UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

DISEÑO Y DESARROLLO DE FORMAS FARMACÉUTICAS
PRODUCTOS BIOLÓGICOS

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

"DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICÓTICO DE KETOCONAZOL INCORPORADO EN CRISTALES LÍQUIDOS LIOTRÓPICOS EN *C. albicans*"

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

PRESENTA

IBI. Alfonso Santiago Téllez.
2121801476

Comité Tutoral

Dra. Laura Estela Castrillón Rivera.

Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda.

M en C. Alejandro Palma Ramos.

Julio 2014.

DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICÓTICO DE KETOCONAZOL INCORPORADO EN CRISTALES LÍQUIDOS LIOTRÓPICOS EN *C. albicans*

COMITÉ TUTORAL

Dra. Laura Estela Castrillón Rivera. _____

Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda. _____

M en C. Alejandro Palma Ramos _____

IBI. Alfonso Santiago Téllez 2121801476. _____

DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICÓTICO DE KETOCONAZOL INCORPORADO EN CRISTALES LÍQUIDOS LIOTRÓPICOS EN *C. albicans*

JURADO

PRESIDENTE: Dra. Elizabeth Piñón Segundo. ----------

VOCAL: Dra. María Eugenia Castro Mussot. ----------

SECRETARIO: Dra. Laura E Castrillón Rivera. ----------

RESUMEN

El uso de los cristales líquidos liotrópicos en formulaciones farmacéuticas como sistemas de entrega de fármacos es un campo amplio de investigación, sobre todo en sistemas a escala nanométrica. En este trabajo se muestra el uso potencial como antimicótico de un sistema nanométrico de entrega de fármacos o nanosistema líquido cristalino liotrópico (NSLCL) conteniendo Ketoconazol (KTZ). En general, los sistemas nanométricos cargados con uno o más principios activos buscan imitar o modificar procesos biológicos y pueden brindar soluciones a algunos problemas asociados con la solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y citotoxicidad de muchos fármacos. Se incorporó KTZ en un NSLCL por la similitud de esta mesofase con algunas de las estructuras de la piel, sitio en donde son comunes las micosis y en la que por su natural propiedad de barrera, la difusión y permanencia de los antimicóticos se ve limitada, requiriéndose una terapia concomitante oral y tópica. El NSLCL cargado con el principio activo fue elaborado como una dispersión de tensoactivos en agua, utilizando ultrasonicación.

Se determinó el efecto antimicótico del KTZ incorporado en el NSLCL sobre levaduras de *C. albicans* de la cepa de referencia ATCC 10231, habiéndose comparado esta actividad con el efecto que presentaron muestras del fármaco disuelto en una base lipófila y en una solución metanol-agua. Para el estudio comparativo se realizaron previamente cinéticas de crecimiento de la levadura en caldo dextrosa Sabouraud, utilizando una técnica turbimétrica para determinar la concentración de UFC/ml. Se realizaron ensayos Kirby-Bauer y de vaciado en placa con los diferentes vehículos conteniendo KTZ para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del KTZ y los resultados también se contrastaron con los obtenidos de alícuotas de concentración equivalente, extraídas de formas farmacéuticas comerciales. Para determinar el tamaño de partícula y la morfología del NSLCL, así como comprobar que el KTZ se encontraba dentro de la nanoestructura se utilizó difractometría láser y microscopía electrónica de transmisión (MET), respectivamente.

Los resultados mostraron la formación de una nanoestructura hexosómica que contuvo KTZ en su interior (NSLCL-KTZ), habiendo demostrado tener una mayor potencia antimicótica contra *C. albicans*, con una CMI de 24 µg/ml, comparada con los 40 µg/ml del KTZ disuelto en metanol-agua y de las formas farmacéuticas comerciales.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco a:

La Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco y concretamente a la Coordinación y profesores del programa de Maestría en Ciencias Farmacéuticas

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**), por la beca 423193/269893, para la realización de mis estudios de posgrado.

La Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación (**SECITI**) por el apoyo recibido mediante el proyecto de la División de CBS: Obtención y evaluación de nanomedicinas para resolver problemas de micosis mucocutáneas y prevención de fotodermatosis y cáncer en piel, convenio ICYTDF/153/2013, clave 34611138; para disponer de recursos materiales adicionales para el proyecto de Maestría, así como la presentación de avances en el V Congresso Ibero-Americano de Ciências Farmacéuticas e VIII Conferência Nacional de EducaçàoFarmacéutica. Brasilia, BRASIL. Junio de 2013.

La Ing. Patricia Castillo del Laboratorio Central de Microscopía Electrónica de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, y al M. en C. Jorge Sepúlveda del Laboratorio de Microscopia Electrónica del Edificio de la Ciencia y Tecnología Ambiental de esa misma Unidad, así como al Dr. Fernando García, del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo recibido para la obtención de las distintas imágenes de los sistemas nanoestructurados en estudio.

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Agradezco a mi comité tutoral; la Dra. Laura Castrillón, al M en C Alejandro palma y al Dr. Tomás Quirino por haber confiado en mí, por la paciencia y la dirección de este trabajo así como el apoyo, los consejos y el ánimo en todo el proceso de elaboración de esta Tesis.

A la Ing. Adriana Avalos Hernández (Ally), quien me acompañó en la aventura que significó la maestría y que, de manera incondicional me brindó su apoyo y entendió mis malos momentos.

Gracias también a mis queridos amigos y compañeros, que me apoyaron y me permitieron entrar en su vida durante estos años de convivir dentro y fuera del salón de clase.

A toda mi familia por comprender las largas ausencias, que a pesar de la distancia siempre estuvo atenta para saber cómo iba mi proceso.

A los QFB. José de Jesús Juárez y Juan Ramírez del Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada de la UAM-Xochimilco, por todo el apoyo. Y a todas las personas que de alguna forma han influido en mi vida académica.

Y gracias a la vida por la oportunidad de concluir este viaje y por el horizonte que abre.

Gracias a todos.

Dedicato a tutti quelli che stanno aspettando.
Forti e degni.

INDICE

Pag.

Abreviaturas. **12**

Reactivos. **13**

Índice tablas. **14**

Índice de imágenes. **15**

Índice de gráficas. **16**

Índice de figuras. **17**

Introducción. **18**

Marco teórico.

1.1 Micosis. **21**

1.1.2 Clasificación de las micosis. **22**

1.1.3 Epidemiología. **23**

1.2 Hongos. **24**

1.3 Candidiasis. **25**

1.4 Candida. **26**

1.4.1 Patogénesis de C. albicans. **28**

1.5 Antimicóticos. **30**

1.5.1 Azoles. **32**

1.6 Ketoconazol. **33**

1.6.1 Farmacocinética del Ketoconazol. **34**

2. Estrategias para el tratamiento de las micosis: nanotecnología. **35**

2.1 Nanoacarreadores. **37**

*2.2 Tipos de Nanoacarreadores de interés tópico y/o transdérmico***.** **39**

2.2.1 Nanopartículas poliméricas. **39**

2.2.2 Nanopartículas inorgánicas. **40**

2.2.3 Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). **40**

2.2.4 Complejos nanométricos de ciclodextrinas. **41**

2.2.5 Niosomas. **42**

2.2.6 Nanoemulsiones. **42**

2.2.7 Dendrímeros. **43**

2.2.8 Liposomas. **43**

3. Cristales líquidos liotrópicos. **45**

Planteamiento del problema. **49**

Hipótesis y Objetivos. **51**

Metodología.

1. Reproducción y caracterización de un NSLCL conteniendo Ketoconazol **54**

1.1 Reproducción del NSLCL. **54**

1.2 Determinación del tamaño de partícula. **55**

1.3 Microscopía electrónica de transmisión (MET). **55**

1.3.1 Análisis elemental. **55**

1.3.2 Morfología. **57**

2. Evaluación del efecto antimicótico del KTZ incorporado en un NSLCL y comparación contra KTZ en solución y en base lipófila. **57**

2.1 Sensibilidad de la cepa *C albicans* ATCC10231 al Ketoconazol. **58**

2.2 Determinación de la CMI de Ketoconazol[a] en solución. **58**

2.3 Determinación de la CMI por vaciado en placa de Ketoconazol en solución. **58**

2.4 Determinación de la CMI de Ketoconazol en base lipófila y NSLCL. **59**

3. Desarrollo de un método de cuantificación de levaduras por turbimetría Mediante la adaptación del nefelómetro de McFarland. **60**

4. Determinación mediante el método de microdilución en caldo de la CMI en *Candida albicans* del NSLCL conteniendo Ketoconazol y comparación contra la CMI de Ketoconazol en solución. **62**

5. Comparación del efecto inhibitorio del Ketoconazol incorporado en NSLCL con el de formas farmacéuticas comerciales. **63**

5.1 Determinación del efecto antimicótico de formas farmacéuticas comerciales con Ketoconazol por el método Kirby-Bauer**.** **63**

5.2 Determinación del efecto antimicótico de formas farmacéuticas comerciales con Ketoconazol por el método de microdilución en caldo**.** **63**

6. Determinación por microscopía electrónica de transmisión (MET) el efecto de NSLCL/KTZ sobre la morfología de las levaduras de *C. albicans.* **64**

Resultados

1. Reproducción y caracterización de un NSLCL conteniendo Ketoconazol **67**

1.1 Reproducción del NSLCL. **67**

1.2 Determinación del tamaño de partícula. **68**

1.3 Microscopía electrónica de transmisión (MET). **69**

1.3.1 Análisis elemental. **69**

1.3.2 Morfología. **71**

2. Evaluación del efecto antimicótico del KTZ incorporado en un NSLCL y comparación contra KTZ en solución y en base lipófila. **72**

2.1 Sensibilidad de la cepa *C albicans* ATCC10231 al Ketoconazol. **71**

2.2 Determinación de la CMI de Ketoconazol[a] en solución. **73**

2.3 Determinación de la CMI por vaciado en placa de Ketoconazol en solución. **74**

2.4 Determinación de la CMI Ketoconazol en base lipófila y NSLCL. **76**

3. Desarrollo un método de cuantificación de levaduras por turbimetría mediante la la adaptación del nefelómetro de McFarland. **78**

4. Determinación mediante el método de microdilución en caldo de la CMI en *Candida albicans* del NSLCL conteniendo Ketoconazol y comparación contra la CMI de Ketoconazol en solución. **81**

5. Comparación del efecto inhibitorio del Ketoconazol incorporado en NSLCL con el de formas farmacéuticas comerciales. **87**

5.1 Determinación del efecto antimicótico de formas farmacéuticas comerciales con Ketoconazol por el método Kirby-Bauer**.** **87**

5.2 Determinación del efecto antimicótico de formas farmacéuticas comerciales con Ketoconazol por el método de microdilución en caldo**.** **89**

6. Determinación por microscopía electrónica de transmisión (MET) el efecto de NSLCL/KTZ sobre la morfología de las levaduras de *C. albicans.* **93**

Discusión. **94**

Conclusiones. **98**

Perspectivas del proyecto. **99**

Bibliografía. **100**

Anexos **107**

Abreviaturas

KTZ	Ketoconazol.
NS	Nano sistema.
CLL	Cristal Líquido Liotrópico.
NSLCL	Nano sistema líquido cristalino liotrópico.
SB	Medio de cultivo Dextrosa Sabouraud.
ml	Mililitro.
UFC/ml	Unidades formadoras de colonias por mililitro.
CMI	Concentración mínima inhibitoria.
abs	Absorbancia.
nm	Nanómetro
µg	Microgramo.
mg	Miligramo.
h	Hora.
MET	Microscopía electrónica de transmisión.
DLS	Difractometría de luz láser.
rpm	Revoluciones por minuto.
°C	Grados Celsius.
kV	Kilovolts.
Ø	Diámetro.

Reactivos

a. Ketoconazol: Ketoconazol calidad farmacéutica, distribuido por Química LUFRA, S. A.
b. Agua desmineralizada (AGUAM, UAM-Xochimilco).
c. Nizoral® tabletas, Janssen-Cilag, S.A. de C.V.Lote TGE180, Febrero 2013.
d. Nizoral® suspensión, Janssen-Cilag, S.A. de C.V. Lote THE 053, Junio 2013.
e. Glicéridos de lauroil macrogol-32 (Gelucire® 44-14, Gattefossé; Químicos Lyontec, S. de R.L. de C.V.).
f. Glicéridos de estearoil macrogol-32 (Gelucire® 50-13, Gattefossé; Químicos Lyontec, S. de R.L. de C.V.).
g. Monolinoleato de glicerilo (Maisine® 35-1, Gattefossé; Químicos Lyontec, S. de R.L. de C.V.).
h. Monooleato de glicerilo (Peceol®, Gattefossé; Químicos Lyontec, S. de R.L. de C.V.).
i. Poloxámero 407 (Pluronic® F127; Sigma-Aldrich Química, S. de R.L. de C.V.).
j. Propilenglicol monolaureato (Lauroglycol® 90, Gattefossé; Químicos Lyontec, S. de R.L. de C.V.).

Índice de tablas

Pag

Tabla 1. Clasificación de las micosis según la OMS. 23

Tabla 2. Clasificación general de los fármacos antifúngicos. 30

Tabla 3. Número de muestras y concentración de Ketoconazol. 54

Tabla 4. Concentraciones de Ketoconazol[a] (KTZ) en agar dextrosa Sabouraud. 59

Tabla 5. Porcentaje de agar en el medio de cultivo. 60

Tabla 6. Concentraciones de Ketoconazol[a] analizadas en cinéticas de crecimiento. 62

Tabla 7. Concentraciones de Ketoconazol [c, d] comparadas en cinéticas de crecimiento. 64

Tabla 8. Tratamientos para microscopía electrónica de transmisión. 65

Tabla 9. Tamaño de partícula NSLCL. 68

Tabla 10. Prueba de sensibilidad a Ketoconazol. 73

Tabla 11. Resumen de resultados del ensayo Kirby-Bauer KTZ en solución. 74

Tabla 12. Resultados del ensayo de inhibición de *C. albicans* en cilindro/placa. 75

Tabla 13. Resultados de la prueba Kirby-Bauer de NSLCL. 77

Tabla 14. Halos de inhibición del ensayo cilindro/placa base lipófila y NSLCL. 78

Tabla 15. Nefelómetro con levaduras de *C. albicans* ATCC10231. 80

Tabla 16. Tabla de valores de concentración de levaduras en presencia de KTZ. 82

Tabla 17. Diámetros de áreas de inhibición de medicamentos comerciales[c,d]. 88

Índice de imágenes

Pág.

Imagen 1. Microfotografías de cristales líquidos liotrópicos. 47

Imagen 2. Reporte de análisis de tamaño de partícula DLS. 56

Imagen 3. Lotes de NSLCL en proceso de diálisis. 67

Imagen 4. NSLCL cargado con KTZ disuelto en medio de cultivo SB. 67

Imagen 5. Microfotografía NSLCL/ acetato de uranilo. 71

Imagen 6. Microfotografía MET en portaobjetos criogénico. 72

Imagen 7. Fotografía sensibilidad de *C. albicans* ATCC10231 a Ketoconazol. 73

Imagen 8. Resultado del ensayo Kirby-Bauer con KTZ en solución. 74

Imagen 9. Ensayo de inhibición por vaciado en placa. 75

Imagen 10 Comparación del efecto inhibitorio del NSLCL y discos de Referencia 76

Imagen 11 Ensayo cilindro/placa con agar al 1.2% NSLCL sobre *C. albicans.* 77

Imagen 12. Cuenta estándar de levaduras de *C. albicans.* 79

Imagen 13. Ensayo Kirby-Bauer tabletas con Ketoconazol 200 mg. 87

Imagen 14. Ensayo Kirby-Bauer suspensión oral con Ketoconazol 2%. 88

Imagen 15. Microfotografías de levaduras de *C. albicans* en presencia de diferentes concentraciones de Ketoconazol en NSLCL. 93

Índice de gráficas

pág.

Gráfica 1. Curva tipo que relaciona la turbidez (absorción) con UFC/ml de levaduras de *C. albicans* ATCC102. 80

Gráfica 2. Curva de crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231. 81

Gráfica 3. Cinéticas de inhibición de KTZ sobre levaduras de *C.albicans.* 83

Gráfica 4. Cinética de de inhibición del KTZ en NSLCL a diferentes concentraciones. 84

Gráfica 5. Cinética de de inhibición del KTZ en NSLCL fase exponencial. 85

Gráfica 6. Cinética de inhibición NSLCL en *C.albicans* de diferentes lotes. 86

Gráfica 7. Efecto inhibitorio de Nizoral tabletas en el crecimiento de *C. albicans*. 90

Gráfica 8. Efecto inhibitorio de Nizoral suspensión oral en el crecimiento de *C.albicans*. 91

Gráfica 9. Efecto inhibitorio de KTZ incorporado en diferentes vehículos en el crecimiento de *C.albicans.* 92

Índice de figuras

Pag

Figura 1. Cronología de la aparición de algunos antimicóticos. **31**

Figura 2. Ruta de síntesis del ergosterol en la célula fúngica. **34**

Figura 3. Estructura química del Ketoconazol. **34**

Figura 4. Diagrama de flujo de la elaboración de la curva patrón con el nefelómetro McFarland. **58**

Figura 5. Difractogramas de NSLCL. **69**

Figura 6. Espectro de masas para Ketoconazol[a] **70**

Figura 7. Espectro de masas del lote N1 de NSLCL-KTZ. **70**

Introducción

La creciente incidencia de las infecciones causadas por hongos se ve reflejada en un mayor empleo de antifúngicos sistémicos. La importancia de las micosis también se puede observar en las grandes cifras de ventas y aunque en México no hay cifras concretas disponibles, en países como España por ejemplo, entre junio de 2011 y mayo de 2012 se vendieron en las farmacias españolas un total de 19.5 millones unidades de antimicóticos [6].

