



**UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:  
DISEÑO Y EVALUACIÓN DE FORMAS FARMACÉUTICAS**

**“EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y DE LA  
CINÉTICA DE DIFUSIÓN PERCUTÁNEA *IN VITRO* DE CRISTALES  
LÍQUIDOS LIOTRÓPICOS CARGADOS CON KETOCONAZOL”**

**IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL  
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**PRESENTA**

**Q.F.B CÉSAR GAZGA URIOSTE  
2133800283**

**COMITÉ TUTORAL**

**TUTOR: DR. CARLOS TOMÁS QUIRINO BARREDA Vo.Bo. \_\_\_\_\_  
ASESORA: DRA. NORMA ANGÉLICA NOGUEZ MÉNDEZ Vo.Bo. \_\_\_\_\_  
ASESOR: DR. ERNESTO RIVERA BECERRIL Vo.Bo. \_\_\_\_\_**

**Noviembre, 2015**

**“EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y DE LA  
CINÉTICA DE DIFUSIÓN PERCUTÁNEA *IN VITRO* DE CRISTALES  
LÍQUIDOS LIOTRÓPICOS CARGADOS CON KETOCONAZOL”**

**COMITÉ TUTORAL**

**TUTOR: DR. CARLOS TOMÁS QUIRINO BARREDA**  
Vo.Bo. \_\_\_\_\_

**ASESORA: DRA. NORMA ANGÉLICA NOGUEZ MÉNDEZ**  
Vo.Bo. \_\_\_\_\_

**ASESOR: DR. ERNESTO RIVERA BECERRIL**  
Vo.Bo. \_\_\_\_\_

**ALUMNO: Q.F.B CÉSAR GAZGA URIOSTE**

**MATRÍCULA: 2133800283**

**FIRMA: \_\_\_\_\_**

**“EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y DE LA  
CINÉTICA DE DIFUSIÓN PERCUTÁNEA *IN VITRO* DE CRISTALES  
LÍQUIDOS LIOTRÓPICOS CARGADOS CON KETOCONAZOL”**

**JURADO**

---

**PRESIDENTE: DRA. DEA HERRERA RUÍZ**

---

**VOCAL: DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD**

---

**SECRETARIO: DR. CARLOS TOMÁS QUIRINO BARREDA**

## RESUMEN

Actualmente existe gran interés en el desarrollo de formas farmacéuticas de uso tópico y transdérmico para la administración de fármacos y una de las tendencias más recientes en tecnología y nanotecnología farmacéutica, es el diseño de formas farmacéuticas innovadoras que incrementen la efectividad por vía tópica de fármacos como el ketoconazol, cuya eficacia terapéutica a las dosis requeridas por otras vías como la oral, le generan al paciente problemas de intolerancia o toxicidad (AEMPS, 2013).

En este contexto, los cristales líquidos como sistemas nanoestructurados, constituyen vehículos de dosificación novedosos por su considerable capacidad para solubilizar tanto fármacos liposolubles como hidrosolubles (Hitesh y cols., 2011), y porque muestran similitud con distintas estructuras de la piel, así como capacidad para penetrar el estrato córneo (Guo y cols., 2010 y Patel y cols., 2010). El presente documento evalúa y profundiza en el conocimiento de las propiedades físico-químicas de sistemas nanoestructurados líquido-cristalinos liotrópicos, así como de la cinética de liberación y de permeación dérmica en modelos *in vitro* del ketoconazol cuando éste es parte de dichos sistemas. Los resultados muestran la formación de una estructura hexagonal de tamaño nanométrico con ligera carga superficial para los sistemas que contienen al fármaco y cuyas propiedades morfológicas y reológicas sugieren la formación de un sistema nanoestructurado en dispersión acuosa de cristales líquidos hexagonales o hexosomas, que por medio del análisis de su comportamiento térmico, muestran estabilidad en un periodo de tiempo superior a 6 meses. Por otro lado, la nanoestructura líquido-cristalina es capaz de liberar al fármaco con una cinética descrita por el modelo de primer orden y en cuanto a ensayos *in vitro* empleando membranas artificiales, la permeación muestran apegarse a un mecanismo de difusión complejo descrito por el modelo de Korsmeyer-Peppas. Por último, los ensayos de permeación *in vitro* con membranas de piel de oreja de cerdo revelan que este sistema es capaz de depositar al fármaco entre los estratos de la piel, convirtiendo a estos sistemas nanoestructurados líquido-cristalinos liotrópicos hexosómicos en nanomedicinas promisorias para la liberación controlada de fármacos por vía tópica.

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

El alumno agradece al CONACyT por la beca otorgada (CVU becario: 553375), que permitió la realización de este proyecto.

Se agradece a los Departamentos de Ciencias Naturales (DCN) y de Procesos y Tecnología (DPT) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa (UAM-C), por haberme permitido hacer uso de sus instalaciones (laboratorios de Biofísicoquímica y de Espectroscopía), reactivos y equipos durante la realización de este proyecto, así como por la asesoría brindada por sus investigadores.

Se agradece al Departamento de Sistemas Biológicos (DSB) de la Unidad Xochimilco de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-X), porque a través del Área de Tecnología Farmacéutica, facilitó el uso de los instrumentos analíticos del Área de Equipamiento Común de la Unidad Interdisciplinaria de Docencia, Investigación y Servicios (UIDIS). Así mismo y de manera particular, al equipo de investigadores del Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada, por las facilidades y apoyo otorgados para el uso de instalaciones, equipamiento y recursos materiales que permitieron la realización de este proyecto.

Se agradece a la M. en C. Marcela Hurtado y de la Peña, investigadora del Laboratorio de Farmacocinética y Farmacodinamia de la UAM-X, y responsable del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) del Área de Equipamiento Común de la UIDIS, por su orientación, apoyo y las facilidades otorgadas para el uso de este instrumento.

Se agradece a la empresa Químicos Lyontec, S. de R. L. de C.V., y de manera particular a la QFB. Dalia Toledo, por la generosa dotación de muestras de varios de los excipientes de la marca Gattefossé utilizados en la formación de los sistemas nanoestructurados de este proyecto.

Se agradece los servicios de microscopía electrónica de transmisión del Laboratorio de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y de la asesoría para este efecto, proporcionada por el M. en C. Jorge Sepúlveda Sánchez, de la UAM-Iztapalapa.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Al Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda: Por la confianza depositada en mí para la realización de este proyecto, el apoyo, la paciencia y asesoría brindados y por ayudarme a crecer a nivel profesional y personal.

A la Dra. Norma Angélica Noguez Méndez: Por su asesoría, gentileza y buen humor que me acompañaron durante esta etapa y me permitieron cumplir con los objetivos planteados.

Al Dr. Ernesto Rivera Becerril: Por su gran apoyo y sabio consejo que permitieron que el trabajo realizado rebasara los objetivos planteados, permitiéndome así obtener una formación más completa.

Al Dr. Gerardo Pérez Hernández: Por su constante apoyo, asesoría y dedicación que me permitieron profundizar y mejorar en mi desarrollo académico y profesional.

Al Dr. Abraham Faustino Vega: Por su apoyo, asesoría y acertadas observaciones que permitieron hacerme de un razonamiento más crítico y preciso.

A Gloria Urioste Castrejón: Por ser una motivación constante y mi mayor ejemplo de superación y perseverancia. Por todo el apoyo, amor y paciencia brindados y por enseñarme que la vida no debe medirse únicamente en términos de las victorias, sino también en cuanto a los amigos, experiencias y todas esas pequeñas cosas que a veces pasamos por alto.

A Héctor Adolfo Gazga Bello: Por ser siempre mi modelo a seguir, asesor y amigo en cada etapa de mi vida. Por todo el apoyo otorgado, por haberme mostrado que para hacer las cosas bien únicamente hay que desear hacerlo y que no existen atajos, únicamente el esfuerzo honesto. Por tus constantes enseñanzas, y por hacerme ver que cada deficiencia puede ser en realidad una oportunidad de crecimiento.

A Karla Gazga Urioste: Por permitirme verte crecer como persona y como profesional, por ser mi amiga, mi motivación y orgullo.

A Julia Jimena Falcón Gerónimo: Consciente de que no existen palabras que me permitan expresar lo agradecido que estoy con la vida por haberte colocado en mi camino, únicamente diré gracias por compartir conmigo un mar de experiencias maravillosas y por acompañarme y apoyarme en aquellas situaciones difíciles. Te estoy inmensamente agradecido por dejarme ver la vida a través de tus ojos y por mostrarme siempre una sonrisa. Por lograr hacer de mí la persona que jamás imaginé que podía ser, por nunca dejarme caer, por toda la paciencia y por siempre creer en mí.

A Manuel Alejandro Barrón Cruz, José de Jesús Juárez Sandoval y Xóchitl Citlali Palomec Reyes, por su inmensurable apoyo que me permitió superar los objetivos planteados. Por demostrar ser grandes profesionales, por compartirme sus experiencias y dejarme aprender de ustedes.

| <b>ÍNDICE GENERAL</b> |   | <b>Página</b> |
|-----------------------|---|---------------|
|                       | Glosario  | 16            |
| <b>1.</b>             | Introducción  | 17            |
| <b>2.</b>             | Antecedentes y Planteamiento del Problema                                       | 19            |
| <b>3.</b>             | Marco Teórico   | 21            |
| <b>3.1.</b>           | La Piel, Estructura y Funciones   | 21            |
| <b>3.2.</b>           | La Piel como Barrera  | 25            |
| <b>3.2.1.</b>         | Penetración a Través del Estrato Córneo   | 28            |
| <b>3.2.2.</b>         | Modulación de la Penetración en la Piel   | 28            |
| <b>3.2.3.</b>         | Determinación de la Permeación en la Piel                                       | 32            |
| <b>3.3.</b>           | Micosis   | 34            |
| <b>3.4.</b>           | Antimicóticos   | 36            |
| <b>3.4.1.</b>         | Ketoconazol   | 38            |
| <b>3.4.1.1.</b>       | Ketoconazol como Agente Terapéutico   | 38            |
| <b>3.4.1.2.</b>       | Limitaciones y Riesgos del Uso de Ketoconazol                                   | 39            |
| <b>3.4.1.3.</b>       | Características Fisicoquímicas del Ketoconazol                                  | 40            |
| <b>3.5.</b>           | Cristales Líquidos (CL)   | 41            |
| <b>3.5.1.</b>         | Cristales Líquidos Termotrópicos (CLT)  | 41            |
| <b>3.5.2.</b>         | Cristales Líquidos Liotrópicos (CLL)  | 44            |
| <b>3.5.2.1.</b>       | Formación y Aplicaciones Farmacéuticas de los CLL                               | 46            |
| <b>3.5.2.2.</b>       | CLL como Sistemas de Liberación de Fármacos por Vía Tópica                      | 49            |
| <b>3.5.3.</b>         | Estabilidad de las Emulsiones y Sistemas Coloidales                             | 52            |
| <b>3.5.4.</b>         | Estabilidad de los Sistemas Líquido-Cristalinos Liotrópicos                     | 57            |
| <b>3.6.</b>           | Métodos para Caracterizar Sistemas Líquido-Cristalinos                          | 59            |
| <b>3.6.1.</b>         | Microscopía de Luz Polarizada   | 59            |
| <b>3.6.2.</b>         | Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)                                    | 59            |
| <b>3.6.3.</b>         | Difractometría de Rayos X   | 60            |
| <b>3.6.4.</b>         | Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)                                       | 61            |
| <b>3.6.5.</b>         | Reología  | 64            |
| <b>3.6.6.</b>         | Espectroscopía de Correlación de Fotones. Determinación de Tamaño de Partícula. | 67            |



| <b>ÍNDICE GENERAL (cont.)</b> |   | <b>Página</b> |
|-------------------------------|---|---------------|
| <b>4.</b>                     | Hipótesis   | 71            |
| <b>5.</b>                     | Objetivo General  | 71            |
| <b>5.1.</b>                   | Objetivos Particulares  | 71            |
| <b>6.</b>                     | Materiales y Métodos  | 72            |
| <b>6.1.</b>                   | Obtención de los Sistemas tipo Cristal-Líquido Liotrópico Hexosómico sin (CLLH) y con Ketoconazol (CLLH-KTZ)        | 72            |
| <b>6.2.</b>                   | Determinación de la Estructura por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)                                     | 72            |
| <b>6.3.</b>                   | Determinación del Tamaño de Partícula y Potencial Z de los Sistemas sin (CLLH) y con Ketoconazol (CLLH-KTZ)         | 73            |
| <b>6.4.</b>                   | Viscosidad de los sistemas sin (CLLH) y con Ketoconazol (CLLH-KTZ)  | 73            |
| <b>6.5.</b>                   | Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)   | 74            |
| <b>6.6.</b>                   | Desarrollo de Métodos Analíticos para la Cuantificación de Ketoconazol  | 75            |
| <b>6.7.</b>                   | Estudio de las Cinéticas de Liberación y Permeación <i>in vitro</i> del Sistema CLLH-KTZ                            | 76            |
| <b>6.7.1.</b>                 | Cinética de liberación de Ketoconazol desde el sistema CLLH-KTZ   | 76            |
| <b>6.7.2.</b>                 | Evaluación de la Cinética de Permeación utilizando Membranas Artificiales Mediante el Modelo de Celdas de Franz     | 77            |
| <b>6.7.3.</b>                 | Evaluación de la Cinética de Permeación y Retención en Piel de Oreja de Cerdo Mediante el Modelo de Celdas de Franz | 78            |
| <b>7.</b>                     | Resultados y Discusión  | 80            |
| <b>7.1.</b>                   | Obtención de los Sistemas tipo Cristal Líquido Liotrópico Hexosómico sin (CLLH) y con Ketoconazol (CLLH-KTZ)        | 80            |
| <b>7.2.</b>                   | Determinación de la Estructura por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)                                     | 80            |
| <b>7.3.</b>                   | Determinación del Tamaño de Partícula y Potencial Z de los Sistemas sin (CLLH) y con Ketoconazol (CLLH-KTZ)         | 82            |

| <b>ÍNDICE GENERAL (Cont.)</b> |   | <b>Página</b> |
|-------------------------------|---|---------------|
| <b>7.4.</b>                   | Viscosidad de los sistemas sin (CLLH) y con Ketoconazol (CLLH-KTZ)  | 89            |
| <b>7.5.</b>                   | Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)   | 98            |
| <b>7.6.</b>                   | Desarrollo de Métodos Analíticos para la Cuantificación de Ketoconazol  | 105           |
| <b>7.7.</b>                   | Estudio de las Cinéticas de Liberación y Permeación <i>in vitro</i> del Sistema CLLH-KTZ                            | 107           |
| <b>7.7.1.</b>                 | Cinética de liberación de Ketoconazol desde el sistema CLLH-KTZ   | 107           |
| <b>7.7.2.</b>                 | Evaluación de la Cinética de Permeación utilizando Membranas Artificiales Mediante el Modelo de Celdas de Franz     | 110           |
| <b>7.7.3.</b>                 | Evaluación de la Cinética de Permeación y Retención en Piel de Oreja de Cerdo Mediante el Modelo de Celdas de Franz | 113           |
| <b>8.</b>                     | Conclusiones  | 121           |
| <b>9.</b>                     | Referencias Bibliográficas  | 123           |
|                               | Índice de Tablas  | 11            |
|                               | Índice de Figuras   | 12            |
|                               | Anexo   | 133           |

---

## ÍNDICE DE TABLAS

---

| <b>Tabla</b> |  | <b>Página</b> |
|--------------|--|---------------|
| <b>3.1.</b>  | Mesofases cúbicas y hexagonales como vehículos para fármacos reportados entre 2004-2009.   | 50            |
| <b>3.2.</b>  | Mesofases cúbicas y hexagonales como vehículos para fármacos reportados entre 2007-2012.   | 51            |
| <b>7.1.</b>  | Tamaño de partícula y potencial Z de los sistemas líquido-cristalinos.   | 86            |
| <b>7.2.</b>  | Determinación de la viscosidad del sistema CLLH-KTZ-1 a diferentes temperaturas y velocidades de corte.  | 90            |
| <b>7.3.</b>  | Determinación de la viscosidad del sistema CLLH-KTZ-2 a diferentes temperaturas y velocidades de corte.  | 91            |
| <b>7.4.</b>  | Determinación de la viscosidad del sistema CLLH a diferentes temperaturas y velocidades de corte.  | 92            |
| <b>7.5.</b>  | Análisis de ajuste a modelos matemáticos de la cinética de liberación del KTZ a partir del sistema líquido-cristalino en membranas para diálisis.  | 108           |
| <b>7.6.</b>  | Análisis de ajuste a modelos matemáticos de la cinética de permeación del KTZ a partir del sistema líquido-cristalino en membranas de polisulfona de 0.45 $\mu\text{m}$ mediante el modelo de celdas de Franz. | 112           |
| <b>7.7.</b>  | Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para los resultados de porcentaje de KTZ retenido en piel para el sistema líquido-cristalino y el medicamento de referencia.  | 117           |
| <b>7.8.</b>  | Prueba de Levene para igualdad de varianzas y prueba de T para la igualdad de medias de los resultados de % KTZ promedio retenido con el sistema líquido-cristalino y el medicamento de referencia             | 117           |

---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

| <b>Figura</b> |   | <b>Página</b> |
|---------------|---|---------------|
| <b>3.1.</b>   | Esquema de la piel humana (a) y de la formación desde el estrato espinoso (EE), de la estructura lipídica que envuelve a los corneocitos (b)  | 23            |
| <b>3.2.</b>   | Esquema que representa la estructura tipo ladrillo-cemento de la piel, así como las rutas de permeación a través del estrato córneo   | 27            |
| <b>3.3.</b>   | Estructura de algunas sustancias empleadas comúnmente como agentes promotores de la permeación.   | 30            |
| <b>3.4.</b>   | Mecanismos por los cuales pueden actuar algunos agentes promotores de la permeación   | 30            |
| <b>3.5.</b>   | Representación esquemática de una celda de difusión para medir la permeación de fármacos en la piel.  | 34            |
| <b>3.6.</b>   | Estructura química del fármaco Ketoconazol.   | 40            |
| <b>3.7.</b>   | Representación de las fases CLT, (a) fase esméctica A; (b) fase esméctica C; (c y d) fase nemática.   | 42            |
| <b>3.8.</b>   | Mesofases CLT dependiendo de la forma molecular de los mesógenos. (a, c-e) Mesofases calamíticas; (b,f,g, b´) Mesofases discóticas; (a) fase nemática; (b) fase colestérica; (c-e) fases esmécticas; (f) fase columnar hexagonal; (g) fase columnar hexagonal inclinada; (b´) representación del “pitch” de una fase colestérica. | 43            |
| <b>3.9.</b>   | Geometrías de las moléculas hidratadas. Cilindros, asociados a estructuras laminares ( $L\alpha$ ). Conos, asociados a estructuras hexagonales, normal (H1) o inversas (H2).  | 45            |

---

---

**ÍNDICE DE FIGURAS (Cont.)**

---

| <b>Figura</b> |   | <b>Página</b> |
|---------------|---|---------------|
| <b>3.10.</b>  | Representación esquemática de diferentes fases CLL. L1, micelas en fase normal; L2, micelas en fase reversa; I1, fase cúbica micelar (tipo I); I2, fase cúbica inversa (tipo IV); H1, fase hexagonal normal; H2, fase hexagonal inversa; V1, fase cúbica bicontinua (cúbica tipo II); V2, fase cúbica bicontinua inversa (cúbica tipo III) y L $\alpha$ , fase laminar. | 46            |
| <b>3.11.</b>  | Diagramas para la preparación de dispersiones coloidales por medio de las aproximaciones (a) de arriba hacia abajo y (b) de abajo hacia arriba.   | 48            |
| <b>7.1.</b>   | Sistema líquido cristalino en dispersión (hexosoma CLLH / CLLH-KTZ) obtenido mediante la metodología propuesta por el laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada de la UAM-X.  | 80            |
| <b>7.2.</b>   | Imágenes por MET de las estructuras líquido-cristalinas obtenidas, (a y b) pertenecen a un sistema líquido-cristalino cargado con Ketoconazol a un mes de su preparación observado a 12000 X y 50000 X respectivamente; (c y d). Sistema líquido-cristalino cargado con Ketoconazol a un día de su preparación observado a 10000 X y 15000 X.                           | 82            |
| <b>7.3.</b>   | Efecto de la temperatura sobre el tamaño de partícula de los sistemas líquido-cristalinos con Ketoconazol (a) sistema CLLH-KTZ-1 y (b) sistema CLLH-KTZ-2 y sin Ketconazol (c) sistema CLLH.  | 83            |

---

---

**ÍNDICE DE FIGURAS (Cont.)**

---

| <b>Figura</b> |  | <b>Página</b> |
|---------------|--|---------------|
| <b>7.4.</b>   | Posibles cambios estructurales del sistema líquido-cristalino hexosómico en dispersión (CLLH / CLLH-KTZ), cuando incrementa la temperatura.  | 84            |
| <b>7.5.</b>   | Comportamiento reológico del sistema CLLH-KTZ-1. Se muestra en (a), el tipo de flujo que muestra el sistema líquido-cristalino a diferentes temperaturas y en (b) la viscosidad del sistema a cada temperatura con respecto al tiempo. | 94            |
| <b>7.6.</b>   | Comportamiento reológico del sistema CLLH-KTZ-2. Se muestra en (a), el tipo de flujo que muestra el sistema líquido-cristalino a diferentes temperaturas y en (b) la viscosidad del sistema a cada temperatura con respecto al tiempo. | 95            |
| <b>7.7.</b>   | Comportamiento reológico del sistema CLLH. Se muestra en (a), el tipo de flujo que muestra el sistema líquido-cristalino a diferentes temperaturas, en (b) la viscosidad del sistema a cada temperatura con respecto al tiempo.        | 96            |
| <b>7.8.</b>   | Termogramas del sistema CLLH en esquema de 10 °C hasta 110°C a velocidad de 1 °C/min. La línea sólida corresponde al primer barrido y la línea punteada al segundo barrido.  | 99            |
| <b>7.9.</b>   | Termogramas del sistema CLLH-KTZ en esquema de 10 °C hasta 110°C a velocidad de 1 °C/min. La línea sólida corresponde al primer barrido y la línea punteada al segundo barrido.  | 99            |
| <b>7.10.</b>  | Termogramas del sistema CLLH en esquema de 10 °C hasta 50 °C a velocidad de 1 °C/min. La línea sólida corresponde al primer barrido y la línea punteada al segundo barrido.  | 101           |

---

---

**ÍNDICE DE FIGURAS (Cont.)**

---

| <b>Figura</b> |  | <b>Página</b> |
|---------------|--|---------------|
| <b>7.11.</b>  | Termogramas del sistema CLLH-KTZ en esquema de 10 °C hasta 50 °C a velocidad de 1 °C/min. La línea sólida corresponde al primer barrido y la línea punteada al segundo barrido.  | 102           |
| <b>7.12.</b>  | Estabilidad térmica de los sistemas líquido-cristalinos cargados con Ketoconazol después de un periodo superior a 6 meses (199 días).  | 103           |
| <b>7.13.</b>  | Prueba de estabilidad de los sistemas líquido-cristalinos a diferentes velocidades de calentamiento.   | 104           |
| <b>7.14.</b>  | Curvas de calibración para la cuantificación de Ketoconazol, (a) valoración de contenido en los sistemas líquido-cristalinos, (b) estudios de liberación y permeación en membranas artificiales, (c) estudios de permeación en piel y (d) determinación de Ketoconazol retenido en piel. | 106           |
| <b>7.15.</b>  | Cinética de liberación de KTZ a partir del sistema líquido-cristalino empleando membranas para diálisis de 1 KDa de tamaño de poro.  | 107           |
| <b>7.16.</b>  | Cinética de permeación de KTZ con el modelo de celdas de Franz a partir del sistema líquido-cristalino, empleando membranas de polisulfona de 0.45 µm de tamaño de poro.   | 110           |
| <b>7.17.</b>  | Cinética de permeación de KTZ con el modelo de celdas de Franz para el sistema líquido-cristalino y el medicamento de referencia empleando membranas de piel de oreja de cerdo.  | 114           |
| <b>7.18.</b>  | Porcentaje de KTZ retenido en la piel después de los experimentos de permeación. Se muestra la comparación entre el sistema líquido-cristalino y el medicamento de referencia.   | 116           |

---

## GLOSARIO

| <b>Abreviatura</b>                 | <b>Significado</b>                                      |
|------------------------------------|---|
| AIC                                | Criterio de Información de Akaike                       |
| CDB                                | Calorimetría Diferencial de Barrido                     |
| CHMP                               | Comité de Medicamentos de uso Humano                    |
| CLAR                               | Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución            |
| CL                                 | Cristales líquidos                                      |
| CLL                                | Cristales líquidos liotrópicos                          |
| CLLH                               | Cristal líquido liotrópico hexagonal sin fármaco        |
| CLLH-KTZ                           | Cristal líquido liotrópico hexagonal con Ketoconazol    |
| CLT                                | Cristales líquidos termotrópicos                        |
| Cp                                 | Capacidad calorífica                                    |
| cP                                 | Centipoise  |
| Cs,m                               | Solubilidad del fármaco en la membrana                  |
| Cs,v                               | Solubilidad del fármaco en el vehículo                  |
| Cv                                 | Concentración del fármaco en el vehículo                |
| Dm                                 | Coefficiente de difusión                                |
| EB                                 | Estrato basal   |
| EC                                 | Estrato córneo  |
| EE                                 | Estrato espinoso  |
| EG                                 | Estrato granuloso                                       |
| EMA                                | Agencia Europea de Medicamentos                         |
| KTZ                                | Ketoconazol   |
| LB                                 | Cuerpos laminares                                       |
| MET                                | Microscopía electrónica de transmisión                  |
| mV                                 | Mili Volts  |
| OECD                               | Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico |
| R <sup>2</sup> <sub>ajustado</sub> | Coefficiente de Determinación Ajustado                  |



## 1. INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano humano más grande y se encarga de que sustancias dañinas, así como los fármacos liberados de formulaciones aplicadas tópicamente no puedan acceder al organismo, siendo el estrato córneo la principal barrera. Cuando se logra la permeación, la velocidad de ésta depende en gran medida de variables como la concentración del fármaco aplicado, así como de su coeficiente de partición y su difusividad, tanto en el vehículo como en el estrato córneo (*Walters, 2002, Hitesh y cols., 2011*).

La administración de medicamentos por vía tópica y de acción local, difiere de la transdérmica, que tiene por objetivo alcanzar una actividad sistémica; de modo que la administración tópica puede ser definida como la aplicación sobre la piel de una formulación que contiene al fármaco para el tratamiento de algún desorden cutáneo, con la intención de mantener el efecto farmacológico en la superficie o dentro de la piel (*Tadwee y cols., 2011*), como sería el caso del tratamiento de las micosis mucocutáneas y de algunos cánceres de piel.

Actualmente existe gran interés en el desarrollo de formas farmacéuticas de uso tópico y transdérmico para la administración de fármacos y biofármacos; consecuentemente, una gran variedad de moléculas están siendo evaluadas por su potencial absorción percutánea. Sin embargo, una de las tendencias más recientes en tecnología y nanotecnología farmacéutica es el diseño de formas farmacéuticas innovadoras, que incrementen la efectividad y eficacia tópica de fármacos genéricos como el ketoconazol, cuya eficacia terapéutica a las dosis requeridas por otras vías como la oral, le generan al paciente problemas de intolerancia o toxicidad (*AEMPS, 2013*).

En este contexto, los cristales líquidos como sistemas nanoestructurados, constituyen vehículos de dosificación novedosos debido a su considerable

capacidad para solubilizar tanto fármacos liposolubles como hidrosolubles (*Hitesh y cols., 2011*), así como por su similitud organizacional con las estructuras y la composición de la membrana celular y de los fluidos intercelulares (*Pasquali y cols., 2006; Chávez y cols., 2013*). Entre las mesofases líquido cristalinas que mayor atención han obtenido en las últimas décadas para fines terapéuticos, están las laminares, cúbicas y hexagonales, ya que algunas composiciones de éstas han mostrado similitud con distintas estructuras de la piel, así como cierta capacidad para penetrar el estrato córneo (*Guo y cols., 2010 y Patel y cols., 2010*).

De tal forma, con el propósito de contribuir con respuestas científico-tecnológicas al tratamiento más efectivo de las micosis y otras patologías mucocutáneas que afectan a la población mexicana, en el Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada (LFMLC) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (UAM-X), se planteó obtener y estudiar la utilidad antimicótica de un sistema nanométrico tipo cristal líquido liotrópico hexosómico (CLLH) cargado con ketoconazol (CLLH-KTZ), para lo cual también se contó con la colaboración de investigadores de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la UAM-Cuajimalpa, del laboratorio de Inmunología de la UAM-X y de estudiantes de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas (*Maldonado-Campos, 2012; Santiago-Télez, 2014*).

El presente documento representa una continuidad de dicho proyecto, por lo que los resultados que a continuación se muestran tienen como propósito profundizar en el conocimiento de los sistemas CLLH con y sin carga de fármaco, evaluando las propiedades físico-químicas de éstos y de manera particular, la cinética de liberación y de permeación dérmica en modelos *in vitro*, del ketoconazol cuando éste es parte de una nanoestructura de tipo CLLH. Con este proyecto también se concretó recientemente ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, la solicitud de registro de la patente: Composición tópica con base en cristales líquidos liotrópicos (*Quirino y cols., 2015*), con la que se pretende que para casos como el del antifúngico Ketoconazol, este tipo de nanomedicamentos tópicos puedan constituir una alternativa de mayor eficacia y seguridad de uso de éste y otros

antimicrobianos, frente a los actuales esquemas farmacoterapéuticos aplicados a padecimientos mucocutáneos.

## 2. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los cristales líquidos (CL) son sistemas que exhiben propiedades intermedias entre líquidos convencionales y sólidos cristalinos, por lo que un CL puede fluir como un líquido pero sus moléculas poseen un arreglo y orientación similar a las de un cristal; esta combinación de propiedades los ubica como mesofases (*Mueller-Goymann, 2002*), los cuales se clasifican e identifican por su proceso de obtención y propiedades en termotrópicos (CLT) y liotrópicos (CLL).

Los CLL se presentan en un determinado intervalo de temperatura cuando ciertas sustancias se dispersan en un líquido. También, a una temperatura fija, los CLL se forman en un intervalo de concentración; siendo los más comunes los constituidos por dispersiones de tensoactivos en agua (*Pasquali y cols., 2006*). Los métodos y técnicas apropiados para la investigación y caracterización de los CLL son tanto macroscópicos como microscópicos, dentro de los que se incluyen: microscopía de luz polarizada, microscopía electrónica de transmisión, difracción de rayos X, calorimetría diferencial de barrido, reología y la determinación del tamaño de la vesícula por difracción láser (*Patel y Patel, 2010*).

En las formulaciones farmacéuticas y cosméticas los CLL que se utilizan con mayor frecuencia presentan estructuras laminares, hexagonales y cúbicas, tanto normales como inversas (*Pasquali y cols., 2006; Kim y cols., 2009*), las cuales a su vez han sido investigadas extensamente por su habilidad para prolongar la liberación de un amplio abanico de sustancias bioactivas, desde fármacos de bajo peso molecular hasta proteínas, péptidos y ácidos nucleicos (*Mohammady y cols., 2009; Rizwan y cols., 2010; Guo y cols., 2010*).

Por otra parte, debido a que ciertas patologías mucocutáneas o del estrato córneo y uñas, como es el caso de las candidiasis u onicomicosis, requieren de una acción directa en el sitio de infección sobre el agente causal de la enfermedad, y que hasta la fecha su tratamiento ha necesitado de una combinación terapéutica oral y tópica, ocasionada por la limitada absorción de los activos a través de la piel, cada vez es mayor el número de estudios donde se plantean distintas estrategias y productos encaminados a resolver para esos efectos, los problemas de difusión o absorción, estabilidad y permanencia en y a través de la piel.

En la búsqueda de respuestas a lo anterior, se ha observado similitud de ciertas mesofases líquido-cristalinas cúbica y hexagonal con distintas estructuras de la piel y que aquellas son capaces de penetrar el estrato córneo (*Guo y cols., 2010 y Patel y cols., 2010*); es por ello que se ha planteado profundizar en el conocimiento de las propiedades físico-químicas y de la cinética de permeación de estructuras tipo CLL hexosómicas, obteniendo este tipo de sistemas cargados con Ketoconazol (CLLH-KTZ), como una alternativa nanotecnológica para la farmacoterapia antifúngica de padecimientos mucocutáneos.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 La Piel, Estructura y Funciones

La piel constituye la envoltura que separa el medio interno del ambiente y posee múltiples funciones de vital importancia para la homeostasis del organismo. Tiene una extensión de 1.4 a 1.8 m<sup>2</sup>; refleja la edad y padecimientos o infecciones generales como la diabetes, la lepra, y otras. Una de las funciones fundamentales de la piel es ofrecer protección a las estructuras y órganos internos. Esta protección comprende no solamente una defensa contra los traumatismos físicos, sino también contra variaciones en la temperatura, radiación ultravioleta, penetración de sustancias orgánicas e inorgánicas y constituye una barrera contra microorganismos patógenos capaces de producir enfermedad cutánea o sistémica. Además de sus funciones como órgano sensorial, la piel realiza actividades endócrinas (síntesis de vitamina D) y actúa como una barrera mecánica debido a su constitución, a sus propiedades de elasticidad y de resistencia. Al igual que el tracto gastrointestinal y las vías respiratorias, es colonizada por microorganismos desde el nacimiento; sin embargo, no resulta habitable para muchos de ellos y, en cambio, otros constituyen la flora normal de la piel (*Menon, 2002; Magaña y Magaña, 2003, Vélez y cols., 2009*).

La piel es un sistema pluricelular y multiestratificado constituido de dos capas distintas desde la superficie al interior: la epidermis y la dermis (figura 3.1 a); aunque también suele describirse una tercera capa, la hipodermis o tejido celular subcutáneo. Incluidas dentro de estos tres estratos se encuentran algunas estructuras importantes como son los denominados anexos cutáneos: las glándulas sudoríparas, ecrinas y apocrinas, los folículos pilosos y las glándulas sebáceas; además contiene los vasos sanguíneos, nervios y también los vasos linfáticos (*Menon y cols., 2012; Vélez y cols., 2009*).

La dermis se encuentra compuesta de colágeno, elastina, glicosaminoglicanos (colectivamente conocidos como la matriz extracelular), así como de fibroblastos que elaboran la matriz extracelular; es una capa altamente vascularizada, y también

incluye unidades pilosebáceas, glándulas sudoríparas, adipocitos, mastocitos y leucocitos infiltrados (*Moser y cols., 2001; Menon, 2002*).

La epidermis es la capa más superficial y mejor conocida de la piel. Consiste en una delgada capa constituida por diversos tipos de células, siendo el 90 - 95 % de ellas queratinocitos (de los cuales, los que se encuentran en las capas más internas, están anclados a la membrana basal por medio de hemidesmosomas) y el resto son melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. Su espesor promedio es inferior a medio milímetro, siendo más gruesa en aquellas zonas donde se ejerce mayor presión o fricción como en las palmas de las manos y las plantas de los pies, y más delgada en áreas delicadas como los párpados.

La epidermis es un epitelio estratificado (grosor ~100 - 150  $\mu\text{m}$ ), constituido por varias capas de queratinocitos, que contienen filamentos de queratina de diferentes tamaños. La estructura multilaminar de la epidermis se encuentra dividida a su vez en cuatro capas distintas: estrato basal (EB), estrato espinoso (EE), estrato granuloso (EG) y estrato córneo (EC), las cuales representan diferentes etapas de diferenciación celular. Así, moviéndose hacia arriba desde la capa proliferativa basal, las células de la epidermis cambian de manera ordenada desde células metabólicamente activas a células de defensa, funcionalmente muertas y queratinizadas: los corneocitos (*Moser y cols., 2001; Menon, 2002; Vélez y cols., 2009*).

El EB es una capa única de células basales columnares que permanecen unidas a la membrana basal vía hemidesmosomas. Se encuentra compuesto de células madre epidérmicas que muestran una alta proporción núcleo/citoplásmica, organelos celulares como mitocondrias y filamentos de queratina que se encuentran insertados en los hemidesmosomas. Por otro lado, los desmosomas conectan a las células adyacentes y a las que se encuentran en capas superiores (*Menon, 2002*).

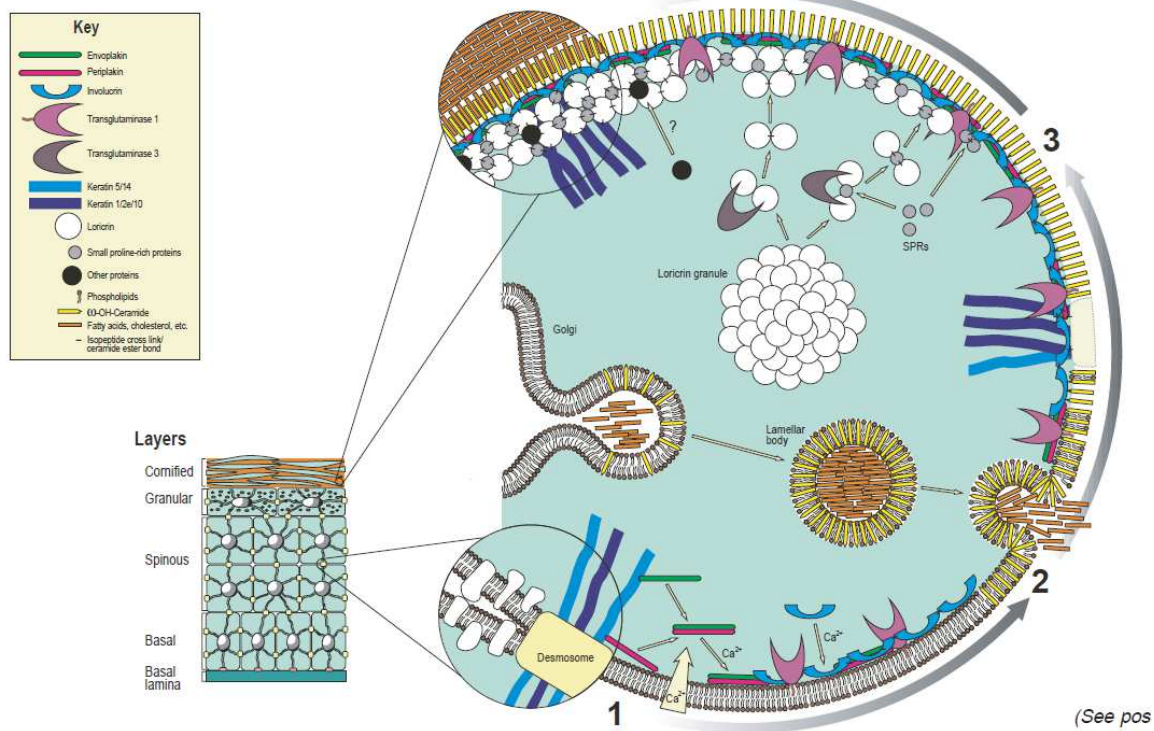
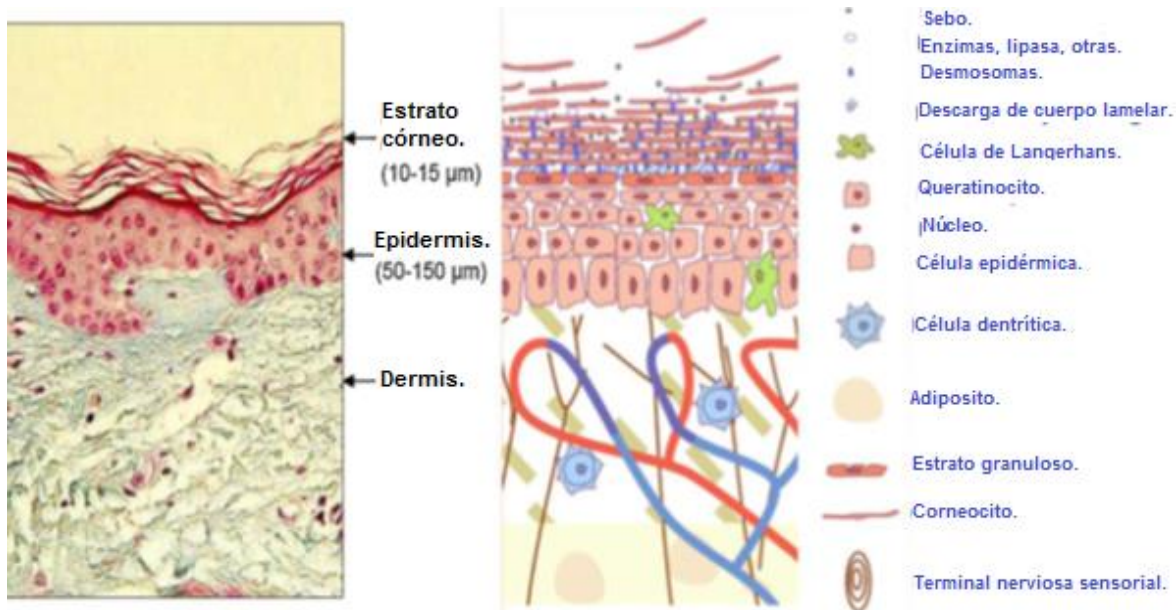


Figura 3.1. (a) Esquema de la piel humana. Modificado de *Trommer y Neubert, 2006*. (b) Esquema de la formación desde el estrato espinoso (EE), de la estructura lipídica que envuelve a los corneocitos. Modificado de *Kalinin y cols., 2001*.

