, implica que para obtener una formulación tipo solución tengamos que utilizar un agente solubilizante.

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 HPβCD, ensayada con éxito para este fármaco por diferentes autores (Pérez-Barrales y cols., 1995; Loftsson y Järvinen, 1999; Granero y cols., 2008).

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:  $\alpha$ -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 (Szejtli, 1984; Moyano y cols., 1994). Sus estructuras se recogen en la figura 4.

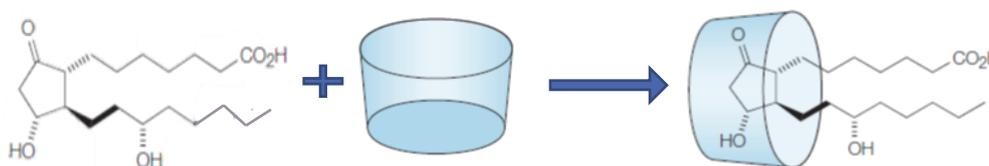


**Figura 4.** Estructura química de las CDs naturales (Torralba, 2014).

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, pudiendo mejorar algunas propiedades de la sustancia alojada como son la solubilidad y estabilidad. (Saenger, 1980).

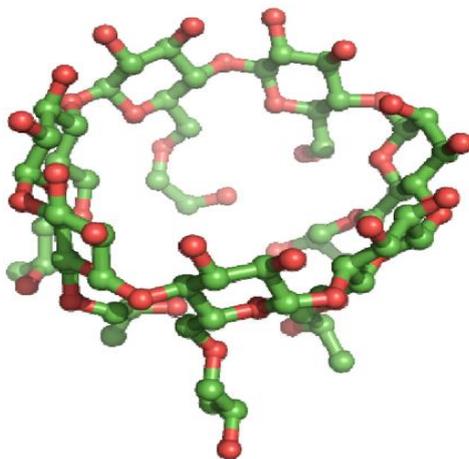
Un complejo es la asociación reversible de  $m$  moléculas de substrato (principio activo) con  $n$  moléculas de ligando (sustancia complejante) para dar lugar a una nueva especie que puede presentar una mayor solubilidad y velocidad de disolución (Stella, 1980).

El proceso global se ve esquematizado en la figura 5.



**Figura 5.** Esquema de la formación de un complejo de inclusión (Davis y Brewster, 2015).

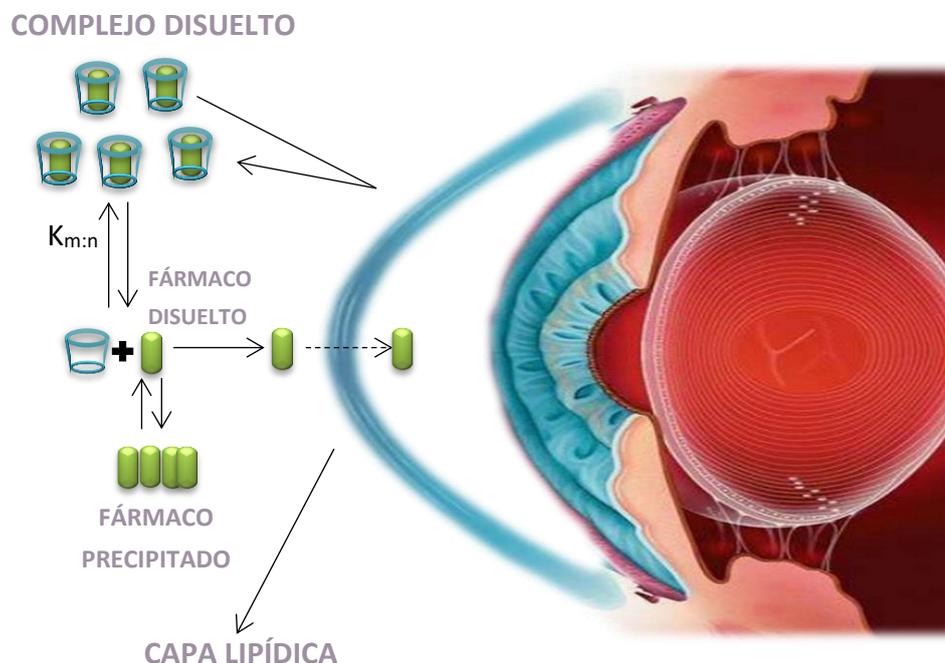
La HP $\beta$ CD es un derivado hidroxipropilado de la  $\beta$ CD que presenta mayor solubilidad que la CD de partida y que forma complejos sin límite de solubilidad, por lo que es muy utilizada en formulaciones acuosas. Su estructura se recoge en la figura 6 (Szejtli, 1984).