Las micosis en piel y uñas es uno de los problemas de salud pública, a los que se enfrentan tanto individuos que no procuran una adecuada higiene o se exponen a la exposición por hongos en sitios de alta concurrencia y humedad, como son las piscinas y baños de balnearios, como los pacientes inmuno suprimidos, entre éstos, los pacientes con VIH-SIDA y los diabéticos.

La farmacoterapia antimicótica actual para piel y uñas, particularmente en casos recurrentes o crónicos, requiere de la administración simultánea de dosis orales y tópicas, no estando exenta de problemas de seguridad y toxicidad asociados a la farmacocinética y metabolismo de la dosis sistémica del fármaco, a los que se añaden los relativos a fenómenos de resistencia microbiana. Esto mantiene vigente la necesidad de profundizar en el desarrollo de nuevos antimicóticos, así como en la de disponer de mejores sistemas de entrega de fármacos que aporten ventajas apreciables respecto a los ya existentes, eludiendo o modificando la propiedad de barrera natural de la piel, para optimizar la difusión y/o permanencia de los antimicóticos en el sitio de acción.

Bajo este contexto, en el Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada de la UAM-Xochimilco, se planteó obtener un nanosistema líquido cristalino liotrópico (NSLCL) con capacidad de carga y transporte de KTZ, para su posterior difusión y permanencia en el estrato córneo y las primeras capas de la piel. Lo anterior teniendo como base la similitud de las mesofases líquido cristalinas cubosómicas y hexosómicas con algunas de las estructuras de la piel en donde son comunes las micosis.

La preparación del NSLCL cargado con KTZ (NSLCL-KTZ) consistió en la dispersión de una mezcla de tenso-activos y KTZ en agua, utilizándose ultrasonido de alta intensidad para conseguir la talla nanométrica, aprovechando el fenómeno de cavitación [85].

En este proyecto se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC), del KTZ incorporado en el NSLCL sobre levaduras de la cepa de referencia *C. albicans* ATCC1023 comparándola con la CMI del KTZ incorporado en una base lipófila, en una solución metanol-agua y en alícuotas equivalentes de dos formas farmacéuticas comerciales (tabletas y suspensión). Estos ensayos se realizaron en el Laboratorio de Inmunología de la UAMX.

Se utilizaron las técnicas: Kirby-Bauer, vaciado en placa y cilindro-placa, evaluándose la cinética de crecimiento de la cepa de referencia en medio líquido, cuando crece en presencia de KTZ incorporado en el NSLCL-KTZ, en solución, y con las alícuotas equivalentes de las dos formas farmacéuticas comerciales utilizadas para fines comparativos en este estudio.

Para medir la concentración de levaduras en el medio de cultivo, se utilizó una técnica por espectrofotometría estandarizada para levaduras, con este ensayo se determinó y comparó el efecto antimicótico del KTZ incorporado en los diferentes vehículos.

Se realizaron estudios de distribución de tamaño de partícula por difractometría láser y de la morfología y presencia del KTZ en las nanopartículas líquido cristalinas, por MET.

Las técnicas microbiológicas utilizadas sobre levaduras de *C. albicans* condujeron a la observación de que cuando el KTZ se encuentra dentro de los nanocristales líquidos liotrópicos, existe un aumento en el efecto antimicótico que hace concluir que el uso de dichos nanoacarreadores como sistema de entrega de fármacos, es una alternativa que puede reducir los efectos adversos del KTZ cuando éste es utilizado con una farmacoterapia conjunta vía oral y tópica.

Marco teórico

1. Marco teórico

1.1 Micosis

Una micosis es una enfermedad causada por hongos microscópicos, habitualmente en la piel. En ésta, así como en la boca, el intestino y los órganos sexuales, los hongos y levaduras conviven normalmente y de forma natural con otros microorganismos. Cuando hay una proliferación exagerada de los hongos se produce la micosis.

Las enfermedades micóticas en el hombre fueron descritas desde el siglo XVII, pero el estudio de las micosis cedió ante el creciente interés por las infecciones bacterianas. Un siglo después, al disponer la humanidad de medios para controlar los anteriores procesos infecciosos, las micosis resurgieron como agentes de especial importancia clínica. A este aumento contribuyeron los avances que permiten la supervivencia de pacientes debilitados y que alteran con algún propósito el ambiente inmunológico del individuo; además, el que en las últimas décadas se haya presentado la pandemia del SIDA. Todo lo anterior ha incrementado la incidencia y severidad de las micosis [1].

La capacidad de los hongos para producir enfermedad es puramente accidental y no está ligada a la necesidad de mantener la especie, salvo en los casos de los dermatofitos en los cuales la adaptación a los humanos ha sido completa. La localización de las micosis en el organismo humano refleja capacidades de variada naturaleza; así los dermatofitos atacan la piel porque poseen enzimas capaces de digerir la queratina. Los hongos que causan micosis subcutáneas tienen restricciones de penetración al tejido y por ello deben tener acceso al sitio de infección por implantación traumática; los agentes causales de las micosis sistémicas son saprófitos del medio externo en donde crecen como mohos, pero al encontrarse en los tejidos, se vuelven termotolerantes, colonizan el órgano blanco y se diseminan ampliamente [1,2].

1.1.2 Clasificación de las micosis

Las micosis han sido clasificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) según su el lugar de infección en el cuerpo humano. En la tabla 1 se resume la clasificación de las micosis según esta organización y también se muestran algunos agentes infecciosos y las patologías que producen; en este sentido, las micosis se han dividido en cuatro categorías según el sitio en que se localizan [3,4].

Las micosis superficiales son infecciones por diferentes especies de hongos que se localizan en el epitelio o capa más externa de las mucosas, piel y uñas. La piel es el órgano más extenso del cuerpo y su principal función es proteger contra cambios de temperatura, lesiones e infecciones. Las características de la piel (grosor, textura, presencia de pelo) no son uniformes en todo el cuerpo. Muchos de los hongos se encuentran en el suelo o en animales como perros, y son principalmente los dermatofitos, la causa de tiñas o infecciones en la piel, pelo y uñas [2].

Micosis subcutáneas se presentan mayormente en regiones tropicales y subtropicales donde las personas caminan descalzas pueden producirse infecciones por hongos saprófitos de las plantas, los musgos o el suelo. La penetración de estos hongos a través de los cortes y abrasiones de la piel da lugar a la formación de una lesión primaria localizada. En la esporotricosis puede verse afectado también el sistema linfático, pero la diseminación hemática es rara [5].

Las micosis sistémicas agrupan todas aquellas afecciones cuyo agente etiológico es capaz de diseminarse por vía linfohemática en algún momento de su evolución. Son graves, incluso potencialmente mortales. En las micosis oportunistas cualquier órgano puede resultar afectado. Son poco frecuentes en personas con un sistema inmunitario normal. Al tratarse de microorganismos oportunistas, es fácil que estas patologías las padezcan pacientes muy debilitados que tengan alterados sus mecanismos de defensa frente a las infecciones (pacientes en tratamiento con quimioterapia, enfermos de VIH-SIDA) [6].

Tabla 1. Clasificación de las micosis según la OMS.

Micosis	Características	Hongo	Patología
Superficiales	-Muy frecuentes - Distribución geográfica amplia - Infección por contacto directo	*Malassezia furtur*	Pitriasis versicolor
Subcutáneas	- Son relativamente frecuentes. - Su distribución geográfica se restringe principalmente a zonas rurales. - La infección generalmente es adquirida por lesiones en la piel. - Se consideran como infecciones de tipo ocupacional. - Son de difícil curación.	*Tricophyton, Microsporum , Candida albicans, Sporothrix schenkii*	Dermatofitosis Candidiasis muco cutánea Esporotricosis
Sistémicas	- Poco frecuentes. - Distribución geográfica restringida principalmente a zonas endémicas. - Infección por inhalación. - Son de difícil curación.	*Blastomyces dermatitides* *Coccidiodes inmitis* *Hytoplasma capsulatum* *Paracoccidiodes brasilensis*	Blastomicosis Coccidiodimicosis Histoplasmosis Paracoccidiodimicosis
Oportunistas	- Muy frecuentes. - Distribución geográfica amplia. - Infección por contacto directo, traumatismo cutáneo o inhalación.	*Crypotococcus neoformans* Especies de *Mucor y Rhisopus*	Criptococosis Cigomicosis

Fuente: Tomado y modificado de [3,4]. Las micosis han sido clasificadas en cuatro clases según su sitio de infección. La tabla muestra las características de las micosis así como las patologías y agentes causales de algunas micosis.

1.1.3 Epidemiología

Las dermatofitosis son micosis superficiales muy frecuentes en México. Actualmente constituyen del 70 al 80% de todas las micosis y tienen una frecuencia del 5% en la consulta dermatológica [7].

Aunque la demanda de atención médica no es tan grande como su prevalencia, las dermatofitosis son frecuentes en adultos. En el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) cada año se registran unas 507,849 consultas en medicina familiar, 9,745 en urgencias y 19, 404 en especialidad [2]. La importancia de las micosis superficiales es su alta prevalencia, ya que una gran cantidad de la población adulta las padece en sus diferentes variedades. La tiña *corporis* se presenta más frecuentemente en climas tropicales húmedos calientes. *Trichophyton rubrum* es el agente infeccioso más común en el mundo y es la causa de 47% de los casos de tiña *corporis* y el *Microsporum canis* es la tercera causa asociada al 14% de esta tiña.

Por otra parte, *T. tonsurans* es el agente más común de tiña *capitis*. Ésta es causada tanto por especies del género *Trichophyton* como por el *Microsporum* es la dermatofitosis más común en niños a nivel mundial. Las dermatofitosis no se asocian a mortalidad importante, pero pueden afectar la calidad de vida. En general, ambos sexos y todas las edades son afectados por igual. Por ejemplo, la onicomicosis es la primera causa de enfermedad ungueal ya que corresponde del 18 al 40% de todas las onicopatías. Su prevalencia mundial se estima de 1 a 11%, mientras que en México es la segunda dermatofitosis después de la tiña *pedis* [2,8].

Otras micosis de gran importancia son las que afectan la mucosa vaginal. La micosis vaginal afecta al 70-75% de las mujeres al menos una vez en la vida, y la mitad de ellas sufre la infección más de una vez. Esta condición se da más frecuentemente en mujeres jóvenes. La *Candida* (sobre todo, *albicans*) es la causa más común de infección micótica vaginal. La candidiasis urogenital tiene una incidencia de aproximadamente 300 mil casos nuevos cada año y ocupa el 13º lugar de los padecimientos en México en todas las unidades de salud pública [8].

1.2 Hongos

El término hongo (del latín, fungus, seta), incluye una gran variedad de tipos celulares con diferentes formas, simples y complejos, móviles o inmóviles, parásitos, simbiontes o saprófitos, microscópicos o macroscópicos. Son organismos eucariontes, heterótrofos, poseen una pared rígida generalmente de quitina. Los hongos presentan una morfología muy variada. La única célula o el conjunto de células que los constituyen se denominan talo. En la naturaleza pueden encontrarse formas simples como las levaduras, formas filamentosas multinucleadas o formas macroscópicas más complejas [9]. La mayoría de las especies crece por la continua extensión y bifurcación de estructuras como las ramas de los árboles. Los hongos crecen como células únicas, levaduras, o como colonias multicelulares filamentosas, mohos y setas [10].

La diferenciación en los hongos se refiere a la serie de eventos regulados que conducen al cambio de un estado a otro en un organismo. Estos cambios pueden ser morfológicos, fisiológicos o ambos. Algunas especies de hongos

crecen sólo como mohos y otras únicamente como levaduras. Sin embargo, muchas especies pueden crecer de una u otra forma, dependiendo de las condiciones ambientales. Esta capacidad se conoce como dimorfismo. Esto es importante clínicamente, porque la mayoría de los hongos patógenos en el hombre son dimórficos [10].

La germinación de esporas, el dimorfismo y la producción de metabolitos secundarios son ejemplos de diferenciación. Se dice que un hongo es pleomórfico cuando posee la capacidad de presentarse en dos o más formas. El dimorfismo micelio-levadura es un tipo especial de pleomorfismo que tienen algunos hongos patógenos. Estos pueden cambiar de forma miceliar o levaduriforme y viceversa en respuesta a un único factor, a diferentes factores o bien a factores combinados. El mecanismo bioquímico que justifica el fenómeno para un hongo no necesariamente es aplicable para otro [9, 11].

1.3 Candidiasis

La candidiasis es una micosis causada por diversas especies de levaduras del género *Candida*. Cualquier tejido puede ser afectado por lo que se presentan diversos cuadros clínicos, cada uno de ellos asociado directamente al estado inmunológico del paciente. Las candidiasis de mucosas y piel son las más frecuentes, mientras que las sistémicas son de evolución aguda o crónica y generalmente severas.

Las candidiasis superficiales son frecuentes, de fácil tratamiento y no atentan contra la vida del paciente, en tanto que las sistémicas de evolución aguda o crónica son generalmente graves. La distribución geográfica de esta micosis es universal y más de 70 % de ellas son producidas por *C. albicans*. Los casos de candidiasis sistémica están relacionados a pacientes con severas deficiencias en su sistema inmune. *C. krusei* y *C. glabrata* son habitualmente resistentes a los compuestos azólicos y su hallazgo como agentes infecciosos involucrados en enfermedades sistémicas intrahospitalarias ha aumentado en los últimos años [12].

Los casos registrados de candidiasis muestran que el sexo es indistinto, a excepción de la candidiasis urogenital que tiene mayor incidencia en el sexo

femenino. La edad y raza de las personas son factores que, según la clínica, no influyen en la presentación de la micosis, la cual realmente dependerá del factor de inmunocompromiso asociado; sin embargo, por lo que respecta a la ocupación aunque no es un factor de importancia, se considera que algunas actividades de las personas pueden favorecer la infección.

En México, la candidiasis urogenital es una entidad nosológica que afecta principalmente al sexo femenino. En 2009 tuvo un índice mujer-hombre de 31.5 y se enfocó en el grupo etario de 25 a 44 años. Presentó una tasa de incidencia por cien mil habitantes a nivel nacional de 269.1, y las entidades más afectadas por este padecimiento fueron Nayarit con 504.3 casos por cien mil habitantes, seguido de Veracruz (503.8) y Zacatecas (483.5); la menos afectada fue el DF con una tasa anual de incidencia de 98.3 por cien mil habitantes [11, 12].

Por otro lado, la candidiasis urogenital es el décimo tercer padecimiento en el país según estadísticas de los servicios de salud pública. Los agentes patógenos de la candidiasis son levaduras (el estado anamorfo) del género *Candida* pertenecientes al *Phylum Ascomycotina*. Muchas especies se han aislado de vegetales, suelo, agua, aire, alimentos y algunas de ellas forman parte de la biota normal de la piel y membranas mucosas (boca, vagina, vías respiratorias altas, tracto gastrointestinal) de mamíferos. Este género incluye aproximadamente 150 especies identificadas. Aunque se han reportado más de 17 especies patógenas, el 90% de las infecciones se atribuyen a: *C. albicans, C. krusei, C. glabrata, C. parasilopsis, C. tropicalis* [13].

1.4 Candida

Candida albicans es un hongo patógeno oportunista de humanos que en individuos inmunocompetentes forma parte de la flora normal de las mucosas del organismo. Sin embargo, en condiciones de inmunosupresión temporal o permanente puede causar infecciones sistémicas que ponen en riesgo la vida de los pacientes [14].

Candida spp. son levaduras mitospóricas alargadas o ligeramente redondas de 2 a 6 µm [15, 16] que se reproducen por gemación (blastoconidios). A

excepción de *C. glabrata,* el resto de las especies asociadas a candidiasis pueden formar seudomicelios; *C.albicans* y *C.dubliniensis* además son formadoras de hifas. Las especies de *Candida* son organismos eucariontes, levaduriformes, unicelulares, asexuales, aerobios, heterótrofos; son muy versátiles debido a su dualidad para sobrevivir como comensales en varios sitios anatómicos (tracto gastrointestinal, genitourinario y regiones mucocutáneas), y por su capacidad oportunista para volverse patógenas, causando desde infecciones cutáneas leves hasta infecciones sistémicas fatales, debidas estas últimas a la presencia de factores de riesgo en el hospedero [17].

La pared celular de *C. albicans* está compuesta por una capa interna de β-glucanas y quitina y una externa de manoproteínas. Estas últimas son proteínas que están modificadas, ya sea con glicolípidos en el extremo C-terminal y/o con oligosacáridos [18].

C. albicans es un hongo polimórfico debido a que puede presentar morfología levaduriforme o bien, crecer como hongo filamentoso formando hifas verdaderas. Algunas hifas, denominadas seudohifas, presentan constricciones a intervalos regulares, como si se tratara de una cadena formada por células con forma de salchicha que se unieran por sus extremos, y se forman cuando las células de levaduras y su progenie de adhieren entre sí y forman estas cadenas. Se considera un comensal oportunista que existe como parte de la microbiota del área mucocutánea, gastrointestinal y genitourinaria en el ser humano sano, y coloniza las membranas mucosas en el 30 a 60 % de las personas. Bajo ciertas condiciones y en el hospedero susceptible, es capaz de causar infecciones superficiales y sistémicas, siendo el principal hongo patógeno del ser humano [19].