El EE debe su nombre a la abundancia de desmosomas, que hacen que las células presenten una apariencia espinosa y en adición a los organelos celulares típicos observados en las capas basales, en el EE se aprecia la presencia de cuerpos laminares (LB) abundantes en lípidos, que también han sido llamados cuerpos de Odland, los cuales tienen un diámetro de 0.2 - 0.5  $\mu\text{m}$ , con discos ricos en lípidos apilados de forma paralela y envueltos en una membrana trilaminar. En esta capa también puede observarse un incremento en los filamentos de queratina comparado con el EB; además, las células en capas superiores del EE comienzan a elongarse y aplanarse pasando a formar parte del EG, en donde la progresiva diferenciación celular resulta evidente por el incremento en la síntesis de proteínas y de una mayor lipogénesis (presencia de un mayor número de LB).

En las capas superiores del EG las células muestran una organización estructural y funcional única de los LB; las secreciones de éstos hacia los dominios extracelulares juegan un rol importante en la formación final de los corneocitos y del EC. La composición bioquímica de los LB incluye ceramidas glicosiladas, fosfolípidos, colesterol y enzimas hidrolíticas como lipasas, esfingomielinasas,  $\beta$ -glucosilcerebrosidasas y fosfodiesterasas, existiendo evidencia de que una vez secretados los LB, su contenido lipídico es procesado por las enzimas co-secretadas, transformando a los lípidos en la estructura final de barrera lipídica rica en ceramidas, que da lugar a la formación de bicapas extracelulares de comportamiento líquido-cristalino en el EC.

El proceso de diferenciación celular y formación de la envoltura lipídica líquido-cristalina intercelular en el EC, depende de muchas señales cuya naturaleza aún debe ser elucidada. Sin embargo, una de las señales que activan el proceso es la presencia de iones de  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual inicia con concentraciones bajas en las capas proliferativas basales, y tiene un incremento progresivo conforme la epidermis se estratifica y diferencia (*Kalinin y cols., 2001; Menon, 2002; Bouwstra y Ponc, 2006; Menon y cols., 2012*).

Un flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del citosol en los granulocitos de las capas superiores conlleva a la transformación de aquellos en corneocitos. Ésta última capa de células



(rodeada por bicapas de lípidos multilaminares), constituye la capa más externa (10 - 20  $\mu\text{m}$ ) de la epidermis: el EC (*Moser y cols., 2001; Vélez y cols., 2009*). En la piel humana el EC tiene entre 18 y 21 capas celulares, teniendo los corneocitos entre 20 y 40  $\mu\text{m}$  de diámetro (en contraste con las células basales, cuyo diámetro es de 6 - 8  $\mu\text{m}$ ).

Los corneocitos pueden diferir en grosor, número de desmosomas, etcétera, dependiendo de su localización en el EC. Estas características también pueden influenciar el grado de hidratación de la piel, el cual varía de entre el 10 al 30%. Por otro lado, la presencia de crestas y ondulaciones en los corneocitos ayudan a que las células se entrecrucen, incrementando la estabilidad de esta capa (*Menon, 2002*).

### **3.2 La Piel como Barrera**

Son muchos los grupos de investigación que en los últimos años han contribuido a la mayor comprensión de la estructura, la composición y los mecanismos de penetración de sustancias en la piel y que identifican al estrato córneo como la principal barrera para la penetración. Sin embargo, también se reconoce que la piel sirve como una vía de administración de fármacos ventajosa, pues se evita el metabolismo de primer paso, puede conseguirse una velocidad de penetración prolongada, y es factible disminuir la toxicidad de éstos y otros xenobióticos (*Sinkó y cols., 2012*). Por lo tanto, para los farmacéuticos la piel representa tanto un reto (barrera) como una oportunidad (gran superficie) para la liberación de fármacos (*Menon, 2002*).

Las propiedades de barrera de la piel se basan en el contenido y composición específico de los lípidos del EC, y en particular, al arreglo excepcional de la matriz de lípidos intercelulares y de los lípidos que envuelven a las células, los cuales forman bicapas rodeando a los corneocitos, produciéndose una estructura similar a una pared de ladrillo y cemento (figura 3.2), donde los corneocitos son los ladrillos y los lípidos intercelulares el cemento. La matriz lipídica del EC contiene como

principales componentes cerca del 50% de ceramidas, 35% de ácidos grasos libres y 15% de colesterol, lo cual hace también que su comportamiento sea diferente al de otras membranas biológicas (*Moser y cols., 2001; Menon, 2002; Bouwstra y Ponc, 2006; Menon y cols., 2012; Sinkó y cols., 2012*). Deficiencias en cualquiera de las tres especies lipídicas resultan en anormalidades caracterizadas por el incremento en la pérdida de agua trans-epitelial.

La organización clásica de la piel como ladrillos (corneocitos) y cemento (lípidos intercelulares) es la descripción más simple, en donde los corneocitos ricos en proteínas imparten cierto grado de tortuosidad al paso de agua o cualquier otra molécula que atravesase por el EC, mientras que los lípidos hidrófobos proveen una barrera al ya tortuoso camino. Sin embargo, los lípidos intercelulares han recibido más atención que los corneocitos, proponiéndose varias teorías con respecto a su organización estructural tanto a nivel micro como molecular; de este modo, se ha considerado que los lípidos intercelulares del EC se encuentran en un estado líquido-cristalino, en una mezcla de fases líquido-cristalinas y de gel o en una única fase gel.

Por otro lado, el EC manifiesta autopoiesis (mantiene su organización a través de perturbaciones experimentales y cambios, regenerando sus componentes en el curso de la operación), comportándose como un sistema inteligente; por lo tanto, la respuesta reparadora de la piel pudiera afectar la liberación efectiva de fármacos (*Norlén, 2001; Menon, 2002; Bouwstra y Ponc, 2006*).

De igual forma es importante destacar el hecho de que el EC se encuentra íntimamente ligado al EG, tanto estructural como funcionalmente. Desde el punto de vista estructural, los dos estratos se encuentran unidos por medio de los desmosomas; funcionalmente, la barrera intercelular formada por los complejos de unión localizados en el EG también contribuyen al efecto barrera (*Menon y cols., 2012*) Por lo tanto, ya sea para la formación inicial de la barrera o su reparación u homeostasis, la interfase EC-EG es el sitio de acción en donde se desarrolla la envoltura de lípidos que rodean a los corneocitos, formando así la formidable

barrera contra el paso de sustancias y microorganismos a través de la epidermis (Menon, 2002).

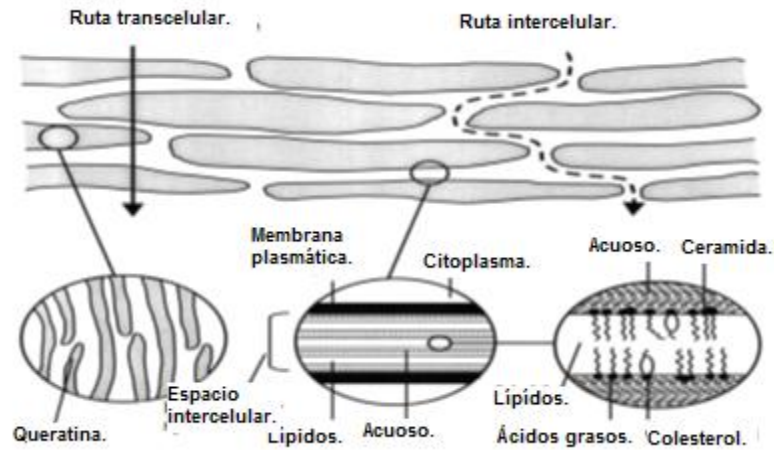


Figura 3.2. Esquema que representa la estructura tipo ladrillo-cemento de la piel, así como las rutas de permeación a través del estrato córneo. Modificado de Moser y cols., 2001.

La permeación de fármacos a través de la piel incluye la difusión por la epidermis intacta y por sus apéndices; sin embargo, éstos últimos ocupan sólo el 0.1% de la superficie total de la piel humana y su contribución es considerada mínima; de modo que como se mencionó anteriormente, la permeación de los fármacos por la piel se encuentra limitada por el EC, habiéndose identificado (figura 3.2) dos vías a través de la barrera intacta: 1) la ruta de lípidos intercelulares entre los corneocitos y 2) la ruta transcelular, que cruza a través de los corneocitos y de los lípidos. Por lo tanto, en ambos casos el agente activo deberá difundir en algún punto entre la matriz lipídica intercelular, la cual es considerada como el mayor determinante de la velocidad de transporte percutáneo (Moser y cols., 2001; Trommer y Neubert, 2006).

### **3.2.1 Penetración a Través del Estrato Córneo**

El flujo de un fármaco a través del estrato córneo (J) puede describirse con la primera ley de Fick (ecuación 1):

$$J = \frac{Dm \cdot Cs,m}{L} \cdot \frac{Cv}{Cs,v} \dots\dots\dots (1)$$

donde:  $Dm$  representa el coeficiente de difusión del fármaco en la membrana,  $Cs,m$  es la solubilidad del fármaco en la membrana,  $Cv$  es la concentración de fármaco disuelto en el vehículo, y  $Cs,v$  es la solubilidad del fármaco en el vehículo.

Se han postulado tres estrategias para incrementar con el desarrollo farmacéutico, la permeación de fármacos basados en la ley de Fick, las dos primeras: 1) Incrementar  $Dm$ , y 2) aumentar  $Cs,m$ , implican un efecto del vehículo en la función de barrera del estrato córneo por medio de la introducción de un intensificador de la penetración en esta capa y por el subsecuentemente desorden de los lípidos intercelulares; también se puede conseguir mediante la extracción de los lípidos por la solvatación generada por algún componente de la formulación. La siguiente estrategia: 3) incrementar la relación  $Cv/Cs,v$ , se basa en una interacción entre el fármaco y el vehículo, lo cual se logra por medio de la saturación del vehículo o por la disminución de la solubilidad del fármaco en el vehículo (*Moser y cols., 2001*).

### **3.2.2 Modulación de la Penetración en la Piel**

El incremento de la penetración de fármacos después de su aplicación tópica puede lograrse con sistemas o formulaciones que utilizan diversos compuestos capaces de promover el transporte de activos a través de la piel (figura 3.3). Existen varios mecanismos por los cuales estos sistemas y/o sustancias son capaces de incrementar la penetración. Una posibilidad es la interacción de los agentes promotores de la permeación con las porciones polares de los lípidos. De este modo, son afectadas las interacciones de los grupos polares y el orden estructural de los lípidos y el resultado es la facilitación de la difusión de fármacos hidrofílicos. La simple hidratación (utilizando agentes oclusivos, por ejemplo), también se puede

emplear para modificar la estructura del EC y cambiar la penetración de los fármacos.

La interrupción de las porciones polares de los lípidos por medio del uso de promotores polares es una forma de afectar las porciones no polares de los lípidos ocasionando reacomodos en las bicapas. Otra posibilidad es la interacción de intensificadores lipofílicos con las cadenas hidrocarbonadas de las bicapas; de esta manera, por medio de la interrupción del ordenamiento estructural debida a un incremento en la fluidización de las cadenas hidrocarbonadas, se facilita la penetración de fármacos lipofílicos. Estos cambios influyen asimismo en el orden de las porciones polares, lo cual explica (figura 3.4) el incremento de la penetración de fármacos hidrofílicos (*Trommer y Neubert, 2006*).

El aumento de la solubilidad y el mejoramiento del coeficiente de partición son otros mecanismos de acción de algunos promotores. Adicionalmente, el EC puede hacerse más permeable para fármacos por medio de la extracción de los lípidos; los alcoholes por ejemplo, son capaces de extraer lípidos y proteínas, y por lo tanto, incrementan la porosidad del EC. De esta forma también es facilitada la penetración de fármacos hidrofílicos.

Por otro lado, los ácidos grasos tienen efectos promotores de la permeación que son influenciados fuertemente por su estructura, siendo los ácidos grasos saturados menos efectivos que sus derivados insaturados, de modo que, conforme aumenta el número de dobles enlaces en la molécula aumenta la efectividad. De manera adicional, ácidos grasos con configuraciones *cis* son más efectivos que ácidos grasos en configuración *trans*, debido a que los compuestos con insaturaciones *cis* tienen un mayor potencial para causar disturbios en el orden de empaquetamiento de los lípidos entre las bicapas (*Trommer y Neubert, 2006*).

Sustancias como el propilenglicol también han incrementado la permeación en la piel, como es el caso del metronidazol, lo cual se explica en base a los parámetros de solubilidad; logrando que el parámetro de solubilidad del EC (9.8) cambie en

dirección al del fármaco (13.8), debido al parámetro de solubilidad del propilenglicol (14). De manera adicional, un mecanismo de arrastre por disolvente es considerado como participante del efecto promotor del propilenglicol (Moser y cols., 2001).

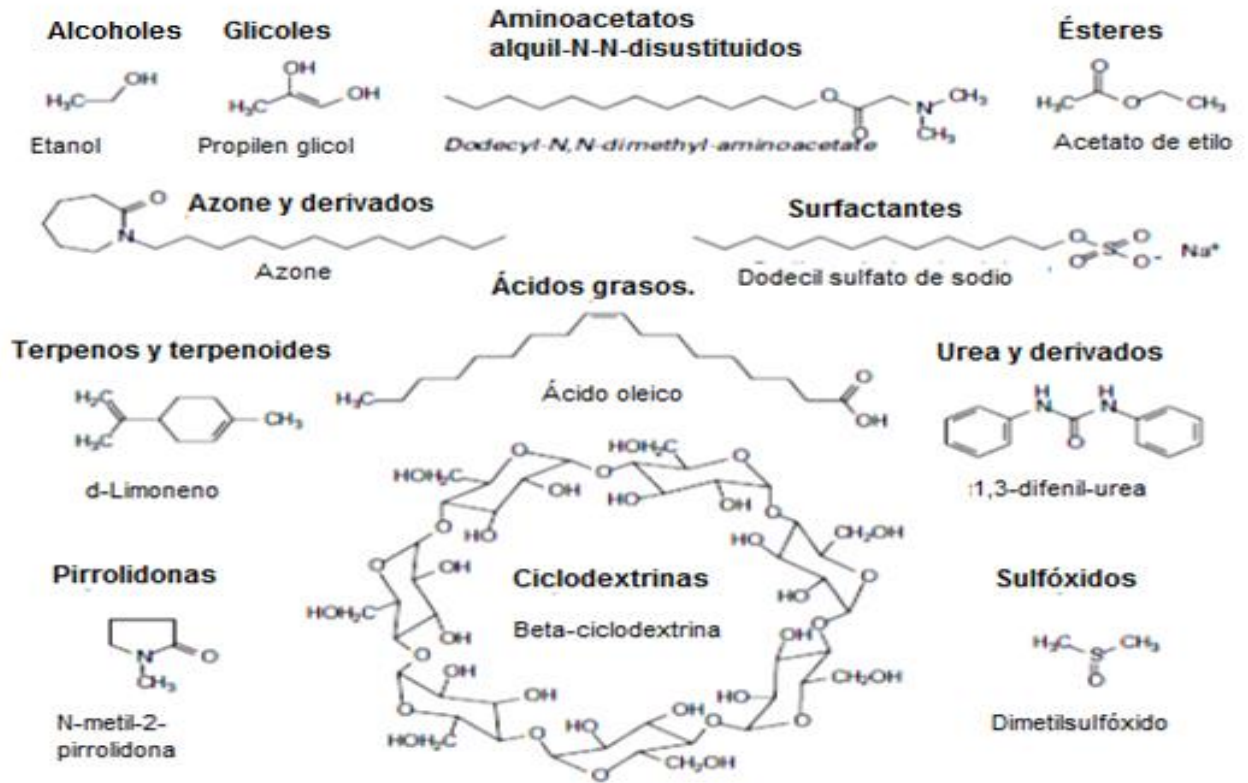


Figura 3.3. Estructura de algunas sustancias empleadas comúnmente como agentes promotores de la permeación. Modificado de Trommer y Neubert, 2006.

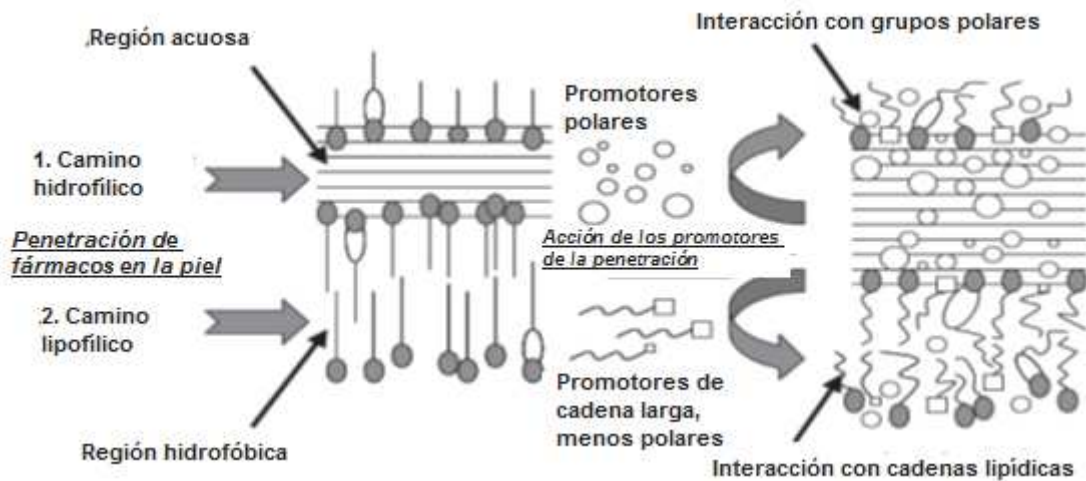


Figura 3.4. Mecanismos por los cuales pueden actuar algunos agentes promotores de la permeación. Modificado de Trommer y Neubert, 2006.

Por otra parte, es conocido que la administración de fármacos por vía tópica se encuentra limitada a moléculas con la combinación correcta de peso molecular y lipofiliidad, la carga también puede jugar un rol importante. De tal forma es como los compuestos catiónicos pueden tener efectos sinérgicos sobre la permeación en la piel, ya que ésta posee carga negativa por la presencia de los grupos cargados negativamente de la fosfatidilcolina y los carbohidratos presentes en las células de los mamíferos; reportándose así que nanoemulsiones cargadas positivamente fueron más efectivas en términos de difusión a través de piel de cerdo que nanoemulsiones con carga negativa (*Honary y Zahir, 2013*). En el mismo sentido, en otro estudio se observó que al emplearse nanopartículas en combinación con microagujas, en donde las nanopartículas estaban cargadas negativamente, se consiguió un mayor grado de permeación en comparación con nanopartículas cargadas positivamente, y esto a pesar de que las primeras tenían un tamaño de partícula superior (367 nm y 122 nm, respectivamente), lo cual se asoció al hecho de que la piel posee carga neta negativa, teniendo como consecuencia la repulsión de las nanopartículas negativas, lo cual redujo la absorción de éstas en la superficie de la piel, pero a la vez hizo que las nanopartículas negativas se dirijan al interior de los microcanales generados por las microagujas (*Gomaa y cols., 2014*).

De tal forma, la carga superficial parece tener efectos opuestos en la permeación de vehículos a través de microcanales o de la piel intacta, siendo incrementada en esta la última por un potencial Z positivo, que promueve la atracción electrostática con la piel cargada negativamente. Por lo anterior, aún quedan por realizar estudios para determinar los efectos de la carga en la permeación a través de las capas de la piel, pues como se ha descrito, el potencial Z no influye únicamente en la estabilidad de sistemas farmacéuticos, sino también en el grado y ruta de la permeación.

### **3.2.3 Determinación de la Permeación en la Piel**

De acuerdo con las guías 2004 y 2011 de la organización para la cooperación y el desarrollo económicos (OECD de sus siglas en inglés), los métodos para medir la absorción en piel y la liberación dérmica pueden dividirse en dos categorías: Métodos *in vivo* e *in vitro*. Los métodos *in vivo* tienen algunas ventajas sobre los *in vitro*, dentro de las cuales se incluyen la generación de cinéticas a nivel sistémico e información metabólica. Las desventajas son el uso de animales vivos, la necesidad de utilizar materiales radio-marcados para facilitar resultados confiables, dificultades para la determinación de las fases tempranas de absorción y las diferencias de permeabilidad entre las especies seleccionadas y la piel humana; en este sentido, la piel de animales es generalmente más permeable y por lo tanto puede sobreestimarse la absorción percutánea en humanos.

Por otro lado, las ventajas de los estudios *in vitro* son que puede utilizarse membranas sintéticas y de igual manera, piel de humanos y de otras especies; también pueden hacerse varias repeticiones con la misma o diferente muestra, no se emplean animales vivos y se consigue estudiar condiciones de exposición probable; puede utilizarse una mayor variedad de formas físicas de muestra (sólidos, granulados, etcétera); y es posible evaluar el impacto o daño en la piel, evitándose asuntos éticos.

Las limitaciones de dichos estudios son el hecho de que las condiciones sink o de drenado del flujo sanguíneo periférico que ocurren *in vivo*, pudieran no ser reproducibles. Sin embargo, los estudios llevados a cabo utilizando apropiadamente condiciones experimentales *in vitro* han producido datos que demuestran la utilidad del método; siendo útiles para realizar comparaciones en estudios de liberación de sustancias químicas a través de la piel a partir de diferentes formulaciones y también han provisto de modelos útiles para la determinación de riesgos debidos a la absorción percutánea en humanos.

Durante los estudios *in vitro*, la formulación a probar se aplica sobre la superficie de la piel extirpada, la cual está montada en una celda de difusión. En la mayoría de los casos, los estudios tienen la intención de predecir la absorción en piel humana,



por lo tanto, el uso de piel humana es el más relevante. Sin embargo, por razones regulatorias o prácticas, se pueden utilizar otras especies animales, usualmente ratas o cerdos. La piel de cerdo suele ser utilizada por su similitud con la piel humana en términos de morfología y características de permeabilidad, haciéndola una alternativa práctica (*OECD, 2004; OECD 2011*).

Existen varios tipos de celdas de difusión que se emplean en este tipo de ensayos, pero todas ellas consisten en un compartimiento donador y un compartimiento receptor, entre los cuales se coloca la membrana (figura 3.5). Cuando la membrana es de piel, ésta es posicionada con el estrato córneo hacia arriba. El diseño de la celda debe permitir el control exacto de la temperatura de la piel y del medio receptor. El fluido receptor se mantiene en contacto con la parte posterior de la piel y debe solubilizar adecuadamente la sustancia en estudio, pues es imperativo que la solubilidad no sea un paso limitante para la determinación de la permeación. Para la evaluación de compuestos solubles en agua puede utilizarse como medio receptor solución salina pH 7.4; sin embargo, para compuestos lipofílicos el fluido receptor puede contener disolventes orgánicos como etanol (40, 50% v/v) o metanol (10, 20, 50% v/v) (*Moser, y cols., 2001; OECD, 2004; OECD 2011; Patel y cols., 2009; Shirsand y cols., 2012; Jacobs y cols., 2014*).

La preparación permanece sobre la piel por un periodo de tiempo especificado, relacionado con la exposición potencial. El medio receptor es muestreado a diferentes tiempos para determinar la cantidad de sustancia que atraviesa por la piel. El tiempo de exposición deberá reflejar las condiciones de uso y por lo tanto, permitir la cuantificación de la cantidad de sustancia que ha sido absorbida durante el periodo de tiempo relacionado con la exposición potencial. Por lo tanto, puede ser tan corto como unos pocos minutos o por 24 horas o más. Sin embargo, los periodos de exposición de 24 horas, aunque aceptables, tienden a sobreestimar el tiempo de exposición y deben ser considerados con precaución pues la piel puede deteriorarse (*OECD, 2004; OECD 2011*).

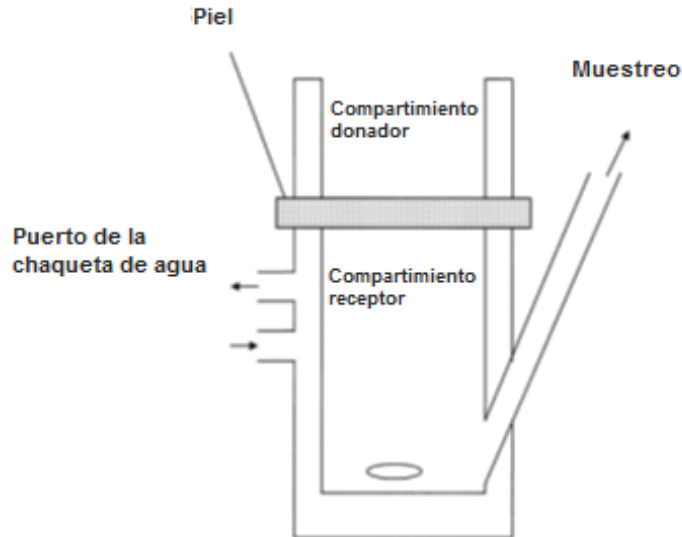


Figura 3.5. Representación esquemática de una celda de difusión para medir la permeación de fármacos en la piel. Modificado de *Moser, y cols., 2001*.

### **3.3 Micosis**

Las enfermedades infecciosas producidas por hongos se conocen como micosis y a menudo su naturaleza es crónica (*Mycek y cols., 2004*). Las infecciones fúngicas son muy frecuentes en la población y en general afectan a la piel o las mucosas. En personas sanas, más que una verdadera amenaza, se suele tratar de procesos benignos, aunque sencillamente molestos. Sin embargo, los hongos también pueden penetrar la piel y causar infecciones subcutáneas y pueden convertirse en un problema grave cuando el sistema inmunitario está comprometido o cuando consiguen acceder a la circulación sistémica, en cuyo caso una micosis puede resultar mortal (*Mycek y cols., 2004; Rang y Dale, 2008*).

Desde los años setenta se ha observado un incremento progresivo de la incidencia de infecciones sistémicas graves por hongos. Uno de los factores que ha contribuido a este fenómeno ha sido el uso generalizado de antibióticos de amplio espectro, que reducen o eliminan las poblaciones de bacterias no patógenas que normalmente compiten con los hongos. Otras causas son la diseminación del SIDA y el uso de fármacos inmunosupresores o quimioterapéuticos para el cáncer. El

resultado ha sido un aumento de la prevalencia de infecciones oportunistas. Los ancianos, personas con diabetes, gestantes y quemados, tienen especial riesgo de sufrir infecciones micóticas, como la candidiasis (*Velasco y cols., 2003; Prescott y cols., 2004; Rang y Dale, 2008; Waldman y Terzic, 2010*).

Las micosis se dividen en cinco grupos de acuerdo con el tejido que infectan en el huésped: superficiales, cutáneas, subcutáneas, sistémicas y oportunistas (*Prescott y cols., 2004*).

Las micosis superficiales se producen principalmente en los trópicos y se limitan a la superficie externa del pelo y de la piel. Son patologías que se encuentran entre las diez primeras causas de consulta dermatológica y su incidencia se ha incrementado a nivel mundial; estimándose que alrededor de 40 millones de personas han sufrido infecciones fúngicas tanto en naciones desarrolladas como subdesarrolladas (*Prescott y cols., 2004; Güngör y cols., 2013*).

En las micosis cutáneas, llamadas también dermatomicosis o tiñas, los hongos colonizan el pelo, las uñas y la capa exterior (estrato córneo) de la epidermis. Se producen en todo el mundo y representan las micosis más frecuentes en los seres humanos. Dentro de las micosis superficiales y cutáneas se incluyen las dermatofitosis o tiñas, las candidiasis, las pitiriasis versicolor, la tiña negra y las piedras. Las dermatomicosis incluyen infecciones de la piel, los pelos y las uñas (onicomicosis), que se suelen producir por *Trycophyton*, *Microsporum* o *Epidermophyton*, originando diversos tipos de tiñas; éstos son hongos afines por la queratina y habitualmente permanecen en la superficie del estrato córneo, la lámina ungueal o la corteza del pelo y sólo en ocasiones penetran a tejidos más profundos. En la candidiasis superficial, se pueden infectar las mucosas oral y vaginal o la piel, pero ocasionalmente puede ser sistémica o visceral. Causada por la levadura *Candida albicans*, microorganismo saprófito que en condiciones especiales se torna patógeno. Se encuentra como saprófita comensal en la cavidad oral y en el recto y la vagina; sin embargo, no se puede considerar como saprófita en la piel normal, donde indicará siempre un estado patogénico. (*Magaña y Magaña, 2003; Prescott y cols., 2004; Tortora y cols., 2007; Rang y Dale, 2008; Vélez y cols., 2009*).

Los dermatofitos que causan las micosis subcutáneas son saprófitos normales del suelo y de la vegetación en descomposición. Debido a que son incapaces de atravesar la piel, deben ser introducidos en el tejido subcutáneo por una herida punzante contaminada con tierra que contiene al hongo. La mayoría de las infecciones afectan a agricultores que trabajan descalzos. Una vez en el tejido subcutáneo, la enfermedad se desarrolla lentamente, a menudo a lo largo de un periodo de años. Durante este tiempo los hongos producen un nódulo que termina por ulcerarse, y los microorganismos se extienden por los vasos linfáticos, determinando la formación de más nódulos subcutáneos (*Prescott y cols., 2004; Tortora y cols., 2007*).

Casi todos los hongos que producen las micosis sistémicas o profundas son dimórficos, es decir, muestran una forma parásita análoga a las levaduras y una fase moho saprófito o micelio. La mayoría de las micosis sistémicas se adquieren por inhalación de esporas de la tierra en la que residen los hongos. Si una persona inhala esporas suficientes, comienza una infección parecida a una lesión pulmonar, que se cronifica y se propaga por el torrente sanguíneo a otros órganos. Por otro lado, un organismo oportunista es generalmente inofensivo en su ambiente habitual, pero se vuelve patógeno en un huésped comprometido. Existen muchas causas que provocan esta situación, entre las que se encuentran la malnutrición, alcoholismo, cáncer, diabetes, leucemia u otra enfermedad infecciosa; traumatismo quirúrgico o accidental, y alteración de la microbiota por empleo prolongado de antibióticos e inmunodepresión por fármacos, virus (VIH), hormonas, deficiencias genéticas, pacientes con quimioterapia y pacientes con edad avanzada (*Prescott y cols., 2004*).

### **3.4 Antimicóticos**

Los antimicóticos pueden ser utilizados tanto por vía tópica como sistémica. La decisión de utilizar uno u otro depende del sitio y extensión de la afección, condición general del paciente, adherencia al tratamiento e incluso la comodidad para el paciente y el costo (*Magaña y Magaña, 2003; Prescott y cols., 2004; Tortora y cols., 2007; Rang y Dale, 2008; Vélez y cols., 2009*).

La clasificación de los antimicóticos puede hacerse de diferentes maneras, según su indicación, sus estructuras químicas, el tipo de micosis para las que se empleen, tipo de acción (fungicida o fungistático), nivel celular en el que actúan (núcleo, membrana, pared, etc.) y vía de administración. En la actualidad, se utilizan dos grupos de fármacos; los producidos por microorganismos (antibióticos) y un segundo grupo que engloba todos los antifúngicos sintéticos. La clasificación por medio de la estructura química es de gran utilidad porque agrupa a los compuestos relacionados por el mecanismo de acción, además es una de las más aceptadas para su mejor descripción y comprensión. Por lo tanto, se puede clasificar a los antifúngicos como antibióticos poliénicos o no poliénicos, y a los antifúngicos sintéticos como azoles, alilaminas, tiocarbamatos, morfolininas, antimetabolitos, equinocandinas e hidroxipiridonas (*Velasco y cols., 2003; Trejo y cols., 2010*).

Dado que los hongos pertenecen al dominio *Eukarya*, la mayor parte de su maquinaria celular es la misma del hombre y los animales, por lo que los agentes antimicóticos que afectan rutas metabólicas en hongos a menudo interfieren con las correspondientes rutas en las células hospedadoras (*Madigan y cols., 2004*); este hecho ha limitado hasta la fecha las posibilidades de desarrollo de nuevos compuestos.

La membrana celular de la célula fúngica se diferencia de la de los mamíferos en que contiene ergosterol en lugar de colesterol. Por este motivo, su biosíntesis (metabolitos y enzimas participantes) constituyó uno de los objetivos para la actividad antifúngica. Pertenecen a este grupo los polienos como la anfotericina B, los compuestos azólicos, los derivados de morfolininas, las alilaminas y los tiocarbamatos. Otros antifúngicos actúan interfiriendo la síntesis de ácidos nucleicos como la flucitosina u obstaculizando el proceso de mitosis, fijándose a la tubulina de los microtúbulos del huso mitótico como hace la griseofulvina (*Velasco y cols., 2003; Madigan y cols., 2004*).

Dentro de los antimicóticos, los más útiles para el tratamiento de las micosis superficiales son los azoles tópicos de tipo imidazol como el clotrimazol, miconazol, econazol, isoconazol, bifonazol, ketoconazol, sertaconazol, y otros (*Magaña y*

*Magaña, 2003; Prescott y cols., 2004; Tortora y cols., 2007; Rang y Dale, 2008; Vélez y cols., 2009*). A lo largo de los últimos años, estos compuestos se han estudiado ampliamente y un gran número de ellos poseen actividad contra diversos microorganismos.

Los azoles son moléculas sintéticas con anillos de cinco elementos con dos nitrógenos (imidazoles) o con tres nitrógenos (triazoles) en su estructura, éstos se unen por enlaces C-N a otros anillos aromáticos. Son compuestos fungistáticos con un espectro antifúngico amplio, siendo activos frente a levaduras, hongos filamentosos y hongos dimórficos. (*Velasco y cols., 2003*).

### **3.4.1 Ketoconazol**

#### **3.4.1.1 Ketoconazol como Agente Terapéutico**

El Ketoconazol es un derivado sintético imidazólico (figura 3.6) compuesto de un anillo de cinco elementos con dos nitrógenos en su estructura, unido por enlaces C-N a otros anillos aromáticos; es activo frente a una gran variedad de hongos que producen micosis superficiales y profundas, aunque más bien se ha empleado profusamente en candidiasis mucocutánea, onicomycosis, candidiasis vaginal y dermatofitosis.

Este fármaco se absorbe bien por el aparato digestivo y se distribuye ampliamente en los tejidos y líquidos corporales, pero no alcanza concentraciones terapéuticas en el sistema nervioso central (SNC), salvo cuando se aplican dosis altas. Se une fuertemente a las proteínas plasmáticas (84%) y posee una semivida de entre 6 y 8 horas. Se inactiva en el hígado y se excreta en la bilis y al orina. Como el resto de los derivados azólicos aplicados por vía tópica es uno de los medicamentos de elección para el tratamiento de casi todo tipo de micosis superficiales. Su mecanismo de acción consiste en la formación de un complejo entre el azol y el citocromo P450 y como consecuencia se inhibe la oxidación inicial del lanosterol, un paso imprescindible para que actúen las enzimas que catalizan la 14C-desmetilación del lanosterol (desmetilasa alfa C-14), que es el precursor del

ergosterol de la membrana fúngica. La disminución resultante de la cantidad de ergosterol altera la fluidez de la membrana e interfiere en la acción de las enzimas asociadas a la membrana. La acumulación de lanosterol también es dañina para la célula fúngica. El efecto global es una inhibición de la replicación. (*Velasco y cols., 2003; Katzung, 2007; Rang y Dale, 2008; Trejo y cols., 2010*).

#### **3.4.1.2 Limitaciones y Riesgos del Uso de Ketoconazol**

Las reacciones adversas más frecuentes con el uso del Ketoconazol son las náuseas y los vómitos. Las alergias, el prurito, las cefaleas y las hemorragias gingivales son otras reacciones adversas. El Ketoconazol interfiere en la síntesis de esteroides; así, en mujeres puede ocasionar alteraciones menstruales y hemorragias uterinas. Se han descrito también casos de ginecomastia y alteraciones de la libido en varones, e incluso casos de azoospermia y menor producción de testosterona si las dosis son elevadas, lo cual se atribuye a la inhibición que causa sobre las enzimas dependientes del citocromo P450. (*Velasco y cols., 2003; Trejo y cols., 2010*).

El tratamiento con Ketoconazol por vía oral se encuentra asociado con toxicidad hepática pudiendo producir hepatitis, cirrosis e insuficiencia hepática, además, se han notificado casos con desenlace mortal o que han requerido trasplante. Por lo anterior, el Comité de Medicamentos de uso Humano (CHMP) de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) ha decidido que, si bien las reacciones hepáticas asociadas al uso de antifúngicos de tipo azólico son reacciones adversas conocidas, la incidencia y la gravedad del daño hepático son mayores con Ketoconazol respecto a otros antifúngicos disponibles. En consecuencia el 11 de Octubre de 2013, la Comisión Europea decidió suspender la autorización de la comercialización de los medicamentos de administración oral que contengan Ketoconazol, pero los medicamentos con Ketoconazol de administración tópica podrán continuar utilizándose (*AEMPS, 2013; EMA, 2013; Geve, 2013*). Sin embargo, en modelos con piel humana, el Ketoconazol fue retenido en el estrato córneo por más de 16

horas después de la aplicación por vía tópica de una crema, lográndose poca o ninguna penetración en la epidermis (McEvoy, 2006).

### **3.4.1.3 Características Fisicoquímicas del Ketoconazol**

De acuerdo con Xu y Trissel, 2008; Guinama, 2013; Jacobs y cols., 2014.

- Descripción: Polvo blanco o casi blanco.
- Solubilidad: Prácticamente insoluble en agua (40 µg/mL) a 23°C, fácilmente soluble en cloruro de metileno, soluble en metanol, relativamente soluble en alcohol a 23°C.
- Punto de fusión: 146 - 147 °C.
- Peso molecular: 531.43 g/gmol.
- pKa: 2.9 y 6.5
- Coeficiente de reparto (n-octanol/agua): 3.507 - 4.31.

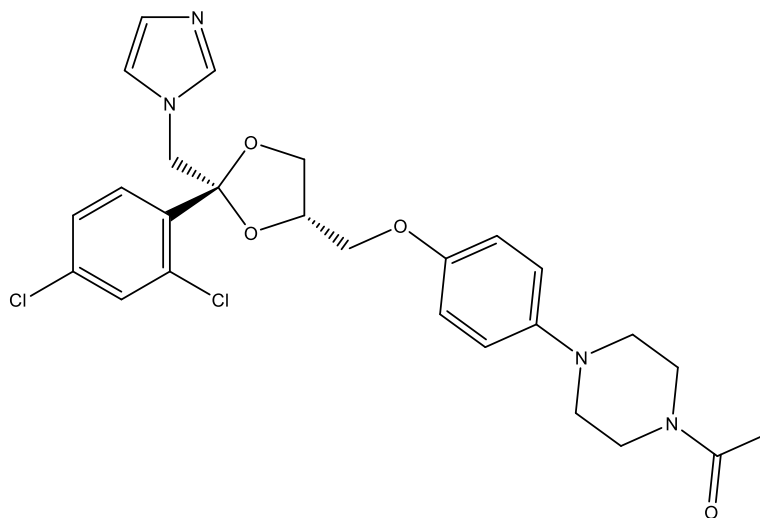


Figura 3.6. Estructura química del fármaco Ketoconazol.



### **3.5 Cristales Líquidos (CL)**

Los cristales líquidos (CL) son mesofases o estados de la materia, que se encuentran entre un líquido isotrópico y un sólido cristalino, por lo tanto combinan propiedades de ambos estados. Específicamente, las moléculas en los CL tienden a apuntar en una cierta dirección mientras aún poseen libertad traslacional (posición). Las moléculas que pueden formar mesofases son llamadas mesógenos. Dependiendo de la forma molecular, mesógenos con forma de varilla dan origen a mesofases calamíticas y mesógenos con forma de disco a mesofases discóticas (*Muller-Goyman, 2002; Patel y Patel, 2010; Tadwee y cols., 2012*).

Los CL se clasifican principalmente en función de los parámetros físico-químicos responsables de la transición de fase como: termotrópicos (CLT) y liotrópicos (CLL). Así, a partir de su estado cristalino, la formación de una mesofase comienza cuando se incrementa la temperatura, o bien al añadir un disolvente, lo cual corresponde a la diferenciación entre CLT y CLL, respectivamente. Por lo tanto, los CLL son formados por mesógenos que no son las moléculas en sí mismas, sino sus hidratos o solvatos, así como por asociaciones de moléculas hidratadas o solvatadas. Por otro lado, con los CLL, al igual como sucede con los CLT, una variación en la temperatura también puede causar una transición de fase entre diferentes mesofases (*Muller-Goyman, 2002; Pasquali y cols., 2006; Patel y Patel, 2010*).

Aunque son mejor conocidos por sus aplicaciones en pantallas de televisión, los CL también son parte esencial de todas las formas de vida, siendo algunos ejemplos sustancias orgánicas esenciales como el ADN, lípidos de membranas celulares y proteínas (*Tadwee y cols., 2012*).