**Figura 6.** Estructura de la 2-HP $\beta$ CD (Danciu y cols., 2014).

Por último, un aspecto interesante a considerar es la influencia que puede ejercer la formación del complejo de inclusión fármaco-CD en el proceso de permeación ocular del fármaco. 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 (Frömming y Szejtli, 1994; Lipinski y cols., 2001), por lo que sólo la fracción libre del fármaco puede atravesar la córnea (figura 7).



**Figura 7.** Esquema del proceso de absorción de un fármaco administrado vía ocular en forma de complejo de inclusión con CDs.

Según se deduce del proceso esquematizado en la figura 7, complejos con bajos valores de constantes de estabilidad, 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 estabilidad 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  $5000 \text{ M}^{-1}$  (Blanco y cols., 1991).

La determinación del aspecto cuantitativo de la formulación en lo referente a la cantidad de solubilizante a emplear es un aspecto complejo y requiere conocer la estequiometría del proceso de complejación y constante del proceso. En nuestro caso, la revisión bibliográfica realizada (Loftsson y cols., 2008), ha puesto de manifiesto que el proceso de complejación de la ACZ con la HP $\beta$ CD en medio líquido responde a diagramas de solubilidad lineales donde el complejo formado no presenta un límite de solubilidad. Teniendo en cuenta este diagrama y

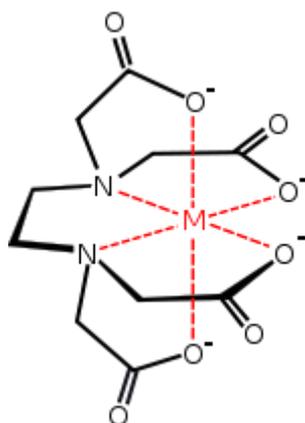
que es recomendable disponer de un cierto margen de solubilización para evitar que posibles cambios en la formulación diseñada pudieran acabar con la precipitación del fármaco, hemos decidido utilizar una concentración de HP $\beta$ CD similar a estos autores del 16,5% p/v.

#### 4.1.5 PROMOTOR DE LA ABSORCIÓN / ANTIOXIDANTE

Otro aspecto a considerar en nuestra formulación son los problemas de permeación que puede presentar un fármaco (Bosman y cols. 1992; Villarino y Landoni 2006;). Existen varias formas para intentar solucionar esta limitación. Una posibilidad es utilizar liposomas (Abad, 2012), pero lo más simple y habitual en las formulaciones oftálmicas es incluir en la formulación un promotor de la absorción, entre los que destaca el AEDT ensayado con buenos resultados para la ACZ (Hochman y Artrusson, 1994). Esta sustancia es capaz de alterar la estructura de las membranas celulares de la córnea facilitando el transporte paracelular de las moléculas de fármaco.

Además, 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. (Moliere y Rojas, 2007, Rowe y cols., 2012).

Por último, debemos señalar que AEDT se le puede catalogar como un agente antioxidante por mecanismo quelante, ya que es capaz de unirse de forma reversible a iones metálicos por sus cuatro posiciones acetato y dos aminas, que lo convierten en un ligando hexadentado (figura 8), lo que puede ayudar a mejorar posibles problemas de estabilidad de la ACZ.