1.4.1 Patogénesis de *C. albicans*

Como ya se mencionó, la *Candida albicans* es una levadura común, comensal en animales y humanos y es el principal patógeno oportunista de los mismos, siendo causante de la candidiasis en huéspedes inmunodeprimidos. Este hongo coloniza superficies mucocutáneas de las cavidades oral y vaginal, así como del aparato gastrointestinal. La naturaleza y la medida del deterioro de las defensas del huésped influyen en la manifestación y severidad de la infección. Con frecuencia, *Candida spp*. se encuentra presente en las mucosas normales, pero cuando se hace invasiva produce diversas lesiones agudas o crónicas, localizadas o ampliamente diseminadas [20].

Los hongos *C. albicans* y los dermatofitos tienen características especiales que les confieren la capacidad de infectar tejido queratinizado. *C. albicans* es un comensal que en algunas circunstancias y en el hospedero susceptible es capaz de causar infecciones superficiales o sistémicas. Los factores de virulencia de este patógeno oportunista incluyen: su capacidad de adherencia a células del hospedero, la secreción de enzimas degradativas, su cambio de morfología y la formación de biopelículas. La vaginitis por *Candida spp*, es frecuente en la mujer y se caracteriza por ardor, comezón, flujo e inflamación de la vagina. Otra infección ginecológica causada por *C. albicans* es la peritonitis pélvica. [21]

La candidiasis sistémica es una micosis oportunista causada por diversas especies del género *Candida spp*, su nivel de profundidad o agresividad no depende tanto del agente etiológico en sí, sino del factor de riesgo con el que se asocie. La candidiasis invasiva es una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad infecciosa en recién nacidos, principalmente en neonatos de muy bajo peso al nacer. Los tres principales factores de riesgo del huésped son: administración prolongada de antibióticos de amplio espectro, prematurez extrema con edad gestacional de 28 semanas o menos, e inserción de catéteres venosos centrales. *Candida* tiene fuerte afinidad por órganos específicos como riñones, ojos, corazón y sistema nervioso central y *C. albicans* es el tercer microorganismo más frecuentemente aislado en neonatos [22].

La *Candid*a *spp* es importante en la patología de la población mexicana. En un estudio se encontró que 7.8 % de 1303 levaduras fueron *C. albicans* [23]. Por otra parte, en una muestra de población mexicana, 60% de 234 pacientes tuvieron cultivos positivos para *C. albicans* y 40% para *Candida spp* (Centro de atención primaria: centro de salud José Castro Villagrana México DF) [21]. La importancia de las candidiasis en México también se puede observar a través de diversos estudios, por ejemplo un estudio de tipo observacional transversal realizado de junio de 1999 a mayo de 2000, con pacientes del Hospital Regional General Ignacio Zaragoza; donde de 108 pacientes, se analizaron y procesaron una muestra de 268 especímenes para estudio micológico, el cual incluyó examen directo, frotis, cultivos y micro cultivos en medios específicos además de pruebas bioquímicas. El resultado fue que se obtuvieron 183 aislamientos de levaduras y 66 de hongos filamentosos y se diagnosticaron 45 micosis, que en su mayoría correspondieron a candidiasis pulmonar (32 casos). Las especies de *Candida* más frecuentes asociadas a patología fueron *C. albicans* y *C. parapsilosis* [24].

Incluso en las micosis superficiales, *Candida* es uno de los principales agentes patógenos en población mexicana, después de los hongos dermatofitos, según lo demuestra un estudio realizado en el hospital general "Manuel Gea González" de la Ciudad de México, donde en una muestra de pacientes menores de 18 años se encontró un 27.7 % de los casos [25]. También se observó un incremento en las tasas de infección por 1000 egresos de 1999 a 2004. Se encontraron 45 casos de infecciosos causados por *Candida* sp, con una mortalidad de 35.5%. No se identificó la especie en 18 pacientes, *C. albicans* en 16 casos, y otras *Candidas* no *albicans* en 24%. Con el advenimiento de mejores tratamientos y una mayor supervivencia en los pacientes críticamente enfermos, las infecciones por gérmenes oportunistas como *C. albicans*, son cada vez más frecuentes. Se ha observado una tasa creciente de infección de 0.10 eventos por 100 egresos en 1999 a 0.47 en 2004 y una tasa por 1000 días de estancia de 0.12 y 0.65 respectivamente [26].

1.5 Antimicóticos

El concepto de agente antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o su capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped.

Debido a que los hongos comprenden cinco clases ampliamente diferentes de flora primitiva, con variaciones extremas en su fisiología y bioquímica celulares, los agentes antimicóticos, si bien incluyen una amplia variedad de sustancias químicas, su espectro antimicótico es bastante estrecho. Los antimicóticos que se consideran de amplio espectro por lo general son tóxicos e irritantes, como cabría de esperar por la no selectividad; adicionalmente, muchos de ellos tienen una absorción limitada a través de la epidermis y no obstante tienen que ser empleados en preparados dermatológicos[27].

Básicamente, los antimicóticos se dividen en fungicidas y fungistáticos, los primeros son fármacos capaces de matar a los microorganismos y los segundos inhiben el crecimiento y proliferación del hongo. Otra forma de clasificar a los antimicóticos es por su origen: de síntesis química o los que son producidos por otros microorganismos. Los antifúngicos sintéticos se agrupan en azoles (imidazoles y triazoles), alilaminas, tiocarbamatos y morfolinas, entre otros grupos. En la tabla 2 se enlistan algunos de ellos [28].

Los antimicóticos producidos por microorganismos, suelen ser metabolitos secundarios de éstos, fundamentándose la actividad antimicótica en su capacidad de inhibir procesos metabólicos primarios esenciales de los hongos. No todos los agentes antimicóticos son fungicidas, muchos son sólo fungistáticos y algunos fármacos antimicóticos tópicos deben su eficacia a una acción queratolítica que produce un esfacelo del estrato córneo que se retira junto con los hongos que contiene [29].

Evitar la proliferación de enfermedades fúngicas sigue siendo una ardua tarea para el siglo XXI, es por ello que continúa el desarrollo de nuevos antifúngicos cada vez más potentes, como se muestra en la figura 1. En la síntesis de estos

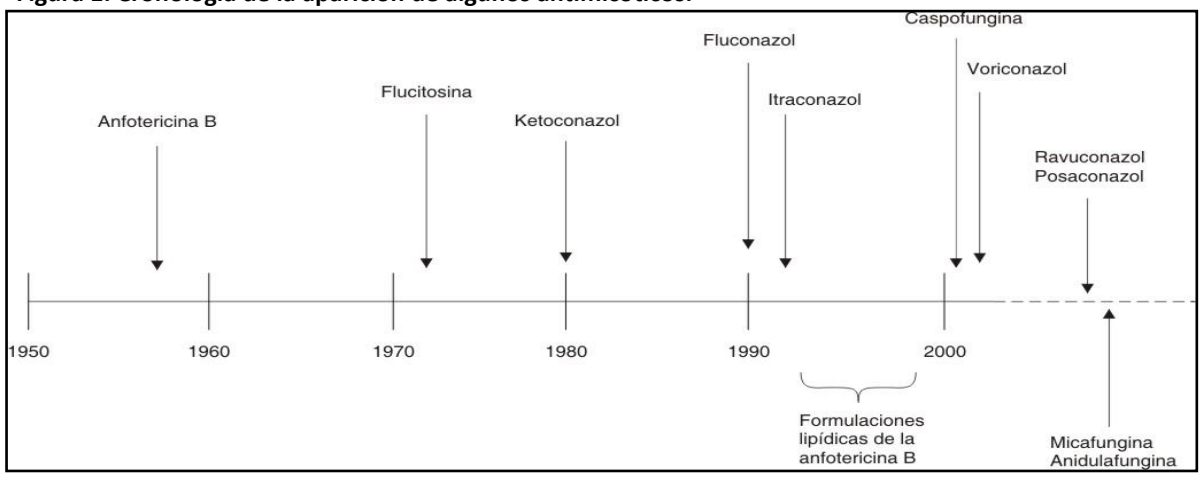
fármacos es muy importante tener en cuenta la relación de su estructura-actividad, pues sobre esta base es que se podrá garantizar la muerte del hongo sin provocar graves daños al organismo hospedero. Debido a la similitud de algunas rutas metabólicas entre las células mamíferas y las fúngicas, es que resulta un problema diseñar la molécula antifúngica, pues ésta debe ser selectiva de la célula patógena y no de la célula humana sana [30].

Tabla 2. Clasificación general de los fármacos antifúngicos.

Antibióticos Polienos: *anfotericina*, nistatina y natamicina No polienos: griseofulvina
Azoles Imidazoles: miconazol Triazoles: ketoconazol, *itraconazol*, *fluconazol*, *voriconazol*, posaconazol, ravuconazol Tópicos: bifonazol, butoconazol, clotrimazol, econazol, fenticonazol, sulconazol, tioconazol, terconazol
Pirimidinas fluoradas *Flucitosina*
Equinocandinas *Caspofungina*, micafungina, anidulafungina
Alilaminas Terbinafina y naftifina
Otros Yoduro potásico, ciclopirox, tolnaftato

Se denominan antibióticos a los fármacos obtenidos de microorganismos. En esta tabla se muestran las principales clases de antifúngicos, debiéndose aclara que en la actualidad hay fármacos que ya no pueden ser incluidos en un grupo específico.

Figura 1. Cronología de la aparición de algunos antimicóticos.



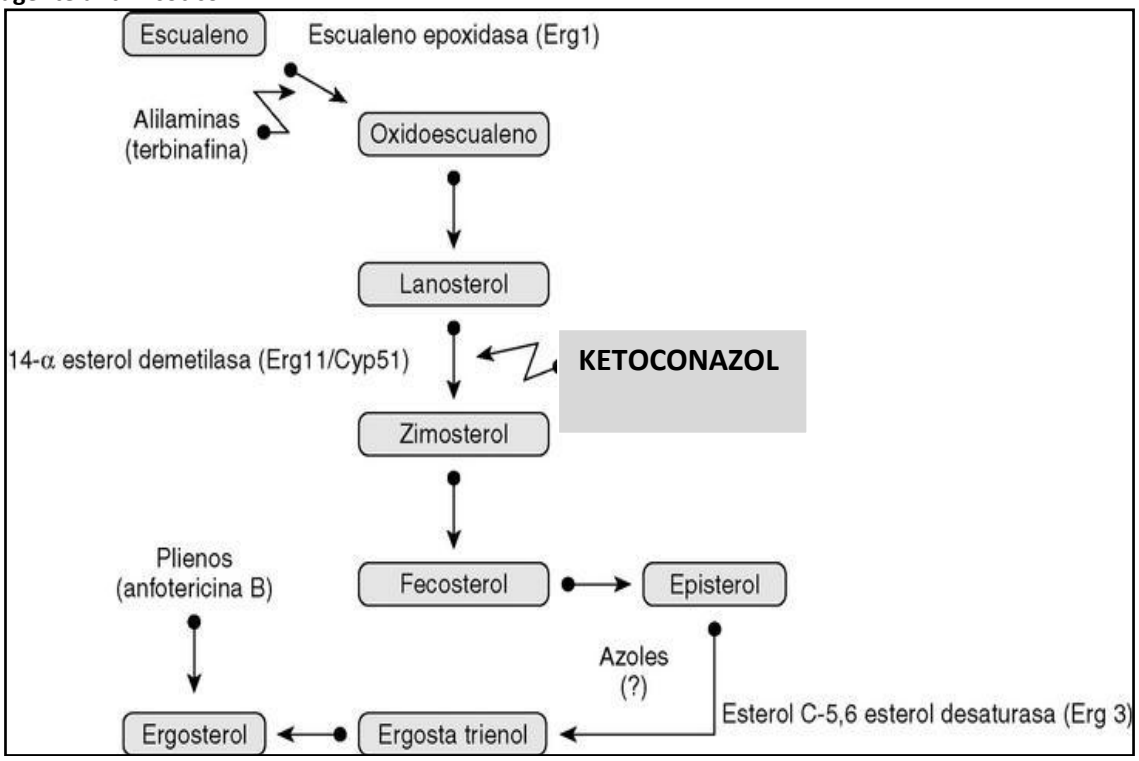
Se muestra la fecha aproximada en que se dan a conocer los antimicóticos, la evolución no ha terminado. A partir del año 2000 aparecen nuevos tipos de antifúngicos derivados de proteínas.

La creciente incidencia de las infecciones causadas por hongos se ve reflejada en un mayor empleo de antifúngicos sistémicos. Los problemas de seguridad y toxicidad, a los que se añaden los relativos a fenómenos de resistencia (intrínseca, primaria o secundaria), mantienen vigente la necesidad de profundizar en el desarrollo de nuevos antifúngicos que aporten ventajas apreciables respecto a los ya existentes. Entre las dificultades para encontrar un nuevo antifúngico destaca el hecho de que tanto el hongo como las células del huésped infectadas son eucariotas, con características bioquímicas similares, por lo que la posibilidad de provocar efectos no deseados sobre el huésped es mayor. Además, la gran diversidad de especies fúngicas con múltiples dianas diferentes e inestabilidad genética tampoco facilita la búsqueda de nuevos antifúngicos. Por otra parte, la falta de correlación entre los resultados de actividad antifúngica *in vitro* y la evolución de los pacientes, observada hasta la fecha, y el costo elevado del desarrollo de estos nuevos antifúngicos, son dificultades añadidas que obstaculizan la búsqueda de nuevas sustancias [31].

1.5.1 Azoles.

Uno de los grupos de fármacos antimicóticos obtenidos por síntesis son los azoles. Estos inhiben a la citocromo P-450-3-A de la célula fúngica, a través de la inactivación de la enzima C-14-α-dimetilasa, con lo cual se interrumpe la síntesis del ergosterol en la membrana celular del hongo. La figura 2 muestra la ruta metabólica del ergosterol en el hongo. Como se puede observar, debido a la falta de ergosterol se comienzan a acumular esteroles tóxicos intermedios, aumenta la permeabilidad de la membrana y se interrumpe el crecimiento del hongo [30].

Figura 2. Ruta de síntesis del ergosterol en la célula fúngica y etapa en que actúa el Ketoconazol como agente antimicótico.



El Ketoconazol al igual que otros azoles, interrumpe la síntesis de ergosterol al unirse a la enzima 14-α esterol desmetilasa.

1.6 Ketoconazol

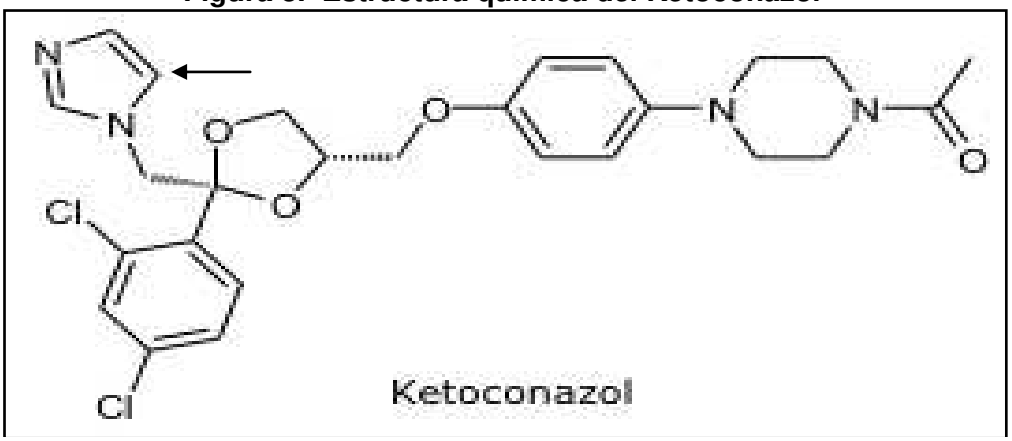
El Ketoconazol (KTZ) es un agente antifúngico del tipo imidazol. En la figura 3 se puede ver la estructura química del KTZ. Como otros imidazoles, tiene 5 estructuras del anillo que contienen 2 átomos de nitrógeno. La formulación oral está disponible en EE.UU. desde 1981. El KTZ es el único miembro de la clase de los imidazoles que se emplea actualmente para el tratamiento de infecciones sistémicas. Este antifúngico es un compuesto lipofílico, propiedad que le permite encontrarse en concentraciones altas en los tejidos grasos, aunque sus concentraciones en el fluido cerebroespinal son pobres en presencia de inflamación. Su solubilidad y su absorción oral son óptimas al pH ácido gástrico.

El KTZ es afín a las membranas celulares de mamífero y por ello induce a la toxicidad. Se usó muy ampliamente antes del desarrollo de nuevas moléculas menos tóxicas y más eficaces (compuestos del triazol como fluconazol e itraconazol, que tienen una afinidad mayor a las membranas celulares fúngicas

que el KTZ), por lo que su utilización en estos últimos años se ha limitado y constituye un fármaco de segunda línea [30].