#### **3.5.1 Cristales Líquidos Termotrópicos (CLT)**

Como se ha mencionado, la transición de fase de los CLT depende de la temperatura; existiendo dos tipos principales de CLT: esmécticos y nemáticos. (figura 3.7). Conforme la temperatura incrementa, la primer fase CL es la esméctica, en donde existe un arreglo tipo laminar así como movimiento traslacional y

rotacional de las moléculas. Con un aumento de la temperatura, surge la fase nemática en donde las moléculas difunden hacia afuera de la estructura inicial tipo enrejado así como del arreglo tipo laminar. A una temperatura más alta, el material se transforma en un líquido isotrópico; observándose que el movimiento de las moléculas cambia nuevamente (*Patel y Patel, 2010*).

Las mesofases calamíticas (formadas por mesógenos con forma de varilla) tienen orientación paralela de sus moléculas, que de manera adicional se encuentran acomodadas en láminas, son llamadas CL esmécticos. El plano de la lámina puede orientarse ya sea perpendicular o inclinado con respecto al eje longitudinal de la molécula.

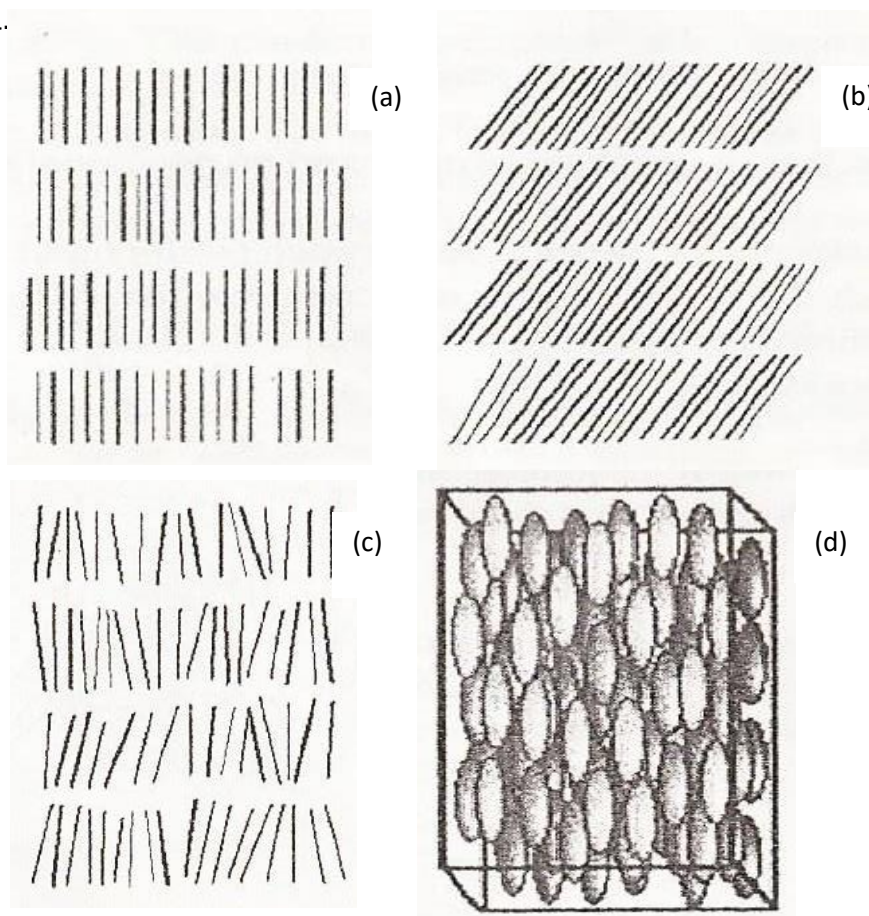


Figura 3.7. Representación de las fases CLT, (a) fase esméctica A; (b) fase esméctica C; (c y d) fase nemática. Modificado de *Muller-Goyman, 2002; Patel y Patel, 2010*.

Los CL discóticos (formados por mesógenos con forma de disco) surgen como mesofases nemáticas o colestéricas (figura 3.8). Sus características estructurales son similares a las de sus mesofases calamíticas respectivas. En lugar de las mesofases esmécticas, surgen CL discóticos columnares a partir del apilamiento de los discos uno sobre otro. Las columnas de la fase discótica columnar forman un enrejado que se encuentra ya sea en una modificación hexagonal o rectangular. En adición, las columnas pueden o no estar inclinadas.

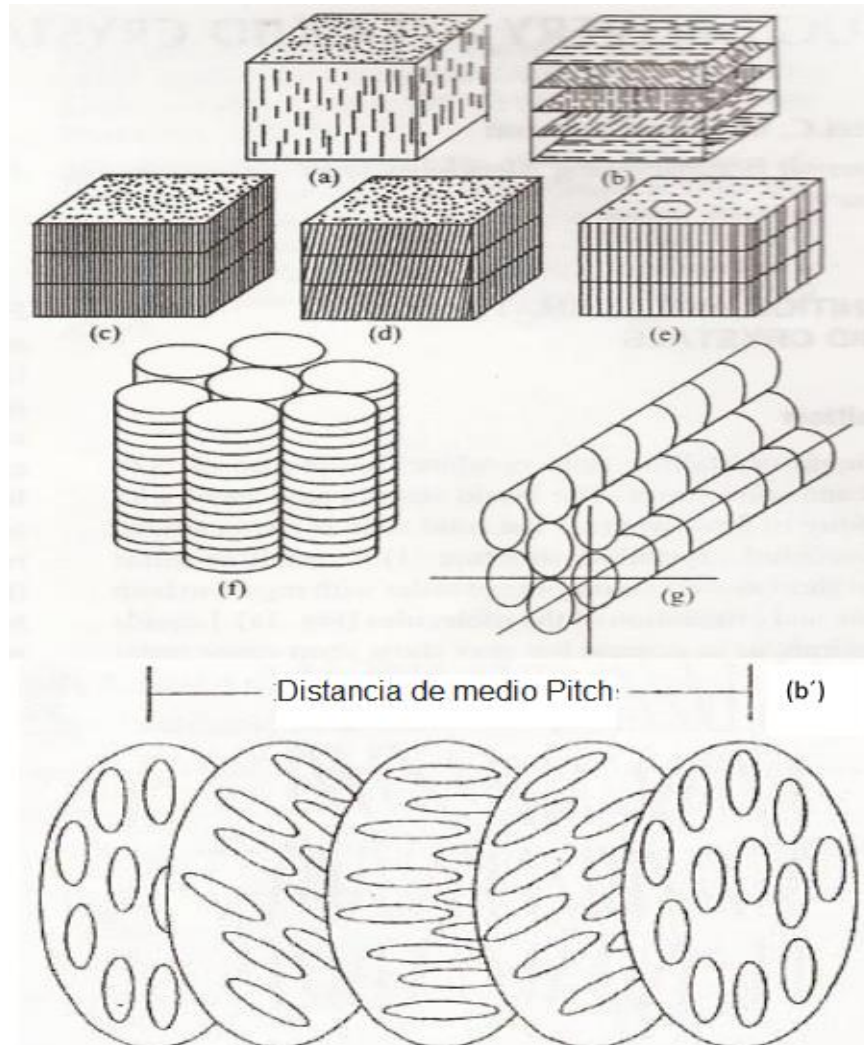


Figura 3.8. Mesofases CLT dependiendo de la forma molecular de los mesógenos. (a, c-e) Mesofases calamíticas; (b,f,g, b') Mesofases discóticas; (a) fase nemática; (b) fase colestérica; (c-e) fases esmécticas; (f) fase columnar hexagonal; (g) fase columnar hexagonal inclinada; (b') representación del "pitch" de una fase colestérica. Modificado de *Muller-Goyman, 2002; Patel y Patel, 2010*.

Por otro lado, los CL colestéricos no exhiben únicamente una orientación paralela, sino que la orientación rota entre láminas ya sea de izquierda o derecha. La distancia de la lámina en donde sucede una rotación de  $360^\circ$  se llama “pitch,” que puede comprender varios cientos de nanómetros. Los CL nemáticos son similares a los colestéricos en que poseen un orden orientacional con la diferencia de que no existe la rotación descrita anteriormente (*Muller-Goyman, 2002; Patel y Patel, 2010*).

### **3.5.2 Cristales Líquidos Liotrópicos (CLL)**

En los CLL, la transición de fase depende de la temperatura y la concentración, por lo que los CLL son mezclas de moléculas anfifílicas y disolventes a determinadas temperaturas y concentraciones. Las propiedades mesomórficas cambian con la temperatura, presión y concentración relativa de diferentes componentes de la mezcla.

Una característica importante de los CLL es el auto-ensamblaje de las moléculas anfifílicas como estructuras supramoleculares, las cuales son las unidades básicas de la mesofase. El grado de hidratación o solvatación depende de las propiedades anfifílicas de la molécula. La hidratación y solvatación de la mayoría de las moléculas tipo varilla resulta en diferentes figuras geométricas tales como conos o cilindros (figura 3.9). Los cilindros se acomodan en láminas; lo que resulta en fases laminares que alternan capas polares y no polares.

Un incremento en la concentración de disolvente transforma a la molécula en forma de varilla solvatada en una forma cónica, conduciendo a un cambio de fase. Dependiendo del carácter polar o no polar del agente solvatador y de la molécula misma, la transición resulta en una fase hexagonal o hexagonal inversa. En la fase hexagonal, la cantidad de agua o disolvente no polar que puede añadirse es limitada. Conforme la geometría molecular sigue cambiando durante la solvatación, otra transformación de fase hacia la forma cúbica (tipo I) o cúbica inversa (tipo IV) ocurre, la cual consiste en micelas esféricas o elipsoidales y en micelas inversas o ambas.

En adición a las formas cúbicas descritas, existen otras formas (figura 3.10) entre la fase laminar y la hexagonal (cúbica tipo II) o hexagonal inversa (cúbica tipo III). En contraste con las fases discontinuas tipo I y IV, las mesofases cúbicas tipo II y III pertenecen a las fases bicontinuas (Muller-Goyman, 2002; Müller-Goyman, 2004; Pasquali y cols., 2005; Pasquali y cols., 2006; Hegmann y cols., 2007; Patel y Patel, 2010; Kim y cols., 2015).

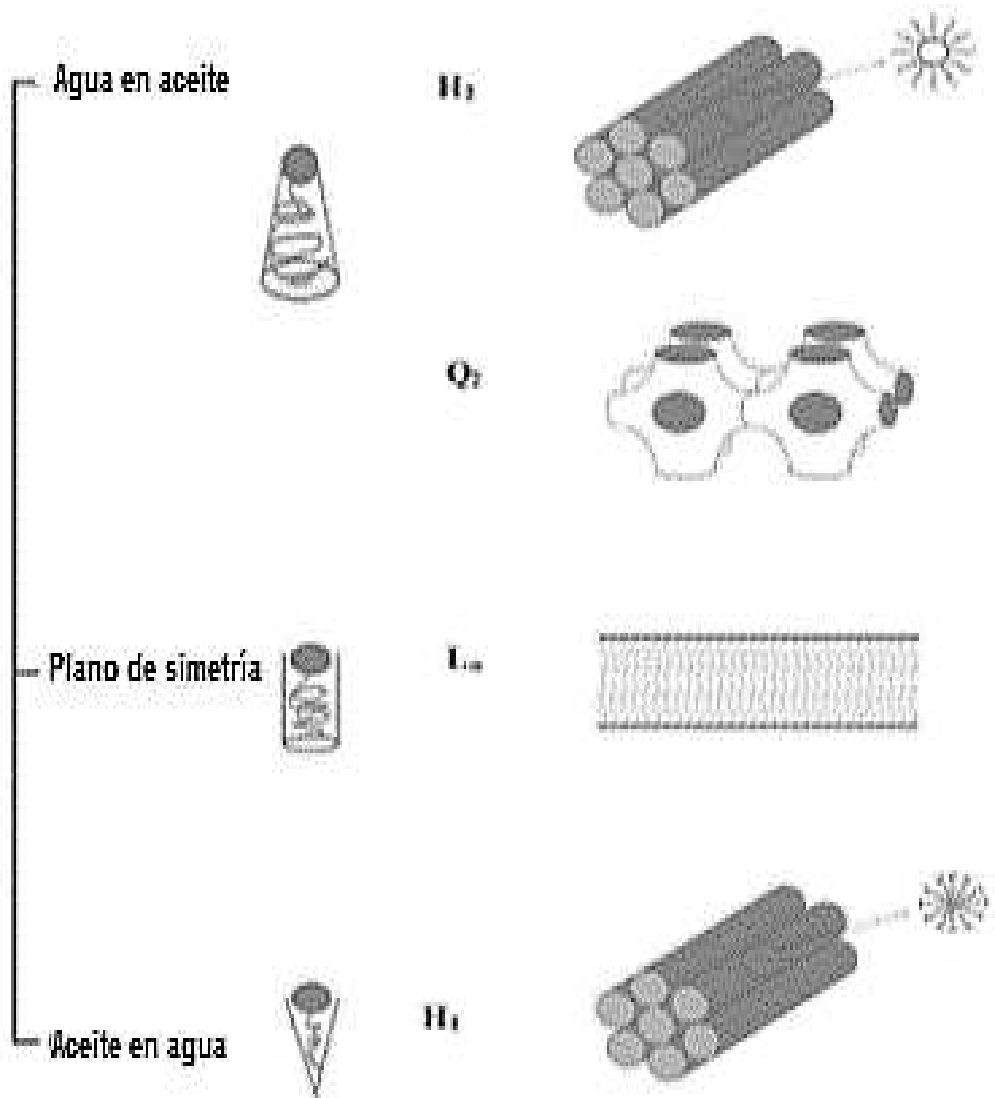


Figura 3.9. Geometrías de las moléculas hidratadas. Cilindros, asociados a estructuras laminares ( $L_\alpha$ ). Conos, asociados a estructuras hexagonales, normal ( $H_1$ ) o inversas ( $H_2$ ). Modificado de Kim y cols., 2015.

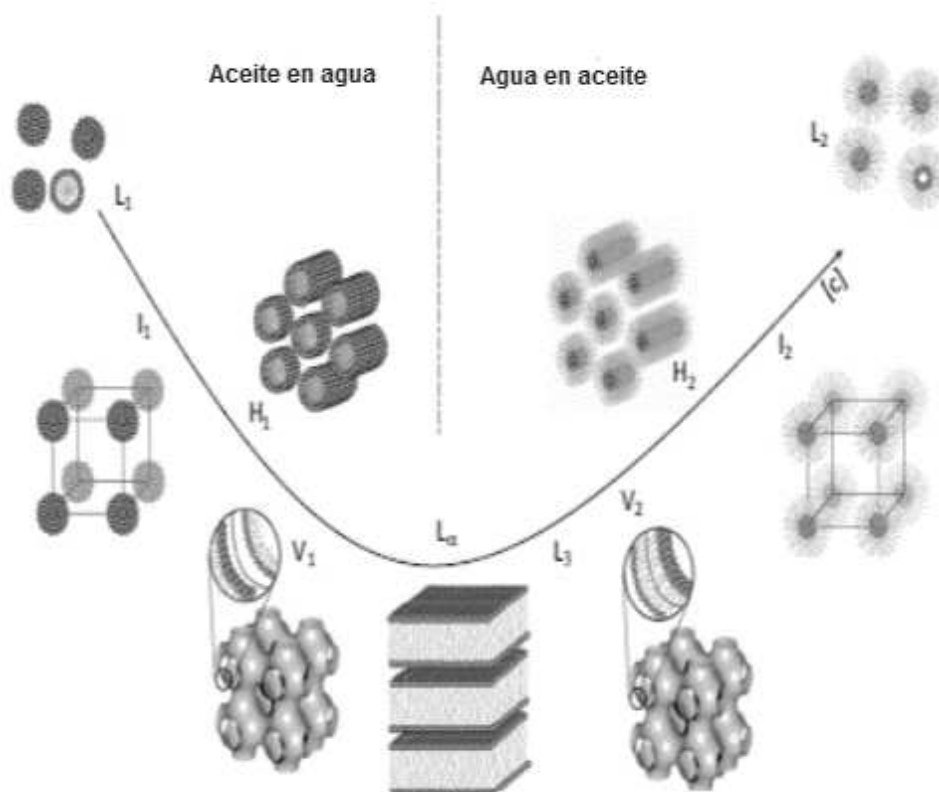


Figura 3.10. Representación esquemática de diferentes fases CLL. L1, micelas en fase normal; L2, micelas en fase reversa; I1, fase cúbica micelar (tipo I); I2, fase cúbica inversa (tipo IV); H1, fase hexagonal normal; H2, fase hexagonal inversa; V1, fase cúbica bicontinua (cúbica tipo II); V2, fase cúbica bicontinua inversa (cúbica tipo III) y  $L_{\alpha}$ , fase laminar. Modificado de *Chang y cols., 2014*.

### 3.5.2.1 Formación y Aplicaciones Farmacéuticas de los CLL

Las fases liotrópicas que se encuentran con mayor frecuencia en las formulaciones farmacéuticas y cosméticas son las laminares, hexagonales (normal e inversa) y las cúbicas (*Pasquali y cols., 2006; Amar-Yuli y cols., 2007*).

Los CLL cúbicos y hexagonales se forman a menudo de manera espontánea por la adición de ciertos lípidos anfifílicos en ambientes acuosos. Las fases son comúnmente muy viscosas y debido a esto, se hacen difíciles de manejar y limita su aplicación y lo que es más, puede causar irritación cuando se pone en contacto

con el epitelio biológico. Para superar lo anterior, una estrategia innovadora ha sido empleada para dispersar la fase original en agua en la forma de pequeñas partículas (Yaghmur y Glatter, 2009; Guo y cols., 2010; Lodha y cols., 2014); pero una característica de gran relevancia es asegurar que el sistema mesofásico inicial de interés (hexagonal o cúbico, por ejemplo), mantenga su estructura intacta al diluirse (dispersarse) en el medio acuoso (Amar-Yuli y cols., 2007).

Cuando los CLL cúbicos o hexagonales se dispersan en un exceso de agua y con la adición de agentes estabilizantes (tales como copolímeros de polioxietileno/polipropileno: Poloxámero o Pluronic®), forman dispersiones coloidales que son conocidas como cubosomas y hexosomas, respectivamente. En general, los métodos de preparación de CLL cúbicos y hexagonales son más sencillos que los de sus dispersiones. Por ejemplo, CLL cúbicos o hexagonales pueden ser preparados al mezclar fases lipídicas anfifílicas y acuosas con un vórtex. En contraste, la fabricación de cubosomas o hexosomas es más complicada.

Existen dos técnicas que se emplean comúnmente para preparar cubosomas o hexosomas (figura 3.11) y que coinciden con lo aplicado en lo general en la nanotecnología. La primera se conoce como aproximación de arriba hacia abajo (*top-down*) o miniaturización, en la cual una mezcla de los lípidos que forman la estructura y los estabilizantes es hidratada para permitir el auto-ensamblado en un material viscoso. Posteriormente, el material es dispersado en una solución acuosa por medio de la adición de energía de alto nivel (homogenización a alta presión y ultrasonificación) para formar cubosomas o hexosomas.

La segunda técnica de preparación de cubosomas y hexosomas se conoce como aproximación de abajo hacia arriba (*bottom-up*) o amplificación, en donde el factor clave es la presencia de un hidrótopo, el cual puede disolver lípidos insolubles en agua para crear un precursor líquido y prevenir la formación de CLL a concentraciones elevadas. La adición controlada de medio acuoso en la solución anterior reduce rápidamente la solubilidad del lípido, resultando entonces en la formación de cubosomas o hexosomas. El método requiere menor energía y tiene la ventaja de producir nanopartículas con menor tamaño de partícula y mejor estabilidad (Guo y cols., 2010; Chen y cols., 2014; Lodha y cols., 2014).

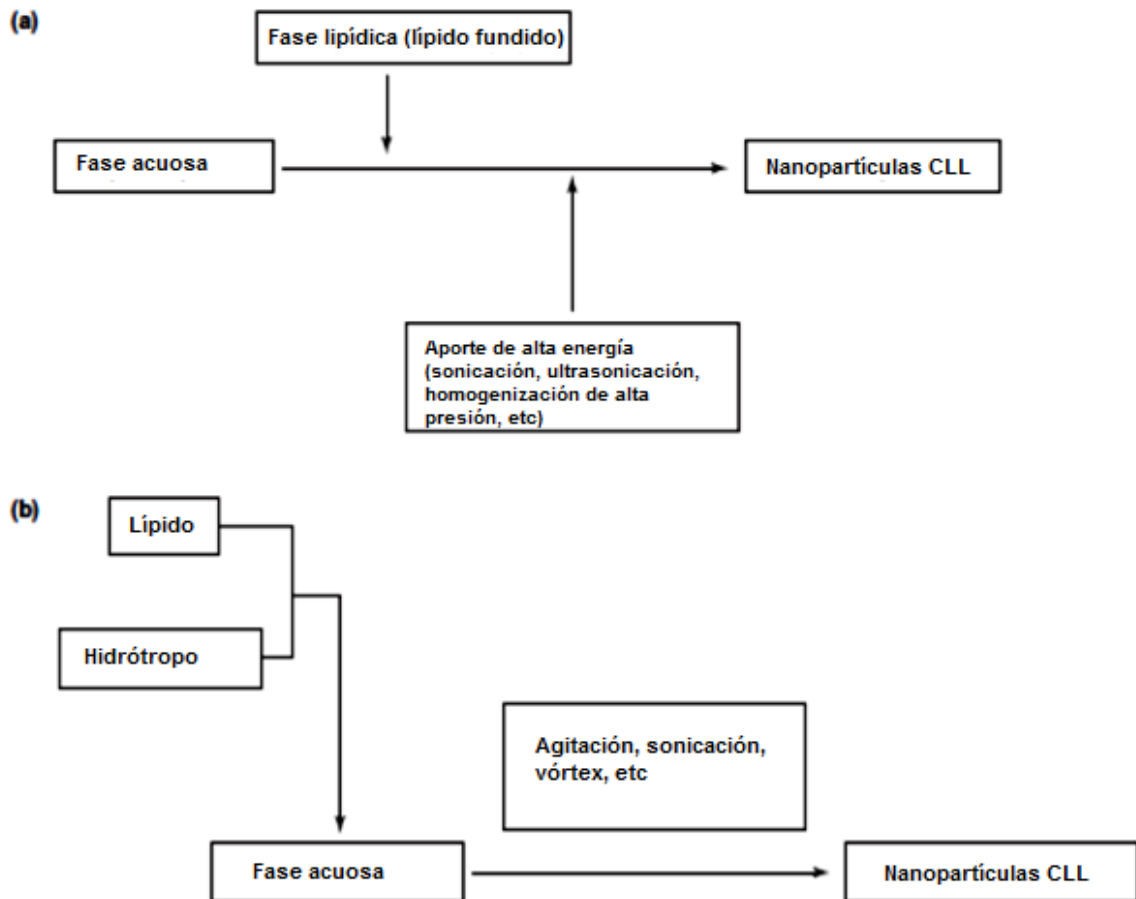


Figura 3.11. Diagramas para la preparación de dispersiones coloidales por medio de las aproximaciones a) de arriba hacia abajo y b) de abajo hacia arriba. Modificado de *Guo y cols., 2010*.

Los CLL han sido considerados como un nuevo método de liberación de fármacos debido a sus propiedades físico-químicas únicas, teniendo como ventajas: 1) La solubilización efectiva comparada con otros acarreadores tradicionales, 2) una elevada capacidad de carga para fármacos con un amplio rango de polaridades y tamaños, 3) de 20 a >100 veces mejor biodisponibilidad de péptidos solubles en agua, 4) son un vehículo prometedor para la protección de fármacos sensibles a degradación enzimática, 5) exhiben gran flexibilidad en términos de su composición, 6) son biodegradables y 7) facilitan la liberación lenta y sostenida de los fármacos incorporados (*Kim y cols., 2015*).



En años recientes, las fases cúbicas y hexagonales han recibido atención considerable debido a su potencial como sistemas de liberación de fármacos, pues proporcionan una matriz de liberación lenta y protegen péptidos, proteínas y ácidos nucleicos de la degradación física y química. De manera adicional, al ser los lípidos formadores de CLL no tóxicos y biodegradables, pueden utilizarse para varias rutas de administración (*Chen y cols., 2014; Guo y cols., 2010*). Por otro lado, la falta de métodos de fabricación a gran escala apropiados para preparar dispersiones bien definidas y estables es una barrera considerable para la comercialización de sistemas de liberación tipo CLL (*Amar-Yuli y cols., 2007*). De manera adicional, la cantidad de lípidos adecuados disponibles para la preparación de los sistemas es limitada (*Kim y cols., 2015*). Sin embargo, varias rutas de administración potenciales han sido estudiadas (*Guo y cols., 2010; Chen y cols., 2014*). Tablas 3.1 y 3.2.

### **3.5.2.2 CLL como Sistemas de Liberación de Fármacos por Vía Tópica**

Las vías de administración transdérmica y tópica son alternativas interesantes con respecto a la vía oral debido a que evitan limitaciones de la liberación oral, dentro de las cuales se encuentran el efecto hepático de primer paso, baja biodisponibilidad, así como varios efectos dosis dependientes (*Kim y cols., 2015*). Su principal problema es la limitada absorción de fármacos a través de la piel, y son necesarios más estudios con respecto a la absorción de fármacos por vía tópica que permitan facilitar el diseño de sistemas de liberación de fármacos eficientes, ya que como se ha mencionado antes, se considera que el estrato córneo (EC) es la principal barrera que limita el paso de fármacos.

Tabla 3.1. Mesofases cúbicas y hexagonales como vehículos para distintos fármacos y vías de administración, reportados entre 2004-2009. *Modificado de Guo y cols., 2010.*

| <b>Tipo de fase CLL</b>                            | <b>Sistema lipídico</b>  | <b>Molécula bioactiva</b> | <b>Ruta de administración</b> |
|--|--|---------------------------|-------------------------------|
| Fase cúbica  | PT/agua;PT/VitEA/agua  | Glucosa                   | Inyección subcutanea          |
| Cubosomas  | GMO/F127/agua  | Colesterol                | Inyección intravenosa         |
| Nanopartícula líquido-cristalina con base lipídica | Fosfatidilcolina/glicerol dioleato/Tween 80/agua                 | Somatostanina             | Inyección intravenosa         |
| Fase cúbica  | GMO/agua;OG/agua   | Cinarizina                | Administración oral           |
| Fase cúbica/fase hexagonal                         | GMO/agua;PT/agua;PT/VitEA /agua                                  | Glucosa                   | Administración oral           |
| Fase hexagonal                                     | OG/agua  | Pamidronato sódico        | Administración oral           |
| Cubosomas  | GMO/agua   | Omapatrilat               | Administración oral           |
| Cubosomas  | GMO/F127/agua  | Simvastatina              | Administración oral           |
| Fase cúbica  | GMO/agua;PT/agua; GMO/propilenglicol/agua PT/propilenglicol/agua | Ácido aminolevulinico     | Aplicación tópica             |
| Cubosomas  | GMO/F127/agua  | Indometacina              | Aplicación tópica             |
| Fase cúbica/Fase hexagonal                         | GMO/agua;GMO/Ác. Oléico/agua                                     | Cys A                     | Aplicación tópica             |
| Hexosomas  | GMO/Ác. Oléico/F127/agua   | Cys A                     | Aplicación tópica             |
| Fase hexagonal/hexosomas                           | GMO/agua;GMO/F127/agua   | Vit K                     | Aplicación tópica             |
| Hexosomas  | GMO/Ác. Oléico/F68/agua  | Progesterona              | Aplicación en mucosas         |

PT: Fitantriol; GMO: Monooleato de glicerilo; OG: Glicerato de oleilo; F127: Poloxámero 407; F68: Poloxámero 188

Tabla 3.2. Mesofases cúbicas y hexagonales como vehículos para fármacos reportados entre 2007-2012. Modificado de *Chen y cols., 2014*.

| Tipo de fase       | Composición                  | Molécula bioactiva | Ruta de administración |
|--------------------|------------------------------|--------------------|------------------------|
| Fase gel cúbica    | GMO/agua y PT/agua           | Glucosa y dextran  | Oral                   |
| Cubosomas          | GMO/F127/agua y PT/F127/agua | Cinarizina         | Oral                   |
| Cubosomas          | PT/F127/agua                 | Amfotericina B     | Oral                   |
| Fase gel cúbica    | GMO/propilen glicol/agua     | Capsaicina         | Transdérmica           |
| Fase gel cúbica    | GMO/agua                     | Paeonol            | Transdérmica           |
| Fase gel cúbica    | GMO/agua y PT/agua           | Sulforodamina B    | Transdérmica           |
| Cubosomas          | GMO/F127/agua                | Ciclosporina A     | Oftálmico              |
| Fase gel hexagonal | OG/agua                      | Cinarizina         | Oral                   |
| Fase gel hexagonal | GMO/vitamina K/agua          | Vitamina K         | Transdérmica           |
| Hexosomas          | GMO/vitamina K/F127/agua     | Vitamina K         | Transdérmica           |
| Fase gel hexagonal | GMO/TAG/agua                 | Diclofenaco sódico | Transdérmica           |
| Hexosomas          | GMO/ácido oléico/F68/agua    | Progesterona       | Oromucosal             |

PT: Fitaniol; GMO: Monooleato de glicerilo; OG: Glicerato de oleilo; F127: Poloxámero 407; F68: Poloxámero 188; TAG: Triglicéridos

No obstante lo anterior, existen estudios que han mostrado que los CLL, incluyendo formulaciones de mesofases cúbicas y hexagonales son capaces de penetrar a través del EC, y por ello son promisorios candidatos como sistemas de liberación de fármacos por vía tópica. (*Guo y cols., 2010; Chen y cols., 2014; Kim y cols., 2015*).

Por otro lado, tanto cubosomas como hexosomas también han sido empleados para liberación de fármacos por vía tópica; en donde, comparado con fases cúbicas y hexagonales, las dispersiones muestran algunas ventajas únicas: 1) La buena fluidez y gran área superficial de las dispersiones proporcionan un contacto más íntimo con la piel, 2) la dispersión puede ser integrada en otras formulaciones y 3) no causan irritación después de la aplicación tópica (*Guo y cols., 2010*). De manera adicional, se ha propuesto que debido a la similitud existente entre la estructura de las fases cúbicas y hexagonales y la estructura de los corneocitos y los lípidos que

los rodean (EC) (*Norlén y cols., 2004*), sea razonable suponer una interacción entre el sistema líquido cristalino y las capas de la piel, que lleve a la formación de un depósito del sistema en la piel a partir del cual el fármaco sea liberado de manera controlada (*Patel y cols., 2010, Chen y cols., 2014*).

### **3.5.3. Estabilidad de las Emulsiones y Sistemas Coloidales**

Prácticamente ningún sistema disperso heterogéneo es por completo estable y la estabilidad relativa dependerá de la velocidad de colisión entre las partículas y de la probabilidad de que tras la colisión formen un agregado, lo cual conduciría a la separación progresiva en dos fases (*Delgado y cols., 2001*).

Para aumentar o disminuir la estabilidad de las emulsiones se han generado diversas estrategias, en algunos casos se han utilizado medios dispersantes mecánicos y/o aditivos químicos que cambian tanto las propiedades interfaciales de las gotas de la emulsión como las propiedades viscosas del medio continuo.

La estabilidad de las emulsiones se ha podido describir haciendo uso de la denominada *teoría DLVO* (llamada así por las iniciales de los investigadores que la desarrollaron de forma independiente: **Deryaguin, Landau, Verwey y Overbeek**), que en términos generales considera que la mejora en la estabilidad de los sistemas en dispersión debe tener en cuenta las distintas interacciones entre sus componentes, como son las de Van der Waals y las electrostáticas, impedimentos estéricos, hidratación, entre otras (*Fernández., 2006*).

El punto de partida de esta teoría es que la estabilidad de un sistema disperso está determinada por la suma de las fuerzas atractivas y repulsivas existentes entre sus partículas. Las fuerzas de atracción entre partículas son resultado de las fuerzas de dispersión, a menudo llamadas “de London-van del Waals”. Las fuerzas de repulsión se establecen a consecuencia de la doble capa eléctrica que rodea a cada partícula. En un principio, esta teoría se desarrolló para describir sistemas dispersos estabilizados por medio de la carga eléctrica; posteriormente, se extendió a sistemas estabilizados estéricamente (mediante capas de polímero adsorbidas

sobre las partículas) (*Delgado y cols., 2001*). El balance de estas fuerzas opuestas determina la estabilidad del sistema y ambas contribuciones se pueden estudiar separadamente, a saber:

- a) **Fuerzas intermoleculares:** Son fuerzas de atracción entre las moléculas y son responsables del comportamiento no ideal de los gases. Ejercen aún más influencia en las fases condensadas de la materia, es decir, en los líquidos y los sólidos. Las fuerzas **dipolo-dipolo**, **dipolo-dipolo inducido** y las **fuerzas de dispersión** integran lo que los químicos denominan **fuerzas de van der Waals**, nombradas así por reconocimiento al físico holandés Johannes van der Waals. Los iones y dipolos se atraen entre sí mediante fuerzas electrostáticas conocidas como **fuerzas ion-dipolo**, que no son fuerzas de van der Waals. El **punteo o enlace de hidrógeno** es un tipo de interacción dipolo-dipolo particularmente fuerte. Dado que sólo unos pocos elementos participan en la formación del puente de hidrógeno, éste se trata como una categoría aparte. Según la fase de una sustancia, la naturaleza de los enlaces químicos y los tipos de elementos que la componen, en la atracción total entre las moléculas pueden actuar distintos tipos de interacciones (*Chang, 2010*).
  
- b) **Fuerzas dipolo-dipolo:** Son las fuerzas de atracción entre moléculas polares, es decir, entre moléculas que poseen momentos dipolares. Su origen es electrostático y se pueden entender en función de la ley de Coulomb. A mayor momento dipolar mayor será la fuerza (*Chang, 2010*).
  
- c) **Fuerzas ion-dipolo:** Son las fuerzas que atraen entre sí a un ion (ya sea un catión o un anión) y a una molécula polar. La intensidad de esta interacción depende de la carga y del tamaño del ion así como de la magnitud del momento dipolar y del tamaño de la molécula. Las cargas en los cationes están más concentradas porque estos iones suelen ser más pequeños que los aniones. En consecuencia, con una carga de igual magnitud, un catión

experimenta una interacción más fuerte con los dipolos que un anión (*Chang, 2010*).

**d) Fuerzas de dispersión:** Son fuerzas de atracción que se establecen entre moléculas no polares. Si un ion o una molécula polar se acerca a un átomo o a una molécula no polar, la distribución electrónica del átomo o molécula se distorsiona por la fuerza que ejerce el ion o la molécula polar, dando lugar a una clase de dipolo. Se dice que el dipolo del átomo o molécula no polar es un **dipolo inducido** por que la separación de sus cargas positiva y negativa se debe a la proximidad de un ion o una molécula polar. La interacción atractiva entre un ion y un dipolo inducido se conoce como interacción **ion-dipolo inducido**, en tanto que la atracción entre una molécula polar y el dipolo inducido se conoce como interacción **dipolo-dipolo inducido**. La probabilidad de inducir un momento dipolar depende no sólo de la carga del ion o de la fuerza del dipolo, sino también de la *polarizabilidad* del átomo o molécula, es decir, de qué tan fácil se distorsiona la distribución electrónica del átomo o molécula. En general un átomo o molécula tiende a ser más polarizable a medida que aumenta el número de electrones y se hace más difusa la nube de electrones. Por difusa se entiende una nube electrónica que se distribuye en un volumen considerable, de tal forma que los electrones no están fuertemente unidos al núcleo. Por otro lado, en un instante cualquiera los átomos o moléculas no polares pueden tener un momento dipolar generado por las posiciones específicas de los electrones. Este momento dipolar se denomina **dipolo instantáneo** por que dura sólo una fracción de segundo. El punto importante es que este tipo de interacción produce fuerzas de dispersión, es decir, fuerzas de atracción que se generan a partir de los dipolos temporales inducidos en los átomos o moléculas. Las fuerzas de dispersión aumentan con la masa molar. Como las moléculas con mayor masa molar suelen tener más electrones, las fuerzas de dispersión aumentan con el número de electrones (*Chang, 2010*).

- e) **El puente de hidrógeno:** Tipo especial de interacción dipolo-dipolo entre el átomo de hidrógeno de un enlace polar, como N-H, O-H o H-F, y un átomo electronegativo de O, N o F. La energía promedio de un puente de hidrógeno es demasiado grande para una interacción dipolo-dipolo (más de 40 KJ/mol). Por esta razón, los puentes de hidrógeno tienen un fuerte efecto en la estructura y propiedades de muchos compuestos (*Chang, 2010*).

Las fuerzas intermoleculares analizadas son fuerzas de atracción. Sin embargo, se debe tener en cuenta que entre las moléculas también hay fuerzas de repulsión. En consecuencia, cuando dos moléculas entran en contacto, la repulsión entre sus electrones y núcleos entra en juego, La magnitud de la fuerzas de repulsión aumenta muy rápido a medida que disminuye la distancia que separa a las moléculas en una fase condensada. A esto se debe que los líquidos y los sólidos sean muy difíciles de comprimir (*Chang, 2010*).

Para que un sistema sea estable por periodos apreciables de tiempo habrá que impedir la formación de agregados irreversibles de partículas (coagulación), para lo cual se puede recurrir a dos mecanismos:

- 1) **Estabilización electrostática:** Consiste en proporcionar una carga eléctrica a las partículas, de forma que al tener la misma carga, se repelan al acercarse.
- 2) **Estabilización estérica:** Consiste en recubrir las partículas con una capa adsorbida de un material (por ejemplo, un polímero) que evita que se acerquen mucho. La utilización cada vez más frecuente de macromoléculas no iónicas como estabilizantes de emulsiones y suspensiones ha exigido ampliar la teoría DLVO para considerar la existencia de otros tipos de fuerzas que intervienen en la estabilización del sistema. Supóngase unas partículas cuya superficie se han absorbido polímeros no iónicos. Cuando las capas de polímero se acerquen, se producirá una interacción estérica entre ellas que causan la repulsión entre las mismas; así, las partículas no pueden acercarse a distancias menores de dos veces el espesor de la capa de polímero adsorbido (*Delgado y cols., 2001*).

f) **Potencial Z:** Es un parámetro que se encuentra relacionado con la carga superficial, una propiedad que todos los materiales poseen, o adquieren, cuando son suspendidos en un fluido (*Fairhurst, 2013*).

Es un término científico para el potencial electrocinético en sistemas coloidales, en otras palabras; es el potencial eléctrico en la doble capa interfacial que se encuentra en el plano de corte o deslizamiento con respecto a un punto del medio de dispersión que se encuentra lejos de la interfaz. El término expresa la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria de fluido que se encuentra unida a la partícula en dispersión (*Honary y Zahir, 2013*).

La determinación del potencial Z permite estimar la estabilidad de los sistemas dispersos heterogéneos. Por ejemplo, la repulsión electrostática permite impedir la agregación de las partículas dispersas y se opone a la coagulación y floculación. En el caso de las emulsiones, la repulsión electrostática favorece la dispersión (*Delgado y cols., 2001*).

Los fenómenos más importantes en la estabilidad de las emulsiones son:

- **Naturaleza física de la película interfacial:** Se refiere a la resistencia máxima presentada por las moléculas de surfactante con fuertes interacciones intermoleculares. Los agentes emulsionantes con características idóneas para asegurar una alta estabilidad, son mezclas de dos o más surfactantes, siendo la combinación más recomendada, la constituida por un surfactante hidrofílico y uno lipofílico (*Villareal, 2004*).
- **Viscosidad de la fase continua:** Determina la frecuencia de las colisiones entre las gotas, a través del coeficiente de difusión de las mismas. Un incremento en la viscosidad reduce dicho coeficiente de difusión y consecuentemente retarda la coalescencia. Esta es una razón que justifica la incorporación de agentes viscosantes a la fase externa (*Villareal, 2004*).



- **Distribución del tamaño de gota:** Las emulsiones son más estables cuanto menor es el tamaño de gota y más estrecha la distribución de dichos tamaños.
- **Relación de volúmenes de fases (WOR):** Se refiere a la proporción relativa entre el volumen de fase dispersa y el volumen de fase continua. Esto es lo que se conoce como WOR (Water-Oil Ratio). Cuando la fase interna constituye menos del 30% del volumen total, las gotas individuales no interfieren entre sí y las propiedades físicas del sistema estarán primariamente determinadas por la naturaleza de la fase continua (*Villareal, 2004*).
- **Temperatura:** Se puede decir que los cambios de temperatura afectan considerablemente la estabilidad de las emulsiones, a través de su influencia sobre la tensión interfacial, la naturaleza y viscosidad de la película interfacial, el coeficiente de reparto del tensoactivo, la viscosidad de las fases y la agitación térmica de las partículas dispersadas (*Villareal, 2004*).

#### **3.5.4. Estabilidad de los Sistemas Líquido-Cristalinos Liotrópicos**

Debido a sus propiedades fisicoquímicas y estructurales, los sistemas líquido cristalinos liotrópicos son más estables que otro tipo de sistemas dispersos (*Amar-Yuli y cols., 2007*). Esto se observa también con las emulsiones que se han desarrollado en los últimos años a base de cristales líquidos (*Kim y cols., 2009; Zhang y Liu, 2013*), ya que la formación de una interfase con características líquido cristalinas proporciona una mayor estabilidad, la cual es atribuida al incremento de la fuerza mecánica de la interfaz aceite-agua y a la fijación de las gotas de la emulsión a la estructura líquido-cristalina. Esta multicapa que rodea a las gotas de la emulsión reduce las interacciones de van der Waals entre las gotas de aceite y actúa como una barrera en contra de la coalescencia (*Lavaselli y cols., 2012*).