**Figura 8.** Estructura del complejo formado por EDTA con un metal (Quimitube, 2015).

Así, es muy utilizado en formulaciones acuosas como antioxidante al presentar la capacidad de secuestrar trazas de iones metálicos, en particular cobre, hierro y manganeso, que de otro modo podrían catalizar reacciones de autooxidación.

El EDTA se suele utilizar a una concentración comprendida entre el 0,005 y 0,1% p/v, habiendo elegido en nuestro caso una concentración intermedia del 0,05% p/v utilizada por algunos autores a la cual este producto manifiesta un efecto promotor efectivo para nuestro fármaco (Petchimuthu y Narayanan, 2013).

#### **4.1.6 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). componentes de la formulación).

Además, el viscosizante utilizado debe ser soluble ya que en caso contrario obtendríamos una suspensión en lugar de la solución planteada, y los viscosizantes más habituales como son los derivados celulósicos no lo son.

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, como ocurre en el caso de nuestra formulación, donde el empleo de HP $\beta$ CD al 16,5% p/v aporta a viscosidad a la formulación.

#### **4.1.7 CONSERVANTE**

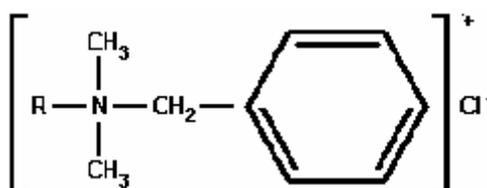
Todo preparado oftálmico debe prepararse en condiciones de esterilidad y mantenerlas durante el periodo de utilización por parte del paciente. Hay que señalar que el uso de conservantes sólo

debe ser utilizado el caso de formulaciones multidosis de pequeño volumen, como es el caso de los colirios, 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. Así, para 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).

También tendríamos la posibilidad de elaborar una formulación multidosis con sistema ABAK, es decir sin emplear conservantes. Se trata de un sistema alternativo que incorpora un sistema filtrante formado por una membrana multicapa de nylon con un poro de 0,2 µm que impide su contaminación bacteriana por lo que no sería necesario incluir conservantes en la formulación, garantizando la esterilidad durante 2 meses. El único problema es que su utilización encarecería la posible puesta en el mercado de nuestra formulación

A la hora de elegir entre las dos posibles alternativas anteriormente comentadas, decidimos consultar la AEMPS para ver que opción predominaba entre las formas actualmente comercializadas. Los resultados fueron muy concluyentes, la totalidad de las formas usadas para el tratamiento del glaucoma utilizaban cloruro de benzalconio en combinación con el AEDT, mientras que el sistema ABAK era utilizado mayoritariamente por las formulaciones para el tratamiento del ojo seco. Estos resultados tienen su lógica, cuando se utiliza una formulación con un promotor de la absorción se corre el riesgo de posible penetración de microorganismos patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, patógeno habitual de la flora ocular, por lo que resulta más adecuado el uso de cloruro de benzalconio en combinación con dicho promotor por su efecto sinérgico anteriormente comentado.

Su nombre químico es cloruro de alquildimetil(fenilmetil)amonio y a continuación recogemos su estructura:



**Figura 9.** Estructura química del cloruro de benzalconio (Organo Síntesis, 2013).

El cloruro de benzalconio se utiliza como conservante antimicrobiano, antiséptico, desinfectante, agente solubilizante y agente humectante. Es un compuesto de amonio

cuaternario de naturaleza tensioactiva que en preparaciones oftálmicas se utiliza a concentraciones que varían desde 0,05 al 0,001% p/v (Herrero 2007; Charles y cols., 2011).