Como se observa en la figura 2, el KTZ pudiera unirse con sitios activos de la enzima C-14-α-dimetilasa a través asociaciones de Van der Walls (grupo CH_3 del fármaco y CH_3 de la enzima), al intervenir en esta etapa de la síntesis del ergosterol en la membrana del hongo, se afecta la estructura y viabilidad de la membrana de éste, pero también puede afectar de manera similar a las membranas celulares del hospedero. De ahí su toxicidad [30]

Figura 3. Estructura química del Ketoconazol



La estructura del Ketoconazol.La flecha muestra un anillo imidazol con dos átomos de nitrógeno y dos dobles enlaces.

1.6.1 Farmacocinética del Ketoconazol

El KTZ se absorbe bien cuando se administra por vía oral. Una dosis de 2 g con la comida produce un nivel plasmático máximo de 3.5 µg/ml, pero se han reportado niveles de hasta 50 µg/ml. Se une a proteínas en un 95 %. La principal vía de eliminación está dada por el metabolismo hepático y la secreción biliar de los metabolitos; la secreción renal es inferior al 4%. La circulación enterohepática complica la farmacocinética. La vida media es de 1.4 a 3.3 horas [29].

Los derivados azólicos más recientes (bis-triazólicos) como el itraconazol, el fluconazol, poseen diferentes facetas farmacocinéticas, farmacodinámicas y terapéuticas que las diferencian de los antimicóticos precursores, específicamente con el KTZ, que no obstante es el fármaco antimicótico azólico de mayor administración a nivel mundial [30].

Los pacientes con onicomicosis han recibido KTZ en dosis de 200-400 mg/día durante 4-6 meses en casos de micosis de las uñas de las manos y durante 8-18 meses en micosis de las uñas de los pies. Las tasas de curación son comparables con las de la griseofulvina, pero un riesgo de 1:10,000 de hepatotoxicidad restringe el uso del KTZ. En las indicaciones que vienen dentro de los envases se señala que casi todos los casos notificados de hepatotoxicidad (61.3% de ellos) ocurrieron en pacientes que recibían un tratamiento para la onicomicosis [32].

Puesto que los azoles son capaces de desencadenar disfunción hepática, es recomendable determinar cuáles son las cifras iníciales de las enzimas hepáticas y repetir las pruebas a intervalos regulares. Además de lo anterior, las interacciones farmacológicas constituyen un problema considerable con cada uno de los antimicóticos del grupo de los azoles, los cuales inhiben el sistema enzimático hepático P-450 que metaboliza a los fármacos. Cuando la actividad de este sistema es impedida, es posible que las concentraciones sanguíneas de otros fármacos procesados por este sistema aumenten rápidamente. Para librar estas dificultades desde hace algunos años se ha investigado sobre el uso de la nanotecnología para el desarrollo de sistemas de entrega de fármacos que disminuyan las reacciones adversas del KTZ y otros antifúngicos [32].

2. Estrategias para el tratamiento de las micosis: nanotecnología.

La medicina demanda nuevas soluciones y respuestas a las enfermedades actuales. Para ello, se necesitan nuevas herramientas y tecnologías. La nanomedicina es el empleo de la nanotecnología para conseguir avances médicos. El término nanotecnología se refiere a un amplio rango de proyectos de escala nanométrica (entre 0,1-100 nm), la nanomedicina comprende la aplicación de estos conceptos y herramientas a las ciencias médicas. [33,34].

Cuando un fármaco o molécula biológicamente activa se administra en una forma convencional (comprimido, inyectable, etc.), el principio activo suele ser liberado rápidamente al medio biológico y su comportamiento en el organismo

es completamente dependiente de su estructura química y propiedades fisicoquímicas como solubilidad y coeficiente de reparto (log P). Estas propiedades condicionan su eventual absorción a través de las membranas y su distribución en el organismo. Al distribuirse las moléculas de fármaco en el organismo, son capaces de llegar al tejido enfermo pero, al mismo tiempo, alcanzan regiones o tejidos sanos, induciendo efectos secundarios o indeseables. Por el contrario, cuando la molécula activa se administra bajo la forma de nanopartículas simples o estructuradas (nanosomas), son las propiedades físicas y físicoquímicas de éstas (tamaño y propiedades de superficie), las que condicionan la distribución de la nanoestructura y del fármaco en el organismo, así como su concentración en el lugar de acción. Una vez alcanzada la región enferma, las nanopartículas transportadoras de fármaco deben controlar la liberación de su contenido. El hecho de poder concentrar el fármaco en su lugar de acción o de absorción ofrece la posibilidad de minimizar los efectos secundarios y aumentar el índice terapéutico de la molécula en cuestión [35].

En este sentido, la investigación en liberación de fármacos y tratamientos con nanomateriales intenta avanzar hacia un nuevo nivel tecnológico no alcanzado hasta ahora, y los resultados de la investigación innovadora pretenden satisfacer muchos y prolongados desafíos en la industria farmacéutica, cosmecéutica y nutracéutica, entre otras.

La búsqueda para resolver los temas de solubilidad, biodisponibilidad, estabilidad química y mejoría sobre los posibles efectos secundarios de los tratamientos farmacológicos es perseguida con energía y de manera prometedora por los actuales avances en investigación. Dentro de la nanomedicina se puede observar una gran cantidad de estudios sobre distintos materiales o compuestos, así como de diferentes nanopartículas o nanoestructuras transportadoras de fármacos, donde se diferencian entre muchas otras, las nanopartículas poliméricas, los liposomas o las micelas poliméricas. Este tipo de nanopartículas fue descrita por primera vez por Speiser y colaboradores en los años 70’s [34].

La nanomedicina suele utilizar sistemas complejos de escala nanométrica formados por al menos dos componentes, uno de los cuales es el principio activo o molécula biológicamente activa y, el segundo, es el propio sistema nanoparticulado que permite una función especial relacionada con el diagnóstico, tratamiento, o prevención de una enfermedad. Las nanopartículas incluyen componentes activos u objetos en el intervalo comprendido desde un nanómetro hasta varios cientos de nanómetros, ejemplo de ello, por ser de las estructuras más antiguas y con mayor número de estudios, están los liposomas que pueden facilitar la liberación de fármacos hidrofóbicos y ahora, por su tamaño, los nanoliposomas [36].

Por lo tanto, las formas farmacéuticas basadas en la nanotecnología pueden proporcionar mejores métodos de diagnóstico médico y de tratamiento. Adicionalmente, la respuesta biológica a los nanomateriales de ingeniería y a sus subproductos debe ser cuidadosamente estudiada antes de poner en práctica algunos de los abordajes basados en la nanotecnología discutidos anteriormente. Actualmente, la mayoría de la investigación en este campo se centra en la biocompatibilidad y toxicidad de varios nanomateriales [37].

2.1 Nanoacarreadores

A mediados o finales de 1970 el concepto de conjugado polímero-fármaco o "Nano-terapéutica", surgió de forma independiente en varios lugares alrededor el mundo. Desde finales de los años 80 del siglo XX hasta la actualidad, tres tecnologías clave fueron los principales factores que estimularon esta inmensa actividad y éxito clínico de la Nanomedicina, la primera fue el concepto de "PEGilación", que se refiere al conjugado polietilen-glicol fármaco o nanoacarreador de fármacos; el segundo es el concepto de "objetivo focalizado" del nanoacarreador o transportador de fármacos, mediante la conjugación de la membrana celular con anticuerpos del receptor, péptidos o pequeños ligandos unidos al soporte polimérico. El tercero fue el descubrimiento de la "permeabilidad mejorada y el efecto de retención (EPR) " por Hiroshi Maeda en Kumamoto, Japón, según el cual los nanoacarreadores

se internan dentro de tumores sólidos debido a la vasculatura del tumor. Esto se denominó vectorización “pasiva” en contraste con un enfoque activo [38].

La encapsulación de fármacos en nanovehículos tiene dos propósitos: proteger al cuerpo contra la toxicidad del fármaco, y proteger al fármaco contra el sistema de defensa del organimso. Otro beneficio de los nanovehículos es su perfil farmacocinético mejorado en comparación con la administración de fármacos con sistemas convencionales. Los fármacos provenientes de formas farmacéuticas convencionales se distribuyen uniformemente a lo largo el cuerpo, resultando en un gran volumen de distribución (Vd). Este perfil de distribución requiere el uso de altas dosis del fármaco [39].

El uso de nanovehículos (“nanocarriers” o nano acarreadores de fármacos) podría proporcionar oportunidades casi ilimitadas en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos altamente especializados y eficientes. Tales sistemas multifuncionales de entrega de fármacos permiten la interacción coordinada con el individuo para permitir el suministro de agentes farmacológicos en un lugar, un espacio de tiempo y con un patrón de liberación requerido. Aunque este enfoque ha emergido recientemente, muestra un futuro prometedor. Actualmente se utilizan nanovehículos farmacéuticos tales como liposomas, micelas, nanoemulsiones, nanopartículas poliméricas y muchos otros, los cuales muestran una amplia variedad de propiedades útiles, tales como el aumento en el tiempo de residencia en la sangre, lo que permite su acumulación en áreas patológicas con vasculatura comprometida; vectorización específica a ciertos sitios de la enfermedad debido a varios ligandos unidos a la superficie de los nanovehículos; penetración intracelular mejorada con la ayuda de diversas moléculas unidas a su superficie; propiedades de contraste debido a la carga del soporte con diversos materiales de contraste que permiten la visualización directa en el paciente; estímulos-sensibilidad que permite la liberación del fármaco bajo ciertas condiciones fisiológicas u otros factores[40,41].

2.2 Tipos de nanoacarreadores de interés tópico y/o transdérmico.

Las nanopartículas y nanoacarreadores de interés farmacéutico pueden clasificarse de una forma amplia como poliméricas (sintéticas y naturales), inorgánicas, nanopartículas lipídicas sólidas y otras más. Una característica común de las nanopartículas es su comportamiento coloidal en fluidos biológicos y no biológicos; su tamaño suele ser no mayor a los 500 nm, y en ellas los agentes terapéuticos de distinto origen (de síntesis química, extracción natural o de biotecnología), pueden estar atrapados (matrices), encapsulados o químicamente ligados a su superficie. Los nanoacarreadores se caracterizan por su alta estabilidad y su capacidad de incorporar un amplio espectro de fármacos, y de modificar la farmacocinética del principio activo, que permite prolongar, controlar o vectorizar su entrega [42].

Debido a la amplia variedad de sistemas nanotransportadores que existen para los fármacos, a continuación sólo se hará mención de algunos que se relacionan con los sistemas y objetivos del presente trabajo de investigación.

2.2.1 Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas se formulan usando ya sea polímeros naturales o sintéticos con un alto nivel de biocompatibilidad para reducir la citotoxicidad y maximizar la compatibilidad con los tejidos. El únicos polímeros sintéticos que han sido aprobados por la FDA de Estados Unidos para el uso humano son: poli-D, L- ácido láctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), poli (ácido láctico-co- ácido glicólico) (PLGA), poli-e-caprolactona (PCL), y poli (metil metacrilato) (PMMA) [43].

Las nanopartículas poliméricas, se preparan principalmente mediante el uso de emulsiones o procesos de precipitación. Su tamaño depende del método de fabricación y van desde 10 a hasta varios cientos de nanómetros. El constituyente polimérico de estas nanopartículas no son necesariamente anfifílicos como en las micelas, y por lo tanto la formación de estas nanopartículas no es causado por auto-ensamblaje, pero requiere un proceso activo para su formación. Las moléculas de un fármaco son atrapadas ya sea físicamente o químicamente en el núcleo hidrófobo de estas nanopartículas. La

naturaleza sólida de las nanopartículas poliméricas, les confieren gran estabilidad y permite la liberación controlada de los fármacos; que puede ser por difusión o a través de la degradación de la matriz polimérica. Además, pueden incluirse en estos nanovehículos elementos sensibles a determinados estímulos y así controlar el tiempo y lugar de la liberación del fármaco. La liberación desde estos nanocarriers es activada por una señal externa o por cambios en el microentorno local de dentro del cuerpo [44,45,46].

2.2.2 Nanopartículas inorgánicas

Las nanopartículas inorgánicas son mucho menores que las nanopartículas poliméricas con tamaños comúnmente menores de 20 nm. Éstas se preparan a través de la modificación de la superficie de óxidos inorgánicos, y estas modificaciones son importantes para proporcionar diversidad en el tamaño, forma, solubilidad, estabilidad a largo plazo, y la fijación selectiva de grupos funcionales [47]. El concepto de la utilización de nanopartículas de oro multivalentes para inhibir la fusión del VIH se introdujo por primera vez hace varios años. En 2008 se emplearon partículas de oro modificadas con ácido mercaptobenzoico como un sistema a escala nanométrica para la elaboración de una terapia multivalente. Después de la conjugación de estas nanopartículas con SDC- 1721 (un fragmento del potente inhibidor del VIH TAK-779), la fusión del VIH se inhibió de manera significativa, mientras que la l SCC-1721 no incorporada en nanopartículas no mostró efecto inhibidor. Otra estrategia basada en el uso de nanopartículas de plata como candidatos a antivirales ha sido propuesta recientemente [48].

2.2.3 Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)

Entre las nanopartículas que se han estudiado con potencial de ser consideradas como vehículos para mejorar la administración de fármacos por vía tópica se encuentras las NLS [49]. Éstas suelen ser partículas esféricas de talla nanométrica, elaboradas a partir de lípidos sólidos y emulsionantes. Entre sus numerosas posibilidades de uso y ventajas, se incluye la posibilidad de modificar la liberación de los fármacos contenidos en ellas (sostenida / controlada), así como la vectorización de éstos y un aumento en la estabilidad

del fármaco. También poseen la capacidad de incorporar una amplia variedad de principios activos y poseen amplia biocompatibilidad [50].

Las NLS se pueden fabricar a escala comercial con mayor facilidad que los liposomas; así por ejemplo, las NSL portadoras de polilisina-heparina han sido evaluadas para la liberación del antibiótico hidrófobo Tenofovir en la mucosa vaginal. Estas NSL resultaron ser no citotóxicas para células vaginales durante 48 h y fueron capaces de mejorar la captación celular del antibiótico hidrófobo [51,52,53].

2.2.4 Complejos nanométricos de ciclodextrinas

Para la farmacoterapéutica antimicrobiana de las mucosas, la formación de complejos con ciclodextrinas se ha propuesto como un medio para aumentar la biodisponibilidad del principio activo a través de la inclusión de fármacos poco solubles en complejos de ciclodextrina [54]. La incorporación de clotrimazol en un complejo con b-ciclodextrina en un gel vaginal mucoadhesivo, termosensible compuesto de Pluronic® F127, Carbopol® 934, e hidroetilcelulosa, dieron como resultado la liberación controlada del fármaco incorporado, mostrando actividad antimicótica durante un período de tiempo más largo [55]. También se evaluó una formulación de itraconazol incorporado en hidroxipropil-b-ciclodextrina que mejoró considerablemente la solubilidad de los fármacos, generando un sistema mucoadhesivo en presencia de otros ingredientes. La formulación de una crema vaginal a base de ciclodextrina e itraconazol resultó ser segura y bien tolerada, y retenida en la cavidad vaginal durante un largo período de tiempo.

El aumento en la solubilidad de la anfotericina B se confirmó después de su inclusión en complejos de hidroxipropil-c-ciclodextrina, mientras que la termosensibilidad y dependencia del pH de la formulación del gel aseguró la liberación constante del fármaco en el entorno ácido. Las ciclodextrinas también se estudiaron como nanovehículos para incorporar agentes anti-VIH como el UC781, un antiviral muy potente con escasa solubilidad en agua, el cual al incorporarse en diferentes ciclodextrinas, mejoró su potencia inhibitoria antiviral [56,57].

2.2.5 Niosomas

Los niosomas son vesículas no fosfolípidicas, hechas con compuestos tensoactivos no iónicos tales como mono y dialquil éteres de poliglicerilo o polioxietilen-glicoles. Su morfología es similar a la de los liposomas, pero sus estructuras son distintas. También han sido investigados como vehículos para la administración sostenida y selectiva de fármacos por vía tópica. Así, la incorporación de clotrimazol en un gel niosomal ha mostrado una liberación prolongada del fármaco y una actividad antifúngica adecuada. Además, los niosomas han demostrado ser nanoacarreadores prometedores para la aplicación tópica del tenofovir disoproxil fumarato contra el VIH; en este sentido se ha observado la liberación prolongada del fármaco desde niosomas incorporados en un gel, y no hay signos de irritación de la mucosa vaginal de ratas [58,59,60].

2.2.6 Nanoemulsiones

La estabilidad a largo plazo, facilidad de preparación y alta solubilización de fármacos hacen de las nanoemulsiones un vehículo atractivo para la liberación mejorada de fármacos lipófilos [61]. Aunque a menudo se describen como microemulsiones en la literatura, parece más apropiado referirse a estos sistemas como nanoemulsiones porque el tamaño de partícula es típicamente menor a 200 nm. Varios estudios han evaluado las características de nanoemulsiones destinadas al transporte de agentes antimicrobianos. La naturaleza líquida indeseable de la formulación ha sido superada por la adición de diferentes polímeros y agentes gelificantes. El resultante gel-microemulsión (GM) se ha estudiado en el contexto de la entrega de anticonceptivos [62]. Las nanoemulsiones han demostrado ser más eficaces que el gel disponible en el mercado de nonoxinol-9. Además, la aplicación intravaginal repetida de GMs con espermicidas ha demostrado ser segura y no causar ninguna toxicidad local, sistémica o reproductiva. Por otra parte, la actividad antifúngica y la retención en el moco vaginal de una formulación en nanoemulsión demostró tener un desempeño superior a un producto comercial que contiene clotrimazol [63,64].