Tal y como ya se ha señalado antes, los CLL suelen ser formados con moléculas anfífilas y/o lípidos polares que en distintas proporciones en presencia de agua forman dispersiones coloidales o mesofases cúbicas y hexagonales directas o reversas con alta viscosidad; en la formación de determinada mesofase y su

estabilidad, interviene tanto la proporción de agua como la de los lípidos y otras moléculas anfifílicas co-participantes.

Uno de los compuestos lipídicos anfifílicos más estudiados (*Ganem-Quintanar y cols., 2000; Amar-Yuli y cols., 2007*), es el monooleato de glicerilo, que puede formar al menos cuatro mesofases bien caracterizadas: una lamelar, dos fases cúbicas bicontinuas reversas a temperatura ambiente, y una fase hexagonal reversa a una temperatura relativamente más alta. Con éste y otros compuestos se ha demostrado que la estabilidad de cada fase en los CLL y sus dispersiones (hexosomas y cubosomas), es función entre otros factores, de la relación que exista entre el lípido anfifílico, la presencia de un coestabilizante polimérico y la proporción de agua; donde el polímero suele actuar como estabilizador de tipo estérico al adsorberse en algunos casos a la superficie de las partículas, sin embargo, el mecanismo aún no ha sido bien dilucidado.

Otro factor determinante en la formación de cada fase en los CLL es la proporción de agua, la cual interviene en la estructuración, orden o cristalinidad del sistema y su tamaño de partícula, habiéndose observado fenómenos de hidratación y deshidratación en los que juega un rol importante una competencia entre la hidratación de la estructura y la adsorción de polímero por el sistema CLL (*Amar-Yuli y cols., 2007*). Otros factores que también gobiernan la formación de las distintas mesofases para una determinada composición de lípido-copolímero-agua, son el sistema de agitación-dispersión y la energía que éste proporciona durante la formación, así como los cambios de temperatura durante y una vez formado el sistema.

Otros factores que influyen en la estabilidad de los CLL y sus dispersiones, aunque en menor medida, son la presencia de electrolitos y moléculas que favorezcan fenómenos de hidrotropía y cambios de pH que afecten la hidratación y en su caso, la gelificación del sistema (*Amar-Yuli y cols., 2007; Guo y cols., 2010*).

### **3.6 Métodos para Caracterizar Sistemas Líquido-Cristalinos**

#### **3.6.1 Microscopía de Luz Polarizada**

Los CLL, con excepción de las mesofases cúbicas muestran birrefringencia; que puede ser observada con un microscopio de luz polarizada en donde dos polarizadores son montados en posición cruzada por debajo y encima del objeto analizado. La posición cruzada de los polarizadores proporciona planos de ondas polarizadas que son perpendiculares entre ellos. Por lo tanto, la luz que atraviesa el polarizador que se encuentra debajo de la muestra no podrá pasar por el polarizador en posición cruzada que se encuentra encima de la muestra. Con un material anisotrópico, algunas porciones de la luz serán capaces de pasar al segundo polarizador debido a que el haz de luz habrá sido rotado. Cada CL muestra texturas claras y oscuras. La adición de una platina  $\lambda$  con propiedades fuertemente birrefringentes permite observar efectos coloridos de las texturas (*Muller-Goymann, 2002; Müller-Goyman, 2004; Pasquali y cols., 2006; Patel y Patel, 2010*).

#### **3.6.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)**

Debido al gran poder magnificador del microscopio electrónico, puede ser visualizada la microestructura de los CL. Sin embargo, muestras acuosas no sobreviven el alto vacío del microscopio electrónico sin que exista pérdida de agua y por consiguiente un cambio en la microestructura. Por lo tanto, son necesarias técnicas especiales para la preparación de muestras son necesarias previo al uso del microscopio electrónico. La técnica de congelación-fractura ha demostrado ser de utilidad; creandose una réplica de la muestra que es observada en el microscopio electrónico. Para preservar la estructura original de la muestra durante la replicación, el primer paso es congelar rápidamente la muestra, para lo cual es colocada entre dos platos delgados de oro y entonces congelada con propano

líquido enfriado con nitrógeno a  $-196^{\circ}\text{C}$  o con nitrógeno líquido a  $-210^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, la muestra congelada es colocada en un aparato de fracturación en donde la fractura se lleva a cabo a temperatura de  $-100^{\circ}\text{C}$  y vacío. Después, la superficie de la muestra es recubierta con una capa de 2 nm de espesor de platino en un ángulo de  $45^{\circ}$ . Un recubrimiento vertical adicional con una capa de carbón diez veces más gruesa (20 nm) proporciona alta estabilidad mecánica que hace más fácil el manejo y observación de la muestra. Otra posibilidad es el uso de la técnica crio-MET, en la cual es necesario dar suficiente contraste a una delgada capa de la muestra congelada utilizando por ejemplo, tetróxido de osmio. Entonces, la muestra puede observarse directamente por MET a temperaturas de  $-196^{\circ}\text{C}$  lo que provoca una presión de vapor muy baja, especialmente de el agua, de modo que la examinación de la muestra se hace preservando la microestructura a pesar del alto vacío (*Muller-Goymann, 2002; Müller-Goyman, 2004; Pasquali y cols., 2006; Patel y Patel, 2010*).

Otra opción, que fue la utilizada por este estudio es la MET con la técnica de tinción negativa, en donde la muestra no es teñida sino que es rodeada por el contraste electrón-denso provocado por una sal densa a los electrones (se tiñe el entorno). Como resultado de lo anterior, la muestra es electrón-transparente en contraste con un fondo electrón-denso. Los contrastes negativos no son usados sobre muestras seccionadas sino sobre muestras completas e intactas como virus, bacterias u organelos celulares, las cuales han sido colectadas sobre rejillas cubiertas con una membrana de soporte. La técnica de tinción negativa es muy simple y rápida. Entre las sales de metales pesados más usados como contrastantes negativos se encuentran: Molibdato de Amonio (1 - 3% acuoso), fosfotungstato de sodio (1 - 2% acuoso), acetato de uranilo (0.5 - 2% acuoso), formato de uranilo (0.5 - 2% pH 4.5 - 5.2 ajustado con hidróxido de amonio) (*Ogura y Rodríguez, 1997*).

### **3.6.3 Difractometría de Rayos X**

La difracción de rayos X en pequeño ángulo es una técnica que también da información sobre la estructura de cada una de las fases líquido-cristalinas; su

diferencia con las técnicas de difracción de rayos X convencionales es el reducido valor del ángulo ( $\theta$ ) entre la dirección del haz de rayos X incidente y los planos que producen la difracción. Los valores bajos de estos ángulos son una consecuencia de que las distancias (a las que se denominan espaciados) entre los planos cristalinos de una misma familia ( $d$ ) son apreciablemente mayores en los cristales líquidos que en la mayoría de los sólidos cristalinos. En efecto, por la ley de Bragg, el seno del ángulo de difracción es inversamente proporcional al espaciado.

$$\text{sen } (\theta) = \frac{n\lambda}{2d} \dots\dots\dots (2)$$

En la ecuación de Bragg (ecuación 2),  $n$  toma valores enteros positivos comenzando por 1 y se denomina orden de la difracción. Para un mismo espaciado, el seno del ángulo es directamente proporcional al orden de la difracción. La longitud de onda de los rayos X depende del elemento que constituye el ánodo. Generalmente se emplea la línea  $K\alpha_1$  del cobre, que tiene una longitud de onda de 0,154056 nm, o bien las líneas  $K\alpha_1$  y  $K\alpha_2$  sin separar, con un valor aproximado de 0,1542 nm (Muller-Goymann, 2002; Müller-Goyman, 2004; Pasquali y cols., 2006; Patel y Patel, 2010).

### **3.6.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)**

La calorimetría es la medición de los cambios energéticos dentro de un material que se manifiestan como eventos exotérmicos (liberan calor) o endotérmicos (absorben calor). Se trata de una técnica para la medición de las propiedades térmicas de los materiales y para establecer una conexión entre la temperatura y propiedades físicas específicas de sustancias y es el único método para la determinación directa de la entalpía asociada con el fenómeno de interés (Gill y cols., 2010).

Un calorímetro consiste de un contenedor que se encuentra aislado de los alrededores, en donde se mide el intercambio de calor que ocurre entre el sistema y el ambiente. Un cambio exotérmico requerirá que la temperatura del ambiente aumente debido a que éste recibe la energía perdida por el sistema, por otro lado,

cambios endotérmicos involucrarán la disminución de la temperatura del ambiente debido a que éste provee la energía absorbida por el sistema (*Clas y cols., 2002*). Los calorímetros se emplean frecuentemente en química, bioquímica, biología celular, biotecnología, farmacología y recientemente en nanociencias para determinar propiedades termodinámicas de biomoléculas y materiales en escala nanométrica (*Gill y cols., 2010*).

Las aplicaciones más comunes de la calorimetría en las ciencias farmacéuticas se encuentran en las técnicas de Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) y en la Microcalorimetría (*Clas y cols., 2002*).

**Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB):** Es una de las técnicas más populares, en donde las diferencias en flujo de calor entre una muestra y una referencia son medidas como función del tiempo y la temperatura de la muestra, permitiendo obtener información cuantitativa y cualitativa con respecto a los cambios físicos y químicos que ocurren en la muestra. En otras palabras, el equipo funciona como un instrumento de análisis térmico que determina la temperatura y el flujo de calor asociado con transiciones de un material como función del tiempo y la temperatura. Durante el cambio de temperatura, el equipo CDB mide la cantidad de calor que es irradiada o absorbida por la muestra con base en la diferencia de temperatura entre la muestra y el material de referencia (*Gill y cols., 2010*). La técnica CDB es usada ampliamente en la industria farmacéutica para determinar puntos de fusión, pureza y temperaturas de transición vítrea de los materiales (*Clas y cols., 2002*).

Dependiendo del mecanismo de operación del equipo, se pueden clasificar en dos tipos, CDB con compensación de poder o CDB con flujo de calor, los cuales proporcionan la misma información pero su fundamento es diferente. En los equipos que funcionan por compensación de poder, la muestra y la referencia son calentadas de manera independiente en hornos separados mientras que sus temperaturas se mantiene iguales. La diferencia en poder requerido para “compensar” la temperatura en ambas celdas es determinada como función de la temperatura de la muestra (*Clas y cols., 2002; Gill y cols., 2010*). Por otro lado, en los equipos de flujo de calor tanto la muestra como la referencia se colocan en un

horno y el calor es transferido a la muestra y referencia a través de un disco termoeléctrico. Sin embargo, debido a la capacidad calorífica (Cp) de la muestra, existirá una diferencia de temperatura entre la muestra y la referencia, la cual es medida, y el flujo de calor consecuente se determina por medio del equivalente térmico de la ley de Ohm (ecuación 3 ):

$$q = \frac{\Delta T}{R} \dots\dots\dots (3)$$

Donde q es el flujo de calor de la muestra, T es la diferencia de temperatura entre la muestra y la referencia y R es la resistencia del disco termoeléctrico (*Gill y cols., 2010*).

**Microcalorimetría:** Es empleada para monitorear cambios térmicos asociados con eventos físicos o químicos que no requieren de calentamiento o enfriamiento para su iniciación. Tales eventos incluyen disolución, precipitación, reacción y cristalización (*Clas y cols., 2002*). Se trata de una técnica ultrasensible que puede medir cambios caloríficos muy pequeños en volúmenes pequeños, convirtiendo a esta técnica en un método útil para el estudio de biometariales, por lo tanto se emplea para estudiar reacciones que involucran biomoléculas, incluyendo interacciones entre moléculas y cambios conformacionales como plegamiento de proteínas. Estos procesos son estudiados frecuentemente utilizando dos técnicas: Calorimetría de Titulación Isotérmica y (CTI) y Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB). La CTI se emplea para el estudio del comportamiento de unión de biomoléculas, mide directamente el calor que es liberado o absorbido durante la unión de biomoléculas, permitiendo realizar la determinación exacta de constantes de unión, estequiometría de la reacción, entalpía y entropía. Por otro lado, la técnica CDB en esta modalidad es empleada para el estudio de la estabilidad de proteínas y otras biomoléculas, encontrando aplicaciones en los campos de ingeniería de proteínas, diseño racional de medicamentos y producción biofarmacéutica en donde el desarrollo de proteínas estables es un punto crítico (*Malvern, 2015*).

Cuando la mayoría de los sólidos se funden, sus átomos y moléculas pasan a un estado con mayor libertad para moverse entre el espacio ocupado por el material. Por lo tanto, las moléculas pierden orden durante la transición desde el estado sólido al líquido y la entropía del sistema incrementa. Con los cristales líquidos existen más de un estado que se encuentran entre el sólido y el líquido (*Winter, 2010*) y las transiciones de fase corresponden a cambios en el contenido energético de un sistema. Debe tenerse en cuenta que la transición desde un sistema cristalino a uno amorfo requiere de mucha energía; pero la transición de cristalino a líquido-cristalino, líquido-cristalino a amorfo y particularmente las transiciones entre diferentes CL consumen pequeñas cantidades de energía. Por lo tanto, es necesario tener cuidado con respecto a la correcta sensibilidad del equipo empleado, así como un límite de detección de cambios energéticos suficientemente bajo. Las transiciones de fase causadas entrópicamente pueden ser reconocidas por medio de un cambio en la pendiente de la línea base, correspondiente a un cambio en la capacidad calorífica. En particular, las transiciones de fase de polímeros líquido-cristalinos resultan a partir de razones entrópicas. Tales transiciones pueden superponerse con el efecto entálpico, por lo que su detección puede ser complicada. Este tipo de estudios permite determinar el rango de temperaturas en el que se presenta una cierta fase con una buena exactitud, pero para identificarla se debe recurrir a la difracción de rayos X o, en su defecto, a la microscopía polarizante (*Muller-Goymann, 2002; Müller-Goyman, 2004; Pasquali y cols., 2006; Patel y Patel, 2010*).

### **3.6.5 Reología**

La reología es el estudio del flujo y la deformación de los cuerpos cuando son sometidos a un estrés. En farmacia, las determinaciones reológicas son utilizadas para caracterizar la facilidad para vaciar una botella o para extraer una formulación del interior de un tubo u otro contenedor deformable, determinar la facilidad de esparcimiento sobre la piel y determinar la facilidad para bombear el producto desde el mezclador hasta el equipo de llenado. Además, resulta de gran importancia para el desarrollo del producto y para el aseguramiento de la calidad del mismo (*Wood,*



1986). La determinación de propiedades reológicas es aplicable a todos los materiales, desde fluidos como soluciones diluidas de polímeros y surfactantes, formulaciones concentradas, semisólidos como cremas y pastas, polímeros sólidos o fundidos e incluso asfalto (Malvern, 2015).

La aplicación tangencial de una fuerza a un cuerpo y la deformación resultante del mismo son componentes esenciales de un fenómeno reológico. Si la fuerza es aplicada por un periodo corto de tiempo y después retirada, la deformación será definida como **elástica** si el cuerpo recupera su forma original (vuelve al punto de partida), pero se clasificará como un **flujo** si la deformación se mantiene. Un **fluido o líquido** se convierte en un cuerpo que fluye bajo la acción de una fuerza. Para entender mejor los componentes fundamentales de un flujo viscoso podemos considerar dos planos paralelos que se encuentran separados por una distancia ( $x$ ). Si el plano superior se mueve de forma horizontal a una velocidad ( $v$ ) debido a la acción de la fuerza ( $F$ ), existirá un gradiente de velocidad entre los planos. Este gradiente es lo que se conoce como velocidad de corte (rate of shear). El esfuerzo cortante (shear stress) es la fuerza por unidad de área causante de la deformación. El esfuerzo cortante puede ser aplicado momentáneamente o de manera constante, de modo que, la deformación elástica ocurrirá si al aplicar la fuerza, el plano superior se mueve en la misma dirección de la fuerza y al retirar ésta, regresa a su posición original, Por otro lado, un **flujo viscoso** ocurrirá si existe un movimiento constante durante la aplicación de la fuerza y no existe recuperación al estado original después de que la fuerza causante de la deformación es retirada. Entre los límites de la deformación elástica y el flujo viscoso existe una combinación de ambos fenómenos, al cual se le conoce como **flujo viscoelástico** (Wood, 1986; Rojas y cols., 2012).

Denominaremos a los materiales con comportamiento viscoso (fluido) como:

1. **Fluido Newtoniano:** A aquel en donde existe una relación directa y proporcional entre las variables velocidad de corte y esfuerzo cortante, siendo la viscosidad la constante de proporcionalidad de la relación esfuerzo cortante/ velocidad de corte (Wood, 1986; Rojas y cols., 2012; Mastropietro y cols., 2013).

**2. Fluidos no Newtonianos:** Son aquellos en donde no existe una relación lineal entre el esfuerzo de corte y la velocidad de corte. La mayoría de los sistemas farmacéuticos pertenecen a esta categoría, en donde el esfuerzo necesario para lograr una determinada velocidad de corte puede incrementar más rápidamente o más lentamente de lo que se requiere para mantener una relación lineal (*Wood, 1986; Rojas y cols., 2012; Mastropietro y cols., 2013*). Lo anterior hace necesario definir a los fluidos no Newtonianos en:

**a) Pseudoplásticos:** Materiales en donde el esfuerzo cortante incrementa más lentamente que la velocidad de corte. Esta pérdida de la resistencia a fluir resulta en la disminución de la viscosidad del fluido. El comportamiento pseudoplástico es el comportamiento reológico más común de las formas farmacéuticas multifase (sistemas heterogéneos) (*Wood, 1986; Rojas y cols., 2012; Mastropietro y cols., 2013*).

**b) Dilatantes:** Estos materiales se caracterizan por el aumento de la viscosidad debido a que el esfuerzo cortante incrementa más rápidamente que la velocidad de corte y generalmente ocurre en suspensiones farmacéuticas con un elevado contenido de sólidos (*Wood, 1986; Rojas y cols., 2012; Mastropietro y cols., 2013*).

**c) Plásticos:** Se caracterizan por que requieren de un esfuerzo inicial (esfuerzo de umbral o cedencia) antes de que se produzca un flujo. Un material plástico de Bingham es representado por una línea recta o curva de esfuerzo cortante/velocidad de corte que se desplaza del origen. De manera adicional, también pueden presentarse curvas pseudoplásticas o dilatantes que requieren de dicho esfuerzo inicial para comenzar a fluir (*Wood, 1986; Rojas y cols., 2012; Mastropietro y cols., 2013*).

Existe un factor adicional, el elemento tiempo. Algunos materiales necesitan tiempo para adaptarse a una nueva condición inducida por el esfuerzo aplicado. Después de que el material ha sido sometido a un esfuerzo cortante ascendente y posteriormente disminuye dicho esfuerzo, la estructura puede o no recuperarse inmediatamente. Si se recobra rápidamente los gráficos (reogramas) de ascenso y

descenso de esfuerzo cortante/velocidad de corte serán una única línea superpuesta. Pero si la estructura no se recupera rápidamente, el reograma de descenso tendrá valores de esfuerzo cortante inferiores o mayores a cada velocidad de corte con respecto a los mostrados en la curva de ascenso. Lo anterior se conoce como tixotropía y reopéxia respectivamente, al área existente entre las dos curvas se conoce como asa de histéresis (*Wood, 1986; Rojas y cols., 2012; Mastropietro y cols., 2013*).

Los diferentes tipos de CL exhiben propiedades reológicas distintas; con un incremento en su organización estructural, los CL aumentan su consistencia y su flujo se hace más viscoso, adoptando características de flujo No Newtoniano, siendo plástico para estructuras cúbicas y hexagonales o pseudoplásticos para estructuras laminares. Una medición por oscilación mecánica es el método de elección para determinar la elasticidad del CL, pudiéndose estudiar las propiedades viscoelásticas de los sistemas sin cambiar su microestructura, lo cual ocurre usualmente en las investigaciones reológicas empleando deformación mecánica. Por otro lado, una dispersión con un bajo contenido de fase interna exhibe propiedades de flujo viscoso ideal o flujo Newtoniano (*Müller-Goyman, 2004; Patel y Patel, 2010*).

### **3.6.6 Espectroscopía de Correlación de Fotones. Determinación de Tamaño de Partícula**

El tamaño de partícula de los sistemas coloidales es un parámetro importante como control de proceso, pero también como aseguramiento de la calidad porque la estabilidad física de la dispersión depende del tamaño de partícula y de la distribución de tamaño. Procesos dinámicos de la dispersión, como el movimiento Browniano causan variaciones en las intensidades de la luz dispersa con el tiempo. Conforme más pequeña es la partícula, mayores son las fluctuaciones por el movimiento Browniano (*Muller-Goymann, 2002; Müller-Goyman, 2004; Patel y Patel, 2010*).

La dispersión dinámica de luz (DDL o DLS, por sus siglas en inglés “Dynamic light Scattering”), espectroscopía de correlación de fotones (PCS) o dispersión de luz quasi elástica (QELS) es una técnica fisicoquímica empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas o macromoléculas como proteínas o polímeros en suspensión (*Cuadros-Moreno y cols., 2014*). La DDL mide el movimiento Browniano y lo relaciona con el tamaño de las partículas por medio de la iluminación de las partículas con un láser y analizando las fluctuaciones en la luz que es dispersada (*Malvern, 2004*). Cuando la luz láser alcanza a las partículas que se encuentran en suspensión, la luz se dispersa en todas las direcciones posibles, Si se separa una dirección, los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada. Si se coloca una pantalla cerca de las partículas, ésta será iluminada por la luz dispersada y mostrará un patrón de puntos que consistirá en áreas brillantes y áreas oscuras en donde no se detecta luz. Las áreas brillantes son aquellas en donde la luz dispersada por las partículas alcanza la pantalla con la misma fase e interfiere de manera constructiva para formar una zona brillante. Las áreas oscuras son aquellas en donde las adiciones de fase son mutuamente destructivas y se cancelan unas con otras (*Malvern, 2004*).

Como consecuencia del movimiento Browniano debido a la colisión aleatoria de las moléculas con el líquido que las rodea, las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, cosa que también provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión. Si las partículas se mueven rápidamente (partículas pequeñas), también se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas lentas (grandes) llevarán a variaciones más lentas. Por norma general, en la dispersión de luz dinámica la suspensión de la muestra permanece en reposo. El término “dinámica” no se refiere al movimiento de la muestra como un conjunto, sino a la “vibración” de las partículas que la componen (*Cuadros-Moreno y cols., 2014*). La relación entre el tamaño de las partículas y su velocidad se encuentra definida por la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 4):

$$D_T = \frac{K_B T}{6\pi\eta(T)r_h} = \frac{K_B T}{3\pi\eta(T)d_h} \dots\dots\dots(4)$$

En donde,  $D_T$  es el coeficiente de difusión,  $K_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta (Kelvin) y  $\eta(T)$  es la viscosidad del líquido (la cual depende fuértemente de la temperatura, haciendo necesario que se mantenga una temperatura constante durante la medición);  $r_h$  y  $d_h$  son el radio hidrodinámico y el diámetro hidrodinámico respectivamente; los cuales son casi siempre mayores que el diámetro de la partícula seca debido a la doble capa que se forma alrededor de la superficie de partículas cargadas. Los contraiones que rodean la partícula forman una región difusa que se mueve con la partícula (*Tscharnuter, 2000*).

Como las partículas están en constante movimiento, el patrón de zonas brillantes y oscuras también parecerá que se mueve, lo cual es debido a que las adiciones de fase constructivas o destructivas de la luz dispersada provocarán que las áreas brillantes y oscuras crezcan y disminuyan en intensidad, en otras palabras, la intensidad fluctuará y el equipo medirá la velocidad de la fluctuación de la intensidad y utilizará la información para calcular el tamaño de las partículas. Lo anterior se realiza gracias a un componente llamado correlador digital, el cual básicamente mide el grado de similitud entre dos señales en un periodo de tiempo. Si comparamos la intensidad de la señal en una zona particular del patrón de puntos en tiempo (t) con la intensidad de la señal después de un periodo de tiempo muy corto (t+Δt) se observará que las dos señales son muy similares (fuertemente correlacionadas). Por otro lado, cuando se compara la señal original después un tiempo mayor (t+2Δt), existirá aún una comparación relativamente buena entre las dos señales, pero no será tan buena como (t+Δt). Por lo tanto, la correlación disminuirá con el tiempo, de modo que, si partículas grandes estan siendo medidas, la intensidad del patrón de puntos fluctuará lentamente, de manera similar, si partículas pequeñas son medidas, la intensidad del patrón de puntos fluctuará rápidamente (*Malvern, 2004*).

En los últimos años, la DDL se ha convertido en un método popular para abordar y comprender mejor el crecimiento de cristales, el inicio de la agregación o la

nucleación de macromoléculas. Debido a que es una técnica sensible para evaluar las interacciones macromoleculares y para detectar la formación de agregados en solución, la DDL ha sido utilizada como una herramienta de diagnóstico de las condiciones en que el disolvente podría cristalizar, o para el seguimiento de la cristalización en soluciones macromoleculares sobresaturadas. Por otro lado, el diseño de materiales altamente ordenados y nanoestructurados es una de las tareas más difíciles en la química de materiales. En este contexto, copolímeros de bloques anfifílicos con dos bloques incompatibles unidos son de especial interés debido a su capacidad de auto-ensamblar a nanoescala. Cuando un bloque copolímero se disuelve en un disolvente selectivo, que es termodinámicamente buen disolvente para un bloque, pero es un pobre disolvente para el otro bloque, se asocia para formar micelas. La formación de micelas es útil para varias aplicaciones en pinturas, cosméticos, liberación de fármacos y terapia génica (*Cuadros-Moreno y cols., 2014*).

#### **4. HIPÓTESIS**

Los cristales líquidos liotrópicos hexosómicos cargados con Ketoconazol (CLLH-KTZ) son mesofases nanométricas con propiedades fisicoquímicas que permitirán la liberación del Ketoconazol, su difusión y retención en membranas empleadas en modelos de permeación *in vitro*.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar mediante técnicas *in vitro*, la cinética de liberación y de difusión percutánea de Ketoconazol contenido en un sistema líquido cristalino hexosómico (CLLH) y compararla con una formulación tópica comercial de Ketoconazol.

##### **5.1 Objetivos Particulares**

- Preparar un sistema líquido cristalino liotrópico hexosómico, conteniendo Ketoconazol (CLLH-KTZ) y evaluar mediante distintas técnicas instrumentales, propiedades como: morfología y distribución de tamaño de partícula, potencial Z, así como su comportamiento reológico (viscosidad y flujo) y térmico.
- Diseñar y validar un método analítico por CLAR, que sea útil para la cuantificación de Ketoconazol en estudios *in vitro* de liberación, permeación y retención del activo contenido en el CLLH-KTZ.
- Evaluar la liberación y permeación *in vitro* del Ketoconazol contenido en el CLLH-KTZ, utilizando membranas poliméricas de uso general en modelos de permeación *in vitro*.
- Realizar estudios *in vitro* de permeabilidad y de retención en piel, utilizando piel de oreja de cerdo.
- Comparar los resultados de permeación y retención en piel del Ketoconazol contenido en CLLH-KTZ con los obtenidos de una formulación tópica comercial.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Obtención de los Sistemas tipo Cristal-Líquido Liotrópico Hexosómico sin (CLLH) y con Ketoconazol (CLLH-KTZ)

**Procedimiento:** Se prepararon sistemas líquido-cristalinos de acuerdo con el método desarrollado en el Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada de la UAM-X, empleando mezclas de tensoactivos y cotensoactivos con exposición a ultrasonido durante la fase de formación. Se obtuvieron sistemas cargados con el antimicótico Ketoconazol 0.3 % p/p (CLLH-KTZ) y sistemas sin el agente antimicótico (CLLH) para determinar las posibles diferencias asociadas a la presencia del fármaco. Los sistemas CLLH-KTZ y CLLH fueron almacenados a temperatura ambiente en envases bien cerrados y protegidos de la luz.

### 6.2 Determinación de la Estructura por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

**Procedimiento:** Para determinar el tipo de estructuración obtenida, los sistemas preparados se observaron por MET empleando el equipo JEOL 1200EXII del Laboratorio de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular (Universidad Nacional Autónoma de México) mediante tinción negativa de la muestra (CLLH y CLLH-KTZ) con acetato de uranilo (1%) como agente de contraste.



### **6.3 Determinación del Tamaño de Partícula y Potencial Z de los Sistemas sin (CLLH) y con Ketoconazol (CLLH-KTZ)**

**Procedimiento:** Se determinó del tamaño de partícula y potencial Z de los sistemas líquido-cristalinos por medio de un Zeta Sizer Nano modelo ZS90 (Malvern Instruments Ltd) utilizando una celda ZEN1002-Zetadipcell con 900 µL de formulación. Las determinaciones de ambas características fueron realizadas a temperaturas de 10, 25, 40 y 50 °C permitiendo que las muestras se equilibraran por un periodo de 5 minutos a cada temperatura.

### **6.4 Viscosidad de los sistemas sin (CLLH) y con Ketoconazol (CLLH-KTZ)**

Las muestras líquido-cristalinas fueron sometidas a diferentes velocidades de corte utilizando un viscosímetro modelo DV3TLVCJO (Brookfield), equipada la aguja CPA-40Z. Los experimentos fueron realizados a temperaturas de 25, 32 y 40 °C empleando un recirculador de agua Thermo-Circulator modelo LCB-60 (LabTech).

**Procedimiento:** Los análisis consistieron en esquemas de cambio ascendente de las velocidades de rotación desde 40 hasta 70 rpm, con intervalos de 5 rpm cada 3 minutos haciendo determinaciones de la viscosidad de los sistemas cada minuto, lográndose así obtener lecturas por triplicado a cada velocidad de corte empleada con el objetivo de observar las propiedades de flujo de los sistemas líquido-cristalinos y evaluar el posible cambio en la viscosidad de los sistemas con la modificación de la velocidad de corte. De manera adicional, se evaluó la existencia de fenómenos dependientes del tiempo (existencia de histéresis), empleando ensayos de velocidad de corte descendente, desde 70 rpm hasta 40 rpm, (bajo las mismas condiciones descritas para los ensayos de velocidades ascendentes). Para cada determinación realizada las muestras fueron equilibradas a la temperatura de análisis durante 5 minutos antes de comenzar cada experimento.

## **6.5 Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)**

Se realizaron estudios sobre el comportamiento térmico de los sistemas líquido-cristalinos por medio del registro de la capacidad calorífica ( $C_p$ ) de los sistemas a diferentes temperaturas empleando un micro calorímetro de celda capilar VP-DSC (MicroCal). De manera adicional, se estimó la estabilidad de los sistemas líquido-cristalinos cuando son sometidos a diferentes temperaturas. Lo anterior se realizó por medio de estudios de reversibilidad de las transiciones observadas con el recalentamiento de la muestra después de enfriar la celda una vez que terminó un primer barrido.

**Procedimiento:** Se plantearon dos esquemas de análisis haciendo un preescaneo a 10°C de 5 minutos y utilizando una velocidad de calentamiento de 1°C/min. El primer esquema consistió en llevar las muestras desde 10°C hasta 110°C, enfriar sin hacer registro de la  $C_p$  y recalentar la muestra haciendo un nuevo registro de  $C_p$ . El segundo esquema tuvo las mismas condiciones del anterior con la excepción de que la temperatura máxima se fijó en 50°C con la intención de establecer el comportamiento y la estabilidad de los sistemas bajo condiciones más probables de uso y almacenamiento. Por último, para comprobar que los termogramas obtenidos no dependieran de la velocidad con la que varía la temperatura, se repitieron los experimentos del segundo esquema (10 - 50 °C) utilizando diferentes velocidades de calentamiento en un rango comprendido entre 0.6 y 1.6 °C/min.

Las muestras fueron desgasificadas previamente al análisis por medio de un ThermoVac® (MicroCal) y los resultados analizados por medio del programa OriginPro® 9.0.

## **6.6 Desarrollo de Métodos Analíticos para la Cuantificación de Ketoconazol**

A partir de un método analítico desarrollado y validado en el laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada de la UAM-X, se obtuvieron métodos analíticos por CLAR para determinar:

- 1) La carga de Ketoconazol en los sistemas líquidos-cristalinos.
- 2) La cinética de liberación y permeación del Ketoconazol en membranas artificiales desde el sistema líquido-cristalino.
- 3) La permeación y retención del principio activo en membranas de piel de oreja de cerdo.

Para realizar lo anterior, para cada caso se emplearon, respectivamente, los siguientes diferentes medios de disolución:

- 1) Metanol.
- 2) Mezcla de solución reguladora de acetatos pH 5.0 y metanol (1:1).
- 3) Mezcla para los estudios de permeación. Esta consistió en una solución reguladora de acetatos pH 5.0 y metanol (1:1) que se mantuvo en contacto con la cara interna de piel de oreja de cerdo por un periodo de 6 horas con agitación constante. Previo a su uso, ésta se filtró por gravedad a través de un filtro Whatman No. 5 y se centrifugó a 10,000 rpm por 40 minutos a 15°C utilizando una centrífuga Beckman Coulter Avanti J.30I.
- 4) Mezcla para los estudios de retención del principio activo en piel. Para este ensayo se utilizó la misma mezcla de disolventes y metodología descrita anteriormente, con la diferencia de que la mezcla de disolventes se mantuvo en agitación con pequeños trozos de piel de oreja de cerdo.

**Procedimiento:** Con cada uno de los medios de disolución descritos, se prepararon soluciones stock de 500 µg/mL de Ketoconazol y a partir de las mismas se

construyeron curvas de calibración (1-500 µg/mL) por triplicado, las cuales fueron filtradas a través de membranas de 0.45 µm e inyectadas a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent 1260 utilizando una columna Agilent Poroshell 120 EC-C18 de 4.6x50 mm, con tamaño de partícula de 2.7 µm, mantenida a 35°C. La fase móvil consistió en una mezcla de (70A:30B), donde A: Trietilamina:Metanol grado HPLC (1:500) y B: Acetato de amonio:Agua (1:200).

**Condiciones del ensayo:** Se utilizó un detector UV a 220 nm. El volumen de inyección de la muestra fue de 5 µL, con un flujo de 1mL/min y un tiempo de corrida de 5 minutos.

### **6.7 Estudio de las Cinéticas de Liberación y Permeación *in vitro* del Sistema CLLH-KTZ**

Los estudios de liberación y permeación *in vitro* del Ketoconazol contenido en los sistemas CLLH-KTZ se realizaron siguiendo las recomendaciones de las guías de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD, de sus siglas en inglés) y de algunos autores como *Moser, y cols., 2001; Patel y cols., 2009; Baert y cols., 2010; Shirsand y cols., 2012; Jacobs y cols., 2014.*

#### **6.7.1 Cinética de liberación de Ketoconazol desde el sistema CLLH-KTZ**

Se realizaron estudios de liberación del Ketoconazol incorporado en el sistema líquido-cristalino empleando membranas para diálisis (Spectra/Por® Dialysis, USA) con tamaño de poro de 1KDa. Para realizar los estudios se cortaron porciones de la membrana que fueron cerrados por un extremo con hilo, posteriormente se colocaron 15 mL de la formulación y se cerró la membrana por el otro extremo de la misma forma.

**Procedimiento:** Los experimentos se llevaron a cabo en vasos de 250 mL que contenían 200 mL de solución reguladora de acetatos pH 5.0:metanol (1:1) como

medio de disolución, los cuales se adaptaron a un disolutor VanKel, VK 7000. La temperatura se mantuvo a  $32 \pm 0.5$  °C con agitación constante a 50 rpm durante 24 horas tomando alícuotas de 3mL con reposición de medio a las 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 7.5, 9.5, 22 y 24 horas.

Las muestras obtenidas fueron filtradas a través de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  e inyectadas al cromatógrafo de líquidos.

La cinética obtenida de liberación del fármaco fue evaluada aplicando a los resultados experimentales los modelos matemáticos de Weibull, Hixson-Crowell, Higuchi, Primer orden y Korsmeyer-Peppas. Para esto se utilizó el complemento DDSolver para Microsoft® Excel, seleccionando el modelo que tuviera el valor más alto de coeficiente de correlación ajustado ( $R^2_{\text{ajustado}}$ ) y el valor más bajo de Criterio de Información de Akaike (AIC) (*Zhang y cols., 2010*).

#### **6.7.2 Evaluación de la Cinética de Permeación utilizando Membranas Artificiales Mediante el Modelo de Celdas de Franz**

Los experimentos de permeación fueron realizados siguiendo las indicaciones de las guías 2004 y 2011 de la OECD. Se utilizó un equipo de celdas de Franz Manual Diffusion Cell 58-001-802 (Hanson Research Corporation, USA) con un área de exposición de 1.767  $\text{cm}^2$  manteniendo agitación de 400 rpm y temperatura de  $32 \pm 0.5$  °C constantes durante todo el experimento. Como barrera semipermeable se emplearon membranas HT-450 Tuffryn® (Pall Corporation) de polisulfona con 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

**Procedimiento:** Se colocaron aproximadamente 250 mg de la formulación CLLH-KTZ, equivalentes a 750  $\mu\text{g}$  de Ketoconazol en el compartimiento donador de cada celda y como medio receptor (7 mL) se utilizó una mezcla de solución amortiguadora de acetatos pH 5.0-metanol en proporción 1:1, tomando alícuotas de 3 mL con reposición de medio con el siguiente esquema de muestreo: 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0,

2.5, 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0 horas. Las muestras obtenidas fueron filtradas por membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  e inyectadas al cromatógrafo.

La cinética de permeación del fármaco obtenida fue evaluada aplicando a los resultados experimentales los modelos matemáticos de Weibull, Hixson-Crowell, Higuchi, Primer orden y Korsmeyer-Peppas. Para esto se utilizó el complemento DDSolver para Microsoft® Excel seleccionando el modelo que tuviera el valor más alto de coeficiente de correlación ajustado ( $R^2_{\text{ajustado}}$ ) y el valor más bajo de Criterio de Información de Akaike (AIC).

### **6.7.3 Evaluación de la Cinética de Permeación y Retención en Piel de Oreja de Cerdo Mediante el Modelo de Celdas de Franz**

Los experimentos empleando piel fueron realizados bajo las mismas condiciones y esquema de muestreo descritos para los experimentos con membranas artificiales.

**Procedimiento:** La piel se limpió retirando el exceso de tejido adiposo y muscular. Previo al comienzo de los estudios la piel fue examinada visualmente en busca de daños que pudieran afectar los resultados, posteriormente se dejó hidratar con el medio receptor por 10 minutos antes de ser colocada entre los compartimientos donador y receptor de la celda.

La cantidad de formulación CLLH-KTZ adicionada fue de 250 mg equivalentes a 750  $\mu\text{g}$  de Ketoconazol aproximadamente. Por otro lado, se utilizó como formulación de referencia al medicamento NIZORAL® (2g/100g) colocando la cantidad equivalente a 750  $\mu\text{g}$  de Ketoconazol (37.5 mg de NIZORAL® aproximadamente).

Al término de los estudios, se retiró la piel de las celdas, se lavó con agua desionizada para eliminar el exceso de formulación y se inspeccionó nuevamente de forma visual para comprobar que no había sufrido daños. Posteriormente, para determinar la cantidad de Ketoconazol que pudiera encontrarse dentro de la piel, las membranas fueron cortadas en pequeños trozos y colocadas en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas, utilizando como medio 25 mL de la mezcla

de solución reguladora de acetatos pH 5.0-metanol (1:1). Al concluir el periodo de 24 horas se realizó un primer filtrado por gravedad utilizando papel filtro Whatman No. 5 y un segundo filtrado por membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ , posteriormente se analizaron por CLAR.

Los resultados obtenidos con la formulación CLLH-KTZ y NIZORAL® se compararon por medio de una prueba de t de student utilizando el programa SPSS versión 20.

Para evaluar la capacidad del método de extracción para recuperar al Ketoconazol retenido en la piel, se colocaron sobre membranas de piel previamente hidratadas alícuotas de una solución concentrada de Ketoconazol en metanol, colocando una cantidad de Ketoconazol equivalente a la colocada en los experimentos de permeación (750  $\mu\text{g}$ ). Posteriormente, se dejó evaporar y la piel se cortó en pequeños trozos, se colocó en agitación y se analizó por CLAR tal y como se describió anteriormente.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Obtención de los Sistemas tipo Cristal Líquido Liotrópico Hexosómico sin (CLLH) y con Ketoconazol (CLLH-KTZ)

Las formulaciones obtenidas presentan características de un fluido poco viscoso que fluye fácilmente, de apariencia blanca y opaca, mostrando una ligera tonalidad azul que pasa a rojiza-rosada cuando se las observa a contraluz (figura 7.1). A simple vista no fue posible distinguir entre sistemas sin (CLLH) y con (CLLH-KTZ) Ketoconazol.



Figura 7.1. Sistema líquido cristalino en dispersión (hexosoma CLLH / CLLH-KTZ) obtenido mediante la metodología propuesta por el laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada de la UAM-X.