Los tensioactivos actúan sobre los microorganismos alterando la membrana celular y produciendo lisis del contenido del citoplasma. Las células de los mamíferos no pueden neutralizar los conservantes químicos así que el conservante se incorpora en la célula y da lugar al efecto tóxico. El ejemplo clásico de este tipo de agentes es el cloruro de benzalconio. Como tensioactivo iónico que es, en solución acuosa se disocia en un catión, responsable de la acción bacteriana y en un anión inactivo. Tiene acción bactericida a tres niveles como son, alteración de la membrana celular, desnaturalización de proteínas e inactivación enzimática. Este mecanismo de acción se debe a su estructura anfipática, esto es gracias a las cadenas carbonadas hidrófobas que penetran en las membranas, mientras que a través del nitrógeno catiónico hidrófilo, interacciona con los fosfatos de los fosfolípidos. Esta alteración provoca la salida del material citoplasmático hacia el exterior y la alteración celular.

En cuanto a su actividad antimicrobiana, es bacteriostático a bajas dosis y bactericida a altas dosis, siendo activo frente a una amplia gama de bacterias, levaduras y hongos, aunque presenta una actividad más marcada frente a Gram positivas que a Gram negativas, siendo mínima su actividad frente a endosporas bacterianas y bacterias ácido alcohol resistente (Rowe y cols., 2012).

Por todo lo anteriormente expuesto decidimos incorporar cloruro de benzalconio a nuestra formulación como agente conservante en una concentración de 0,01% p/v, concentración que se encuentra en el intervalo recomendado para la vía oftálmica.

#### **4.1.8 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.

La osmolaridad fisiológica de la lágrima esta alrededor de los 300 mOsm/l, una osmolaridad menor de 100 mOsm/l irrita el ojo y produce edema. La corrección de isotonicidad de los preparados oftálmicos se suele conseguir adicionando electrolitos entre los más utilizados destacan el cloruro de sodio, cloruro potásico, cloruro cálcico y cloruro magnésico, aunque no debemos olvidar que todos los componentes sólidos disueltos en el medio aportan tonicidad,

por este motivo el ajuste isotónico se debe realizar una vez conocido la composición cuantitativa del resto de componentes de la formulación.

A la hora de realizar el ajuste isotónico hemos de tener en cuenta las llamadas condiciones de isotonía, que en caso de cumplirse en nuestra formulación nos aseguran que el medicamento elaborado es isotónico con el medio en cuestión. En la tabla 2 se recogen dichas condiciones y el parámetro fisicoquímico que es necesario conocer para realizar dicho ajuste.

**Tabla 2.** Condiciones de isotonía y parámetros fisicoquímicos para su cálculo.

CONDICIONES DE ISOTONÍA	PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS
<b>0,9 g de NaCl / 100 mL de formulación</b>	Equivalente isotónico ( $E_i$ )
<b>0,028 Osmoles/100 mL de formulación</b>	Factor de ionización ( $i$ ) Peso Molecular ( $P_m$ )
<b>Descenso crioscópico de 0,52°C</b>	Descenso crioscópico sol 1% p/v ( $\Delta c$ 1% p/v)

El primer problema que se nos plantea a la hora de realizar el ajuste es determinar estos parámetros para cada uno de los componentes elegidos para nuestra formulación.

En la primera condición necesitamos conocer el  $E_i$ , es decir el factor corrector para transformar los gramos de cualquier sustancia a su equivalente en NaCl, una vez conocido este factor sumaremos el contenido de nuestra formulación en NaCl por 100 mL y restándolo del valor de referencia isotónico de 0,9% p/v tendremos los gramos necesarios de NaCl por 100 mL que deberá contener nuestra formulación. De lo anteriormente expuesto se deduce que el  $E_i$  para el NaCl es la unidad.

Si aplicamos la segunda condición hay que tener en cuenta que los osmoles en solución de un preparado isotónico deben ser 0,028 Osmol/100 mL. Puesto que los Osmoles de un producto son los moles en solución de dicho producto, es necesario conocer el factor de ionización de cada sustancia para transformar los moles adicionados de cada sustancia ( $g/P_m$ ) a moles en solución, es decir Osmoles mediante una simple multiplicación ( $g/P_m \times i$ ). Como en el caso anterior la suma de los Osmoles en solución por 100 mL aportados por los componentes restado del valor de referencia (0,028 Osmol/100 mL), nos indica el número de Osmol/100 mL de agente isotonzante a adicionar, en nuestro caso NaCl. Si una sustancia no sufre procesos de ionización su  $i$  es la unidad.