2.2.7 Dendrímeros

Los dendrímeros son una otra clase de nanoestructuras híperamificadas construidas mediante la adición gradual y repetida de subunidades o ramificados a un núcleo reactivo [65]. Los dendrímeros pueden ser de tres tipos: (i) superficie multicapas, (ii) capa que rodea un núcleo, y (iii) un núcleo al que se adhieren las dendritas [66]. Sus propiedades dependen principalmente de los grupos funcionales presentar en las superficies. A pesar de la cuidadosa selección de funcional grupos, es posible desarrollar una amplia variedad de estructuras hechas a medida con amplio potencial de servir como nuevos nanoacarreadores farmacéuticos. Una de las líneas más prometedoras de investigación con dendrímeros es su potencial como transportadores de antibióticos. La mayoría de las estructuras de dendrímeros se basan en poli (amidoamina, PAMAM) o poli (propilen-imina, PPI) [67].

Están disponibles datos muy limitados sobre el uso de dendrímeros en el tratamiento de candidiasis. Algunos ensayos encontraron que la actividad antifúngica de macromoléculas dendríticas solubles en agua cargadas con nistatina, KTZ o clotrimazol en ensayos *in vitro,* son igual o comparativamente más potentes. La inclusión de lípidos en los dendrímeros, dando origen a lipopéptidos dendriméricos, resultó en un aumento de la actividad antifúngica, expresado de una manera multimodal y dosis dependiente [68,69].

2.2.8 Liposomas

Los liposomas son estructuras esféricas y cerradas, compuestas de una o varias bicapas lipídicas concéntricas que rodean un núcleo acuoso. La primera observación de que los fosfolípidos en sistemas acuosos pueden formar estructuras bicapa cerradas fue descrita en 1965. Dependiendo de la estructura de la membrana se dividen en unilamelares o liposomas multilamelares. La distribución de tamaño de partícula, número de laminillas y las fases acuosas interiores / exteriores, son propiedades que dictan sus características de estabilidad y de interacción [70].

Los liposomas pueden transportar fármacos hidrófilos en su núcleo acuoso o fármacos hidrófobos dentro de la membrana lipídica. Los nanoliposomas son

los nanoacarreadores más antiguos con respecto a su uso clínico. Un ejemplo es el Doxil® o doxorubicina liposomal inyectable, aprobada en los EE.UU. en 1995 contra sarcoma de Kaposi refractario. [70].

Los liposomas se han estudiado durante más de 40 años en muchas terapias diferentes, debido a su capacidad para transportar una amplia variedad de fármacos, así como por su versatilidad estructural y su compatibilidad fisiológica [71]. La modificación de su superficie con polietilenglicol (PEG) u otros polímeros les proporciona propiedades de ocultamiento o de circulación largas. El potencial de los liposomas en el tratamiento tópico de la vaginitis fue reportado originalmente en 1999 [72].

Los tres fármacos comúnmente usados en el tratamiento de infecciones vaginales (clotrimazol, metronidazol, y cloranfenicol) se incorporaron en liposomas convencionales de lecitina y se probó la estabilidad *in vitro* a los valores de pH vaginales correspondientes a las etapas de la pre y post menopausia, así como para la estabilidad *in situ* en presencia de mucosa vaginal de vaca [73,74].

En dicho estudio, para mejorar la estabilidad liposomal y la aplicabilidad general de la formulación, los liposomas fueron incorporados en hidrogeles de Carbopol® bioadhesivos. En cuanto a la liberación *in vitro,* los estudios realizados en un simulador de fluido vaginal mostraron un patrón de liberación prolongada de los tres fármacos a partir de su respectivo hidrogel con liposomas. La liberación sostenida de clotrimazol de liposomas destinados a la terapia vaginal fue publicada en 2005 [73,74]. Por otra parte, el mismo grupo de investigación confirmó la actividad antifúngica del nanosistema como adecuada, así como la ausencia de cambios visibles en la morfología de los tejidos expuestos. Otro de los estos enfoques para mejorar la capacidad de los liposomas de penetrar a través de la mucosa ha sido el desarrollar liposomas deformables (elásticos). Las vesículas elásticas son conocidas por penetrar más profundo en la piel que los liposomas convencionales [75,76].

3. Cristales líquidos liotrópicos

Entre los sistemas coloidales de interés farmacéutico también destacan por su estado mesofásico, las dispersiones de cristales líquidos, las cuales pueden ser consideradas como nanoemulsiones (dispersiones de líquido en líquido) o como suspensiones (dispersiones de sólido en líquido), ya que la fase dispersa y la dispersante resultan en un fluido ordenado y nanoestructurado. Las dispersiones de cristales líquidos son cruciales en muchos procesos, fenómenos y productos tales como la recuperación mejorada de petróleo, fabricación de jabones y detergentes, en la estabilización de emulsiones, cosméticos y formas farmacéuticas [77].

Los cristales líquidos (CL) constituyen un cuarto estado de agregación de la materia (mesofase o fase intermedia), que comparten con los líquidos su fluidez y con los sólidos cristalinos el orden de largo alcance. Por su origen u obtención, los CL se clasifican en termotrópicos y liotrópicos. Estos últimos se encuentran en formulaciones farmacéuticas y cosméticas, así como en los sistemas biológicos [78].

Las primeras observaciones de un CL fueron realizadas hace más de un siglo por el botánico y químico austriaco Friedrich Reinitzer estudiando sustancias derivadas del colesterol. Desde entonces, los cristales líquidos son materia de innumerables trabajos tanto teóricos como experimentales, debido a que son materiales extremadamente interesantes por sus aplicaciones tecnológicas, ópticas y biológicas. Dependiendo de la estructura molecular, estos compuestos pasan a través de distintas fases antes de llegar al estado de líquido isotrópico.

Los CL termotrópicos están constituidos por moléculas anisotrópicas, las cuales se organizan en diferentes configuraciones dependiendo de la presión y principalmente de la temperatura. Por otro lado, los CL liotrópicos son formados por mezclas de moléculas anfifílicas (moléculas con una parte hidrofóbica y otra hidrofíca) y un disolvente, el cual es generalmente agua. Las unidades básicas de estos últimos son las micelas, cuyas estructuras son esferas,

bastones o discos. Las fases que los constituyen dependen de la presión, pero principalmente de la temperatura y de la concentración de las sustancias que los componen [79].

Los cristales líquidos liotrópicos (CLL) se presentan en un cierto rango de temperatura cuando algunas sustancias se dispersan en un líquido. Para una temperatura fija, este tipo de CL aparece en un intervalo de concentración. El nombre deriva del latín *lyo,* que significa desleír. Los sistemas liotrópicos más comunes están constituidos por dispersiones de tensoactivos en agua.

Los tensoactivos en disoluciones acuosas pueden formar disoluciones micelares y estructuras líquido-cristalinas liotrópicas resultantes de las interacciones existentes entre las unidades estructurales o agregados micelares que existen en su seno. El conocimiento de las estructuras y el comportamiento reológico de dichas fases micelares y liotrópicas es muy importante, tanto desde el punto de vista fundamental como del aplicado, debido a su amplio grado de utilidad en diversos sectores de la industria [80].

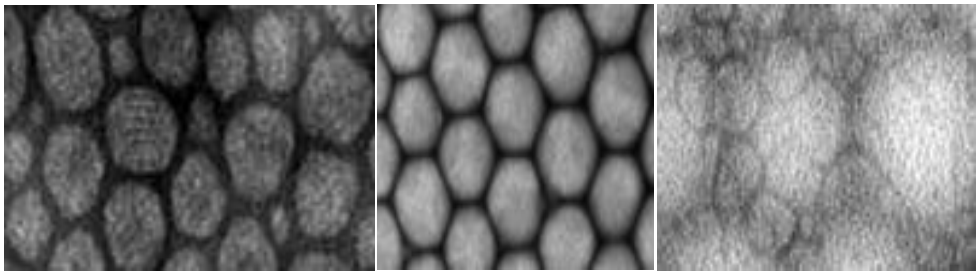
También pueden formar parte de las fases liotrópicas otras sustancias anfifílicas, tales como alcoholes y ácidos grasos, aminas y esteroles, cuyas moléculas se mantienen unidas a las del tensoactivo por fuerzas intermoleculares de van der Waals y uniones por puente de hidrógeno. Este tipo de fases líquido cristalinas aparece en sistemas biológicos, en los que las sustancias dispersas son fosfolípidos, colesterol y sales biliares [81].

Debido a sus altas viscosidades y capacidad para disolver tanto fármacos hidrosolubles como liposolubles, los (CLL) resultan adecuados como sistemas de liberación sostenida de principios activos. Las sustancias liposolubles se alojan entre las cadenas hidrocarbonadas y las hidrosolubles en la zona polar. Los copolímeros en bloques de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) son utilizados también en estas estructuras como sistemas de liberación controlada. Uno de los copolímeros usados con este fin es el Poloxámero 407, que tiene una fórmula media: OE100OP70OE100, donde OE y OP significan, respectivamente, una unidad de óxido de etileno y de óxido de propileno.

A temperatura ambiente, los sistemas formados por Poloxámero 407 y agua presentan dos fases líquido-cristalinas liotrópicas: la cúbica micelar normal (18 a 64 % de copolímero) y la hexagonal normal (66 a 75 % de copolímero). Otro tensoactivo no iónico usado en estos sistemas de liberación controlada es el alcohol oleílico con 10 moles de óxido de etileno (Oleth-10)4. Los sistemas formados por este tensoactivo y agua presentan las fases liotrópicas hexagonal normal (33 a 63 % de tensoactivo) y laminar (67 a 83 % de tensoactivo) [82].

En 2012, en un trabajo conjunto entre el Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-Xochimilco y laboratorios de investigación de los Departamentos de Ciencias Naturales y de Procesos y Tecnología de la UAM-Cuajimalpa, se estudiaron diferentes formulaciones de tensoactivos y agua para obtener CLL empleando sonicación; estos sistemas dispersos se caracterizaron por técnicas instrumentales para conocer su estructuración. Uno de los sistemas que resultó de interés, mostró una configuración hexagonal, tal como se ve en la imagen 1 obtenida por MET [83]. A estas estructuras se les incorporó KTZ como principio activo poco soluble, pero posteriores ensayos sobre el sistema demostraron una estabilidad limitada.

Imagen 1. Microfotografías de CLL



Fotografías obtenidas por MET, se utilizó mediode contraste. Se aprecian estructuras hexagonales que forman los cristales líquidos liotrópicos [80].

Los problemas de coalescencia de los CLL hexosómicos con KTZ se redujeron con el uso de un agente estabilizante, como lo demostró un trabajo realizado en 2013 en el citado laboratorio [84]. Así, con el uso de un diseño de experimentos Simplex de tres componentes, se determinó la proporción de tres sustancias tensoactivas con las que se logra obtener sistemas nanoestructurados líquido cristalinos de mayor estabilidad, así como el límite de carga de KTZ en CLL. La máxima cantidad de Ketoconazol que se puede incorporar en el sistema líquido cristalino liotrópico (CLL-KTZ) es de 150 mg/ 50 g de formulación.

Con esta base, se propuso dar continuidad al estudio de dicho sistema CLL-KTZ, evaluando su potencial actividad antimicótica frente a *Candida albicans*, comparándola a su vez contra muestras comerciales de carga equivalente de principio activo.

Planteamiento del problema

Ante el constante aumento de las micosis cutáneas en el humano, así como el alto costo de investigación de nuevos fármacos antifúngicos, una estrategia alterna es el empleo de antimicóticos genéricos como el KTZ en forma de nuevos sistemas de entrega de fármacos cuya consigna es incrementar su eficacia terapéutica, reducir los efectos adversos derivados de su administración sistémica y la dosis requerida para obtener el efecto en piel, uñas y mucosas. Una manera de conseguir lo anterior es incrementando la permeabilidad en piel de dicho activo y los sistemas nanométricos son una alternativa.

Una de las nuevas opciones nanotecnológicas para sistemas tópicos y transdérmicos de liberación de fármacos la constituyen los sistemas líquido cristalinos, en particular los CL hexosómicos y cubosómicos, por su similitud en composición y estructura con las membranas biológicas y de componentes de los estratos de la piel.

Para el caso específico del KTZ y el interés en optimizar su actividad antimicótica en piel y uñas, mediante la incorporación de KTZ en un NSLCL, se requiere de una primera demostración de que con éste se obtiene una CMI sobre un microorganismo causante de la patología, que sea menor que cualquier otro producto comercializado a la fecha.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

El KTZ incorporado en un NSLCL aumenta su potencia antimicótica en cultivos de *C. albicans,* comparado con el KTZ en solución o en base lipófila.

Objetivo general

Determinar la actividad antimicótica del KTZ contenido en cristales líquidos liotrópicos para *Candida albicans*, en un modelo *in vitro*, determinando la concentración mínima inhibitoria y compararla con dos formulaciones: en solución y en base lipófila.

Objetivos particulares

1. Reproducir y caracterizar un sistema líquido cristalino conteniendo KTZ.

2. Evaluar el efecto antimicótico del KTZ incorporado en un NSLCL y compararlo *vs* KTZ en solución y en base lipófila.

3. Desarrollar un método de cuantificación de levaduras por turbimetría mediante el uso del nefelómetro de McFarland.

4. Determinar con el método de microdilución en caldo, la CMI en *Candida albicans* del NSLCL conteniendo KTZ y compararla con la CMI de KTZ en solución.

5. Comparar el efecto inhibitorio del KTZ incorporado en NSLCL con el de formas farmacéuticas comerciales.

6. Determinar con MET el efecto del NSLCL +KTZ sobre la morfología de las levaduras de *C. albicans.*

Metodología

1. Reproducción y caracterización de un NSLCL conteniendo Ketoconazol.

1.1 Reproducción del NSLCL.

Para reproducir el NSLCL se utilizaron 0.8833 g de monooleato de glicerilo, 0.8833g de Poloxamero (407), 0.8833g de Propilenglicol monolaureato, 47.35 g de agua y diferentes cantidades de KTZ. Para obtener un lote de 50 g. La tabla 3 muestra las proporciones utilizadas para elaborar los 8 lotes o muestras que se estudiaron. Se puede ver que el KTZ varía en un rango de 0 a 3 mg de KTZ /ml.

Tabla 3. Número de muestras y concentración de Ketoconazol.

Lote	Masa de KTZ g	Poloxámero g	Monooleato g	Monolaureato g	[KTZ] mg/g
NS1	150	0.8833	0.8833	0.8833	3
NS2	150	0.8833	0.8833	0.8833	3
NS3	150	0.8833	0.8833	0.8833	3
NS4	0	0.8833	0.8833	0.8833	0
NS5	0	0.8833	0.8833	0.8833	0
NS6	50	0.8833	0.8833	0.8833	1
NS7	100	0.8833	0.8833	0.8833	2
NS8	150	0.8833	0.8833	0.8833	3

Se muestran las ocho formulaciones que se estudiaron con la cantidad de Ketoconazol incorporado en el nanosistema líquido cristalino liotrópico. Todos los demás componentes permanecen constantes. No se muestra la masa de agua, por ser constante (47.35 g).

Para elaborar las formulaciones, se pesó cada componente, los tres tensoactivos se calentaron juntos a 55°C, el agua se calentó a 60°C, y una vez alcanzada esta temperatura, se mezclan. (El KTZ se disolvió en la mezcla de tensoactivos). La mezcla de tensoactivos y KTZ se incorporan al agua caliente mantenida en agitación. Una vez mezclados se lleva a cabo la

sonicación (8 minutos a una amplitud del 70%). Terminado el tiempo de sonicación, cada formulación se sometió a diálisis (en membranas "Spectra 6" MWCO 1000) por cuarenta y ocho horas, utilizando como medio de diálisis metanol al 20%. Las membranas de diálisis fueron preparadas según las especificaciones del fabricante. Terminado el tiempo de diálisis, la formulación se esterilizó por medio de filtración con la ayuda de filtros Millipore® con poro de 0.22 µm. Todos los materiales que se utilizaron fueron esterilizados antes de usarse.

1.2 Determinación del tamaño de partícula.

Es una de las características más importantes de un sistema nanométrico. El tamaño medio y la distribución de tamaño de partícula se determinaron utilizando un analizador de partícula marca HORIBA analyzer LA-950, se colocaron 10 ml de muestra en la celda del equipo y se realizó la lectura. El equipo genera un reporte como el de la imagen 2, en el cual se pueden leer la distribución del tamaño en un histograma, así como la media la moda y otros datos de interés de cada formulación analizada.