### 7.2 Determinación de la Estructura por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Las imágenes obtenidas mediante la técnica de MET muestran que por medio de la metodología desarrollada en la UAM-X y aplicada en este estudio, se obtienen sistemas líquido-cristalinos dispersos, con estructuraciones hexagonales o hexosomas (figura 7.2). Las imágenes expuestas corresponden respectivamente, a



los sistemas CLLH-KTZ, donde la figura 7.2 a y b es de un lote de sistema evaluado después de un mes de su preparación y la figura 7.2 c y d, es de otro lote del mismo tipo de sistema, pero observado a un día posterior a su fecha de obtención.

Las imágenes de microscopía revelan que los sistemas si bien no se observan completamente uniformes, debe considerarse el hecho de que las condiciones necesarias de vacío para el empleo de la técnica hace posible una pérdida de agua y como consecuencia una reestructuración parcial de la muestra (*Patel y Patel, 2010*), pero la fase preponderante es la hexosómica.

Con relación a lo anterior, se debe contemplar así mismo que la manera de preparar las muestras y el tiempo de exposición de éstas dentro del túnel del equipo, son factores determinantes en la resolución de las imágenes a obtener de los sistemas, de ello depende entonces que se pueda apreciar con facilidad y nitidez la estructuración de las dispersiones líquido-cristalinas. Por otro lado, se ha reportado que en la elaboración de sistemas que contienen elevado contenido de agua (como es el caso de las dispersiones líquido-cristalinas), se tiende a formar vesículas que coexisten con las estructuras líquido-cristalinas preponderantes y esto ha sido comprobado mediante la técnica Crio-MET (*Guo y cols., 2010; Lodha y cols., 2014*).

Para corroborar los resultados obtenidos en este estudio, se sugiere que en la medida que se tenga acceso a una técnica como la Crio-MET, se utilice ésta como apoyo a la observación de la estructuración de los sistemas CLLH, pues la muestra podrá observarse a temperaturas de  $-196^{\circ}\text{C}$  con lo que existirá una presión de vapor muy baja, especialmente del agua, de modo que la examinación de la muestra se haría preservando la microestructura a pesar del alto vacío y no habría un posible efecto de modificación de fase y/o tamaño de partícula o morfología por deshidratación (*Muller-Goymann, 2002; Müller-Goyman, 2004; Pasquali y cols., 2006; Patel y Patel, 2010*).

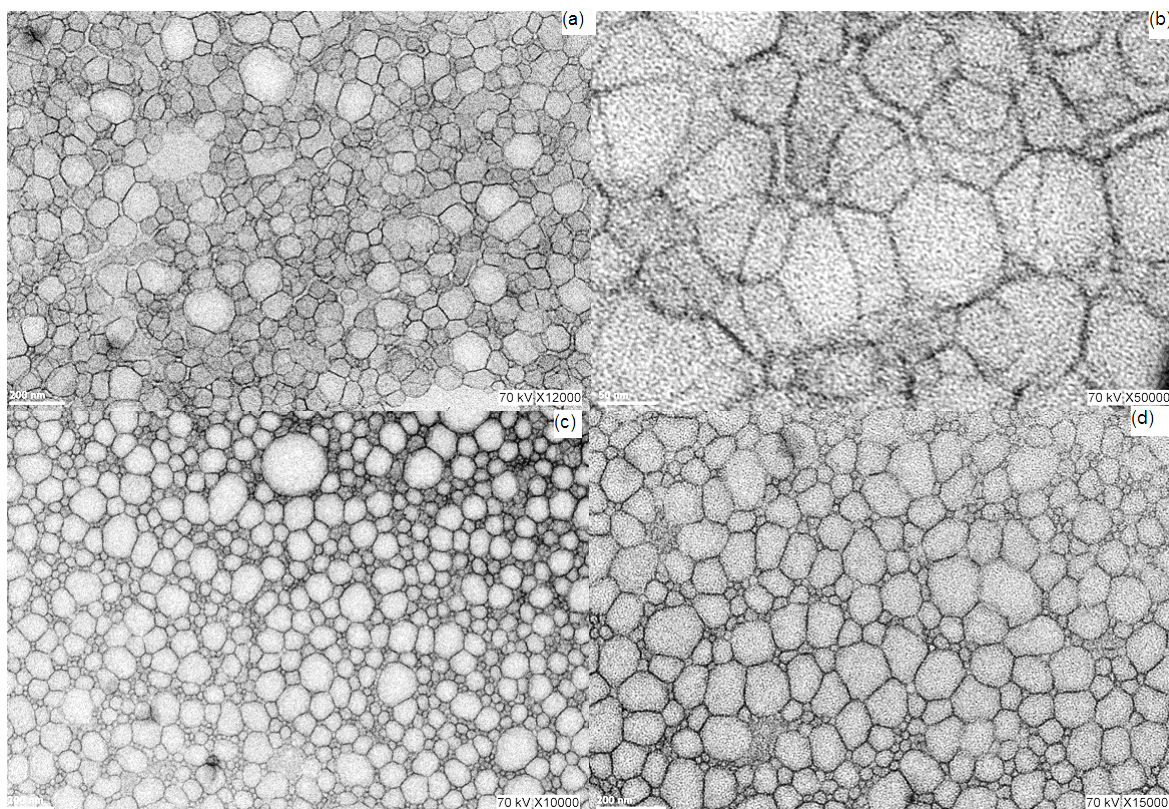


Figura 7.2. Imágenes por MET de las estructuras líquido-cristalinas obtenidas, (a y b) pertenecen a un sistema líquido-cristalino cargado con Ketoconazol a un mes de su preparación observado a 12000 X y 50000 X respectivamente; (c y d). Sistema líquido-cristalino cargado con Ketoconazol a un día de su preparación observado a 10000 X y 15000 X.

### **7.3 Determinación del Tamaño de Partícula y Potencial Z de los Sistemas sin (CLLH) y con Ketoconazol (CLLH-KTZ)**

**Tamaño de partícula.** El análisis de los datos obtenidos mediante el ensayo por dispersión dinámica de luz de los lotes elaborados en este estudio, muestra que los tamaños de partícula promedio de los sistemas líquido-cristalinos en dispersión, con fármaco (CLLH-KTZ) y sin fármaco (CLLH) a diferentes temperaturas, son de  $109.58 \pm 6.90$  nm y  $104.36 \pm 7.80$  nm, respectivamente. Como parte de este estudio se aprecia que el tamaño de partícula en estos sistemas disminuye ligeramente con

el incremento de la temperatura (10 a 50 °C), tal y como se puede observar en la figura 7.3 y en la tabla 7.1.

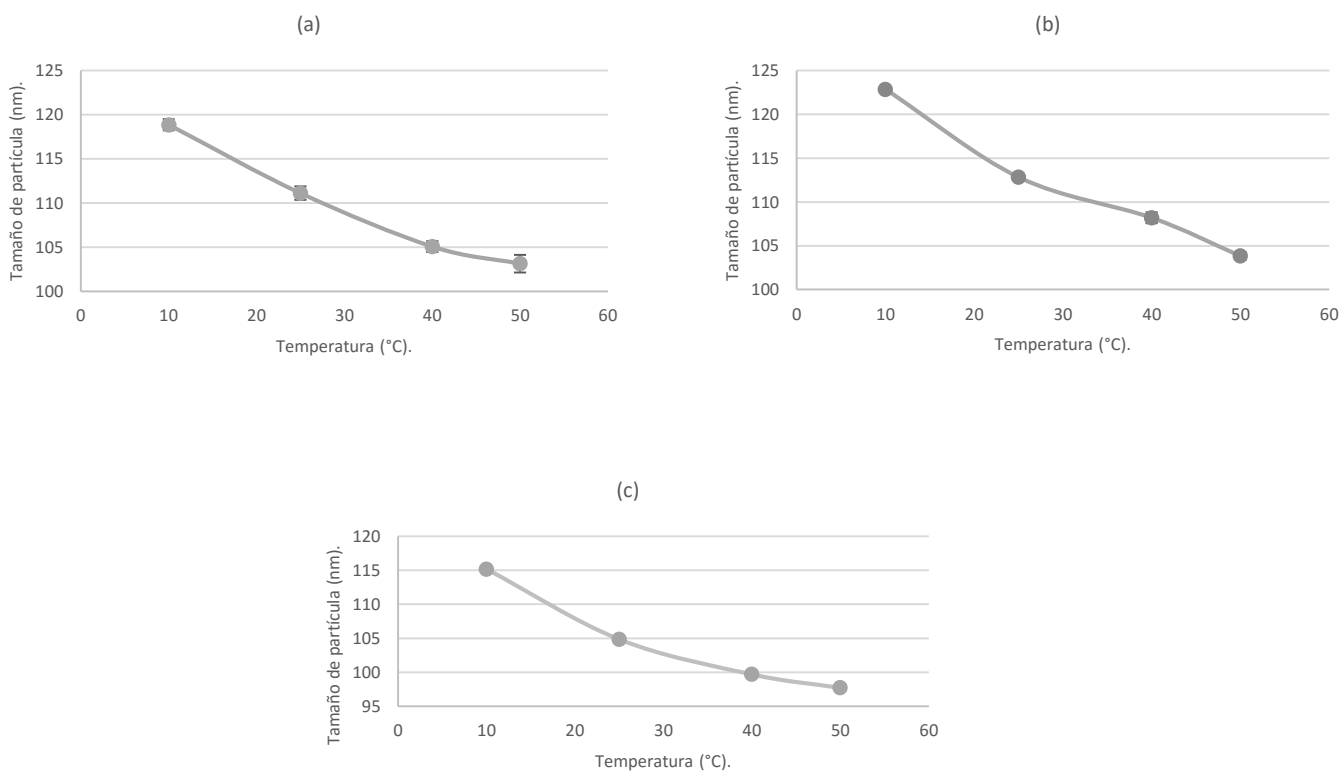


Figura 7.3. Efecto de la temperatura sobre el tamaño de partícula de los sistemas líquido-cristalinos con Ketoconazol (a) sistema CLLH-KTZ-1 y (b) sistema CLLH-KTZ-2 y sin Ketoconazol (c) sistema CLLH.

Esto último puede atribuirse a un efecto de deshidratación con reducción de tamaño del sistema CLLH/CLLH-KTZ o que éste se reestructure de tal manera que se forme una fase más compacta respecto de la estructuración inicial, tal y como se infiere con el esquema planteado en la figura 7.4, lo cual coincidiría con lo observado por otros autores para sistemas y composiciones similares (*Amar-Yuli y cols., 2007*). Otra posible explicación sería que la estructura se separara en agregados con tamaños de partícula ligeramente menores.

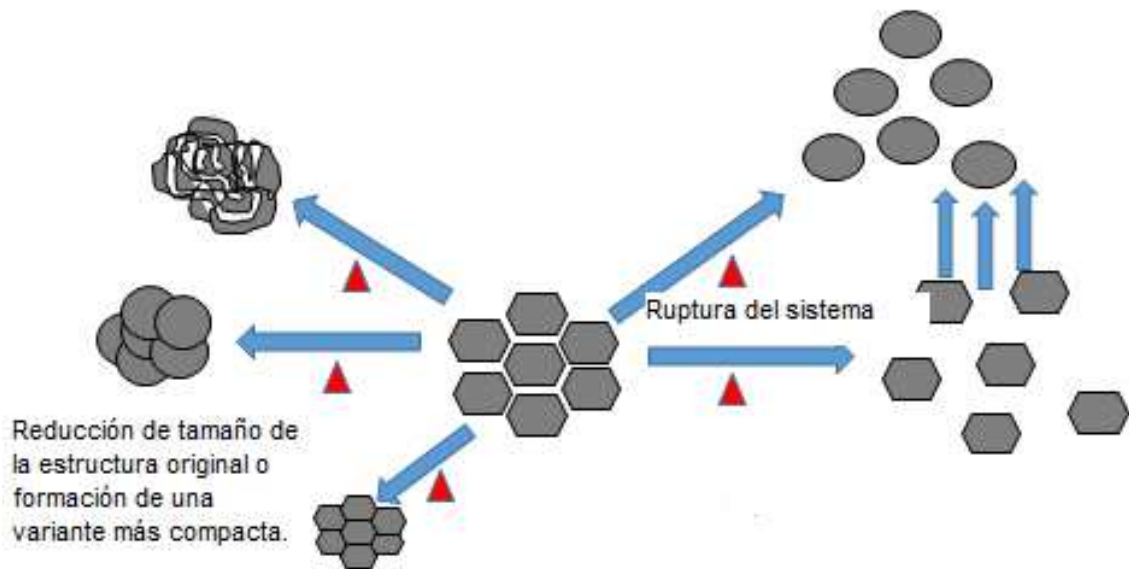


Figura 7.4. Posibles cambios estructurales del sistema líquido-cristalino hexosómico en dispersión (CLLH / CLLH-KTZ), cuando es expuesto a incrementos de temperatura.

Por lo anterior, con relación a los efectos de la temperatura sobre el tamaño de partícula de los sistemas CLLH / CLLH-KTZ obtenidos en este estudio, los resultados muestran que éstos no son afectados de manera importante por este factor, de modo que presentan entonces estabilidad en un intervalo de temperatura entre los 10 y 50° C, que comprendería tanto a posibles condiciones de almacenamiento y/o uso en procesos de producción para ser incluidos en otros sistemas farmacéuticos (cremas, por ejemplo), así como de administración tópica.

De manera adicional, las muestras sometidas a diferentes temperaturas no presentaron algún cambio evidente que demuestre la destrucción del sistema o permita distinguir entre sistemas CLLH y CLLH-KTZ, de modo que cualquier posible modificación en la estructura de esta mesofase no es de una magnitud tal que permita su detección a simple vista por medio del cambio de alguna propiedad macroscópica de los sistemas (color, consistencia, etcétera).

Los resultados de los análisis por CDB que se mostrarán más adelante confirman que tanto los sistemas CLLH como los CLLH-KTZ, presentan un comportamiento

térmico que indica una estabilización de la estructura mesofásica con el incremento de la temperatura. Esto apoyaría la idea de la formación de una estructura más compacta y estable con el aumento de la temperatura. De manera adicional, se observa que el fenómeno de variación del tamaño de partícula es independiente del orden con el cual se realiza el cambio de temperatura, pues en este estudio se hicieron experimentos para los sistemas CLLH y CLLH-KTZ en donde la temperatura fue modificada en orden creciente (10, 25, 40 y 50 °C) y experimentos en donde el cambio de temperatura no siguió un orden (25, 40, 10 y 50 °C), obteniéndose en ambos casos el mismo fenómeno de reducción de tamaño con el incremento de la temperatura. Por lo tanto, parece que la estructura es capaz de aumentar y disminuir ligeramente en tamaño con el cambio en la temperatura sin que exista ruptura o inestabilidad del sistema, pues el efecto observado es reversible.

Finalmente, con todos estos resultados respecto al tamaño de partícula de los sistemas CLLH / CLLH-KTZ obtenidos, se hace factible que estos sistemas funcionarían adecuadamente como vehículos para la aplicación tópica de fármacos, ya que han mostrado estabilidad en un intervalo de temperatura que incluye la temperatura corporal, así como a la relación que se ha descrito entre el tamaño de partícula y la permeación a través de la piel, con la cual el flujo del sistema y/o del fármaco aumenta con la disminución del tamaño de partícula, tal y como observaron *Gomaa y cols.*, en 2014, que compararon el grado de permeación en piel y el tamaño de unas nanopartículas; en su estudio observaron un incremento de cinco veces en la permeación cuando el tamaño de las nanopartículas se redujo de 422.3 nm a 155.2 nm. No obstante, se sabe que el tamaño de partícula no es el único factor determinante de la permeación, por lo que en este sentido es necesario que en todo sistema nanoparticulado con el que se persiga conseguir permeación, se deben determinar otras características del sistema que influyen en dicho proceso.

Tabla 7.1. Tamaño de partícula y potencial Z de los sistemas líquido-cristalinos. Se muestran los valores promedio de las determinaciones hechas a dos sistemas CLLH-KTZ y un sistema CLLH.

| Sistema               | Temperatura (°C) | Potencial Z (mV) | d.e   | Tamaño de partícula (nm) | d.e   |
|-----------------------|------------------|------------------|-------|--------------------------|-------|
| CLLH-KTZ-1<br>pH~5.21 | 10               | +4.210           | 0.600 | 118.860                  | 1.105 |
|                       | 25               | +4.975           | 0.305 | 111.120                  | 1.324 |
|                       | 40               | +4.893           | 0.698 | 105.080                  | 1.073 |
|                       | 50               | +4.545           | 0.604 | 103.147                  | 1.713 |
| CLLH-KTZ-2<br>pH~5.25 | 10               | +3.495           | 0.132 | 122.860                  | 0.296 |
|                       | 25               | +4.625           | 0.329 | 112.833                  | 0.392 |
|                       | 40               | +4.348           | 0.751 | 108.200                  | 1.067 |
|                       | 50               | +4.245           | 0.388 | 103.840                  | 0.803 |
| CLLH<br>pH~4.49       | 10               | -0.702           | 0.243 | 115.160                  | 0.651 |
|                       | 25               | -0.937           | 0.420 | 104.850                  | 0.608 |
|                       | 40               | -1.168           | 0.508 | 99.710                   | 0.156 |
|                       | 50               | -0.300           | 0.617 | 97.730                   | 0.184 |

**Potencial Zeta.** La determinación del potencial Zeta tiene gran significancia debido a la fuerte correlación que existe entre esta característica y las propiedades de los sistemas en dispersión, siendo el potencial Zeta una manifestación de los fenómenos electrostáticos que ocurren en las interfaces y cuyo valor y control juega un papel importante en algunos de estos sistemas como medio de estabilización. Por lo tanto, la determinación del potencial Zeta en sistemas farmacéuticos en dispersión es aplicable para la estimación de la estabilidad física de los mismos. Los resultados obtenidos mediante el análisis del potencial Zeta de las formulaciones líquido-cristalinas se muestran en la tabla 7.1.

Generalmente existe un límite en el valor de potencial Zeta para distinguir entre sistemas estables e inestables, pudiendo ser de  $\pm 30$  mV. Por lo tanto, se acepta que sistemas cuyos valores de potencial Zeta sean más positivos que 30 mV o bien más negativos que -30 mV son estables (*Coulman y cols., 2009*).

Para el caso de los sistemas líquido-cristalinos, los valores de potencial Zeta que han sido determinados, se encuentran por debajo de los aceptados usualmente para describir sistemas estables. Sin embargo, aunque la estabilización electrostática tiene un papel importante en sistemas dispersos conteniendo agentes tensoactivos iónicos, para sistemas que incluyen tensoactivos no iónicos (polímeros), el principal mecanismo de estabilización es la repulsión entre las cadenas de polímero adsorbidas en la superficie, lo cual se conoce como estabilización de tipo estérica (*Chiu y Tian, 2002*) y para tales casos, los valores de potencial Zeta tienen poca significancia para determinar la estabilidad. Así, por el hecho de que los sistemas líquido-cristalinos no incluyan agentes tensoactivos iónicos, es probable que los valores obtenidos de potencial Zeta no sean sinónimo de inestabilidad, siendo entonces importante un mecanismo de estabilización de tipo estérico.

La presencia de carga tanto en los sistemas CLLH como en los CLLH-KTZ obtenidos en este estudio, pudiera explicarse por un lado, con la adsorción de aniones, en específico, de iones hidroxilo del medio acuoso, lo cual ya se ha reportado para liposomas compuestos por fosfolípidos neutros (*Chiu y Tian, 2002*) que adquieren un potencial Z negativo en agua desionizada, tal y como sucede con los sistemas líquido-cristalinos CLLH, y por otro lado, a la factible ionización del Ketoconazol (base débil,  $pK_{a1}= 2.9$  y  $pK_{a2}= 6.5$ ) (*Xu, 2008*), asociada al pH ácido que presenta el sistema tipo CLLH (pH~ 4), donde parcialmente el fármaco se encontraría en estado ionizado con carga positiva (ionización > 90%).

Por otra parte, en este tipo de estudios también es importante evaluar el fundamento y las limitaciones del equipo empleado para determinar el potencial Z. En el caso particular de los ensayos aplicados a los sistemas obtenidos en este estudio, la determinación del potencial Z se hizo a través de la estimación de la movilidad electroforética, cuya determinación con exactitud con el equipo empleado (Malvern, ZS90) puede hacerse con valores de  $0.12 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$ .

Los resultados de los experimentos realizados a los sistemas CLLH muestran valores de movilidad  $<0.12 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$ , lo que indica que no existe una carga importante en los sistemas que no poseen Ketoconazol, lo que tiene como

consecuencia un valor bajo de movilidad y por consiguiente un potencial Z pequeño; en otras palabras, lo más probable es que los sistemas sin fármaco (CLLH) sean en realidad neutros.

Por otra parte, los valores de movilidad electroforética de los sistemas CLLH-KTZ son  $>0.12 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$ , por lo que puede inferirse que aunque pequeña, existe una carga positiva en los sistemas cargados con Ketoconazol. Sin embargo, como ya se había mencionado, es probable que para los sistemas líquido-cristalinos estudiados el mecanismo de estabilización electrostático (potencial Z), no juegue un papel crítico para el mantenimiento de este tipo de sistema, pero es importante tenerlo presente debido a que además de sus implicaciones en la estabilización de sistemas farmacéuticos en dispersión, también se ha reportado (*Chiu y Tian, 2002*) que se pueden lograr mayores capacidades de contenido o carga de fármaco en estos sistemas farmacéuticos por medio de la manipulación de la carga electrostática entre el fármaco y el vehículo, favoreciendo las interacciones de tipo iónico entre ambos y así lograr una mayor dosis de carga de fármaco en el sistema empleado.

Por otro lado, es notorio que a diferencia de lo sucedido con el tamaño de partícula, el efecto del cambio en la temperatura no resulta en una tendencia clara hacia el incremento o disminución en magnitud del potencial Z de los sistemas líquido-cristalinos obtenidos en este estudio. De hecho, en la literatura no existe un acuerdo respecto a la dependencia del potencial Z con la temperatura, pues se ha observado tanto cambios, como independencia en el valor de potencial Z con respecto a la temperatura (*Ramachandran y Somasundaran, 1986; Revil y cols., 1999*). Lo anterior hace difícil predecir algún tipo de reestructuración o cambio de fase que pudieran sufrir los sistemas obtenidos como consecuencia del cambio en el valor de potencial Z, sin embargo, la posible dependencia del potencial Z con la temperatura pudiera deberse a variaciones en los equilibrios químicos, equilibrios de adsorción, así como en el grosor de la doble capa eléctrica (*Kirby y Hasselbrink, 2004*).



#### **7.4 Viscosidad de los sistemas sin (CLLH) y con Ketoconazol (CLLH-KTZ)**

El esquema de análisis al cual fueron sometidos los sistemas líquido-cristalinos y los respectivos resultados se muestran en las tablas 7.2, 7.3 y 7.4, en donde se observan los promedios de tres lecturas de los parámetros viscosidad, esfuerzo cortante y velocidad de corte, hechas a cada velocidad de rotación a diferentes temperaturas. La viscosidad de los sistemas líquido-cristalinos con Ketoconazol (CLLH-KTZ) presentan valores de 1.19, 1.08 y 0.78 cP a 25, 32 y 40 °C para un primer lote (tabla 7.2) y de 1.22, 0.97 y 0.70 cP a 25, 32 y 40 °C para un segundo lote (tabla 7.3). Por otro lado, para un sistema sin Ketoconazol (CLLH), los valores de viscosidad fueron 1.15, 0.91 y 0.66 cP a 25, 32 y 40 °C (tabla 7.4). Por lo tanto, el cambio en la viscosidad de los sistemas con el incremento de la temperatura fue pequeño, menor a 1cP en todos los casos, lo cual indica que tanto los sistemas sin y con fármaco son capaces de conservar gran parte de sus características bajo las condiciones estudiadas.

Tabla 7.2. Determinación de la viscosidad del sistema CLLH-KTZ-1 a diferentes temperaturas y velocidades de corte.

| Velocidad<br>rpm | Temperatura      |  |                              |                  |  |                              |                  |  |                              | Tiempo<br>minutos |
|------------------|------------------|--|------------------------------|------------------|--|------------------------------|------------------|--|------------------------------|-------------------|
|                  | 25 °C            |  |                              | 32 °C            |  |                              | 40 °C            |  |                              |                   |
|                  | Viscosidad<br>cP | Esfuerzo<br>cortante<br>dina/cm <sup>2</sup> | Velocidad<br>de corte<br>1/s | Viscosidad<br>cP | Esfuerzo<br>cortante<br>dina/cm <sup>2</sup> | Velocidad<br>de corte<br>1/s | Viscosidad<br>cP | Esfuerzo<br>cortante<br>dina/cm <sup>2</sup> | Velocidad<br>de corte<br>1/s |                   |
| 40               | 1.19             | 3.57   | 300.00                       | 1.08             | 3.23   | 300.00                       | 0.80             | 2.40   | 300.00                       | 3.00              |
| 50               | 1.19             | 4.48   | 375.00                       | 1.09             | 4.09   | 375.00                       | 0.79             | 2.97   | 375.00                       | 6.00              |
| 55               | 1.20             | 4.94   | 412.50                       | 1.08             | 4.47   | 412.50                       | 0.80             | 3.28   | 412.50                       | 9.00              |
| 60               | 1.20             | 5.42   | 450.00                       | 1.08             | 4.86   | 450.00                       | 0.79             | 3.53   | 450.00                       | 12.00             |
| 65               | 1.20             | 5.85   | 487.50                       | 1.07             | 5.24   | 487.50                       | 0.77             | 3.74   | 487.50                       | 15.00             |
| 70               | 1.20             | 6.32   | 525.00                       | 1.07             | 5.60   | 525.00                       | 0.77             | 4.02   | 525.00                       | 18.00             |
| 65               | 1.19             | 5.81   | 487.50                       | 1.09             | 5.30   | 487.50                       | 0.77             | 3.75   | 487.50                       | 21.00             |
| 60               | 1.19             | 5.37   | 450.00                       | 1.09             | 4.90   | 450.00                       | 0.77             | 3.47   | 450.00                       | 24.00             |
| 55               | 1.19             | 4.92   | 412.50                       | 1.10             | 4.56   | 412.50                       | 0.78             | 3.20   | 412.50                       | 27.00             |
| 50               | 1.19             | 4.47   | 375.00                       | 1.09             | 4.08   | 375.00                       | 0.78             | 2.91   | 375.00                       | 30.00             |
| 40               | 1.18             | 3.55   | 300.00                       | 1.08             | 3.23   | 300.00                       | 0.78             | 2.33   | 300.00                       | 33.00             |
| Promedio         | 1.19             |  |                              | 1.08             |  |                              | 0.78             |  |                              |                   |
| d.e              | 0.01             |  |                              | 0.01             |  |                              | 0.01             |  |                              |                   |
| %CV              | 0.50             |  |                              | 0.95             |  |                              | 1.53             |  |                              |                   |

Tabla 7.3. Determinación de la viscosidad del sistema CLLH-KTZ-2 a diferentes temperaturas y velocidades de corte.

| Velocidad<br>rpm | Temperatura      |  |                              |                  |  |                              |                  |  |                              | Tiempo<br>minutos |
|------------------|------------------|--|------------------------------|------------------|--|------------------------------|------------------|--|------------------------------|-------------------|
|                  | 25 °C            |  |                              | 32 °C            |  |                              | 40 °C            |  |                              |                   |
|                  | Viscosidad<br>cP | Esfuerzo<br>cortante<br>dina/cm <sup>2</sup> | Velocidad<br>de corte<br>1/s | Viscosidad<br>cP | Esfuerzo<br>cortante<br>dina/cm <sup>2</sup> | Velocidad<br>de corte<br>1/s | Viscosidad<br>cP | Esfuerzo<br>cortante<br>dina/cm <sup>2</sup> | Velocidad<br>de corte<br>1/s |                   |
| 40               | 1.23             | 3.69   | 300.00                       | 0.97             | 2.92   | 300.00                       | 0.71             | 2.12   | 300.00                       | 3.00              |
| 50               | 1.22             | 4.57   | 375.00                       | 0.97             | 3.64   | 375.00                       | 0.70             | 2.63   | 375.00                       | 6.00              |
| 55               | 1.22             | 5.04   | 412.50                       | 1.00             | 4.13   | 412.50                       | 0.71             | 2.91   | 412.50                       | 9.00              |
| 60               | 1.22             | 5.49   | 450.00                       | 0.99             | 4.45   | 450.00                       | 0.71             | 3.18   | 450.00                       | 12.00             |
| 65               | 1.22             | 5.96   | 487.50                       | 0.97             | 4.74   | 487.50                       | 0.70             | 3.44   | 487.50                       | 15.00             |
| 70               | 1.23             | 6.47   | 525.00                       | 0.97             | 5.10   | 525.00                       | 0.68             | 3.59   | 525.00                       | 18.00             |
| 65               | 1.23             | 5.98   | 487.50                       | 0.96             | 4.67   | 487.50                       | 0.70             | 3.41   | 487.50                       | 21.00             |
| 60               | 1.23             | 5.52   | 450.00                       | 0.96             | 4.33   | 450.00                       | 0.70             | 3.13   | 450.00                       | 24.00             |
| 55               | 1.23             | 5.07   | 412.50                       | 0.96             | 3.96   | 412.50                       | 0.69             | 2.86   | 412.50                       | 27.00             |
| 50               | 1.22             | 4.57   | 375.00                       | 0.96             | 3.60   | 375.00                       | 0.70             | 2.62   | 375.00                       | 30.00             |
| 40               | 1.21             | 3.63   | 300.00                       | 0.96             | 2.87   | 300.00                       | 0.69             | 2.07   | 300.00                       | 33.00             |
| Promedio         | 1.22             |  |                              | 0.97             |  |                              | 0.70             |  |                              |                   |
| d.e              | 0.01             |  |                              | 0.01             |  |                              | 0.01             |  |                              |                   |
| %CV              | 0.54             |  |                              | 1.43             |  |                              | 1.11             |  |                              |                   |

Tabla 7.4. Determinación de la viscosidad del sistema CLLH a diferentes temperaturas y velocidades de corte.

| Velocidad<br>rpm | Temperatura      |  |                              |                  |  |                              |                  |  |                              | Tiempo<br>minutos |
|------------------|------------------|--|------------------------------|------------------|--|------------------------------|------------------|--|------------------------------|-------------------|
|                  | 25 °C            |  |                              | 32 °C            |  |                              | 40 °C            |  |                              |                   |
|                  | Viscosidad<br>cP | Esfuerzo<br>cortante<br>dina/cm <sup>2</sup> | Velocidad<br>de corte<br>1/s | Viscosidad<br>cP | Esfuerzo<br>cortante<br>dina/cm <sup>2</sup> | Velocidad<br>de corte<br>1/s | Viscosidad<br>cP | Esfuerzo<br>cortante<br>dina/cm <sup>2</sup> | Velocidad<br>de corte<br>1/s |                   |
| 40               | 1.19             | 3.57   | 300.00                       | 0.96             | 2.89   | 300.00                       | 0.69             | 2.07   | 300.00                       | 3.00              |
| 50               | 1.17             | 4.38   | 375.00                       | 0.92             | 3.44   | 375.00                       | 0.67             | 2.53   | 375.00                       | 6.00              |
| 55               | 1.16             | 4.77   | 412.50                       | 0.92             | 3.78   | 412.50                       | 0.67             | 2.77   | 412.50                       | 9.00              |
| 60               | 1.16             | 5.21   | 450.00                       | 0.92             | 4.12   | 450.00                       | 0.66             | 2.98   | 450.00                       | 12.00             |
| 65               | 1.12             | 5.44   | 487.50                       | 0.92             | 4.50   | 487.50                       | 0.66             | 3.23   | 487.50                       | 15.00             |
| 70               | 1.16             | 6.08   | 525.00                       | 0.91             | 4.76   | 525.00                       | 0.66             | 3.44   | 525.00                       | 18.00             |
| 65               | 1.16             | 5.64   | 487.50                       | 0.90             | 4.38   | 487.50                       | 0.67             | 3.25   | 487.50                       | 21.00             |
| 60               | 1.14             | 5.14   | 450.00                       | 0.89             | 4.02   | 450.00                       | 0.67             | 3.00   | 450.00                       | 24.00             |
| 55               | 1.15             | 4.75   | 412.50                       | 0.89             | 3.66   | 412.50                       | 0.65             | 2.70   | 412.50                       | 27.00             |
| 50               | 1.14             | 4.27   | 375.00                       | 0.89             | 3.33   | 375.00                       | 0.66             | 2.46   | 375.00                       | 30.00             |
| 40               | 1.15             | 3.44   | 300.00                       | 0.92             | 2.75   | 300.00                       | 0.64             | 1.92   | 300.00                       | 33.00             |
| Promedio         | 1.15             |  |                              | 0.91             |  |                              | 0.66             |  |                              |                   |
| d.e              | 0.02             |  |                              | 0.02             |  |                              | 0.01             |  |                              |                   |
| %CV              | 1.59             |  |                              | 2.38             |  |                              | 1.92             |  |                              |                   |

Los reogramas que se muestran en las figuras 7.5a, 7.6a y 7.7a muestran que el cambio de las variables: esfuerzo cortante y velocidad de corte mantiene una relación directa entre ellas, lo que tiene como consecuencia la generación de un gráfico cuya pendiente permanece constante durante todo el experimento. Lo anterior indica que la viscosidad de los sistemas líquido-cristalinos obtenidos (CLLH

y CLLH-KTZ) no sufre cambios, por lo que ambos se comportan como fluidos Newtonianos.

Por otro lado, en los sistemas en dispersión, el tiempo es un factor que también debe evaluarse con respecto a los posibles cambios en la estructura, debido a que ciertos sistemas cuando son expuestos a velocidades de corte constantes durante algún tiempo, sufren una ruptura de la estructura de forma gradual, siendo necesario únicamente un tiempo para que el sistema regrese a su estado estable (tixotropía). Sin embargo, también puede observarse el efecto opuesto (reopexia), en el cual se formen agregados de partículas con el tiempo, teniendo como consecuencia el aumento en la viscosidad del sistema (*Mastropietro y cols., 2013*).

Para estudiar la posible presencia de fenómenos tiempo-dependientes con los sistemas líquido-cristalinos obtenidos, una vez que el ensayo de viscosidad se encontraba en la velocidad de rotación más elevada (70 rpm), se procedió a disminuirla a un valor de 40 rpm, regresando exactamente por el mismo camino con el fin de observar si el sistema se recobraba rápidamente, lo que daría como consecuencia gráficos de ascenso y descenso sobrepuestos, o bien un gráfico en donde el ascenso y descenso no se empalmaran, mostrando la existencia de fenómenos como tixotropía o reopexia.

Las figuras 7.5a, 7.6a y 7.7a muestran que con los sistemas líquido-cristalinos obtenidos (CLLH-KTZ, lotes 1 y 2, así como CLLH, respectivamente) conforme la velocidad de corte incrementa hasta 70 rpm y posteriormente disminuye a 40 rpm, las curvas de ascenso y descenso coinciden (no se observa asa de histéresis), lo que reafirma la existencia de un comportamiento Newtoniano o bien que los posibles cambios en la viscosidad de los sistemas son muy sutiles debido a la ausencia o mínima destrucción o cambio de fase de la estructura líquido-cristalina; de modo que de existir dicha destrucción o cambio en la estructura, aun así el sistema muestra una alta capacidad para recuperar rápidamente la estructuración original y por consiguiente, no se aprecian fenómenos tiempo-dependientes.

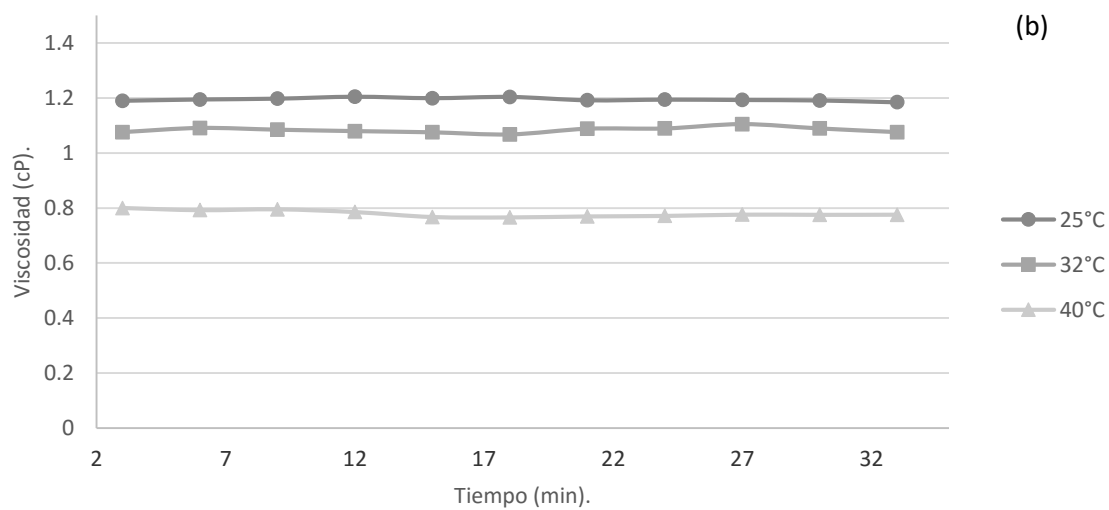
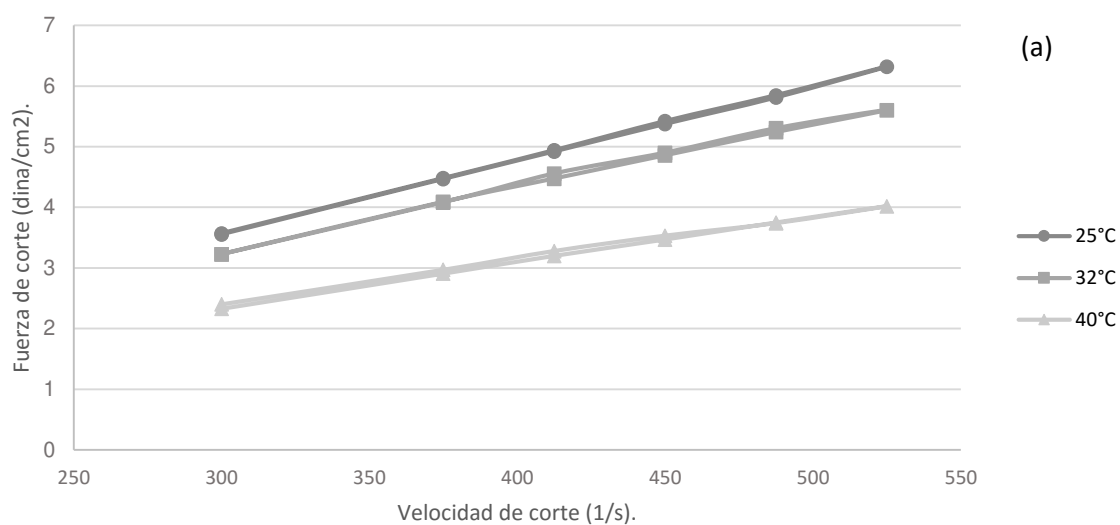


Figura 7.5. Comportamiento reológico del sistema CLLH-KTZ-1. Se muestra en (a), el tipo de flujo que muestra el sistema líquido-cristalino a diferentes temperaturas y en (b) la viscosidad del sistema a cada temperatura con respecto al tiempo.

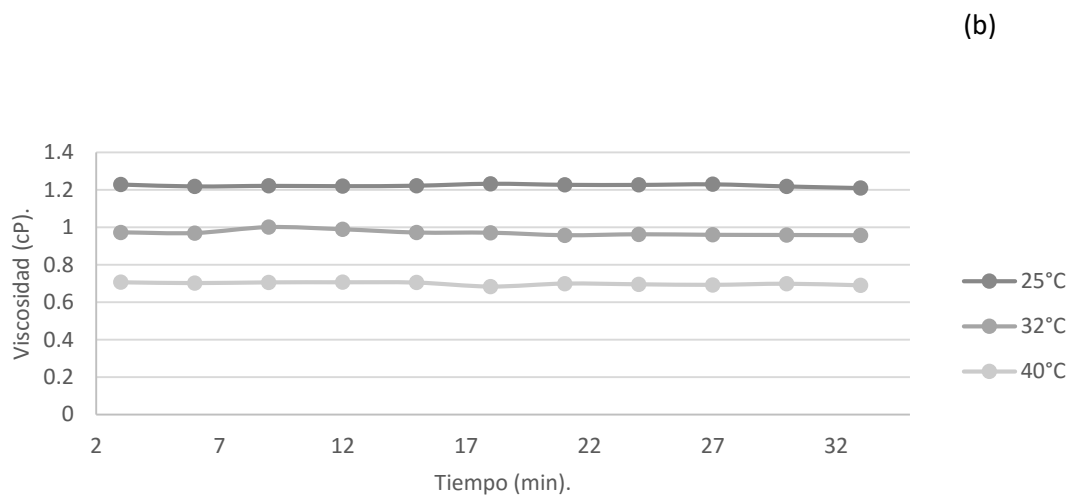
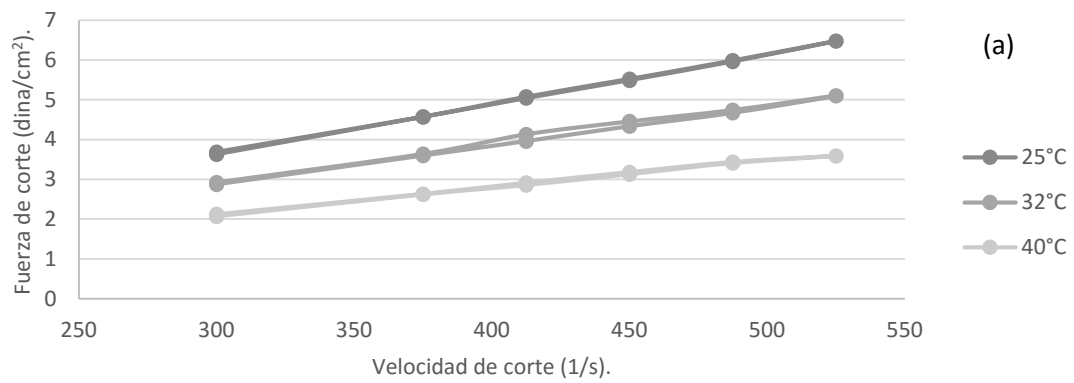


Figura 7.6. Comportamiento reológico del sistema CLLH-KTZ-2. Se muestra en (a), el tipo de flujo que muestra el sistema líquido-cristalino a diferentes temperaturas y en (b) la viscosidad del sistema a cada temperatura con respecto al tiempo.