Por último de forma similar se procedería conociendo los descensos crioscópicos de los componentes de la formulación. En este caso al restarlo del valor de referencia nos daría el descenso que nos falta para alcanzar la condición de isotonía, una vez calculado puede ser transformado a gramos de NaCl u Osmol por 100 mL teniendo en cuenta la siguiente relación de equivalencia:

$$0,9 \text{ g NaCl}/100 \text{ mL} \leftrightarrow 0,028 \text{ Osmol} / 100 \text{ mL} \leftrightarrow \Delta c 0,052^\circ\text{C}$$

Caso de no disponer de los mismos parámetros fisicoquímicos para todos los componentes de la formulación podemos usar la relación de equivalencia anterior para poder transformarlos y utilizar un mismo criterio, que es justo lo que ha ocurrido en nuestro caso. En la siguiente tabla se recogen los datos de nuestra formulación a partir de los cuales procedemos a realizar el cálculo de la cantidad necesaria de NaCl para conseguir que nuestra formulación sea isotónica.

**Tabla 3.** Propiedades fisicoquímicas de los componentes de la formulación utilizados para isotonzar 100 mL de colirio.

FORMULACIÓN	PARÁMETRO FISICOQUÍMICO
ACZ	Pm 222,24 i=1
HPβCD	Pm 1370 ..... i=1
Ácido cítrico 1-hidrato	$\Delta c$ 1% p/v = 0,100 °C (Del Pozo )
Di-sodio hidrógeno fosfato 2-hidrato	$\Delta c$ 1% p/v = 0,069 °C (Del Pozo)
AEDT	$\Delta c$ 1% p/v = 0,132 °C (Del Pozo)
Cloruro de benzalconio	$\Delta c$ 1% p/v = 0,091 °C (Del Pozo)

Dado que para la ACZ y la HPβCD no hemos encontrado el dato del descenso crioscópico, tendremos que trabajar calculando los Osmoles que aportan a la disolución y transformándolos posteriormente a gramos de NaCl mediante la relación de equivalencia anteriormente comentada. Para el resto de la formulación calcularemos el descenso crioscópico aportado en

función de su concentración y transformaremos seguidamente dicho descenso a gramos de NaCl de forma similar.

Seguidamente recogemos en forma de tabla resumen los diferentes cálculos realizados para el ajuste isotónico para 100 mL de formulación:

**Tabla 4.** Tabla resumen con los cálculos necesarios para el ajuste isotónico para 100 mL de formulación.

COMPONENTES	% p/v	OSMOLES	$\Delta c$ °C	g NaCl/100 mL
Acetazolamida	0,5	0.00225		0,072
HP- $\beta$ -ciclodxtrina	16,5	0.01196		0,384
Ácido cítrico 1-hidrato	0,27		0,0270	0,047
Di-sodio hidrógeno fosfato 2-hidrato	3,17		0,2189	0,378
AEDT	0,1		0,0067	0,022
Cloruro de benzalconio	0,05		0,0009	0,008

Si sumamos los gramos de NaCl para 100 mL de formulación aportados por todos los componentes obtenemos un valor de 0,911, como dicho valor supera la condición de isotonía de 0,9 g de NaCl/100 mL debemos concluir que nuestra formulación es ligeramente hipertónica, por lo que no es necesario añadir ningún isotonzante específico.

Como indicamos anteriormente, esto no supone ningún problema pues el ojo tolera un intervalo que oscila entre el 0,7 y 2% p/v de NaCl (Vila-Jato y cols., 1997).