1.3 Microscopía electrónica de transmisión

1.3.1 Análisis elemental.

Las muestras se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión acoplado a espectrómetro de masas. Se utilizó el espectrómetro de masas para realizar un análisis elemental de las muestras y verificar que el KTZ incorporado en el nanosistema se encuentre presente. Para lograrlo se siguió el Si contenido en el KTZ, por ser un átomo más grande que los componentes del KTZ. Se utilizó un portaobjetos criogénico, las muestras se congelaron y se cortaron con un ultramicrotomo de congelación

Imagen 2. Reporte de análisis de tamaño de partícula DLS

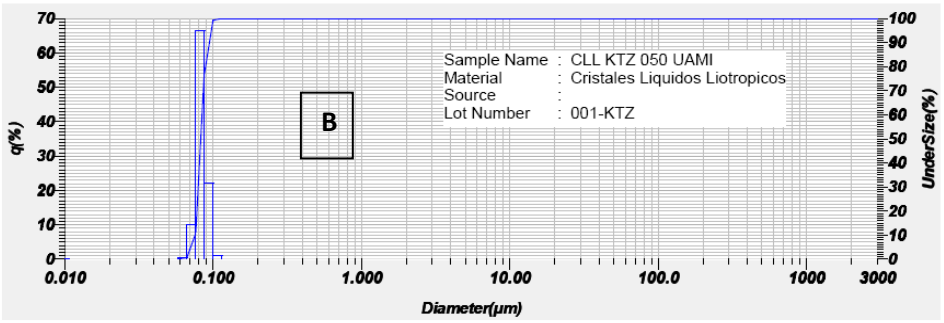
2013.08.28 14:56:5

HORIBA Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950

ID#	: 201308281456188	Median Size	: 0.08263(µm)
Transmittance(R)	: 53.9(%)	Mean Size	: 0.08330(µm)
Transmittance(B)	: 1.0(%)	Std.Dev.	: 0.0068(µm)
Ultra Sonic	: OFF	Geo.Mean Size	: 0.0830(µm)
Circulation Speed	: OFF	Geo.Std.Dev.	: 1.0848(µm)
Agitation Speed	: OFF	Mode Size	: 0.0826(µm)
Form of Distribution	: Auto	Span	: OFF
Distribution Base	: Volume	Diameter on Cumulative %	: (2)10.00 (%)- 0.0758(µm)
Refractive Index (R)	: 1.6-0i in Water[RI=1.60(1.600 - 0.000i),Water(1		
Refractive Index (B)	: 1.6-0i in Water[RI=1.60(1.600 - 0.000i),Water(1		
Sample Name	: CLL KTZ 050 UAMI		

A

Data Name	Graph Type	Transmittance(R)	CV	Median Size	Std.Dev.
201308281456188		53.9(%)	8.1817(%)	0.08263(µm)	0.0068(µm)



C

No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter
1	0.011	0.000	0.000	24	0.259	0.000	100.000	47	5.867	0.000	100.000	70	133.103	0.000	100.000	93	3000.
2	0.013	0.000	0.000	25	0.296	0.000	100.000	48	6.720	0.000	100.000	71	152.453	0.000	100.000		
3	0.015	0.000	0.000	26	0.339	0.000	100.000	49	7.697	0.000	100.000	72	174.616	0.000	100.000		
4	0.017	0.000	0.000	27	0.389	0.000	100.000	50	8.816	0.000	100.000	73	200.000	0.000	100.000		
5	0.020	0.000	0.000	28	0.445	0.000	100.000	51	10.097	0.000	100.000	74	229.075	0.000	100.000		
6	0.022	0.000	0.000	29	0.510	0.000	100.000	52	11.565	0.000	100.000	75	262.376	0.000	100.000		
7	0.026	0.000	0.000	30	0.584	0.000	100.000	53	13.246	0.000	100.000	76	300.518	0.000	100.000		
8	0.029	0.000	0.000	31	0.669	0.000	100.000	54	15.172	0.000	100.000	77	344.206	0.000	100.000		
9	0.034	0.000	0.000	32	0.766	0.000	100.000	55	17.377	0.000	100.000	78	394.244	0.000	100.000		
10	0.039	0.000	0.000	33	0.877	0.000	100.000	56	19.904	0.000	100.000	79	451.556	0.000	100.000		
11	0.044	0.000	0.000	34	1.005	0.000	100.000	57	22.797	0.000	100.000	80	517.200	0.000	100.000		
12	0.051	0.000	0.000	35	1.151	0.000	100.000	58	26.111	0.000	100.000	81	592.387	0.000	100.000		
13	0.058	0.000	0.000	36	1.318	0.000	100.000	59	29.907	0.000	100.000	82	678.504	0.000	100.000		
14	0.067	0.540	0.540	37	1.510	0.000	100.000	60	34.255	0.000	100.000	83	777.141	0.000	100.000		
15	0.076	9.884	10.425	38	1.729	0.000	100.000	61	39.234	0.000	100.000	84	890.116	0.000	100.000		
16	0.087	66.561	76.985	39	1.981	0.000	100.000	62	44.938	0.000	100.000	85	1019.515	0.000	100.000		
17	0.100	22.146	99.131	40	2.269	0.000	100.000	63	51.471	0.000	100.000	86	1167.725	0.000	100.000		
18	0.115	0.869	100.000	41	2.599	0.000	100.000	64	58.953	0.000	100.000	87	1337.481	0.000	100.000		
19	0.131	0.000	100.000	42	2.976	0.000	100.000	65	67.523	0.000	100.000	88	1531.914	0.000	100.000		
20	0.150	0.000	100.000	43	3.409	0.000	100.000	66	77.339	0.000	100.000	89	1754.613	0.000	100.000		
21	0.172	0.000	100.000	44	3.905	0.000	100.000	67	88.583	0.000	100.000	90	2009.687	0.000	100.000		
22	0.197	0.000	100.000	45	4.472	0.000	100.000	68	101.460	0.000	100.000	91	2301.841	0.000	100.000		
23	0.226	0.000	100.000	46	5.122	0.000	100.000	69	116.210	0.000	100.000	92	2636.467	0.000	100.000		

Reporte del análisis de tamaño de partícula por difracción de luz láser. La sección A muestra las medidas de tendencia central. La sección B la polidispersión y la sección C la tabla de la dispersión de tamaños de partícula

para obtener secciones muy delgadas. La microscopia electrónica de alta resolución se realizó en el microscopio electrónico de emisión de campo JEOL 2100F operado a 200kV de el Laboratorio de Microscopia Electrónica del Laboratorio Central del la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

1.3.2 Morfología.

Para observar la morfología del NSLCL se utilizó la técnica de contraste con acetato de uranilo al 1% en agua [86] Se depositó con micropipeta una gota de muestra sobre un soporte de carbono, se dejó reposar por un minuto, se eliminó el exceso de muestra con papel secante, se cubre con una gota de solución de acetato de uranilo al 1%. Se dejó secar por un minuto y el exceso se elimina con papel secante y se dejó secar un minuto más, se colocó en la bayoneta de MET, se armó el equipo, y se generó vacío. Se observó la muestra con sistema óptico para seleccionar la sección a analizar. Con este proceso se analizaron las diferentes muestras NSLCL.

2. Evaluación del efecto antimicótico del KTZ incorporado en un NSLCL y comparación contra KTZ en solución y en base lipófila.

Inoculo

Para todos los ensayos en donde se utilizó inoculo, éste se preparo de la siguiente manera: se preparó 100 ml de medio de cultivo caldo Dextrosa SB marca Bioxon® según las instrucciones del fabricante. En ambiente estéril, con una asa microbiológica, se tomó una muestra de una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 cultivada en agar Dextrosa SB, se inoculó el medio de cultivo y se incubó durante 36 h a 37°C, me midió su densidad óptica en un espectrofotómetro en celda de cuarzo a una longitud de onda de 450 nm para determinar la concentración de levaduras.

2.1 Sensibilidad de la cepa *C albicans* ATCC10231 al Ketoconazol.

Para evaluar la sensibilidad de la cepa de referencia se utilizó la técnica Kirby-Bauer. Se utilizó como referencia discos comerciales de la marca Bio-rad® de 50 µg de Ketoconazol. Se sembró en superficie 0.5 ml del cultivo de *Candida albicans*, y se extendió con una varilla de vidrio en placas de agar dextrosa Sabouraud. Se colocaron los discos de referencia y se incubaron a 37°C por 24 h. se midieron los halos de inhibición del crecimiento de la levadura con al ayuda de un vernier.

2.2 Determinación de la CMI de Ketoconazol[a] en solución.

Se utilizó la técnica Kirby-Bauer, utilizándose discos de 0.5 cm de diámetro hechos de papel Whatman (41) impregnados con solución de KTZ. Las concentraciones estudiadas fueron 50, 100, 250, 500, 1500 y 2000 µg/ml. El KTZ se disolvió en metanol al 80%. Se inocularon placas de agar Dextrosa SB las cuales fueron inoculadas mediante la técnica de siembra en superficie, se colocaron los discos cargados con 300 microlitros de la solución de KTZ. Se incubaron por 24 h a 37°C y se midieron los halos de inhibición del crecimiento de la levadura.

2.3 Determinación de la CMI por vaciado en placa de Ketoconazol en solución.

Para el ensayo se prepararon medios de cultivo agar dextrosa Sabouraud en los cuales de agregó KTZ disuelto en metanol al 80%, se vació el medio con KTZ en cajas de Petri, se dejaron solidificar y se inocularon por extensión en superficie con suspensión de levaduras de *C. albicans,* se incubaron a 37°C por 24 horas, se observó en crecimiento microbiano. Las concentraciones analizadas se muestran en la tabla 4, en donde se indica la concentración final de KTZ en el medio de cultivo.

Tabla 4. Concentraciones de Ketoconazol[a] en agar dextrosa Sabouraud

Concentración de KTZ en el medio µg/ml	Concentración de KTZ en el medio µg/ml	Concentración de KTZ en el medio µg/ml	Concentración de KTZ en el medio µg/ml
0	70	350	900
5	80	400	1000
10	90	450	1500
20	100	500	2000
30	150	550	2500
40	200	600	3000
50	250	700	3500
60	300	800	--------

Concentraciones de KTZ[a] en Agar dextrosa Sabouraud, el fármaco se disolvió previamente en metanol al 80%.

2.4 Determinación de la CMI Ketoconazol en base lipófila y NSLCL.

Para determinar la CMI del KTZ incorporado en el NSLCL se utilizaron las técnicas de Kirby-Bauer y la de cilindro placa. Para realizar la primera se inocularon por extensión placas de agar SB con levaduras de *C. albicans* y se impregnaron con 300 µl de cada una de las ocho muestras de cristales líquidos en discos de papel Whatman #1 de 0,5 cm de diámetros, se colocaron en la superficie de la placa, se colocaron discos de referencia marca Bio-Rad® de 50 µg de KTZ. Se incubaron a 37°C por 36 horas y se midieron los halos en donde no hay crecimiento microbiano.

La técnica de cilindro/placa se utilizó para determinar la CMI del KTZ disuelto en una base lipófila (laureato) y en el NSLCL. Para lo cual se inocularon placas de agar SB con levaduras disueltas en el medio de cultivo, se les perforaron pozos, en cada pozo se colocaron 300 µl de muestra, se incubaron por 36 horas a 37°C, y se midieron los halos de inhibición del crecimiento. En la tabla 5 se muestran los diferentes porcentajes de agar en el medio de cultivo y las concentraciones de KTZ en las diferentes muestras, se disminuyó el porcentaje

de agar en el medio de cultivo SB con la finalidad de disminuir los problemas de difusión del KTZ.

Tabla 5. Porcentaje de agar en el medio de cultivo

% de agar en el medio	Base lipófila	NSLCL
	Concentración KTZ[a] µg/ml	Concentración KTZ[a] µg/ml
1.5	20	1
	30	2
	40	3
1.3	20	1
	30	2
	40	3
1.2	20	1
	30	2
	40	3

Se probaron tres diferentes porcentajes de agar en el medio de cultivo SB con la finalidad de reducir la resistencia a difundir de las muestras. Ambos sistemas se probaron colocando 300 µl en cada pozo.

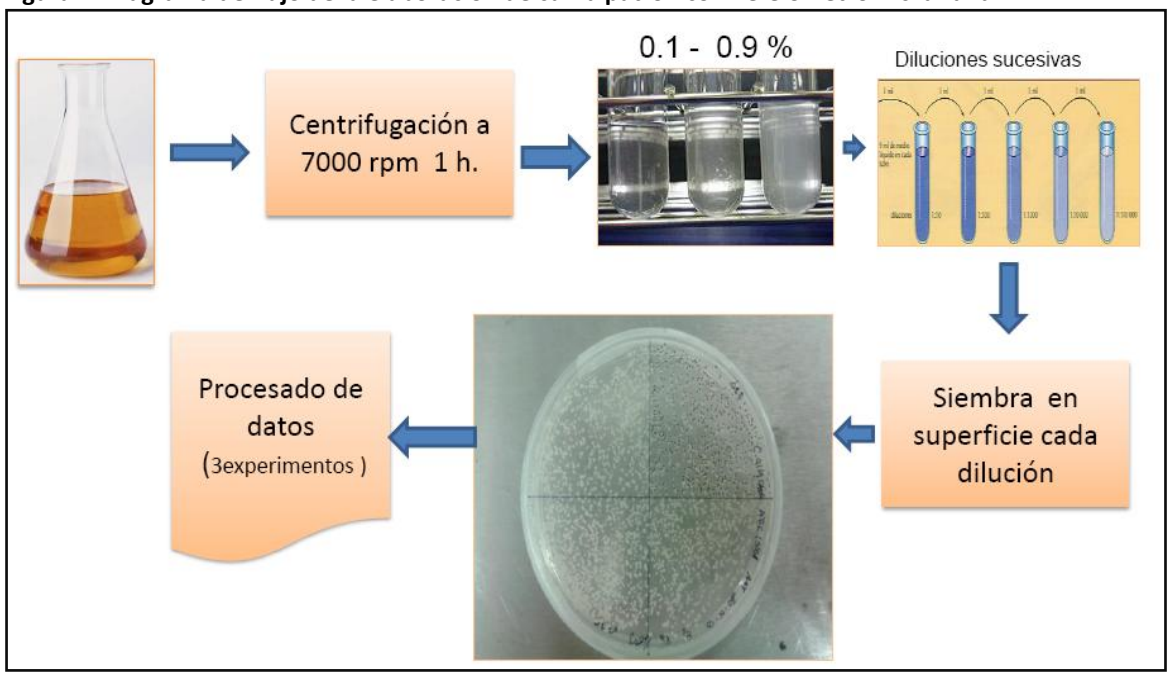
3 Desarrollo del método de cuantificación de levaduras por turbimetría mediante la adaptación del nefelómetro de McFarland.

Se prepararon los nueve tubos del nefelómetro de McFarland, con cloruro de bario al 1%, y cantidades crecientes de ácido sulfúrico al 1%, para formar precipitados de sulfato de Bario.

Se inoculó un cultivo de 500 ml de en caldo SB, con levaduras de *C. albicans,* se incubó por 48 horas a 37°C. La suspensión de levaduras se centrifugó a 7000 rpm por 60 minutos. Se desechó el sobrenadante, las levaduras fueron

resuspendidas en solución salina estéril para obtener una suspensión muy concentrada de levaduras. Se añadieron alícuotas de la suspensión de levaduras a tubos con solución salina hasta que se logró igualar la densidad óptica de cada uno de los tubos del nefelómetro con levaduras de *C. albicans,* la densidad óptica se midió a 540 nm. A cada uno de los nueve tubos con levaduras se les realizaron cuatro diluciones sucesivas (10°, 10^{1}, 10^{2}, 10^{3}, $10^{4)}$, se tomaron 500 µl de cada dilución de cada tubo, y se inocularon por triplicado placas de agar SB. Se incubaron por 36 horas a 37°C. Se realizó el conteo en placa. La figura 4 muestra este proceso. Se determinó la relación entre densidad óptica y concentración de levaduras, se elaboró la curva patrón de concentraciones de levaduras.

Figura 4. Diagrama de flujo de la elaboración de curva patrón con nefelómetro McFarland.



Se utilizó el fundamento de la nefelometría para realizar una curva patrón de concentración de levaduras de *Candida albicans* ATCC 10231. La cuenta estándar o conteo en placa se realizó por triplicado.

4. Determinación mediante el método de microdilución en caldo de la CMI en *Candida albicans* del NSLCL conteniendo Ketoconazol y comparación contra la CMI de Ketoconazol en solución.

Para determinar la CMI del KTZ incorporado en el NSLCL y la comparación con el KTZ disuelto en metanol al 80%, se realizaron cinéticas de crecimiento de *C. albicans* en medio de cultivo líquido (caldo), se inoculó con 0.5 ml de la suspensión de levaduras un matraz con 250 ml de caldo Sabouraud al que se le adicionó Ketoconazol incorporado en NSLCL. En la tabla 6 se muestran las concentraciones de KTZ analizadas en ambos vehículos. Se incubó a 37°C y durante cada cuatro horas desde el tiempo cero hasta 130 horas se tomó una muestra de 2 ml de la suspensión de levaduras, se midió su densidad óptica y se transformó la absorbancia (abs) medida a UFC/ml utilizando el nefelómetro, las muestras se leyeron en un espectrofotómetro UV/Vis marca HP a una longitud de onda de 540 nm.

Tabla 6. Concentraciones de Ketoconazol[a] analizadas en cinéticas decrecimiento.

Ketoconazol[a] en solución µg/ml	Ketoconazol[a] incorporado en SNLCL µg/ml
0	0
10	4
30	8
40	12
50	24
----	36

Con las cinéticas de crecimiento de *C. albicans* se determinó la CMI del KTZ incorporado en NSLCL y disuelto en metanol al 80%.