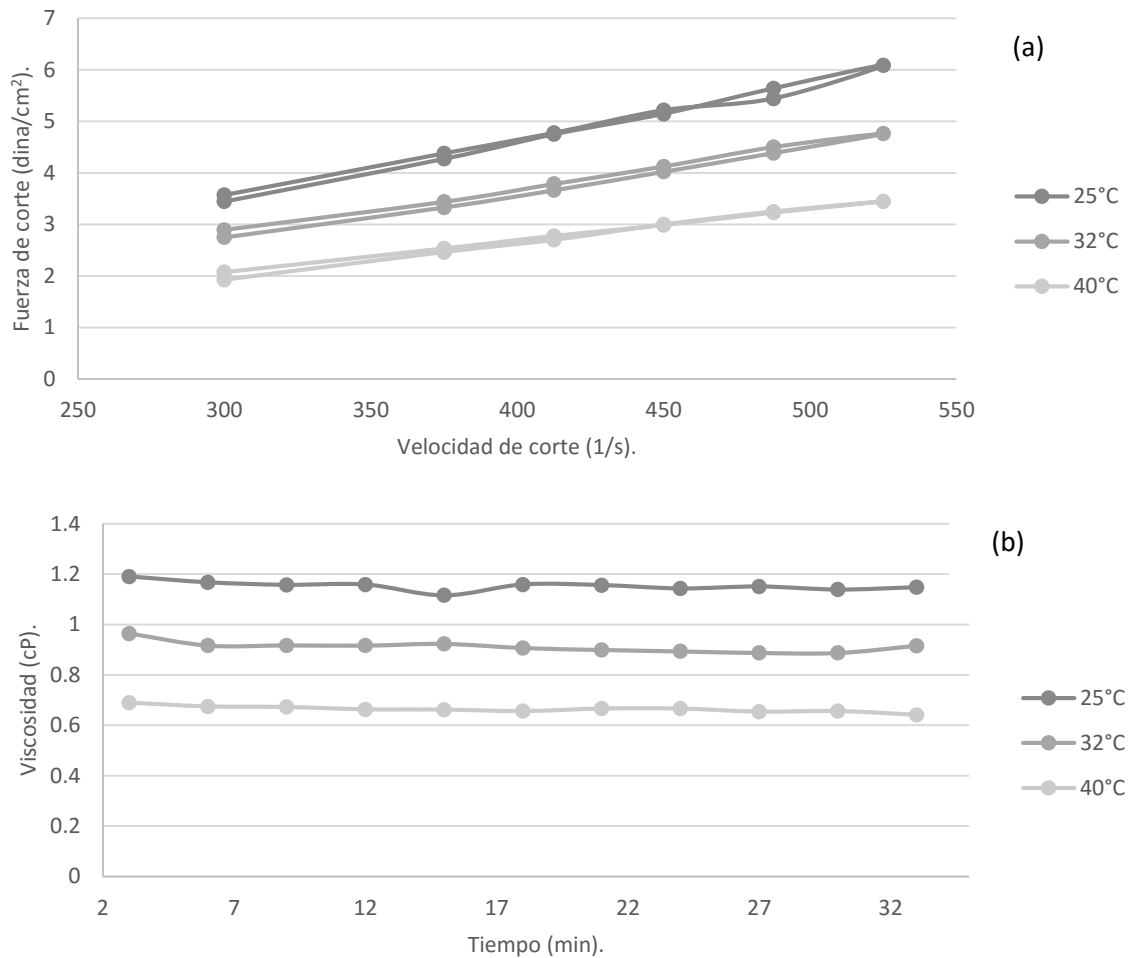


Figura 7.7. Comportamiento reológico del sistema CLLH. Se muestra en (a), el tipo de flujo que muestra el sistema líquido-cristalino a diferentes temperaturas, en (b) la viscosidad del sistema a cada temperatura con respecto al tiempo.

De manera adicional, en las figuras 7.5b, 7.6b, y 7.7b (sistemas CLLH-KTZ, lotes 1 y 2, así como CLLH, respectivamente), se muestra que la viscosidad de los sistemas se mantiene prácticamente constante con respecto al tiempo, lo cual apoya la hipótesis de que los cristales líquidos hexosómicos en dispersión (hexosomas) obtenidos en este estudio, mantienen un comportamiento semejante a un fluido Newtoniano con aparente ausencia de fenómenos dependientes del tiempo. De tal forma, los resultados obtenidos durante estos experimentos contrastan con lo publicado para los sistemas tipo líquido-cristalinos hexosómicos, los cuales suelen



caracterizarse por no fluir bajo acción de la gravedad, siendo necesaria la aplicación de un esfuerzo cortante lo suficientemente grande para fluir plásticamente (*Pasquali y cols., 2006; Patel y Patel, 2010*). Es así que los resultados reológicos realizados a los sistemas CLLH y CLLH-KTZ coinciden con lo notificado para estructuras líquido-cristalinas en dispersiones acuosas (cubosomas o hexosomas) que contienen un bajo contenido de fase interna, las cuales exhiben propiedades de flujo viscoso ideal o flujo Newtoniano (*Müller-Goyman, 2004; Patel y Patel, 2010*).

Por lo anterior, y en concordancia con los resultados de MET, podemos deducir que los sistemas líquido-cristalinos elaborados (CLLH y CLLH-KTZ) pertenecen a sistemas de dispersiones de cristales líquidos, los cuales también han sido empleados para la liberación de fármacos por vía tópica; en donde, comparado con las fases líquido-cristalinas cúbicas y hexagonales (que son viscosas), las dispersiones muestran algunas ventajas únicas (*Guo y cols., 2010*): 1) La buena fluidez y gran área superficial de las dispersiones proporcionarán un contacto más íntimo con la piel, 2) las dispersiones por su composición y consistencia no causan irritación después de la aplicación tópica y 3) puede ser integrada en otras formulaciones; esto último pudo ser demostrado también con el sistema CLLH-KTZ, como una derivación complementaria a este estudio, en ensayos de formulación en crema (*Quirino-Barreda y cols., 2015; Romero-Ochoa, 2015*).

No obstante lo anterior, cabe señalar que al igual que para las características de tamaño de partícula y potencial Z, la viscosidad de los sistemas farmacéuticos en dispersión, es una propiedad que por sí sola no debe emplearse para predecir la eficacia en términos de permeación y retención en la piel, pues se ha reportado que el flujo de sustancias a través de la piel disminuye con la viscosidad de la formulación cuando se coloca una capa gruesa de ésta (dosis infinita), mientras que el flujo incrementa cuando la viscosidad es elevada y se coloca una capa delgada de la formulación (dosis finita). Por otro lado, la retención en la epidermis también disminuye con la viscosidad cuando se colocan capas gruesas de formulación, y en contraste la retención en la epidermis para dosis finitas parece ser independiente de la viscosidad de la formulación empleada (*Cross y cols., 2001*).

No obstante, lo antes mencionado, los sistemas líquido-cristalinos en dispersión elaborados en este estudio, además de poseer baja viscosidad, lo cual puede ser ventajoso en términos de difusión del fármaco a través de la formulación, tienen la capacidad de conservar sus propiedades de flujo (que se ha asociado, como se verá con las pruebas de calorimetría, a la preservación de su estructura) bajo diferentes velocidades de corte e intervalos de temperatura que incluyen a la temperatura corporal, siendo entonces estables no sólo a los cambios de temperatura sino también a condiciones de estrés mecánico, lo cual se ha reportado puede provocar cambios en las estructuras líquido-cristalinas (*Zhang y Liu, 2013*).

### **7.5 Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)**

Los análisis por CDB se iniciaron con ensayos de reversibilidad de los sistemas CLLH y CLLH-KTZ con calentamiento desde 10 °C hasta 110 °C a una velocidad de 1°C/min (primer barrido), posterior enfriamiento y una segunda etapa de calentamiento (segundo barrido). Los resultados se muestran en las figuras 7.8 y 7.9 para sistemas sin Ketoconazol (CLLH) y con Ketoconazol (CLLH-KTZ) respectivamente.

Los termogramas obtenidos para los sistemas CLLH y CLLH-KTZ durante el primer barrido (línea sólida de las figuras 7.8 y 7.9), son semejantes; siendo la transición que se observa alrededor de los 100 °C la que permite diferenciar entre los sistemas que contienen al fármaco de aquellos que no lo poseen (transiciones diferentes). Lo anterior probablemente se deba a una interacción entre el principio activo y los componentes de la formulación. De manera adicional, puede observarse que durante los segundos barridos (líneas punteadas de las figuras 7.8 y 7.9), las curvas de comportamiento térmico obtenidas difieren con respecto a los primeros termogramas (líneas sólidas); por lo que, durante el segundo barrido es posible distinguir fácilmente entre sistemas sin o con fármaco (diferentes trazos con líneas punteadas entre sistemas CLLH y CLLH-KTZ).

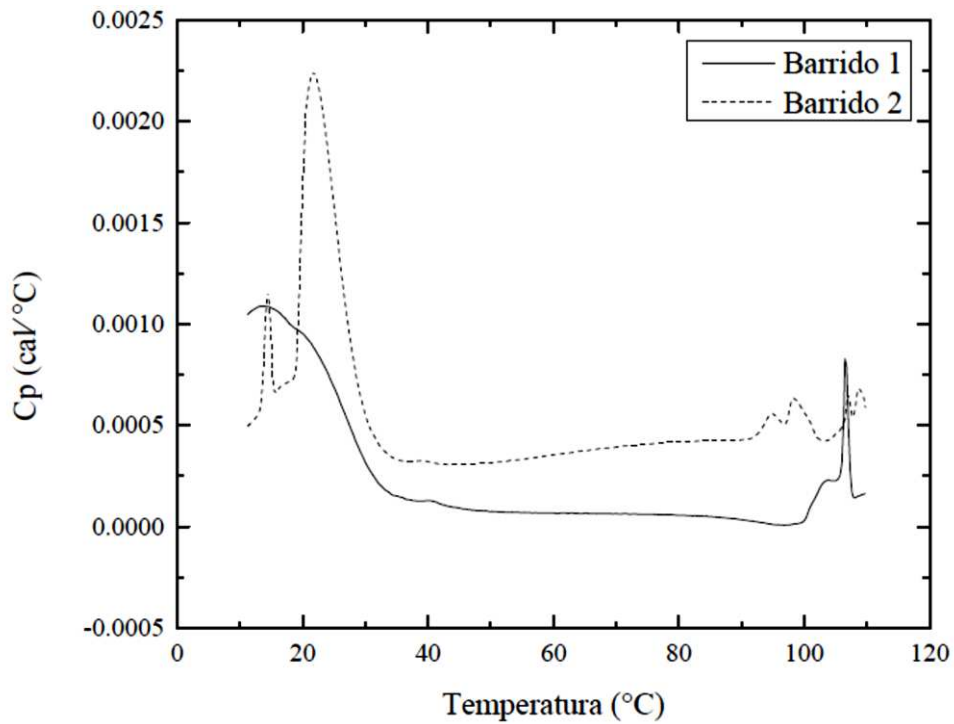


Figura 7.8. Termogramas del sistema CLLH en esquema de calentamiento de 10 °C hasta 110 °C a velocidad de 1 °C/min. La línea sólida corresponde al primer barrido y la línea punteada al segundo barrido.

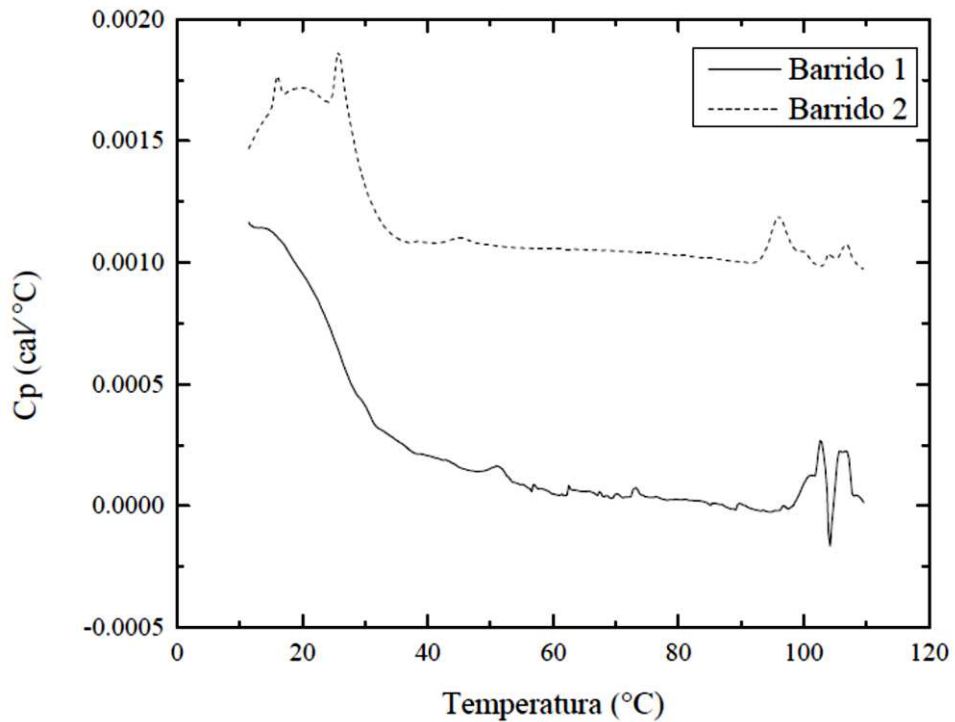


Figura 7.9. Termogramas del sistema CLLH-KTZ en esquema de calentamiento de 10 °C hasta 110 °C a velocidad de 1 °C/min. La línea sólida corresponde al primer barrido y la línea punteada al segundo barrido.

Los resultados sugieren que bajo estas condiciones, en las que se llevó a la muestra hasta 110 °C, es factible que los sistemas líquido-cristalinos en dispersión (CLLH y CLLH-KTZ) pudieran sufrir cambios conformacionales o de fase que se expresan como variaciones en los valores de Cp con respecto a la temperatura; de manera adicional, se observa que bajo las condiciones empleadas los cambios estructurales son de una magnitud tal que no permiten la reestructuración de los sistemas a su estado inicial, lo cual explica el hecho de que durante el segundo barrido el comportamiento térmico mostrado sea diferente al primero independientemente del contenido o ausencia de fármaco.

Con la intención de describir el comportamiento de estos sistemas CLLH y CLLH-KTZ bajo condiciones más probables de uso y almacenamiento, se decidió modificar el esquema de análisis reduciendo el intervalo de temperaturas a las que serían sometidos los sistemas líquido-cristalinos; se realizó así otro ensayo con ambas muestras, partiendo entonces desde 10 °C hasta 50 °C. Los resultados se muestran en las figuras 7.10 y 7.11, que corresponden a los sistemas CLLH y CLLH-KTZ respectivamente.

Como puede observarse, a diferencia de los resultados obtenidos con el primer esquema (10 - 110 °C, mostrados en las figuras 7.8 y 7.9), durante los ensayos realizados estableciendo la temperatura máxima en 50 °C, ambos barridos muestran un comportamiento térmico muy similar. Lo anterior demuestra que bajo las condiciones empleadas durante estos experimentos de menor temperatura, en ambos casos el sistema líquido-cristalino en dispersión es capaz de reestructurarse a su estado inicial, demostrando así estabilidad (reversibilidad) en un intervalo de temperatura comprendido entre los 10 y los 50 °C.

Lo anterior puede deberse al hecho de que al reducir la temperatura máxima a 50 °C se ha evitado la transición de fase (no descomposición), observada alrededor de los 100 °C, la cual podía apreciarse en los experimentos realizados con el primer esquema y probablemente, dicha transición haya sido la responsable de que los sistemas no pudieran reestructurarse nuevamente a su estado inicial. Esto último también se asocia al hecho de que a temperaturas cercanas a los 100 °C, la

estructura es capaz de presentar un proceso de deshidratación por la ebullición del agua de los sistemas, haciendo necesario el reacomodo estructural, el cual no pudo revertirse al enfriar la muestra, situación que de manera similar fue observada en otros estudios (Amar-Yuli, 2007).

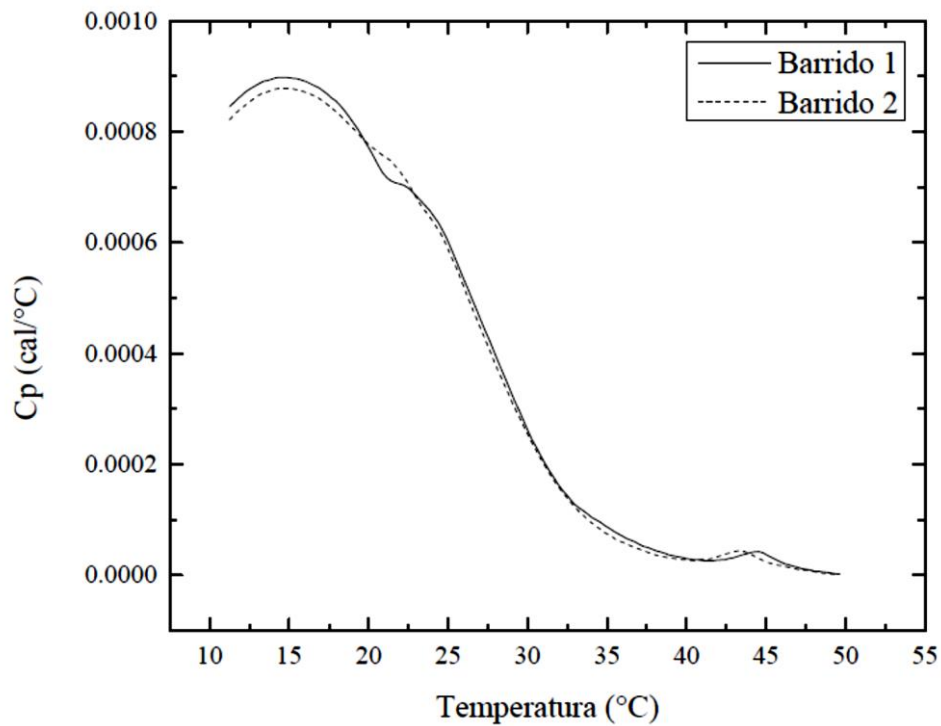


Figura 7.10. Termogramas del sistema CLLH en esquema de calentamiento de 10 °C hasta 50 °C a velocidad de 1 °C/min. La línea sólida corresponde al primer barrido y la línea punteada al segundo barrido.

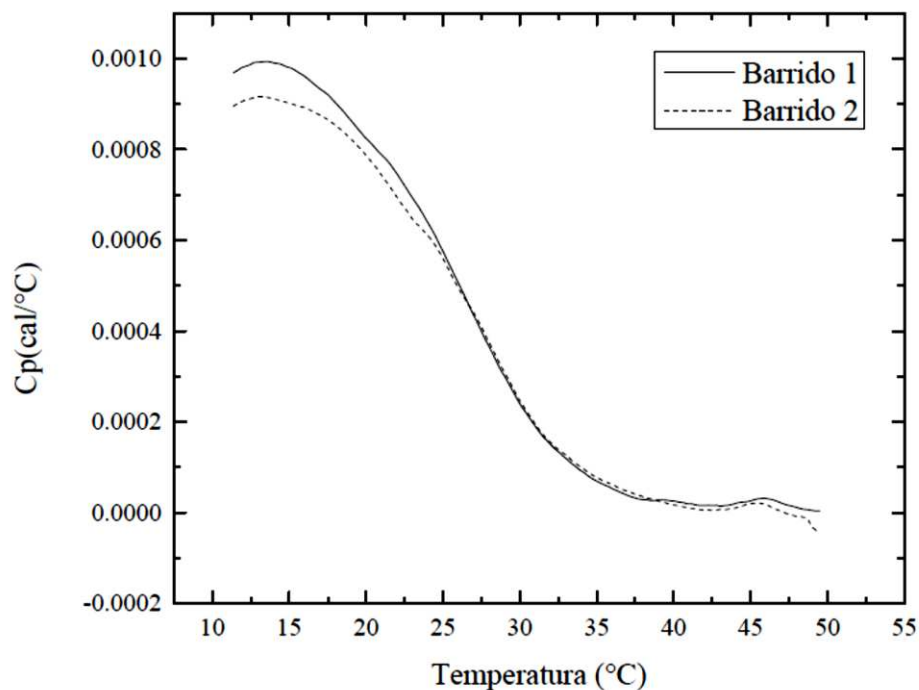


Figura 7.11. Termogramas del sistema CLLH-KTZ en esquema de calentamiento de 10 °C hasta 50 °C a velocidad de 1 °C/min. La línea sólida corresponde al primer barrido y la línea punteada al segundo barrido.

De manera adicional, se realizaron pruebas de estabilidad del sistema líquido-cristalino cargado con Ketoconazol (CLLH-KTZ) por medio del seguimiento de su comportamiento térmico con el tiempo (figura 7.12). Los resultados muestran que el sistema líquido-cristalino en dispersión conserva su comportamiento térmico y propiedades de reversibilidad durante un periodo superior a los 6 meses (199 días aproximadamente). En el anexo se muestran los termogramas del sistema cargado con Ketoconazol a diferentes periodos de tiempo (Figuras A.4, A.5 y A.6) y de un sistema sin Ketoconazol a 7 meses de su fecha de preparación (figura A. 7).

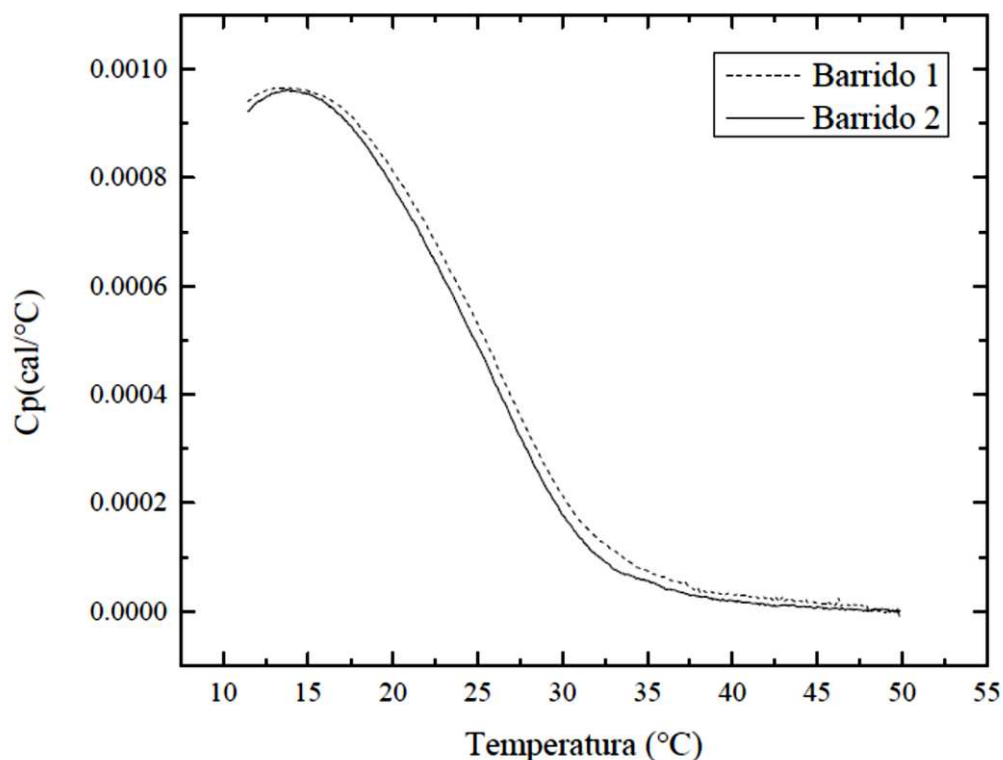


Figura 7.12. Estabilidad térmica del sistema líquido-cristalino cargado con Ketoconazol (CLLH-KTZ) después de un periodo superior a 6 meses (199 días).

Adicional a la prueba de estabilidad de los sistemas con el tiempo, se hicieron pruebas a diferentes velocidades de calentamiento para determinar si el comportamiento térmico de los sistemas dependía únicamente de la temperatura o bien, de la velocidad con la cual se alcanza dicha temperatura. Lo anterior resulta ser una prueba complementaria para determinar la estabilidad de los sistemas, pues los análisis a una sola velocidad sólo muestran que el sistema líquido-cristalino en dispersión vuelve al estado inicial después del enfriamiento, pero es posible que el sistema no esté en equilibrio si se encuentra controlado cinéticamente por la velocidad de barrido utilizada (*Beldarraín, 2001*).

Como se puede apreciar en la figura 7.13, la forma de la curva de comportamiento térmico se mantiene cuando el sistema CLLH-KTZ es sometido al incremento de la temperatura a velocidades de 1.6, 1.3, 1 y 0.6 °C/min, demostrando que el sistema es estable, logrando recuperar su estructura inicial en un intervalo de temperatura de 10 °C hasta 50 °C, incluso con el incremento o disminución de la velocidad de

calentamiento; lo cual indica que se rige por un fenómeno termodinámico y no cinético.

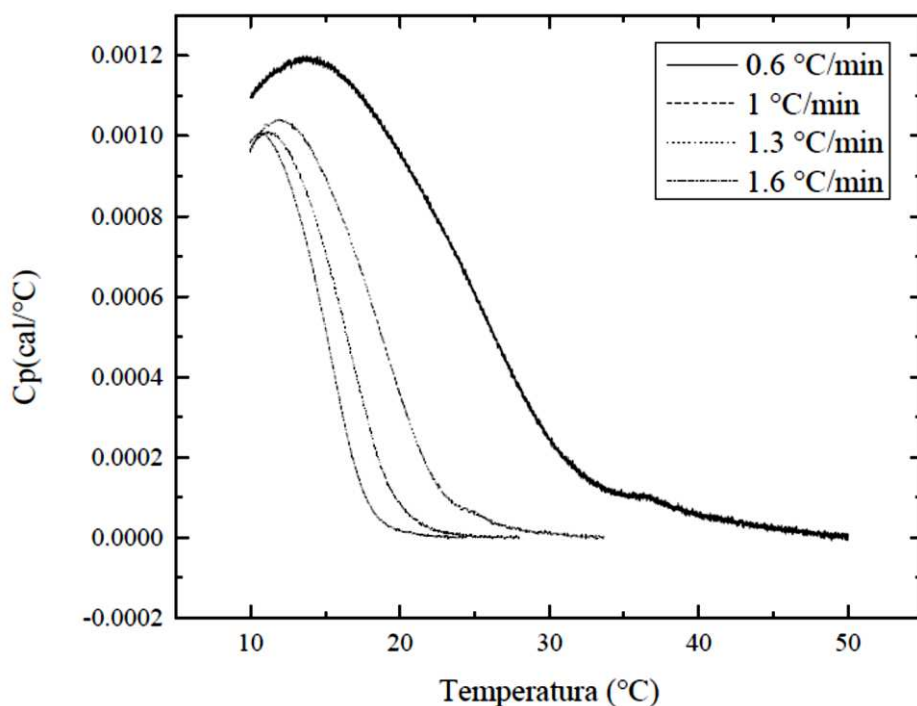


Figura 7.13. Prueba de estabilidad de los sistemas líquido-cristalinos hexosómicos en dispersión cargados con Ketoconazol (CLLH-KTZ), a diferentes velocidades de calentamiento. Se observa que la forma de la curva se mantiene aun cuando varía la velocidad de calentamiento, indicando que el sistema es estable.

En los análisis por CDB, la temperatura de transición de una fase a otra se detecta por la absorción o liberación de calor que se produce en esa transición, lo que permite determinar el intervalo de temperaturas en el que se presenta cierta fase con exactitud, sin embargo, para identificar ésta es necesario recurrir a otras técnicas como la difracción de rayos X o la microscopía de luz polarizada con platina calentable (*Pasquali y cols., 2006*).

Por lo anterior, en este estudio sólo ha sido posible hacer estimaciones con respecto al posible cambio estructural de los sistemas líquido-cristalinos hexosómicos en dispersión obtenidos, utilizando para esto la evidencia de cambio en las propiedades físico-químicas que el sistema pudiera presentar con la temperatura. En el caso



particular de los estudios por CDB, se puede observar que con el incremento de la temperatura los sistemas líquido-cristalinos (CLLH y CLLH-KTZ) parecen estabilizarse, es decir, el valor de  $C_p$  tiende a ser constante, mostrando un intervalo de máxima estabilidad a partir de los  $\sim 30$  °C y hasta los 50 °C (figuras 7.10 - 7.13). Por lo tanto, es probable que la estructura de estos sistemas cambie a una fase con un arreglo más ordenado y estable. De manera adicional, en el anexo se muestran termogramas de sistemas CLLH (figura A.8) y CLLH-KTZ (figura A.9) que fueron sometidos a temperaturas de hasta 80 °C, los cuales conservan sus propiedades de reversibilidad y estabilidad entre 30 y 80 °C.

Lo anterior implica que a temperaturas entre las que se encuentra la temperatura corporal, el sistema líquido-cristalino hexosómico en dispersión (hexosoma), se encuentra en un estado de máxima estabilidad. De manera adicional, se obtiene información importante con respecto a las condiciones de proceso que deberían mantenerse en términos de temperatura, para poder incorporar (de ser necesario) el sistema líquido-cristalino en otro tipo de forma farmacéutica que permita facilitar y mejorar la administración y eficacia terapéutica del fármaco. Por último, permite establecer algunas condiciones de almacenamiento bajo las cuales puede mantenerse la estructura líquido-cristalina, aunque para ser más precisos al respecto habrá que hacerse estudios de estabilidad más rigurosos en los que se verifique la estabilidad y reversibilidad de los sistemas después de haber sido sometidos a diferentes temperaturas por periodos prolongados, por mencionar una opción.

## **7.6 Desarrollo de Métodos Analíticos para la Cuantificación de Ketoconazol**

Durante la construcción de las curvas de calibración no se encontraron interferencias bajo las condiciones de estudio, por parte de los componentes del sistema líquido-cristalino, con y sin Ketoconazol, por lo que el método resultó ser selectivo. En la figura 7.14, se muestran las curvas obtenidas que se utilizaron para: (a) la cuantificación del principio activo en las formulaciones líquido-cristalinas (%CV

= 1.92); (b) la cuantificación del principio activo en los experimentos con membranas artificiales (%CV = 2.39); (c) para los estudios de permeación en piel (%CV = 2.57) y (d) retención en piel (%CV = 2.52).

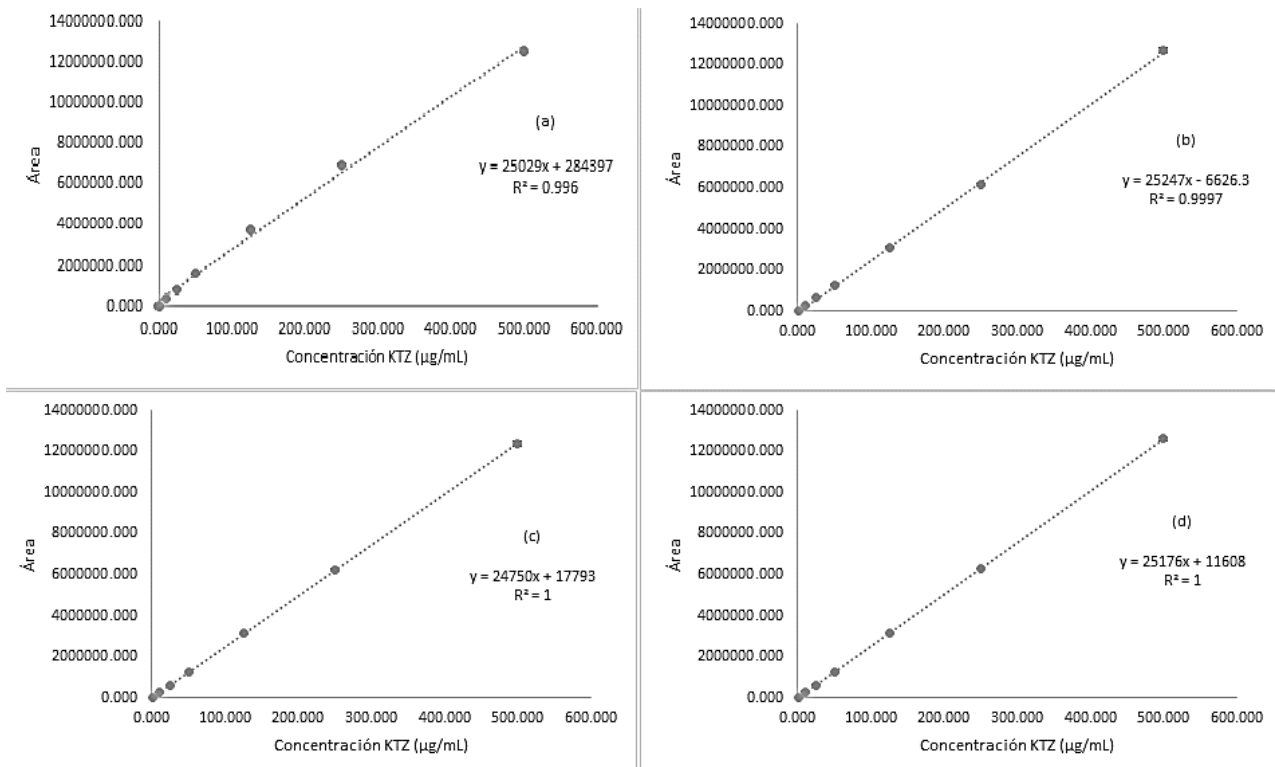


Figura 7.14. Curvas de calibración para la cuantificación de Ketoconazol, (a) valoración de contenido en los sistemas líquido-cristalinos, (b) estudios de liberación y permeación en membranas artificiales, (c) estudios de permeación en piel y (d) determinación de Ketoconazol retenido en piel.

## **7.7 Estudio de las Cinéticas de Liberación y Permeación *in vitro* del Sistema CLLH-KTZ**

### **7.7.1 Cinética de liberación de Ketoconazol desde el sistema CLLH-KTZ**

Fueron empleados 3 lotes de formulaciones líquido-cristalinas cargadas con Ketoconazol (CLLH-KTZ), de los cuales se obtuvieron dos cinéticas de liberación por cada formulación. Las 6 curvas obtenidas fueron analizadas aplicando a los resultados experimentales los modelos de Weibull, Hixson-Crowell, Higuchi, primer orden, orden cero y Korsmeyer-Peppas; esto se hizo por medio del complemento DDSolver para Microsoft® Excel. Seleccionando el modelo con el valor más alto de coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{\text{ajustado}}$ ) y el valor más bajo del Criterio de Información de Akaike (AIC) (Zhang y cols., 2010).

Los resultados se presentan en la figura 7.15, en donde se muestra la curva obtenida del promedio de los 6 experimentos, habiéndose conseguido la liberación del  $85.98 \pm 3.77$  % del Ketoconazol contenido en los sistemas líquido-cristalinos en un periodo de 24 horas.

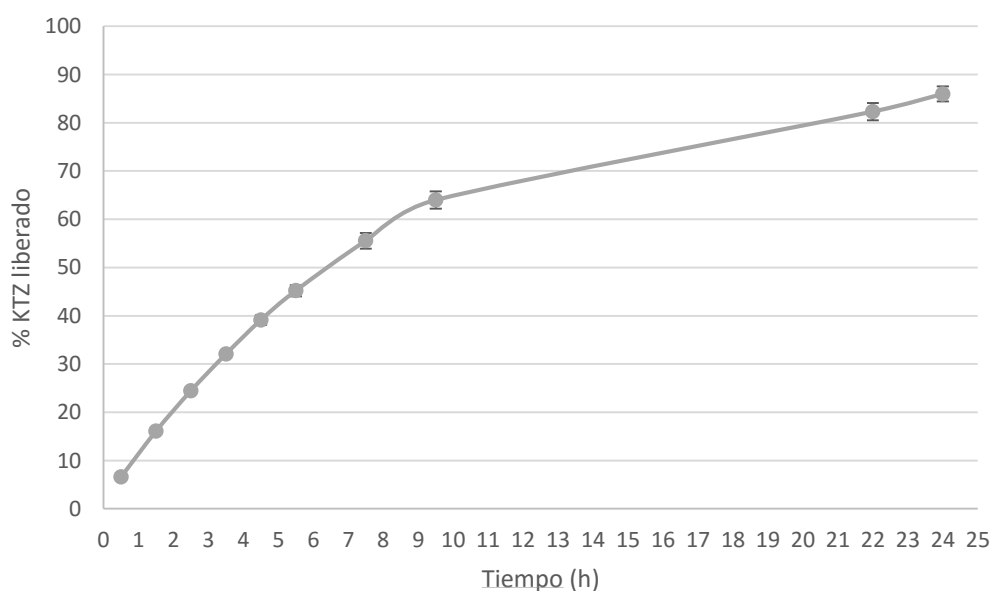


Figura 7.15. Cinética de liberación de KTZ a partir del sistema líquido-cristalino (CLLH-KTZ) empleando membranas para diálisis de 1 KDa de tamaño de poro.

El análisis de ajuste de los resultados a los diferentes modelos matemáticos se muestra en la tabla 7.5, en donde se puede apreciar que los datos experimentales tienen un mejor ajuste a los modelos de primer orden ( $R^2_{ajustado} = 0.98$  y  $AIC = 48.07$ ) y al modelo de Weibull ( $R^2_{ajustado} = 0.99$  y  $AIC = 39.16$ ). Sin embargo, el modelo de Weibull es una ecuación empírica que ha sido adaptada para procesos de liberación/disolución, y aunque la ecuación puede aplicarse exitosamente a casi todos los tipos de curvas de disolución y es comúnmente utilizada para esta clase de estudios, al tratarse de un modelo empírico, el cual no ha sido deducido a partir a algún fundamento cinético, presenta algunas deficiencias y ha estado sujeto a críticas, tales como: 1) No existe un fundamento cinético y únicamente describirá, pero no caracterizará adecuadamente las propiedades cinéticas de disolución de un fármaco, 2) No existe ni un solo parámetro relacionado con la velocidad de disolución intrínseca del fármaco y 3) Es de uso limitado para el establecimiento de correlaciones *in vivo/in vitro* (Costa y Sousa, 2001; Dash y cols., 2010).

Tabla 7.5. Análisis de ajuste a modelos matemáticos de la cinética de liberación del KTZ a partir del sistema líquido-cristalino en membranas para diálisis.

| <b>Modelos matemáticos</b>         |                |                       |                         |                              |                            |                |
|------------------------------------|----------------|-----------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------|
| <b>Parámetro</b>                   | <b>Higuchi</b> | <b>Orden<br/>cero</b> | <b>Primer<br/>orden</b> | <b>Korsmeyer-<br/>Peppas</b> | <b>Hixson-<br/>Crowell</b> | <b>Weibull</b> |
| <b><math>R^2_{ajustado}</math></b> | 0.96           | 0.54                  | 0.98                    | 0.96                         | 0.94                       | 0.99           |
| <b>AIC</b>                         | 56.27          | 81.94                 | 48.07                   | 58.09                        | 61.30                      | 39.16          |

$R^2_{ajustado}$  = Coeficiente de determinación ajustado.

AIC = Criterio de información de Akaike.

Por lo anterior, aunque los datos presentan el mejor ajuste al modelo de Weibull, debido a las limitaciones que presenta, pudiera ser conveniente utilizar el modelo de primer orden para caracterizar el fenómeno de liberación. Por lo tanto, la liberación del Ketoconazol desde el sistema líquido-cristalino (CLLH-KTZ), es

proporcional a la cantidad de fármaco que permanece en el interior del sistema de acuerdo con la ecuación 5:

$$F = 100 * (1 - Exp^{-k1*t}) \dots\dots\dots (5)$$

Donde **F**, es la cantidad de fármaco liberada; **-k1** (- 0.110 h<sup>-1</sup>), es la constante de velocidad de primer orden y **t** el tiempo, de modo que la cantidad de fármaco liberado disminuye con el tiempo.