Como se puede observar en la tabla 4 son dos los motivos principales que justifican este resultado. El primero es la alta concentración del solubilizante empleado, la HP $\beta$ CD, que está justificada por la necesidad de solubilización del fármaco. El segundo es la naturaleza iónica del tampón elegido, en efecto la aportación del cítrico y el fosfato, los dos componentes del tampón, aportan casi la mitad del NaCl requerido para hacer isotónica la formulación,

#### 4.2 FORMULACIÓN FINAL CUALI / CUANTITATIVA

Para concluir la memoria recogemos en la siguiente tabla la composición cuali-cuantitativa de la formulación planteada, así como la función de cada componente.

**Tabla 5.** Formulación cuali-cuantitativa para la administración oftálmica de acetazolamida, y función de cada componente.

FORMULACIÓN	FUNCIÓN	% p/v
Acetazolamida	FÁRMACO	0,5
HP $\beta$ CD	SOLUBILIZANTE	16,5
Ácido cítrico 1-hidrato	REGULADOR DE pH	0,27
Di-sodio hidrógeno fosfato 2-hidrato	REGULADOR DE pH	3,17
AEDT	PROMOTOR DE LA ABSORCIÓN ANTIOXIDANTE	0,1
Cloruro de benzalconio	CONSERVANTE	0,05
AGUA PURIFICADA	c.s.p.	100 mL

## 5 CONCLUSIONES

- 1.- Hemos elegido un colirio tipo solución acuosa como forma farmacéutica por su mejor biodisponibilidad en velocidad. Para ello debido a la baja solubilidad acuosa del fármaco se necesita la incorporación de un agente solubilizante efectivo, y más en concreto HP $\beta$ CD al 16,5% p/v.
- 2.- Los problemas de estabilidad acuosa de la ACZ hacen necesario formular nuestro colirio a un pH 5,34 aportado por el tampón cítrico/fosfato.
- 3.- La baja lipofilia del fármaco nos condiciona a utilizar en nuestra formulación un promotor de la absorción como es el AEDTa al 0,1% p/v, ensayado con buenos resultados para la ACZ.
- 4.- A pesar de tener la opción de elaborar la formulación mediante un sistema ABAK, se ha preferido el empleo de un conservante tradicional como es el cloruro de benzalconio al 0,1% p/v por su menor coste económico a la hora de una posible puesta en el mercado y por su efecto frente a *Pseudomonas aeruginosa*, potenciado por el uso conjunto con AEDT.
- 5.- El ajuste isotónico de la formulación nos muestra que es no necesario adicionar ningún agente isotonizante específico ya que la formulación es ligeramente hipertónica.
- 6.- Hemos decidido no utilizar ningún viscosizante específico ya que los componentes de la formulación y en especial la HP $\beta$ CD pueden aportar una viscosidad adecuada para su administración. Además su empleo puede dificultar la permeación del fármaco y harían más hipertónica la formulación.

## 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.

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.

Charles S, Tressler MD, Richard MD, Michael A. Preservative Use in Topical Glaucoma Medications. *Clin Sci.* 2011; 9(3): 140-158.

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.

Del Pozo A. Problemas de farmacia galénica general 1ª ed. Barcelona: Universidad de Barcelona; 1975.

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

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.

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 acetazolamide-Hidroxi-propyl-Beta-Cyclodextrine 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.

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- $\beta$ -Cyclodextrin Complexation of Drugs. *Drug Develop. Ind. Pharm.* 1996; 22(5): 401-405.

Loftsson T, Hreinsdóttir D, Mátsson 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>

Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) [En línea]. [Consultado en agosto 2017]. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/cima/inicial.do>

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.

Organo Síntesis. Cloruro de N-alkil dimetil bencilamonio. 2013. [Consultado en Abril 2015]. Disponible en: [http://www.organosintesis.com/sp\\_ossamoniocb80.html](http://www.organosintesis.com/sp_ossamoniocb80.html)

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; 613-614.

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. 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>

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<sup>a</sup> 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  $\beta$ -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.

Vercruyssen 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<sup>a</sup> ed. Madrid: Síntesis; 1997.

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