5. Comparación del efecto inhibitorio del Ketoconazol incorporado en NSLCL con el de formas farmacéuticas comerciales.

5.1 Determinación del efecto antimicótico de formas farmacéuticas comerciales con Ketoconazol por el método Kirby-Bauer.

Se determinó el efecto antimicótico de dos formas farmacéuticas comerciales que contienen KTZ; tabletas 200 mg y suspensión oral al 2%. Para lo cual se extrajo el KTZ de la forma farmacéutica con metanol al 85%.

Se molió en un mortero una tableta de 200 mg, se disolvió en metanol, se filtro en papel filtro Whatman #1 y se aforó a 100 ml. Se esterilizó por filtración con filtros Millipore® 0.22 µm. Se inocularon por extensión placas de agar SB, se colocaron en la superficie de la placa discos de papel Whatman impregnados con 300 µl de la solución de KTZ. Se incubaron a 37°C por 36 horas. Se midieron los halos de inhibición.

Para probar la suspensión oral al 2%, se tomó una muestra de 10 ml de suspensión, se diluyó con 40 ml de metanol al 80%, se agitó por 10 minutos. Esta mezcla se centrifugó por 30 minutos a 5000 rpm. Se recuperó el sobrenadante, se filtró y se aforó a 50 ml con metanol al 80%. Se esterilizó la solución por filtración mediante filtro Millipore® 0.22 µm. Se inocularon por extensión placas de agar SB con *Candida albicans*, se colocaron en la superficie de la placa discos de papel Whatman impregnados con 300 µl de la solución de KTZ. Se incubaron a 37°C por 36 horas. Se midieron los halos de inhibición.

5.2 Determinación del efecto antimicótico de formas farmacéuticas comerciales con Ketoconazol por el método de microdilución en caldo.

Para comparar el efecto inhibitorio o antifúngico del NSLCL con KTZ y compararlo con formas farmacéuticas comerciales de KTZ, se realizaron cinéticas de crecimiento de levaduras *C. albicans* en medio de cultivo líquido (caldo). Se inoculó con 0.5 ml un matraz con 250 ml de caldo SB al que se le

adicionó KTZ disuelto en metanol al 80% previamente extraído de los excipientes de las formas farmacéuticas: Tabletas Nizoral de 200 mg y Suspensión Nizoral al 2% , la tabla 7 muestra las concentraciones de KTZ analizadas en dos formas farmacéuticas. Se incubó a 37°C. Se tomó una muestra de 2 ml de la suspensión de levaduras, se midió la densidad óptica y se transformó la absorbancia (abs) medida a concentración de UFC/ml. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro UV/Vis marca HP a una longitud de onda de 540 nm. Se muestreó cada cuatro horas y se siguió la cinética desde el tiempo 0 hasta 130 horas.

Tabla 7. Concentraciones de Ketoconazol [c, d] comparadas en cinéticas decrecimiento.

Nizoral Tabletas µg/ml	Nizoral Suspensión µg/ml
20	20
30	30
40	40

Las cinéticas de crecimiento de *C. albicans* ayudaron para comparar el efecto antimicótico de las formas farmacéuticas comerciales y el NSLCL contra el crecimiento normal de la levadura en el medio de cultivo SB. [c] tabletas Nizoral de 200mg. [d] suspensión oral Nizoral al 2%.

6. Determinación por microscopía electrónica de transmisión el efecto de NSLCL con KTZ sobre la morfología de las levaduras de *C. albicans.*

Para determinar el efecto que el KTZ incorporado en NSLCL tiene sobre la morfología de las levaduras de *C. albicans.* Se inocularon con 0.5 ml de la suspensión de levaduras reactores de 250 ml de medio de cultivo caldo SB, a los cuales se le adicionaron diferentes cantidades de KTZ incorporado en NSLCL, la tabla 8 muestra las concentraciones de KTZ que se prepararon para ser analizadas en el microscopio electrónico de transmisión. Los reactores

inoculados y con NSLCL fueron incubados a 37°C durante 36 h. Terminado el tiempo de incubación, se separaron las levaduras del medio de cultivo por centrifugación. Se centrifugó cada muestra a 7000 rpm durante una hora. Se desechó el sobrenadante, las levaduras se colocaron en viales de vidrio, se congelaron a -70°C en un ultracongelador REVCO, se liofilizaron hasta sequedad. Se sellaron los viales para conservar la esterilidad, se enviaron al laboratorio de microscopia electrónica. Para observar las muestras en el MET, cada una de las muestras fue molida en un mortero de ágata, se colocaron en un vial con alcohol isopropílico, se dispersaron sobre una rejilla de cobre cubierta de carbono (200 mesh). Se observaron en un microscopio electrónico emisión de campo de alta resolución marca JEOL 2100F a 200 kV.

Tabla 8. Tratamientos para microscopia electrónica de transmisión.

Muestra	Tratamiento	Concentración KTZ[a] µg/ml	Lote NSLCL
N1	Levaduras	-------	-----
N2	Levaduras + 1 ml NSLCL	0	NS5
N3	Levaduras + 1 ml NSLCL	4	NS6
N4	Levaduras + 1 ml NSLCL	8	NS7
N5	Levaduras + 1 ml NSLCL	12	NS8

Se muestran los diferentes tratamientos que se les aplicó a los cultivos de *C. albicans.* Todas las muestras se cultivaron y trataron al mismo tiempo, y bajo las mismas condiciones.

Resultados

1. Reproducción y caracterización de un sistema líquido cristalino conteniendo Ketoconazol.

1.1 Reproducción del NSLCL.

Utilizando las proporciones de la tabla 3 se elaboraron 8 lotes, los cuales presentaron uniformidad en su aspecto físico, tal como se observa en la imagen 3 en donde no se aprecian diferencias visibles entre los lotes y tampoco se observa la presencia de agregados, así mismo en la imagen 4 se puede observar que no hay precipitados en los matraces con medio de cultivo después de haber agregado diferentes cantidades de NSLCL.

Imagen 3. Lotes de NSLCL en proceso de diálisis.

De izquierda a derecha, lotes N1, N2, N3 en proceso de diálisis, no hay diferencias visibles en su aspecto físico, tampoco se observan sólidos o precipitados.

Las cinéticas de crecimiento de *C. albicans* pudieron realizarse debido a que se logró disolver el NSLCL en el medio de cultivo.

Imagen 4. NSLCL cargado con KTZ disuelto en medio de cultivo SB.

Fotografía de medios de cultivo inoculados con C. albicans y con diferentes concentraciones de KTZ incorporado en NSLCL. El principio activo y el Nanoacarreador se disolvieron en el medio sin dificultad (2 ml de NSLCL + KTZ). De izquierda a derecha: lote N6, N8, N7 2 ml en SB.

1.2 Determinación del tamaño de partícula.

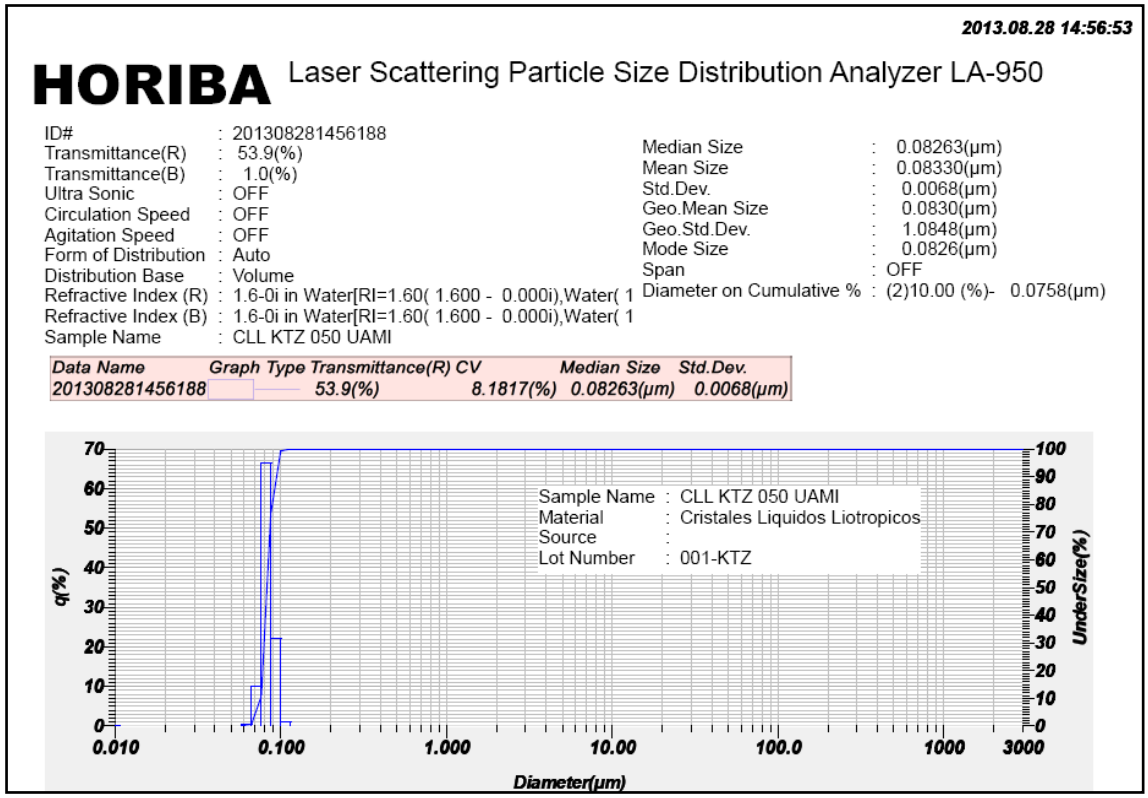
Usando el equipo HORIBA se determinó el tamaño de partícula de los lotes elaborados del NSLCL con y sin KTZ incorporado en el. La figura 5 muestra algunos de los difractogramas obtenidos, los difractogramas completos se pueden consultar en el anexo 1. En estos difractogramas se pueden leer los diferentes datos de interés del sistema como el tamaño de partícula y la polidispersidad del la muestra. Con estos datos se elaboró la tabla 9 que contiene las medias del tamaño de partícula de los lotes analizados. El promedio general del tamaño de partícula del NSLCL se determinó en 80 nm.

Tabla 9. Tamaño de partícula NSLCL.

Lote NSLCL	Ø nm
NS1	81
NS2	85
NS3	80
NS4	83
NS5	73
NS6	82
NS7	74
NS8	85
	80 ± 4

Se muestran los tamaños de partícula de cada lote de NSLCL, y promedio global y la desviación estándar.

Figura 5. Difractogramas de NSLCL.



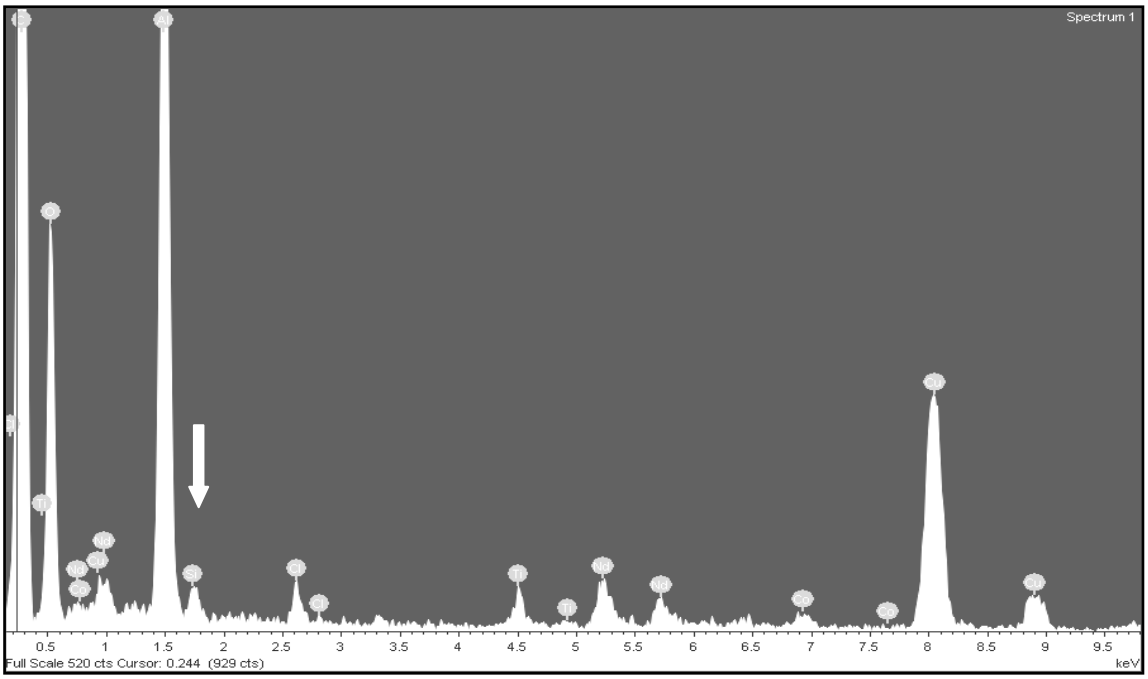
Los difractogramas son la interpretación de los patrones de difracción de un haz de luz láser que pasa a través de una muestra. Los círculos muestran las medidas de tendencia central de los tamaños de partícula. La polidispersidad se representa con el histograma. La polidispersidad es el grado de variación o amplitud de una campana gausiana que representa la distribución de los tamaños de partícula de una muestra. Los difractogramas de las muestras analizadas pueden verse en el anexo.

1.3 Microscopía Electrónica de Transmisión

1.3.1 Análisis elemental

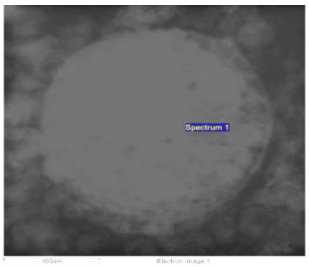
En primer lugar se analizó el KTZ puro, la figura 6 muestra el espectro de masas del KTZ. Se identificó el pico característico del Silicio, una impureza presente en la materia prima. La figura 7 es el espectro de masas del lote N1 del NSLCL con KTZ, se determinó que el Silicio se encuentra presente en la muestra de NSLCL. El análisis elemental muestra que aunque mínima hay presencia de Silicio dentro de la nanoestructura analizada.

Figura 6. Espectro de masas para Ketoconazol[a]

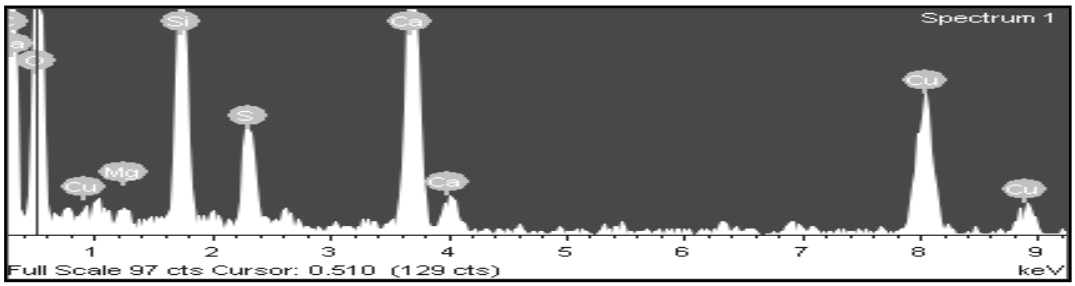


Espectro de masas de Ketoconazol, la flecha marca el pico que muestra la presencia de Silicio en la muestra.

Figura 7. Espectro de masas del lote N1 de NSLCL



Element	Weigh t%	Atomic%
C K	78.14	89.31
O K	5.80	4.97
Mg K	0.34	0.19
Si K	3.99	1.95
S K	1.73	0.74
Ca K	5.32	1.82
Cu K	4.68	1.01
Totals	100.00	

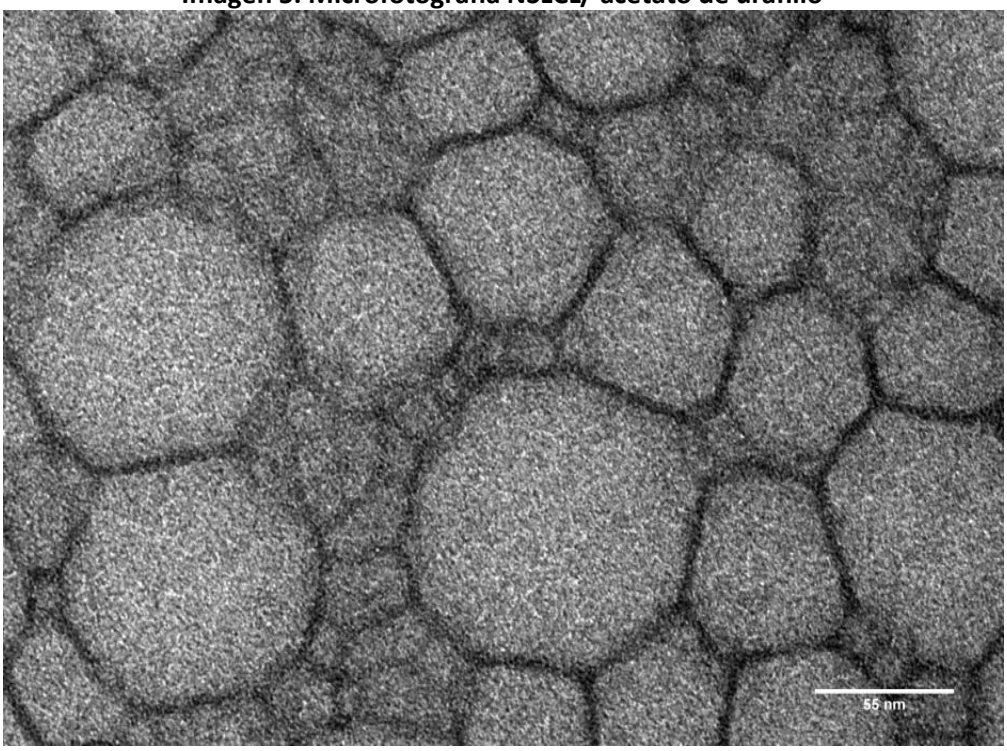


El análisis elemental y el espectro de masas del lote N1 del NSLCL con KTZ, revela la presencia del Silicio perteneciente al KTZl[a] La flecha marca el pico del Silicio.