Con relación a lo anterior y para tener un punto de comparación, se puede mencionar que en un estudio de la liberación *in vitro* (con membranas de diálisis) de Ketoconazol formulado en niosomas (Shirsand y cols., 2012), se observó que el activo se libera en una proporción comprendida entre 46.63 – 72.37 % en un periodo de 24 horas, lo cual siguió una cinética de liberación descrita por el modelo de Korsmeyer-Peppas; es así que de acuerdo con estos autores, el proceso de liberación del fármaco es el resultado de una difusión en combinación con un fenómeno de erosión. En el mismo estudio, se evaluó un gel de niosomas cargado con Ketoconazol, el cual logró una liberación del 36.18 % después de 12 horas.

El hecho de que no se liberara el 100% del Ketoconazol contenido en el sistema líquido-cristalino en dispersion (CLLH-KTZ), pudiera deberse a la afinidad que posee el principio activo por el vehículo, por otro lado, conforme el fármaco se libera, la concentración de activo dentro de la formulación (**Cv**) disminuye con respecto a la solubilidad (concentración de saturación) del principio activo en el Sistema (**Cs,v**), lo cual desfavorece el proceso de difusión de acuerdo con la ecuación 1:

$$J = \frac{Dm Cs,m}{L} \cdot \frac{Cv}{Cs,v} \dots\dots\dots (1)$$

En donde **J** es el flujo del fármaco, **Dm** representa el coeficiente de difusión del fármaco en la membrana, **Cs,m** es la solubilidad del fármaco en la membrana, **Cv** es la concentración de fármaco disuelto en el vehículo, y **Cs,v** la solubilidad del

fármaco en el vehículo (Moser y cols., 2001). De manera adicional, el Ketoconazol es un fármaco lipofílico cuya liberación pudiera verse limitada por la fuerte interacción entre éste y uno de los componentes del sistema líquido-cristalino, en específico con la monooleína, lo cual se ha observado ocurre con fármacos lipofílicos (Guo y cols., 2010).

### **7.7.2 Evaluación de la Cinética de Permeación utilizando Membranas Artificiales Mediante el Modelo de Celdas de Franz**

La figura 7.16 muestra el promedio de 8 repeticiones en porcentaje del total de Ketoconazol permeado durante las pruebas realizadas mediante el modelo de celdas de Franz.

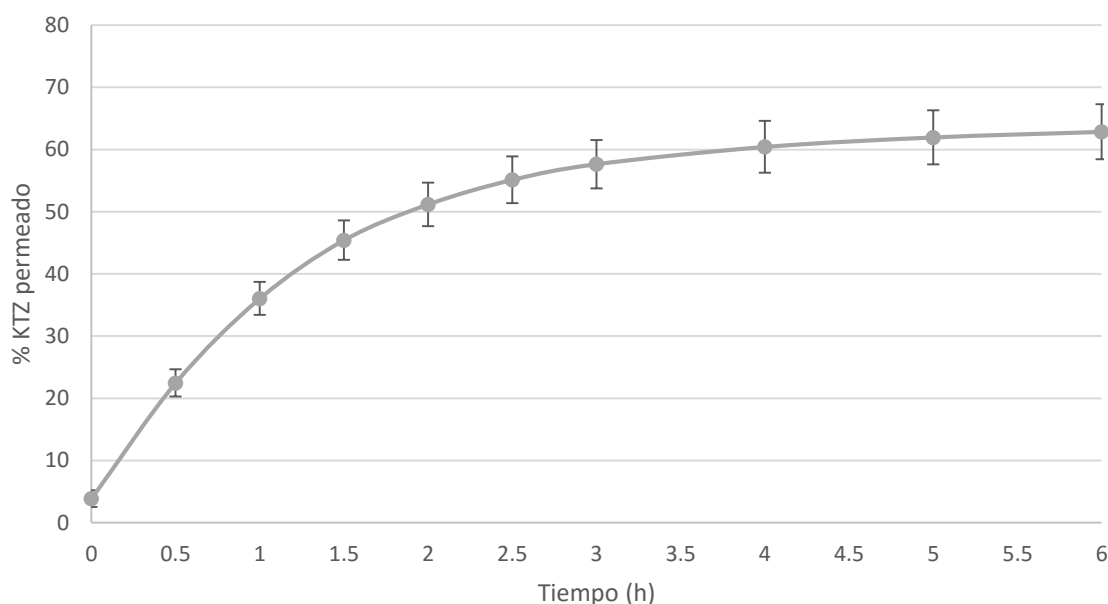


Figura 7.16. Cinética de permeación de KTZ con el modelo de celdas de Franz a partir del sistema líquido-cristalino, empleando membranas de polisulfona de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

Bajo las condiciones experimentales empleadas, la cantidad de Ketoconazol que permeó del sistema CLLH-KTZ hacia el medio receptor en un periodo de 6 horas,

fue del  $62.86 \pm 12.52$  % del total de principio activo presente en la formulación que fue cargada en las celdas de Franz. En contraste, en un estudio realizado por *Patel y cols (2009)* en donde se formularon y evaluaron liposomas cargados con Ketoconazol mediante el modelo de celdas de Franz empleando membranas de  $0.45 \mu\text{m}$  se logró obtener un porcentaje de liberación del 34.96 % en un periodo de doce horas.

El modelo matemático que mejor describe la cinética de difusión fue el modelo de Weibull ( $R^2_{\text{ajustado}} = 0.98$  y  $\text{AIC} = 42.65$ ), en segundo lugar se encuentra el modelo de Korsmeyer-Peppas con valores de 0.94 y 54.90 para el coeficiente de correlación y AIC respectivamente (tabla 7.6). Sin embargo, como se mencionó en el apartado anterior, el modelo de Weibull tiene limitaciones para caracterizar el proceso de disolución. Por lo tanto, en este estudio se decidió aplicar el modelo Korsmeyer-Peppas, el cual se utiliza generalmente para analizar la liberación en formas farmacéuticas poliméricas cuando el mecanismo de liberación no es bien conocido o cuando más de un solo fenómeno de liberación pudiera estar involucrado, de acuerdo con la ecuación 6:

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = k * t^n \dots\dots\dots (6)$$

En donde,  $Mt/M_{\infty}$  es la fracción de fármaco liberado en el tiempo  $t$ ;  $k$  es una constante de la velocidad de liberación que incorpora características estructurales y geométricas de la forma farmacéutica y  $n$ , es el exponente de liberación que indica el mecanismo de liberación del fármaco, en donde valores  $n \leq 0.5$  corresponden a un mecanismo de liberación Fickiana y valores superiores de  $n$ , entre 0.5 y 1.0 ó  $n = 1$ , a fenómenos no Fickianos y procesos de liberación de orden cero respectivamente (*Costa y Sousa, 2001; Dash y cols., 2010; Aragón y cols., 2010; Salome y cols., 2013*). Los resultados obtenidos con el modelo de Korsmeyer-Peppas arrojaron valores de 38.652 para  $k$  y de 0.329 para  $n$ , describiéndose entonces al proceso de liberación como un fenómeno de transporte Fickiano. De manera adicional, en los casos en donde el sistema es un material poroso, la constante  $n$  puede tomar valores menores de 0.5, puesto que se combinan los

mecanismos de difusión parcial a través de una matriz hinchada y a través de los poros llenos de agua. Además, valores de  $n < 0.5$  denotan la presencia de otro fenómeno simultáneo al proceso de difusión (Aragón y cols., 2010).

Tabla 7.6. Análisis de ajuste a modelos matemáticos de la cinética de permeación del KTZ a partir del sistema líquido-cristalino en membranas de polisulfona de 0.45  $\mu\text{m}$  mediante el modelo de celdas de Franz.

| <b>Modelos matemáticos</b>   |                |                       |                         |                              |                            |                |
|------------------------------|----------------|-----------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------|
| <b>Parámetro</b>             | <b>Higuchi</b> | <b>Orden<br/>cero</b> | <b>Primer<br/>orden</b> | <b>Korsmeyer-<br/>Peppas</b> | <b>Hixson-<br/>Crowell</b> | <b>Weibull</b> |
| <b>R<sup>2</sup>ajustado</b> | 0.85           | 0.07                  | 0.67                    | 0.94                         | 0.54                       | 0.98           |
| <b>AIC</b>                   | 62.43          | 81.80                 | 69.88                   | 54.90                        | 74.00                      | 42.65          |

R<sup>2</sup><sub>ajustado</sub> = Coeficiente de determinación ajustado.

AIC = Criterio de información de Akaike.

Los resultados muestran que el sistema es capaz de permear a través de la membrana utilizada. Sin embargo, se esperaba que la cantidad de fármaco detectado fuera mayor debido a que el tamaño de poro (0.45  $\mu\text{m}$ ) pudiera permitir que la permeación fuera el resultado de un proceso combinado entre la liberación del Ketoconazol desde el sistema líquido-cristalino (lo cual se ha comprobado con los experimentos de liberación en membranas de diálisis) y el transporte de la formulación intacta aún con el fármaco en su interior a través de la membrana; lo anterior debido a que los sistemas presentan un tamaño de partícula alrededor de 100 nm. El hecho de que no se lograra la permeación de más del 62.86% del principio activo pudiera explicarse con la posible interacción que tanto el sistema líquido-cristalino como el fármaco pudieran tener con la membrana de polisulfona.

Los experimentos de potencial Z realizados, han demostrado la presencia de cargas positivas en el sistema CLLH-KTZ, atribuidas a la ionización del fármaco, lo que hace posible suponer que existan interacciones de tipo electrostático entre el sistema y el fármaco con los grupos R1-SO<sub>2</sub>-R2 de la membrana. Lo anterior, se



encuentra de acuerdo con lo observado en el modelo de Kormeyer-Peppas ( $n < 0.5$ ) pudiendo ser que el proceso fuera resultado de la combinación de los fenómenos de difusión del fármaco desde el interior del sistema, el paso de la estructura a través de la membrana, con la posterior liberación del activo por difusión, erosión y/o hinchamiento e interacciones con la membrana.

Independientemente de los resultados obtenidos, es importante realizar estudios de permeación empleando membranas artificiales que puedan sustituir el uso de membranas de piel debido a la dificultad que representa el obtenerlas y almacenarlas. De manera adicional, resulta útil para observar el comportamiento del sistema bajo condiciones establecidas, lo cual puede emplearse como un parámetro descriptor del sistema permitiendo contar con más ensayos que pueden fungir como pruebas de control de calidad.

### **7.7.3 Evaluación de la Cinética de Permeación y Retención en Piel de Oreja de Cerdo Mediante el Modelo de Celdas de Franz**

Para evaluar el desempeño de la formulación líquido-cristalina se utilizó piel de oreja de cerdo, que resulta ser una alternativa adecuada a los experimentos con piel humana ya que posee un estrato córneo, composición y espesor de la epidermis, contenido de lípidos y morfología general comparables con la piel humana (*Debandi y cols., 2011*). Se realizó una comparación de los resultados obtenidos con los sistemas líquido-cristalinos con los generados con el medicamento de referencia Nizoral® (*Cofepris, 2013*) por medio del modelo de celdas de Franz.

En la figura 7.17 se muestran los resultados obtenidos con la formulación tipo cristal-líquido y el medicamento de referencia, en donde se muestran los promedios de 14 repeticiones en porcentaje de Ketoconazol permeado para el sistema líquido-cristalino y 10 repeticiones para el medicamento de referencia.

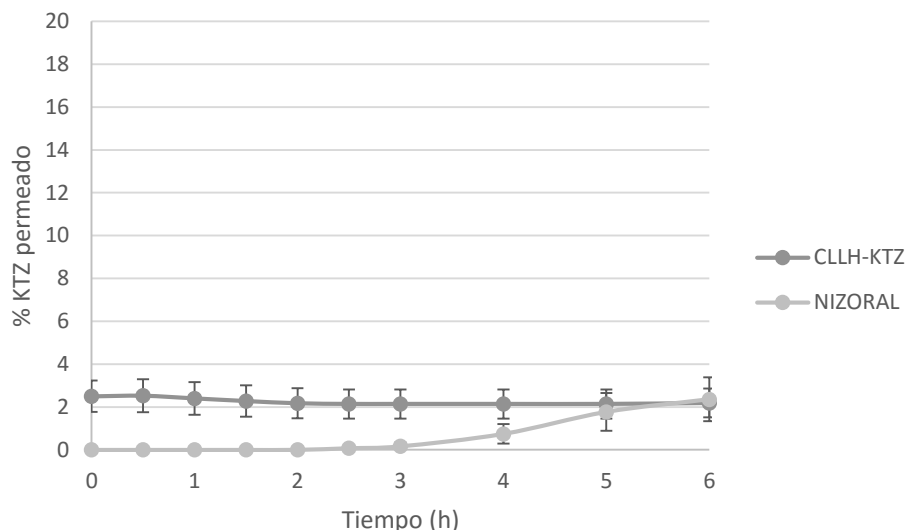


Figura 7.17. Cinética de permeación de KTZ con el modelo de celdas de Franz para el sistema líquido-cristalino y el medicamento de referencia empleando membranas de piel de oreja de cerdo.

Como puede observarse, a diferencia de lo sucedido con membranas artificiales, no existe un flujo importante de Ketoconazol a través de la piel, lo cual debe ser consecuencia del contenido específico y composición de lípidos del estrato córneo y en particular, al arreglo excepcional de la matriz lipídica intercelular, en donde las rutas de permeación de fármacos a través de la piel incluyen la difusión a través de la epidermis intacta y a través de los apéndices de la piel (folículos de cabello y glándulas sudoríparas), aunque se ha estimado que la contribución de éstos últimos es mínima debido a que los apéndices sólo ocupan el 0.1% de la superficie total de la piel por lo que, para que un fármaco logre cruzar tendrá que utilizar cualquiera de dos rutas posibles, la vía intercelular entre los corneocitos y la vía transcelular a través de los corneocitos y los lípidos entre éstos. Por lo tanto, en ambas rutas el agente terapéutico deberá difundir en algún punto entre la matriz lipídica intercelular, la cual se ha identificado como el principal determinante de la velocidad de permeación (*Moser y cols., 2001; Trommer y Neubert, 2006*).

Los resultados obtenidos se asemejan a los reportados por *Jacobs y cols en 2014*, en donde se probaron cuatro formulaciones cargadas con ketoconazol en las cuales

no hubo difusión a través de la piel en un periodo de doce horas empleando el modelo de celdas de Franz. Por otro lado, en el estudio realizado por *Surti y cols en 2014* se observó que el 77.2 % del Ketoconazol contenido en las microemulsiones logró atravesar la piel en un periodo de 8 horas. Lo anterior no es del todo favorable, pues como ya se ha expresado antes, la administración por vía tópica tiene el objetivo de mantener el efecto farmacológico en la superficie o dentro de la piel y no la obtención de un efecto sistémico; lo cual es importante para el caso particular del Ketoconazol, que ha demostrado toxicidad hepática que puede producir hepatitis, cirrosis e insuficiencia hepática, por lo que el Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP) ha recomendado la suspensión de la comercialización de medicamentos de administración sistémica que contienen Ketoconazol (*AEMPS, 2013 y Gever, 2013*).

Los datos muestran que el 2.18 % y el 2.36 % de la cantidad de Ketoconazol colocada inicialmente con el sistema líquido-cristalino y el medicamento de referencia respectivamente, logró atravesar la membrana en un periodo de 6 horas, lo cual indica la existencia de un fenómeno de transporte del fármaco desde el exterior de la membrana hacia el otro extremo, por lo tanto, es de esperarse exista Ketoconazol dentro de la piel.

Por otro lado, puede observarse que con la formulación líquido-cristalina se detecta Ketoconazol desde el comienzo de los experimentos de permeación (figura 7.15), a diferencia de la formulación de referencia en donde se alcanzan concentraciones similares hasta las seis horas. Lo anterior, significa una ventaja del sistema CLLH-KTZ respecto al tiempo de exposición necesario para lograr la penetración del fármaco en la piel, ya que suele sobreestimarse el tiempo durante el cual una formulación tópica permanece sobre la piel. Por lo tanto, un sistema de liberación de fármacos por vía tópica que sea capaz de lograr la permeación y retención del fármaco en la piel en menor tiempo, resultará en una alternativa con mayores probabilidades de éxito.

Para comprobar la existencia de Ketoconazol retenido en la piel, terminados los estudios de permeación, las membranas fueron cuidadosamente retiradas de las

celdas de Franz, se enjuagaron con agua desionizada para retirar el exceso de formulación sobre la superficie y se cortaron en pequeños trozos que se colocaron en agitación por 24 horas, en 25 mL del medio empleado para los experimentos en celdas de Franz. Las muestras fueron filtradas por gravedad a través de un filtro Whatman No. 5 y posteriormente por membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  para ser inyectadas al cromatógrafo de líquidos.

Los resultados que se observan en la figura 7.18 evidencian la existencia de fármaco retenido en la piel después de los experimentos de permeación, habiéndose encontrado el 6.51 % y 10.55 % en promedio de la cantidad de Ketoconazol colocada inicialmente para la formulación líquido-cristalina y el medicamento de referencia respectivamente.

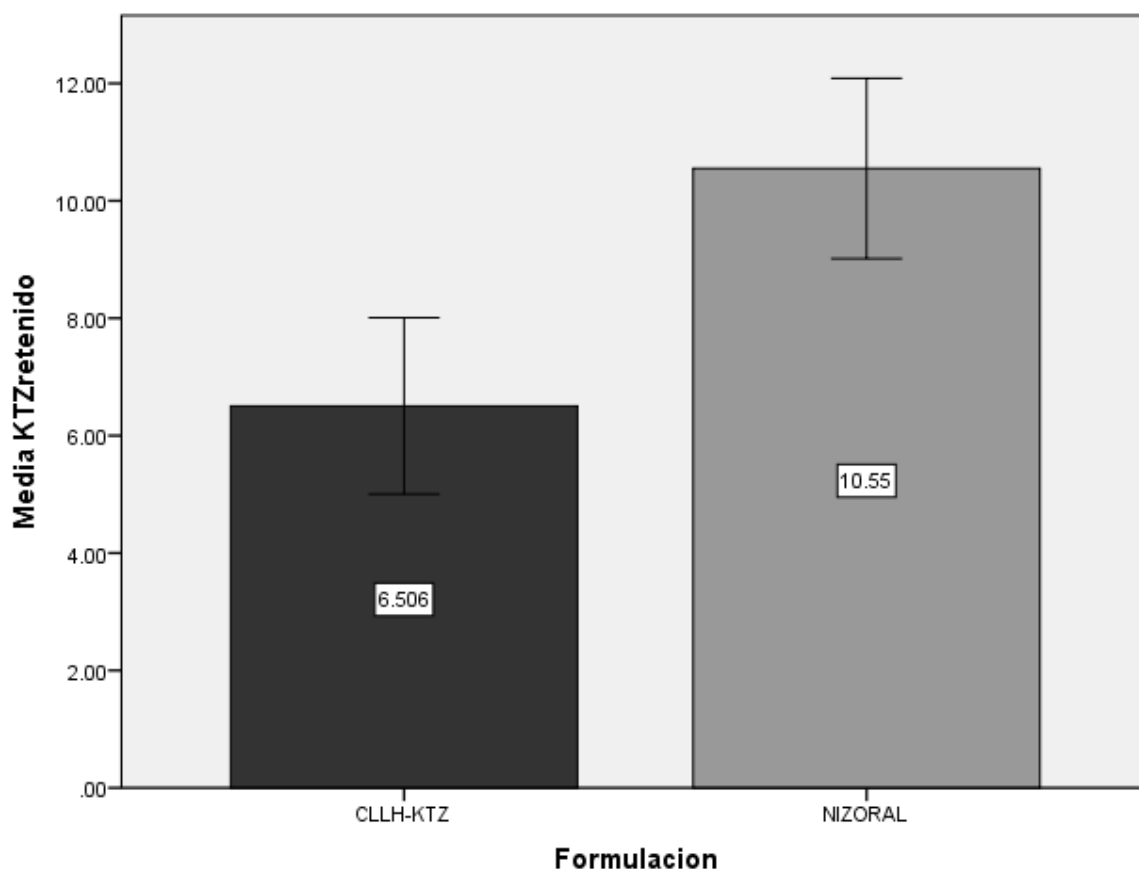


Figura 7.18. Porcentaje de KTZ retenido en la piel después de los experimentos de permeación. Se muestra la comparación entre el sistema líquido-cristalino y el medicamento de referencia. Los porcentajes representan el promedio de los experimentos de extracción de Ketoconazol en piel. Las barras representan el error estándar de la media.

Para corroborar la existencia de diferencia significativa entre formulaciones se realizó un análisis estadístico de comparación de medias para muestras independientes, realizando previamente la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar el ajuste de normalidad de los datos y la prueba de Levene para determinar igualdad de varianzas. Los resultados se muestran en las tablas 7.7 y 7.8.

Tabla 7.7. Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para los resultados de porcentaje de KZ retenido en piel para el sistema líquido-cristalino y el medicamento de referencia.

| Formulación  |         | Kolmogorov-Smirnov |    |       |
|--------------|---------|--------------------|----|-------|
|              |         | Estadístico        | gl | Sig.  |
| %KZ retenido | CLLH-KZ | 0.175              | 10 | .200* |
|              | NIZORAL | 0.157              | 10 | .200* |

\* $p < 0.05$  = Significativo.

\* $p > 0.05$  = No significativo.

Tabla 7.8. Prueba de Levene para igualdad de varianzas y prueba de  $t$  para la igualdad de medias de los resultados de % KZ promedio retenido con el sistema líquido-cristalino y el medicamento de referencia.

|              |                                     | Prueba de Levene para la igualdad de varianzas |       | Prueba T para la igualdad de medias |       |                  |                      |                             |   |          |
|--------------|-------------------------------------|--|-------|-------------------------------------|-------|------------------|----------------------|-----------------------------|---|----------|
|              |                                     | F  | Sig.  | t                                   | gl    | Sig. (bilateral) | Diferencia de medias | Error típ. de la diferencia | 95% Intervalo de confianza para la diferencia |          |
|              |                                     |  |       |                                     |       |                  |                      |                             | Inferior                                      | Superior |
| %KZ retenido | Se han asumido varianzas iguales    | 0.001  | .977* | -1.883                              | 18    | .076*            | -4.04389             | 2.14741                     | -8.55544                                      | 0.46766  |
|              | No se han asumido varianzas iguales |  |       | -1.883                              | 17.99 | .076*            | -4.04389             | 2.14741                     | -8.55561                                      | 0.46783  |

\* $p < 0.05$  = Significativo.

\* $p > 0.05$  = No significativo.

Para ambos grupos de datos la prueba de normalidad demuestra que se ajustan a una distribución normal con valores de  $p > 0.05$  ( $p = 0.200$ ). La prueba de Levene demuestra que existe igualdad de varianzas con  $p > 0.05$  ( $p = 0.977$ ). Por último, la prueba de T para probar la hipótesis de igualdad de medias indica que no hay evidencia suficiente para afirmar la existencia de diferencia entre la cantidad de Ketoconazol retenido en la piel con los experimentos realizados utilizando el sistema líquido-cristalino y el medicamento de referencia con  $p > 0.05$  ( $p = 0.076$ ).

De acuerdo con lo anterior, los resultados muestran que la formulación tipo cristal-líquido es capaz de penetrar el estrato córneo logrando depositar al fármaco entre los estratos de la piel. De manera adicional, estudios *in vitro* hechos a los sistemas líquido-cristalinos demuestran que la potencia del fármaco se ve incrementada cuando forma parte de la nanoestructura, habiéndose encontrado que la concentración mínima inhibitoria del Ketoconazol contra *Candida albicans* en formulaciones comerciales fue de 40  $\mu\text{g/mL}$ , en contraste, con la formulación líquido-cristalina la concentración mínima inhibitoria se encontró en 24  $\mu\text{g/mL}$  (Santiago-Téllez, 2014). Sin embargo, aún debe probarse la eficacia de la formulación bajo condiciones de análisis *in vivo* en donde podrá obtenerse mayor información con respecto a la conveniencia de uso de la formulación líquido-cristalina propuesta.

Por otro lado, hay que considerar que el método empleado para la extracción del Ketoconazol de la piel permitió recuperar el 78.92% (CV%, 6.06) del fármaco colocado sobre membranas de piel previamente hidratadas (empleando una referencia de Ketoconazol en solución con metanol, cuya concentración y volumen permitieron colocar una cantidad de Ketoconazol equivalente a la que se colocó en los experimentos de celdas de Franz). Lo anterior, demuestra que el Ketoconazol es capaz de quedar fuertemente retenido entre los estratos de la piel, dificultando su extracción, lo cual puede deberse a su elevado coeficiente de partición (3.507-4.31). Por lo tanto, los resultados obtenidos con los experimentos empleados para determinar la cantidad de Ketoconazol retenido en la piel también pueden verse limitados por la capacidad del método para recuperar al fármaco.

Algunos autores han sugerido que la organización estructural de los lípidos extracelulares del estrato córneo se encuentra en una fase líquido-cristalina. Norlén (2001) propone que la piel debe asegurar que las propiedades de barrera se mantengan incluso bajo cambios abruptos de las condiciones ambientales, por lo que transiciones de estado entre los lípidos de la matriz extracelular deberán ser evitadas. Por lo tanto, los lípidos del estrato córneo deberán ser tan homogéneos como sea posible y como consecuencia, plantea una fase gel como una estructura lipídica laminar cristalina que tiene un empaquetamiento hexagonal de las cadenas hidrocarbonadas. Sin embargo, también se reporta la coexistencia de un empaquetamiento ortorrómbico y hexagonal en las partes inferiores del estrato córneo. Lo que implicaría que las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos puedan expresar de manera simultánea un empaquetamiento ortorrómbico en la porción superior (cercana a los grupos polares) y hexagonal en la parte inferior (al final de la cadena hidrocarbonada).

Por otro lado, en una revisión realizada por Bouwstra y Ponc (2006) se describen tres tipos de empaquetamiento lateral de los lípidos del estrato córneo: una fase líquida, un empaquetamiento hexagonal, a veces denominado fase gel y un empaquetamiento ortorrómbico. Un empaquetamiento ortorrómbico indica que los lípidos se encuentran densamente empaquetados, siendo aún incierta la coexistencia de fases líquidas y ortorrómbicas. De manera adicional, se ha estudiado el empaquetamiento lateral de los lípidos en función de la profundidad del estrato córneo en piel humana, en donde se observó una transición desde una fase ortorrómbica a una hexagonal entre 30 y 40 °C. Además, el empaquetamiento hexagonal fue detectado principalmente en las capas superficiales del estrato córneo a temperatura ambiente y a 32 °C. Estas observaciones, no concuerdan con el modelo de una única fase tipo gel propuesta por Norlén (2001).

De lo anterior, podemos apoyar la hipótesis de que sistemas tipo CLL con estructuraciones hexagonales o cúbicas, son sistemas de liberación de fármacos por vía tópica promisorios, que permiten la formación de un depósito en la piel con posterior liberación del principio activo (*Guo y cols., 2010; Patel y cols., 2010; Chen*

*y cols., 2014; Kim y cols., 2015*). Así, la lipofilicidad del fármaco y la posible formación de dicho depósito podrían ser los responsables del bajo porcentaje de fármaco extraído de la piel.

En resumen, los resultados obtenidos muestran que el sistema líquido-cristalino empleado presenta características físico-químicas que permiten la liberación y permeación del Ketoconazol en modelos con membranas artificiales, logrado también una permeación y retención en piel del principio activo equivalentes al medicamento de referencia, lo cual convierte al sistema líquido-cristalino en una opción prometedora para la administración de fármacos por vía tópica.

De manera adicional, se cuenta con información sobre la morfología y tamaño de los sistemas, potencial Z, viscosidad y comportamiento térmico, características que pueden relacionarse con su comportamiento en los estudios de permeación y por consiguiente, valiosos para el estudio y propuesta de cambios sobre el sistema que pueden mejorar sus características como vehículo para la administración tópica de fármacos.



## 8. CONCLUSIONES

- La metodología propuesta permite la obtención de un sistema de tamaño nanométrico tipo dispersión de cristales líquidos liotrópicos hexosómicos.
- El tamaño de partícula disminuye ligeramente con el incremento en la temperatura, probablemente consecuencia de la formación de una estructura más compacta y estable.
- El potencial Z de las formulaciones sugiere la existencia de un mecanismo de estabilización de tipo estérico.
- Bajo las condiciones empleadas, los sistemas muestran un comportamiento Newtoniano y ausencia de fenómenos dependientes del tiempo, característico de dispersiones acuosas de cristales líquidos.
- Los sistemas muestran estabilidad por lo menos durante seis meses en un rango de temperaturas comprendido entre los 10 y 50 °C, siendo entonces estables a la temperatura corporal.
- El comportamiento térmico de los sistemas es independiente de la velocidad de calentamiento en un intervalo que va desde 0.6 hasta 1.6 °C/min.
- El método por CLAR no muestra interferentes, permitiendo la cuantificación de Ketoconazol en los experimentos de liberación y permeación.
- El sistema líquido-cristalino es capaz de ceder el fármaco, lográndose liberar aproximadamente el 85% en un periodo de 24 horas con una cinética de primer orden.
- Aproximadamente el 62 % de la cantidad de fármaco colocado sobre la membrana artificial permea en un periodo de 6 horas empleando el modelo de celdas de Franz, con una cinética descrita por el modelo de Korsmeyer-Peppas.
- Las membranas de piel de oreja de cerdo permiten únicamente el paso de menos del 2.5 % del fármaco colocado inicialmente durante los experimentos en celdas

de Franz, independientemente de la formulación empleada (líquido-cristalina o NIZORAL®).

- Existe fármaco retenido en la piel y los análisis de comparación de medias indican que no existe evidencia suficiente que demuestre diferencia entre la cantidad de Ketoconazol retenido con el sistema líquido-cristalino y el medicamento de referencia.
- El sistema líquido-cristalino posee características fisicoquímicas y de estabilidad bajo condiciones probables de uso y almacenamiento que permiten pensar en la utilidad del mismo como vehículo para la dosificación de fármacos por vía tópica.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios AEMPS. 2013. Ketoconazol de administración sistémica (comprimidos): suspensión de comercialización. Consultado en [http://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosUsoHumano/seguridad/2013/docs/NI-MUH\\_FV\\_21-2013-ketoconazol.pdf](http://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosUsoHumano/seguridad/2013/docs/NI-MUH_FV_21-2013-ketoconazol.pdf) 02MAY14 16:00hrs.
- Amar-Yuli, I; Wachtel, E; Shoshan, EB; Danino, D; Aserin, A; Garti, N. 2007. Hexosome and hexagonal phases mediated by hydration and polymeric stabilizer. *Langmuir*. 23(7): 3637-45.
- Aragón, J; Gonzáles, R; Fuentes, G. 2010. Estudio *in vitro* de liberación de fármacos desde un biomaterial compuesto. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*. 41: 1-8.
- Baert, B; Boonen, J; Burvenich, C; Roche, N; Stillaert, F; Blondeel, P; Jan Van Bocxlaer, JV; Spiegeleer, BD. 2010. A New Discriminative Criterion for the Development of Franz Diffusion Tests for Transdermal Pharmaceuticals. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 13(2): 218 - 230.
- Beldarraín, A. 2001. Aplicaciones de la calorimetría diferencial de barrido al estudio de la estabilidad de proteínas. *Biotecnología aplicada*. 18: 10-16.
- Bouwstra, J; Ponc, M. 2006. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1758: 2080-2095.
- Chang, D; Barauskas, J; Dabkowska, A; Wadsäter, M; Tiberg, F; Nylander, T. 2014. Non-lamellar lipid liquid crystalline structures at interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*. [http:// dx.doi.org/10.1016/j.cis.2014.11.003](http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2014.11.003)
- Chang, R. Química. Editorial Mc Graw Hill. Décima edición. China. 2010. pp 462-469.
- Chávez, G; Parra, I; Luzardo, M; Bravo, B; Márquez, N. 2013. Caracterización de cristales líquidos por microscopía óptica de sistema surfactante polietoxilado-alcano-agua. *Química Nova*. 36(9):1343-1347.
- Chen, Y; Ma, P; Gui, S. 2014. Cubic and Hexagonal Liquid Crystals as Drug Delivery Systems. *Hindawi Publishing Corporation. BioMed Research International*. Article ID 815981: 1-12.

- Chiu, L; Tian, Y. Zeta Potential. En: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Editorial Marcel Dekker, Inc. Segunda edición. EUA, 2002. pp 3020-3031.
- Clas, S; Dalton, C; Hancock, B. Calorimetry in Pharmaceutical Research and Development. En Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Editorial Marcel Dekker, Inc. Segunda edición. EUA, 2002. pp 289-299.
- Cofepris, 2013. Comisión de Autorización Sanitaria. Dirección Ejecutiva de Autorización de Productos y Establecimientos. Medicamentos de referencia. Consultado en: [http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/Rel\\_med\\_de\\_ref\\_15-08-2013.pdf](http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/Rel_med_de_ref_15-08-2013.pdf) 08DIC14 20:54hrs.
- Costa, P; Sousa, J. 2001 Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 13: 123-133.
- Coulman, S; Anstey, A; Gateley, C; Morrissey, A; McLoughlin, P; Allender, C; Birchall, J. 2009. Pharmaceutical nanotechnology. Microneedle mediated delivery of nanoparticles into human skin. *International Journal of Pharmaceutics* 366:190–200.
- Cross, S; Jiang, R; Benson, H; Roberts, M. 2001. Can Increasing the Viscosity of Formulations be used to Reduce the Human Skin Penetration of the Sunscreen Oxybenzone? *The Journal of Investigative Dermatology*. 117(1): 147-150.
- Cuadros-Moreno, A; Casañas, R; Martín-Martínez, E; Yañes, J. 2014. Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Latin-American Journal of Physics Education*. 8(4):4314-1 - 4314-5.
- Dash, S; Murthy, P; Nath, L; Chowdhury, P. 2010. *Kinetic Modeling on Drug Release from Controlled Drug Delivery Systems*. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*. 67(3): 217-223.
- *Debandi, M; François, N; Daraio, M.* 2011. Evaluación de distintas membranas para la liberación *in vitro* de principios activos anticelulíticos. *Avances en Ciencias e Ingeniería*. 2(2): 97-105.
- Delgado Charro, M.B; Otero Espinar, F.J; Blanco Méndez, J. Sistemas Dispersos Heterogéneos. En: Tecnología Farmacéutica Volumen 1. Aspectos Fundamentales de los Sistemas Farmacéuticos y Operaciones Básicas. Editorial Síntesis. Primera edición. España. 2001. pp 207-316.

- European Medicines Agency (EMA). 2013. European Medicines Agency recommends suspension of marketing authorisations for oral ketoconazole. Benefit of oral ketoconazole does not outweigh risk of liver injury in fungal infections. Consultado en: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news\\_and\\_events/news/2013/07/news\\_detail\\_001855.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2013/07/news_detail_001855.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1) 22OCT14 18:43 hrs.
- Fairhurst, D. 2013. An Overview of the Zeta Potential - Part 1: The Concept. Consultado en: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/133232-An-Overview-of-the-Zeta-Potential-Part-1-The-Concept/> 03AGO15 13:00 hrs.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 10ª edición. México. Secretaría de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2011.
- Fernández Arteaga, A. 2006. Preparación, caracterización y estabilidad de emulsiones y microemulsiones O/W. Tesis doctoral. Universidad de Granada. 443 pp.
- Ganem-Quintanar, A; Quintanar-Guerrero, D; Buri, P. 2000. Monoolein: A Review of the Pharmaceutical Applications. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 26(8): 809-820.
- Garti, N; Libster, D; Aserin, A. 2012. Lipid polymorphism in lyotropic liquid crystals for triggered release of bioactives. *Food & Function*. 3: 700-713.
- Gever, J. 2013. FDA Puts Strict Limits on Oral Ketoconazole Use. Consultado en: <http://www.medpagetoday.com/InfectiousDisease/GeneralInfectiousDisease/40710> 22OCT14 18:39 hrs.
- Gill, P; Moghadam, T; Ranjbar, B. 2010. Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques* 21:167–193.
- Gomma, Y; Garland, M; McInnes, F; Donnelly, R; El-Khordagui, L; Wilson, C. 2014. Microneedle/nanoencapsulation-mediated transdermal delivery: Mechanistic insights. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 86: 145–155.
- Guinama, 2013. 93890-KETOCONAZOL. Ficha de datos de seguridad, Consultado en: [http://www.guinama.com/media/tecnico/93890\\_FDS%20Ketoconazol%20v01.pdf](http://www.guinama.com/media/tecnico/93890_FDS%20Ketoconazol%20v01.pdf) 28NOV14 19:08 hrs.

- GÜngör, S; Sedefn, M; Aksu, B. 2013. New Formulation Strategies in Topical Antifungal Therapy. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*. 3: 56-65.
- Guo, C; Wang, J; Cao, F; Lee, R; Zhai, G. 2010. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. *Drug Discovery Today*. 15(23/24): 1032-1040.
- Hegmann, T; Qi, H; Marx, V. 2007. Nanoparticles in Liquid Crystals: Synthesis, Self-Assembly, Defect Formation and Potential Applications. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. 17(3): 483-508.
- Hitesh, J; Rushikesh, G; Gauri, J; Jagruti, M; Nirali, T. 2011. Liquid Crystal as Accelerant in Drug Absorption from Topical Formulations. *International Research Journal of Pharmacy*. 2(4): 86-89.
- Honary, S; Zahir, F. 2013. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 12 (2): 255-264.
- Jacobs, G; Gerber, M; Malan, M; du Preez, J; Fox, L; Plessis, J. 2014. Topical delivery of acyclovir and ketoconazole. *Drug Delivery, Early Online*: 1–11.
- Kalinin, A; Marekov, L; Steinert, P. 2001. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *Journal of Cell Science*. 114 (17): 3069-3070.
- Katzung, B. *Farmacología básica y clínica*. Editorial Manual Moderno. Décima edición. México. 2007. pp1036-1038.
- Kim, D-H; Jahn, A; Cho, S-J; Kim, J; Ki, M-H; Kim, D-D. 2015. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery: a review. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 45:1–11.
- Kim, I-Y; Nakagawa, S., Ri, K; Hashimoto, S; Masaki, H. 2009. Liquid crystal o/w emulsions to mimic lipids and strengthen skin barrier. *Cosmetic & Toiletries. Science Applied*. 1-10.
- Kirby, J; Hasselbrink, E. 2004. Review. Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. *Electrophoresis*. 25: 187–202.
- Lavaselli, S.A; Pedemonte, C.I; Mazon, J.I; Lillini, G.J; Pasquali, R.C; Riquelme, B. 2012. Rheological behavior of liquid-crystalline emulsion of topic application with econazole nitrate. *Series on Biomechanics*, 27(3-4): 34-38.

- Lodha, A; Jadhav, G; Pande, V. 2014. Liquid crystals as a cubo-hexagonal topical controlled drug delivery system. *Pharmacophore*.5(3): 430-441.
- Madigan, M; Martinko, J; Parker, J. Brock Biología de los Microorganismos. Editorial Pearson Prentice Hall. Décima edición. España. 2004. pp 710- 717.
- Magaña, M; Magaña, M. Dermatología. Editorial Panamericana. Primera edición. México. 2003. pp 1-17, 115-140.
- Maldonado-Campos, J.F.J. 2012. Incorporación de ketoconazol a dispersiones de cristales líquidos liotrópicos. Tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas. Universidad Autónoma Metropolitana. 160 pp
- Malvern, 2015. Microcalorimetry. Characterizing the interactions and stability of biomolecules. Consultado en: <http://www.malvern.com/en/products/measurement-type/microcalorimetry/default.aspx> 11SEP15 15:39 hrs.
- Malvern, 2015. Rheology and Viscosity. Rheometers for measuring viscosity and viscoelasticity – from formulation to product use. Consultado en: <http://www.malvern.com/en/products/measurement-type/rheology-viscosity/> 12SEP15 17:56 hrs.
- Malvern. Zetasizer Nano Series User Manual. MAN 0317 Issue 1.1, UK, 2004. Pp 193-199. Consultado en: [http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer\\_Nano\\_user\\_manual\\_Man0317-1.1.pdf](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf) 16SEP15 12:31 hrs.
- Mastropietro, D; Nimroozi, R; Omidian, H. 2013. Rheology in Pharmaceutical Formulations-A Perspective. *Journal of Developing Drugs*. 2(2):1-6.
- McEvoy, G.K. 2006. American Hospital Formulary Service. AHFS Drug Information. American Society of Health-System Pharmacists. EUA. p. 3411. Consultado en: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=47576> 02MAY14 16:30 hrs.
- Menon, G. 2002. New insights into skin structure: scratching the surface. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 54(1): S3-S17.
- Menon, G; Cleary, G; Lane, M. 2012. The structure and function of the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*. 435: 3-9.

- Mohammady, S; Pouzot, M; Mezzenga, R. 2009. Oleoylethanolamide-Based Lyotropic Liquid Crystals as Vehicles for Delivery of Amino Acids in Aqueous Environment. *Biophysical Journal*. 96(4): 1537-1546.
- Moser, K; Kriwet, K; Naik, A; Kalia, Y; Guy, R. 2001. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 52: 103-112.
- Mueller-Goymann, C. Drug Delivery-Liquid Crystals in. En: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Editorial Marcel Dekker, Inc. Segunda edición. EUA, 2002. pp 834-851.
- Müller-Goymann, C. 2004. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 58: 343–356.
- Mycek, M; Harvey, R; Champe, P. Farmacología. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Segunda edición. México. 2004. pp 401- 409.
- Norlén, L. 2001. Skin Barrier Structure and Function: The Single Gel Phase Model. *Journal of Investigative Dermatology*. 117:830-836.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Guideline for the Testing of Chemicals. Skin absorption: *In vitro* method. No.428, 2004.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Guidance Notes on Dermal Absorption. Series on Testing and Assessment. No.156, 2011.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. Series on Testing and Assessment, No.28, 2004.
- Ogura, M; Rodríguez, P. Tinción Negativa. En: Introducción a la Microscopía Electrónica. Guía Teórico-Práctica. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Centro de Microscopía Electrónica. 1997. pp 39-40.
- Pasquali, R; Bregni, C; Serrano, R. 2006. Características e identificación de los cristales líquidos liotrópicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37(2): 38-53.



- Pasquali, R; Bregni, C; Serrao, R. 2005. Estructura de las Principales Fases Líquido-Cristalinas Liotrópicas. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 24(3): 453-457.
- Patel, P; Patel, J; Dangar, R; Patel, K; Chauhan, K. 2010. Liquid Crystal Drug Delivery System. *International Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*. 1(1): 118-123.
- Patel, R; Patel, H; Baria, A. 2009. Formulation and Evaluation of Liposomes of Liposomes of Ketoconazole. *International Journal of Drug Delivery Technology*. 1(1): 16-23.
- Patel, R; Patel, T. Liquid Crystals and Their Application in the Field of Drug Delivery. En: Colloids in drug delivery. Editorial CRC Press Taylor & Francis Group. Surfactant Science Series Volume 150. EUA, 2010. pp 311-336.
- Prescott, L; Harley, J; Klein, D. Microbiología. Editorial McGraw-Hill. Quinta edición. España. 2004. pp 1021-1031.
- PubChem. Ketoconazole. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3823#section=Top> 06MAR15 15:03 hrs.
- Quirino-Barreda, C.T; Noguez-Méndez, N.A; Rivera-Becerril, E; Gazga-Urioste, C; Pérez-Hernández, G; Maldonado-Campos, J.F.J; Palma-Ramos, A; Castrillón-Rivera, L.E; Juárez-Sandoval, J.J; Santiago-Téllez, A; Faustino-Vega, A; Gutiérrez-Zamora, A.C; Macín-Cabrera, S.A; Rubio-Martínez, A; Ramírez-Palma, J.A. y Campos-Terán, J. Composición tópica con base en cristales líquidos liotrópicos. IMPI. No. Expediente: MX/a/2015/009845; Folio: MX/E/2015/054803. De fecha 30 de julio, 2015. MÉXICO.
- Ramachandran, R; Somasundaran, P. 1986. Effect of Temperature on the Interfacial Properties of Silicates. *Colloids and Surfaces*. 21: 355-369.
- Rang, H; Dale, M. Farmacología. Editorial Elsevier. Sexta edición. España. 2008. pp 692-697.
- Revil, A; Pezard, P; Glover, P. 1999. Streaming potential in porous media 1. Theory of the zeta potential. *Journal of Geophysical Research*. 104(B9): 21-31.
- Rizwan, S; Boyd, B; Rades, T; Hook, S. 2010. Bicontinuous cubic liquid crystals as sustained delivery systems for peptides and proteins. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 7(10): 1133-1144.

- Rojas, O; Briceño, M.I; Avendaño, J. 2012. Fundamentos de Reología. Laboratorio de Formulaciones, Interfases, Reología y Procesos. Consultado en: <http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S521C.pdf> 26JUL15 15:48 hrs.
- Romero-Ochoa, G. A. (2015). Obtención de cristales líquidos cargados con ketoconazol y su uso en la elaboración de una crema tópico vaginal. Informe de proyecto de Servicio Social. Licenciatura en QFB. UAM-X. (En proceso de publicación).
- Salome, C; Godswill, O; Ikechukwu, O. 2013. Kinetics and Mechanisms of Drug Release from Swellable and Non Swellable Matrices: A Review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 4(1): 97-103.
- Santiago-Téllez, A. 2014. Determinación del efecto antimicótico de Ketoconazol incorporado en cristales líquidos liotrópicos en *C. albicans*. Tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas. Universidad Autónoma Metropolitana. 115 pp
- Shirsand, S; Para, M; Nagendrakumar, D; Kanani, K; Keerthy, D. 2012. Formulation and evaluation of Ketoconazole niosomal gel drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2(4): 201–207.
- Shivanand, P; Devmurari, V; Manish, G; Pandey, D. 2009. Formulation, Optimization and *In-Vitro* Evaluation of Ketoconazole Cream. *Der Pharmacia Lettre*. 1(2): 18-24.
- Sinkó, B; Garrigues, T; Balogh, G; Nagy, Z; Tsinman, O; Avdeef, A; Takács-Novák, K. 2012. Skin-PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 45: 698-707.
- Surti, N; Upadhyay, U; Mehetre, J; Patel, A. 2014. Formulation and Evaluation of Microemulsion based Hydrogel for Topical Delivery of Ketoconazole. *Journal of Advance Pharmaceutical Research and Bioscience*. 2(2): 16-29.
- Tadwee, I; Shahi, S; Ramteke, V; Syed, I. 2012. Liquid Crystals Pharmaceutical Application: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*. 1(2): 06-11.
- Tadwee, I; Gore, S; Giradkar, P. 2011. Advances in Topical Drug Delivery System: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*. 1(1): 14-23.

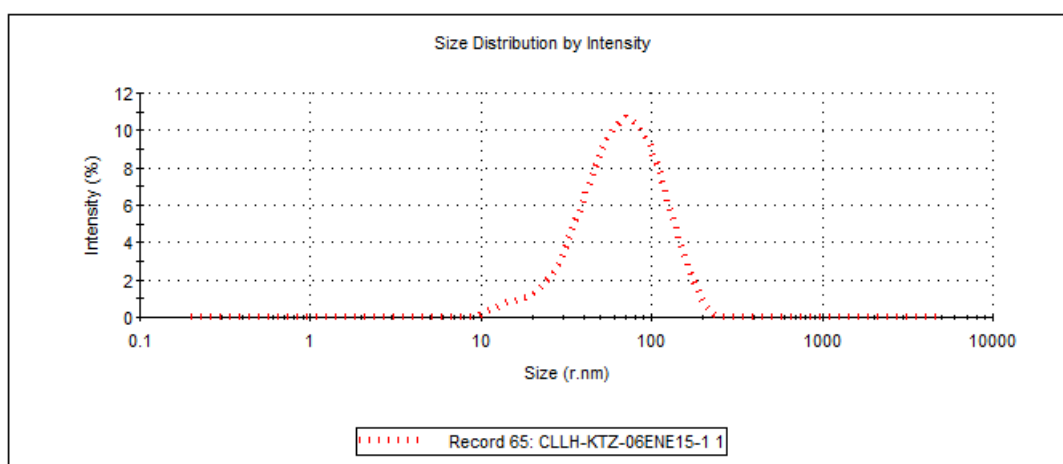
- Tortora, G; Funke, B; Case, C. Introducción a la Microbiología. Editorial Médica Panamericana. Novena edición. Argentina. 2007. pp 613- 630.
- Trejo, S; Dueñas, A; Hernández, G; Nuñez, L; Plascencia, N; Santiago, D; Reynoso, M; Vergara, A; Villalpando, J. Fundamentos de Farmacología. Editorial Trillas. Primera edición. México. 2010. pp 436-453.
- Trommer, H; Neubert, R. 2006. Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. A Review. *Skin Pharmacology and Physiology*. 19: 106-121.
- Tscharnuter, W. Photon Correlation Spectroscopy in Particle Sizing. En Encyclopedia of Analytical Chemistry. Editorial John Wiley & Sons. 2000. pp 5469-5485. Consultado en:  
[http://chenglongresearch.weebly.com/uploads/1/9/9/4/19942735/pcs\\_in\\_particle\\_sizing.pdf](http://chenglongresearch.weebly.com/uploads/1/9/9/4/19942735/pcs_in_particle_sizing.pdf) 16SEP15 12:25 hrs.
- Velasco, A; San Román, L; Serrano, J; Martínez-Sierra, R; Cadavid, I. Farmacología Fundamental. Editorial McGraw-Hill. Primera edición. España. 2003. pp 821-834.
- Vélez, H; Rojas, W; Borrero, J; Restrepo, J. Fundamentos de medicina. Dermatología. Editorial Corporación para investigaciones biológicas. Séptima edición. Colombia. 2009. pp 3-38,72-77,185-191.
- Villareal Carvajal, A.M. 2004. Formulación de una nanoemulsión dermocosmética, nutritiva y regeneradora de la piel. Tesis de maestría. Universidad de los Andes. 142 pp.
- Waldman, S; Terzic, A. Farmacología y terapéutica, Principios para la práctica. Editorial Manual Moderno. Primera edición. México. 2010. pp 179-183.
- Walters, K. Drug Delivery-Topical and Transdermal Routes. En Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Editorial Marcel Dekker, Inc. Segunda edición. EUA, 2002. pp 945-957.
- Winter, 2010. Phase Transitions and Differential Scanning Calorimetry. Overview. Consultado en: <http://www.dartmouth.edu/~pchem/75/pdfs/DSC.pdf> 11SEP15 10:47 hrs.
- Wood, J.H. Pharmaceutical Rheology. En: The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. Lachman, L; Liberman, H.A; Kanig, J.L. Editorial. Lea Febiger. Tercera edición. EUA, 1986. pp 123-144.

- Xu, Q; Trissel, L. Stability-Indicating HPLC Methods for Drug Analysis. American Pharmacists Association. Pharmaceutical Press London, UK. Third Edition. Washinton, D.C., EUA. 2008. pp 448-449.
- Yaghmur, A; Glatter, O. 2009. Characterization and potential applications of nanostructured aqueous dispersions. *Advances in Colloid and Interface Science* 147–148: 333–342.
- Yuksel, N; Kanik, A; Baykara, T. 2000. Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and –independent methods. *International Journal of Pharmaceutics*. 209: 57-67.
- Zhang, W; Liu, L. 2013. Study on the Formation and Properties of Liquid Crystal Emulsion in Cosmetic. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*. 3: 139-144.
- Zhang, Y; Huo, M; Zhou, J; Zou, A; Li, W; Yao, C; Xie, S. 2010. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *The AAPS Journal*. 12(3): 263-271.

## ANEXO

|   |  |
|---|--|
| Sample Name: CLLH-KTZ-06ENE15-1 1           |  |
| SOP Name: Cesarpba.sop                      |  |
| File Name: Trining_2014.dts                 | Dispersant Name: Water   |
| Record Number: 65                           | Dispersant RI: 1.330   |
| Material RI: 1.33                           | Viscosity (cP): 0.8872   |
| Material Absorbtion: 0.000                  | Measurement Date and Time: jueves, 12 de febrero de 2015 02:3... |
| <hr/>                                       |  |
| Temperature (°C): 25.1                      | Duration Used (s): 60  |
| Count Rate (kcps): 353.0                    | Measurement Position (mm): 1.05                                  |
| Cell Description: Disposable sizing cuvette | Attenuator: 3  |
| <hr/>                                       |  |

|                              | Size (r.nm):  | % Intensity | Width (r.nm): |
|------------------------------|---------------|-------------|---------------|
| Z-Average (r.nm): 56.32      | Peak 1: 73.90 | 100.0       | 38.10         |
| PdI: 0.229                   | Peak 2: 0.000 | 0.0         | 0.000         |
| Intercept: 0.950             | Peak 3: 0.000 | 0.0         | 0.000         |
| Result quality : <b>Good</b> |               |             |               |



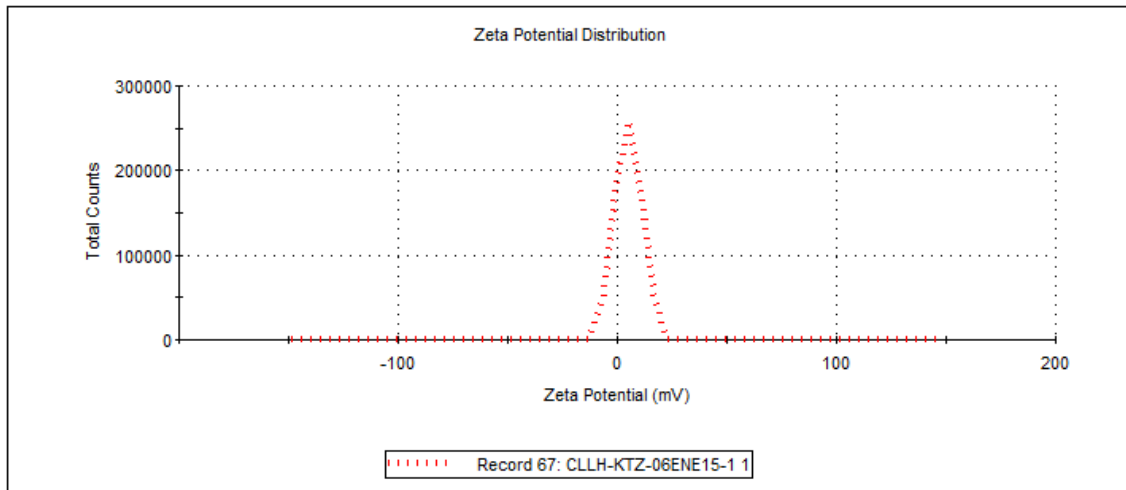
**Figura A.1.** Reporte de Tamaño de Partícula de un Sistema Líquido-Cristalino Cargado con Ketoconazol Obtenido con el Equipo Zeta Sizer Nano Modelo ZS90 (Malvern), mediante el software para nano.APS versión 6.32 Copyrights 2002-2011 Malvern Instruments Ltd.

**Sample Name:** CLLH-KTZ-06ENE15-1 1  
**SOP Name:** cesarZ.sop  
**File Name:** Trining\_2014.dts  
**Record Number:** 67  
**Date and Time:** jueves, 12 de febrero de 2015 02:42:24 ...  
**Dispersant Name:** Water  
**Dispersant RI:** 1.330  
**Viscosity (cP):** 0.8872  
**Dispersant Dielectric Constant:** 78.5

**Temperature (°C):** 25.1  
**Count Rate (kcps):** 184.0  
**Cell Description:** Zeta dip cell  
**Zeta Runs:** 12  
**Measurement Position (mm):** 4.50  
**Attenuator:** 8

|                                     | Mean (mV)           | Area (%) | Width (mV) |
|-------------------------------------|---------------------|----------|------------|
| <b>Zeta Potential (mV):</b> 4.91    | <b>Peak 1:</b> 4.91 | 100.0    | 6.18       |
| <b>Zeta Deviation (mV):</b> 6.18    | <b>Peak 2:</b> 0.00 | 0.0      | 0.00       |
| <b>Conductivity (mS/cm):</b> 0.0521 | <b>Peak 3:</b> 0.00 | 0.0      | 0.00       |

**Result quality :** Good



**Figura A.2.** Reporte de Potencial Zeta de un Sistema Líquido-Cristalino Cargado con Ketoconazol Obtenido con el Equipo Zeta Sizer Nano Modelo ZS90 (Malvern), mediante el software para nano.APS versión 6.32 Copyrights 2002-2011 Malvern Instruments Ltd.

## Data Report

**Sample Information:** Sample Name: CESAR/ CLLH-KTZ-06ENE15-1 T.25

Tester Name: Torque Coefficient: 0.0937300028 Result Notes:  
 Run Time: 03/02/2015 11:43:00  
 Instr. S/N: 8673375  
 Torque Range: LV

**Test Method:** Test Name Cristales liquidos UAM-X

Saved On: 03/02/2015 10:12:00 XAxis: Time Math Model: None Instruction  
 Spindle: CP-40 YAxis: Viscosity Avg. Steps: False  
 # of Steps: 11 Y2Axis: Temperature Avg. Test: False  
 # of Loops: 0 ShowY2: False  
 Use Path: False Result Path:

| Step# | Spd (rpm) | Inc. Spd | Use Tmp | Tmp (C°) | Inc. Tmp | Data Type | Data Intr (sec) | Avr Dur (sec) | Point@ End | End Type | End Value | End Tol. | Density (g/cm3) | QCtype | QCL    | QCH    | In Test Avr. |
|-------|-----------|----------|---------|----------|----------|-----------|-----------------|---------------|------------|----------|-----------|----------|-----------------|--------|--------|--------|--------------|
| 1     | 40        | False    | False   | 25       | False    | Multi     | 60              | 0             | False      | Time     | 180       | 0        | 0.0000          | None   | 0.00 % | 0.00 % | False        |
| 2     | 50        | False    | False   | 25       | False    | Multi     | 60              | 0             | False      | Time     | 180       | 0        | 0.0000          | None   | 0.00 % | 0.00 % | False        |
| 3     | 55        | False    | False   | 25       | False    | Multi     | 60              | 0             | False      | Time     | 180       | 0        | 0.0000          | None   | 0.00 % | 0.00 % | False        |
| 4     | 60        | False    | False   | 25       | False    | Multi     | 60              | 0             | False      | Time     | 180       | 0        | 0.0000          | None   | 0.00 % | 0.00 % | False        |
| 5     | 65        | False    | False   | 25       | False    | Multi     | 60              | 0             | False      | Time     | 180       | 0        | 0.0000          | None   | 0.00 % | 0.00 % | False        |
| 6     | 70        | False    | False   | 25       | False    | Multi     | 60              | 0             | False      | Time     | 180       | 0        | 0.0000          | None   | 0.00 % | 0.00 % | False        |
| 7     | 65        | False    | False   | 25       | False    | Multi     | 60              | 0             | False      | Time     | 180       | 0        | 0.0000          | None   | 0.00 % | 0.00 % | False        |
| 8     | 60        | False    | False   | 25       | False    | Multi     | 60              | 0             | False      | Time     | 180       | 0        | 0.0000          | None   | 0.00 % | 0.00 % | False        |
| 9     | 55        | False    | False   | 25       | False    | Multi     | 60              | 0             | False      | Time     | 180       | 0        | 0.0000          | None   | 0.00 % | 0.00 % | False        |
| 10    | 50        | False    | False   | 25       | False    | Multi     | 60              | 0             | False      | Time     | 180       | 0        | 0.0000          | None   | 0.00 % | 0.00 % | False        |
| 11    | 40        | False    | False   | 25       | False    | Multi     | 60              | 0             | False      | Time     | 180       | 0        | 0.0000          | None   | 0.00 % | 0.00 % | False        |

**Test Data:**

| Loop # | Step # | Point # | Viscosity cP | Speed RPM | Torque (%) | Shear Stress dyn/cm <sup>2</sup> | Shear Rate 1/s | Temperature °C | Bath °C | Time (Sec) |
|--------|--------|---------|--------------|-----------|------------|----------------------------------|----------------|----------------|---------|------------|
| 0      | 1      | 1       | 1.19         | 40.00     | 15.5       | 3.56                             | 300.000        | 25.8           | EEEE    | 00:01:00.0 |
| 0      | 1      | 2       | 1.19         | 40.00     | 15.5       | 3.56                             | 300.000        | 25.8           | EEEE    | 00:02:00.0 |

**Test Data:**

| Loop # | Step # | Point # | Viscosity<br>cP | Speed<br>RPM | Torque<br>(%) | Shear Stress<br>dyn/cm <sup>2</sup> | Shear Rate<br>1/s | Temperature<br>°C | Bath<br>°C | Time<br>(Sec) |
|--------|--------|---------|-----------------|--------------|---------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|------------|---------------|
| 0      | 1      | 3       | 1.20            | 40.00        | 15.8          | 3.59                                | 300.000           | 25.8              | EEEE       | 00:03:00.0    |
| 0      | 2      | 4       | 1.20            | 50.00        | 19.5          | 4.48                                | 375.000           | 25.8              | EEEE       | 00:04:00.0    |
| 0      | 2      | 5       | 1.20            | 50.00        | 19.5          | 4.48                                | 375.000           | 25.8              | EEEE       | 00:05:00.0    |
| 0      | 2      | 6       | 1.20            | 50.00        | 19.5          | 4.48                                | 375.000           | 25.8              | EEEE       | 00:06:00.0    |
| 0      | 3      | 7       | 1.20            | 55.00        | 21.5          | 4.94                                | 412.500           | 25.8              | EEEE       | 00:07:00.0    |
| 0      | 3      | 8       | 1.20            | 55.00        | 21.5          | 4.94                                | 412.500           | 25.8              | EEEE       | 00:08:00.0    |
| 0      | 3      | 9       | 1.20            | 55.00        | 21.5          | 4.94                                | 412.500           | 25.5              | EEEE       | 00:09:00.0    |
| 0      | 4      | 10      | 1.21            | 60.00        | 23.8          | 5.42                                | 450.000           | 25.5              | EEEE       | 00:10:00.0    |
| 0      | 4      | 11      | 1.21            | 60.00        | 23.8          | 5.42                                | 450.000           | 25.5              | EEEE       | 00:11:00.0    |
| 0      | 4      | 12      | 1.21            | 60.00        | 23.8          | 5.42                                | 450.000           | 25.5              | EEEE       | 00:12:00.0    |
| 0      | 5      | 13      | 1.20            | 65.00        | 25.4          | 5.84                                | 487.500           | 25.5              | EEEE       | 00:13:00.0    |
| 0      | 5      | 14      | 1.20            | 65.00        | 25.4          | 5.84                                | 487.500           | 25.5              | EEEE       | 00:14:00.0    |
| 0      | 5      | 15      | 1.20            | 65.00        | 25.5          | 5.88                                | 487.500           | 25.5              | EEEE       | 00:15:00.0    |
| 0      | 6      | 16      | 1.20            | 70.00        | 27.5          | 6.32                                | 525.000           | 25.5              | EEEE       | 00:16:00.0    |
| 0      | 6      | 17      | 1.20            | 70.00        | 27.5          | 6.32                                | 525.000           | 25.5              | EEEE       | 00:17:00.0    |
| 0      | 6      | 18      | 1.20            | 70.00        | 27.5          | 6.32                                | 525.000           | 25.5              | EEEE       | 00:18:00.0    |
| 0      | 7      | 19      | 1.19            | 65.00        | 25.3          | 5.82                                | 487.500           | 25.5              | EEEE       | 00:19:00.0    |
| 0      | 7      | 20      | 1.19            | 65.00        | 25.3          | 5.82                                | 487.500           | 25.5              | EEEE       | 00:20:00.0    |
| 0      | 7      | 21      | 1.19            | 65.00        | 25.2          | 5.79                                | 487.500           | 25.5              | EEEE       | 00:21:00.0    |
| 0      | 8      | 22      | 1.19            | 60.00        | 23.3          | 5.38                                | 450.000           | 25.5              | EEEE       | 00:22:00.0    |
| 0      | 8      | 23      | 1.20            | 60.00        | 23.4          | 5.38                                | 450.000           | 25.5              | EEEE       | 00:23:00.0    |
| 0      | 8      | 24      | 1.20            | 60.00        | 23.4          | 5.38                                | 450.000           | 25.5              | EEEE       | 00:24:00.0    |
| 0      | 9      | 25      | 1.19            | 55.00        | 21.4          | 4.92                                | 412.500           | 25.7              | EEEE       | 00:25:00.0    |

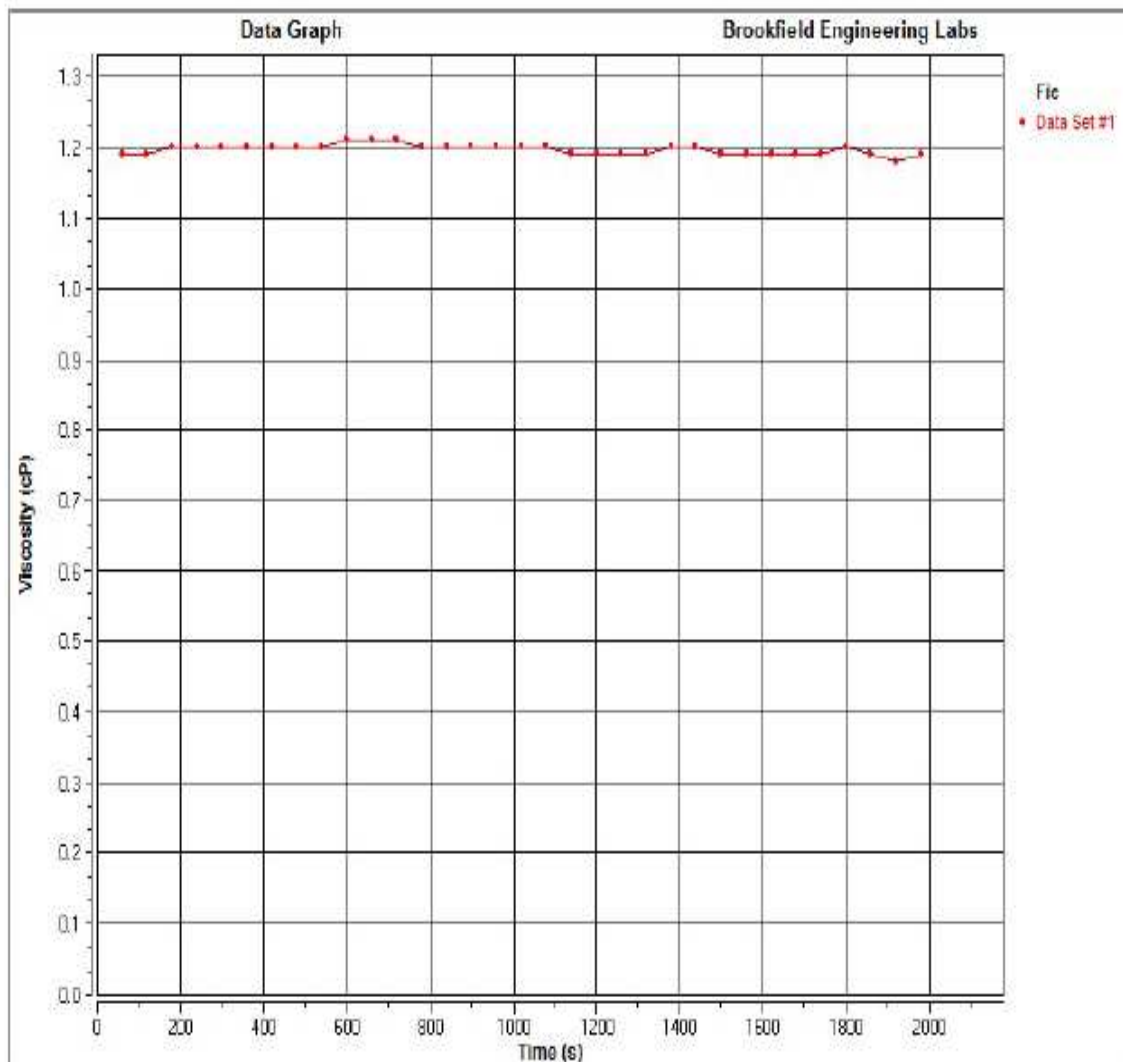


---

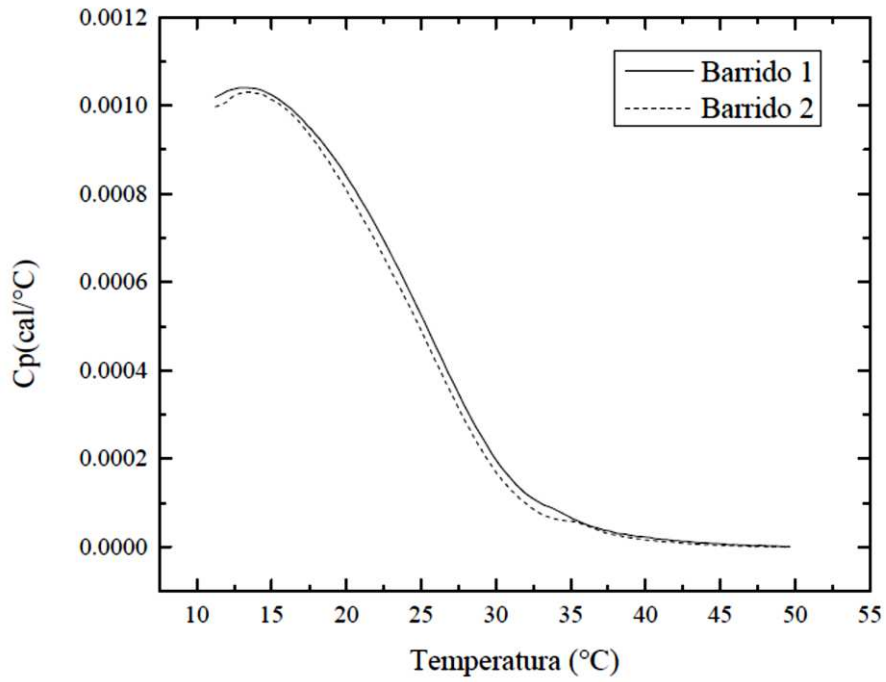
**Test Data:**

| Loop # | Step # | Point # | Viscosity<br>cP | Speed<br>RPM | Torque<br>(%) | Shear Stress<br>dyn/cm <sup>2</sup> | Shear Rate<br>1/s | Temperature<br>°C | Bath<br>°C | Time<br>(Sec) |
|--------|--------|---------|-----------------|--------------|---------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|------------|---------------|
| 0      | 9      | 26      | 1.19            | 55.00        | 21.4          | 4.92                                | 412.500           | 25.7              | EEEE       | 00:26:00.0    |
| 0      | 9      | 27      | 1.19            | 55.00        | 21.4          | 4.92                                | 412.500           | 25.7              | EEEE       | 00:27:00.0    |
| 0      | 10     | 28      | 1.19            | 50.00        | 19.4          | 4.48                                | 375.000           | 25.7              | EEEE       | 00:28:00.0    |
| 0      | 10     | 29      | 1.19            | 50.00        | 19.4          | 4.48                                | 375.000           | 25.7              | EEEE       | 00:29:00.0    |
| 0      | 10     | 30      | 1.20            | 50.00        | 19.5          | 4.48                                | 375.000           | 25.7              | EEEE       | 00:30:00.0    |
| 0      | 11     | 31      | 1.19            | 40.00        | 15.5          | 3.58                                | 300.000           | 25.7              | EEEE       | 00:31:00.0    |
| 0      | 11     | 32      | 1.18            | 40.00        | 15.4          | 3.54                                | 300.000           | 25.7              | EEEE       | 00:32:00.0    |
| 0      | 11     | 33      | 1.19            | 40.00        | 15.5          | 3.58                                | 300.000           | 25.7              | EEEE       | 00:33:00.0    |

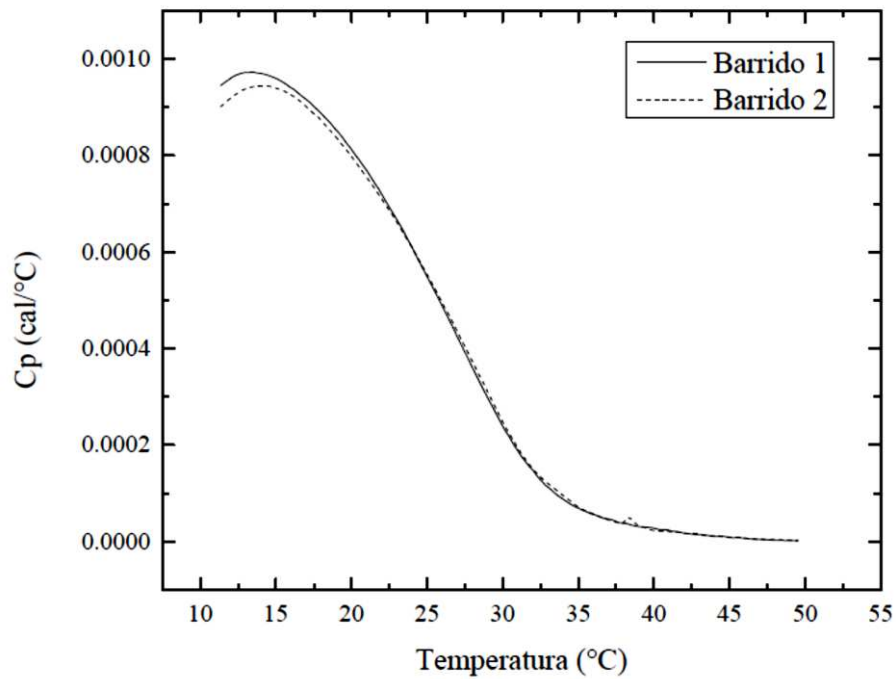
Data Graph:



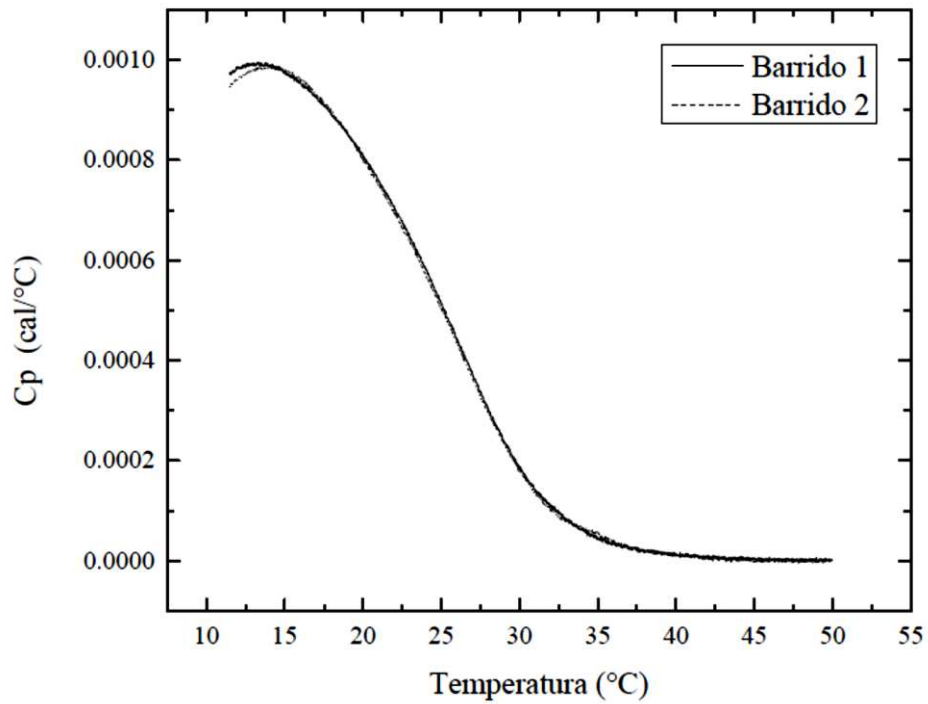
**Figura A.3.** Reporte de Análisis Reológico de un Sistema Líquido-Cristalino Cargado con Ketoconazol Obtenido con el Viscosímetro Modelo DV3TLVCJO (Brookfield), mediante el software Brookfield Rheometer Rheocalc T1.1.13 2013.



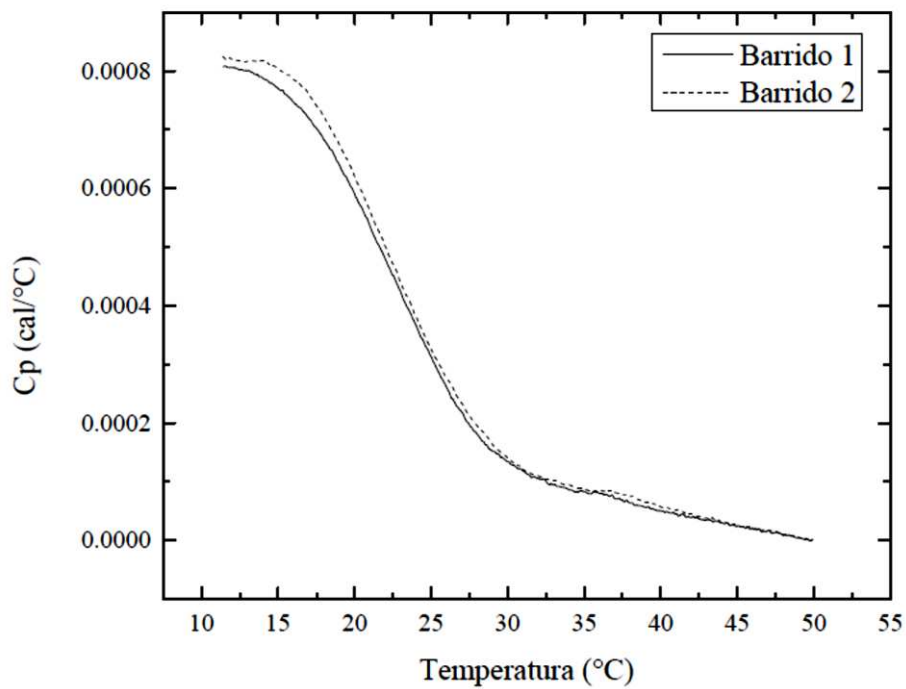
**Figura A.4.** Comportamiento térmico de un sistema CLLH-KTZ a 9 días de su fecha de preparación.



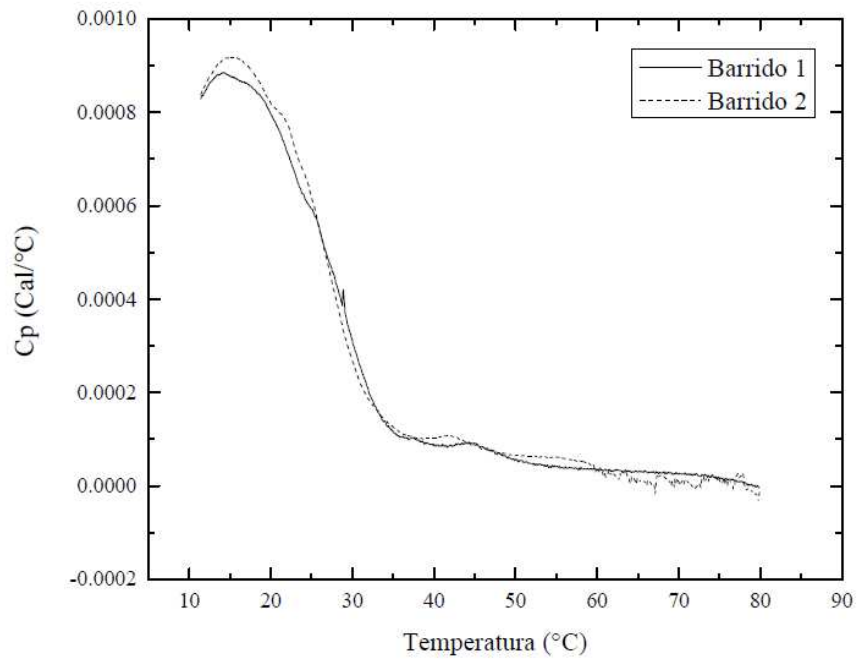
**Figura A.5.** Comportamiento térmico de un sistema CLLH-KTZ a 1 mes de su fecha de preparación.



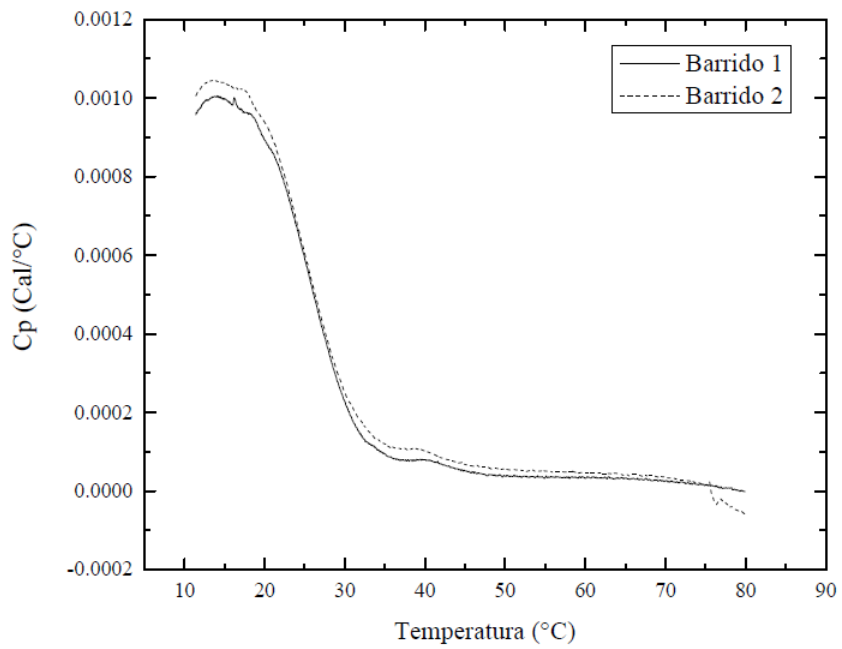
**Figura A.6.** Comportamiento térmico de un sistema CLLH-KTZ a 4 meses de su fecha de preparación.



**Figura A.7.** Comportamiento térmico de un sistema CLLH a 7 meses de su fecha de preparación.



**Figura A.8.** Comportamiento térmico de un sistema CLLH en esquema de 10 a 80 °C.



**Figura A.9.** Comportamiento térmico de un sistema CLLH-KTZ en esquema de 10 a 80 °C.