1.3.2 Morfología.

La morfología del NSLCL se estudió con MET, la imagen 5 muestra las estructuras que se forman en el sistema nano estructurado, se pueden ver formas hexagonales o hexosomas, esta imagen se tomó a 80 kV y fue contrastada con acetato de uranilo.

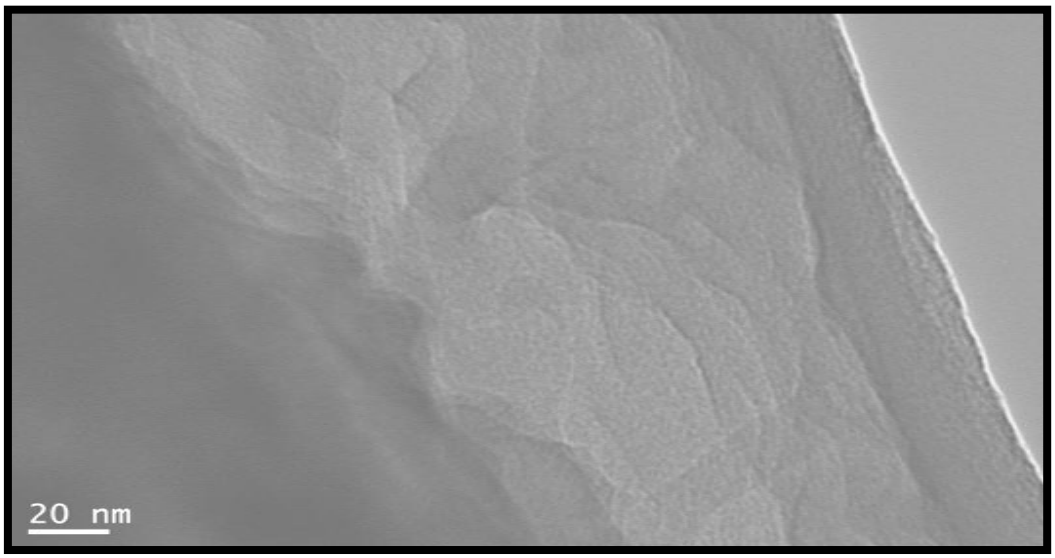
Imagen 5. Microfotografía NSLCL/ acetato de uranilo



Microfotografía obtenida por MET, la muestra fue tratada con acetato de uranilo. Acercamiento a 50000 X se puede ver que el sistema nanométrico se organiza en hexosomas. La muestra tiene incorporado KTZ. La barra marca 55 nm.

La imagen 6 muestra la morfología a 200 kV sin contraste, aunque es un acercamiento mayor, no se aprecia con claridad la estructura del NSLCL, ya que la técnica utilizada en este microscopio fue desarrollada para sólidos, mientras que el sistema analizado es un sistema líquido. La imagen 5 y la imagen 6 fueron tomadas con microscopios y técnicas diferentes.

Imagen 6. Microfotografía MET en portaobjetos criogénico.



Microfotografía obtenida en microscopio electrónico de alta resolución y portaobjetos criogénico, lote N1 aunque el alcance del microscopio supera los 50000 aumentos, la técnica para observar líquidos no esta bien desarrollada. Se aprecia la estructura hexosómica del nano sistema.

2. Evaluación del efecto antimicótico del KTZ incorporado en un NSLCL y comparación contra KTZ en solución y en base lipófila.

2.1. Sensibilidad de la cepa de referencia *C. albicans* ATCC 10231 al Ketoconazol.

La prueba de sensibilidad al KTZ de la cepa de referencia *C albicans* ATCC10231 con sensidiscos marca Bio-Rad® resultó positiva, por lo que en las placas se pudieron medir halos de inhibición del crecimiento microbiano como se muestra en la imagen 7. Las medidas de los halos de inhibición fueron recogidas en la tabla 10.

Imagen 7. Fotografía sensibilidad de *C albicans* ATCC10231 a Ketoconazol

Levaduras crecidas en placas de agar SB, en cada placa se colocaron 2 discos de 50 µg marca Bio-Rad como referencia. Se aprecian los halos de inhibición causado por el antimicótico. La fecha señala un halo de inhibición mientras que el segmento de recta marca el diámetro de un halo de inhibición del crecimiento.

Tabla 10. Prueba de sensibilidad a Ketoconazol.

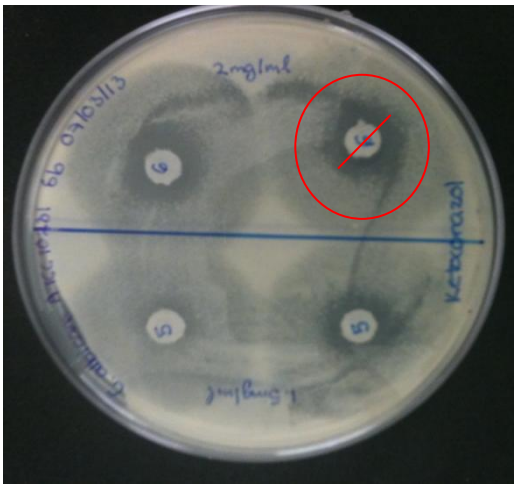
Muestra	Halos de inhibición Ø mm
1	**14**
2	**14.5**

Se determinó la sensibilidad de la cepa de *C albicans* ATCC 10231 a Ketoconazol, se utilizaron discos comerciales de Ketoconazol con 50 µg de Ketoconazol de la marca Bio-Rad.

2.2 Determinación de la CMI del Ketoconazol[a] en solución.

El primer ensayo para determinar la CMI del KTZ con el que se elaboraría el NSLCL fue el método Kirby-Bauer, la imagen 8 es un ejemplo de los resultados obtenidos por esta técnica, en este caso muestra las regiones de nulo crecimiento microbiano (halos de inhibición). Una vez finalizado el tiempo de incubación de las placas, se midieron los halos de inhibición de cada una de las concentraciones, se calculó su media aritmética y con estos datos se elaboró la tabla 11, en donde se resumen los resultados de la prueba, y se señala como CMI 250 µg/ml.

Imagen 8. Resultado del ensayo Kirby-Bauer con KTZ en solución.



El círculo muestra la zona de inhibición de crecimiento, la línea, el diámetro del halo de inhibición. En este caso se probó una concentración de 2000 µg/ml de KTZ

Tabla 11. Resumen de resultados ensayo Kirby-Bauer KTZ en solución.

Concentración KTZ	Diámetro mm (media)
50 µg/ml	0
100 µg/ml	0
250 µg/ml	26
500 µg/ml	30
1500 µg/ml	32
2000 µg/ml	38

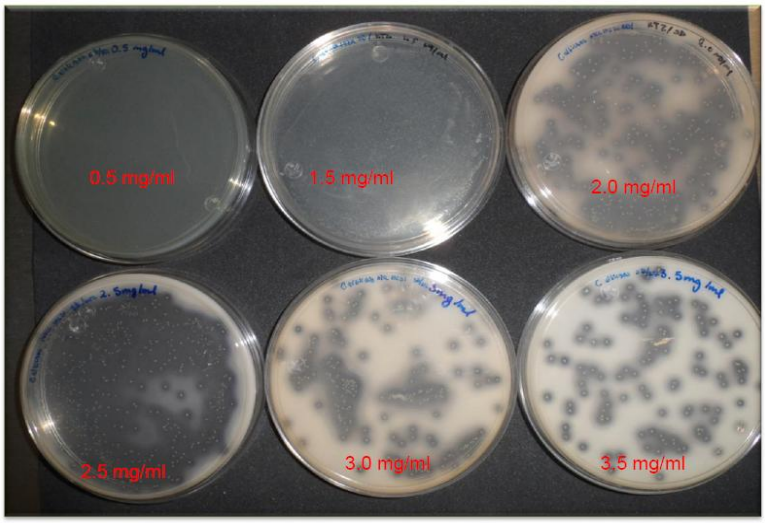
Se muestran las medias de los halos de inhibición de todas las concentraciones analizadas

2.3 Determinación de la CMI por vaciado en placa de Ketoconazol en solución.

Para confirmar o descartar este resultado se procedió a realizar la determinación de la CMI del KTZ pero ahora con la técnica de vaciado en placa en donde el KTZ de encuentra disuelto en el agar SB. La imagen 9 muestra algunos resultados del ensayo.

Se observa una inhibición del crecimiento de levaduras de *C. albicans* hasta 1.5 mg KTZ/ml ya que en concentraciones mayores encontramos precipitación del fármaco.

Imagen 9. Ensayo de inhibición por vaciado en placa.



Se muestran algunas concentraciones de KTZ disuelto en el agar. Se observa un nulo crecimiento de levaduras de *C. albicans* a partir de 1.5 mg KTZ/mL. En concentraciones mayores se observa la precipitación del fármaco. En el anexo 6 se pueden ver más imágenes de este ensayo.

En el ensayo de vaciado en placa, se observó que a altas concentraciones el KTZ tiende a precipitar, formando cristales, disminuyendo su efecto antifúngico. La tabla 12 muestra los resultados de las concentraciones probadas, en este caso no se buscan halos de inhibición, se considera positivo cuando en la placa no hay crecimiento alguno de levaduras. Con este criterio se determinó la CMI en 40 µg/ml.

Tabla 12. Resultados del ensayo de inhibición de *C albicans* en cilindro/placa.

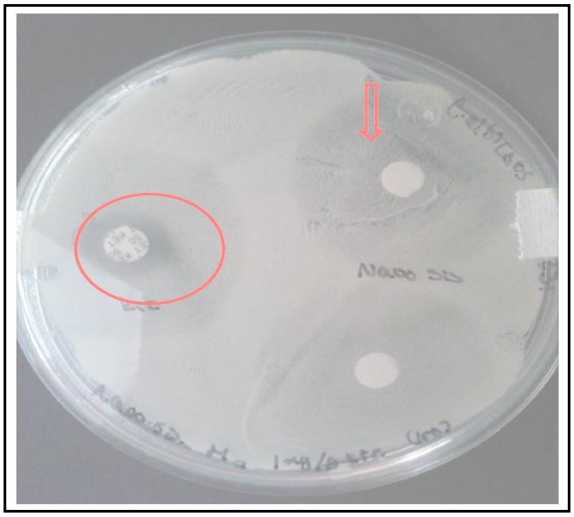
Concentración KZT µg/ml	Crecimiento	Concentración KTZ µg/ml	Crecimiento	Concentración KTZ µg/ml	Crecimiento	Concentración KTZ µg/ml	Crecimiento
3000	-	600	-	200	-	40	-
2500	-	550	-	150	-	30	++
2000	-	500	-	100	-	20	++
1500	-	450	-	90	-	10	++
1000	-	400	-	80	-	5	++
900	-	350	-	70	-	0	++
800	-	300	-	60	-	--------	
700	-	250	-	50	-	--------	

Se muestran todas las concentraciones de KZT analizadas por vaciado en placa. Se determina que la CMI es de 40 µg/ml. (- ausencia de crecimiento, ++ crecimiento).

2.4 Determinación de la CMI del Ketoconazol en base lipófila y NSLCL.

Los resultados del ensayo Kirby-Bauer se resumen en la tabla 13, en donde se muestra que el NSLCL no difunde en la placa de agar. La imagen 10 muestra las placas de inhibición con disco de referencia marca Bio-Rad®, mientras que no se presentan halos de inhibición en los discos impregnados con el NSLCL, por lo cual se realizó la técnica cilindro/placa con reducción del porcentaje de agar.

Imagen 10. Comparación del efecto inhibitorio del NSLCL y discos de referencia.



Se muestra el halo de inhibición del disco de referencia (50 μg/ml Bio-rad) en el círculo, la flecha marca el disco impregnado con NSLCL, no se aprecia halo de inhibición.

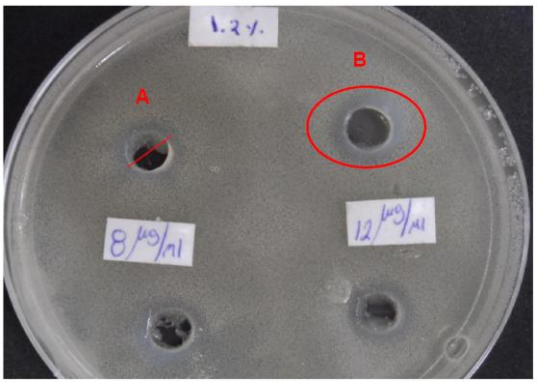
Tabla 13. Resultados de la prueba Kirby-Bauer de NSLCL.

Lote NSLCL	Ø mm
N1	0.0
N2	O.0
N3	0.0
N4	0.0
N5	0.0
N5	0.0
N7	0.0
N8	0.0

Se muestran los resultados del la prueba con KTZ incorporado en NSLCL en sensidiscos, los resultados sugieren que el sistema presenta dificultad para difundir en el agar.

La reducción del porcentaje de agar en el medio de cultivo, tuvo como finalidad minimizar la dificultad de los sistemas a difundir. La imagen 11 muestra un ejemplo de los resultados obtenidos con esta técnica, se aprecia el halo de inhibición que se forma alrededor del pozo en el que se colocó la muestra a analizar, se mide solo el área de inhibición de crecimiento de levaduras de *C. albicans*.

Imagen 11. Ensayo cilindro/placa con agar al 1.2% NSLCL sobre *C. albicans.*



La imagen muestra los halos de inhibición provocados por NSLCL sobre levaduras de *C. albicans*, en este caso en una placa de agar SB con solo el 1.2% de agar en la formulación del medio. A) lote NS7 B) lote NS9.

En el ensayo cilindro/placa para el KTZ incorporado en NSLCL presenta halos de inhibición en concentraciones de agar por debajo de 1.3%, y para el KTZ disuelto en una base líquida lipófila que simula una formulación en crema, se observa que el KTZ es incapaz de difundir en el agar a pesar de haberse reducido la concentración de éste en el medio de cultivo. La tabla 14 muestra los resultados de este ensayo.

Tabla 14. Halos de inhibición del ensayo cilindro/placa base lipófila y NSLCL.

	BASE LIPÓFILA
[KTZ] µg/ml	Ø mm (media)
1.5 % DE AGAR	
20	0
30	0
40	0
1.3 % DE AGAR	
20	0
30	0
40	0
1.2% DE AGAR	
20	0
30	0
40	0

	Nano sistema CLL
[KTZ] µg/ml	Ø mm (media)
1.5 % DE AGAR	
1	0
2	0
3	0
1.3 % DE AGAR	
1	13.5
2	8.5
3	13.5
1.2% DE AGAR	
1	11.5
2	11.0
3	12.0

Resultados del ensayo cilindro/placa. En donde se evaluaron diferentes concentraciones de agar en el medio de cultivo, el Ketoconazol disuelto en la base lipófila no pudo difundir. El NSLCL mostro un mejor comportamiento en medios con menor cantidad de agar.

3. Desarrollar un método de cuantificación de levaduras por turbimetría mediante el uso del nefelómetro de McFarland.

Se prepararon los nueve tubos del nefelómetro de McFarland. Se inoculó un cultivo de 500 ml de en caldo SB, con levaduras de *C. albicans,* una vez crecida se centrifugó y se resuspendió en solución salina estéril para obtener una suspensión de levaduras que iguale la densidad óptica de cada uno de los tubos del nefelómetro leídos a 540 nm. A cada uno de los nueve tubos con levaduras se le realizaron cuatro diluciones (directo, 10^1, 10^2, 10^3, $10^{4)}$, se tomaron 500 µl de cada dilución, y se inocularon por triplicado placas de agar

SB. Se incubaron durante 36 horas a 37°C. Se realizó el conteo en placa. La imagen 12 muestra uno de estos conteos.

Imagen 12. Cuenta estándar de levaduras de *C. albicans.*

Se muestra el conteo de UFC/ml en la dilución $10^{-4.}$

La cuantificación de UFC se muestra en la tabla 15, en donde se puede observar que el rango de UFC/ml va de 4.6 millones para la densidad óptica del tubo 1 hasta 51.7 millones para el tubo 9 del nefelómetro, estas concentraciones contrastan con las reportadas para nefelómetros realizados con bacterias, pues en éstos las concentraciones sobrepasan los cientos de millones de bacterias. Por este motivo se elaboró una curva con levaduras de *Candida albicans* ATCC 10231 para ser usada como curva patrón e interpolar los valores de absorbancia de cualquier cultivo en medio líquido.

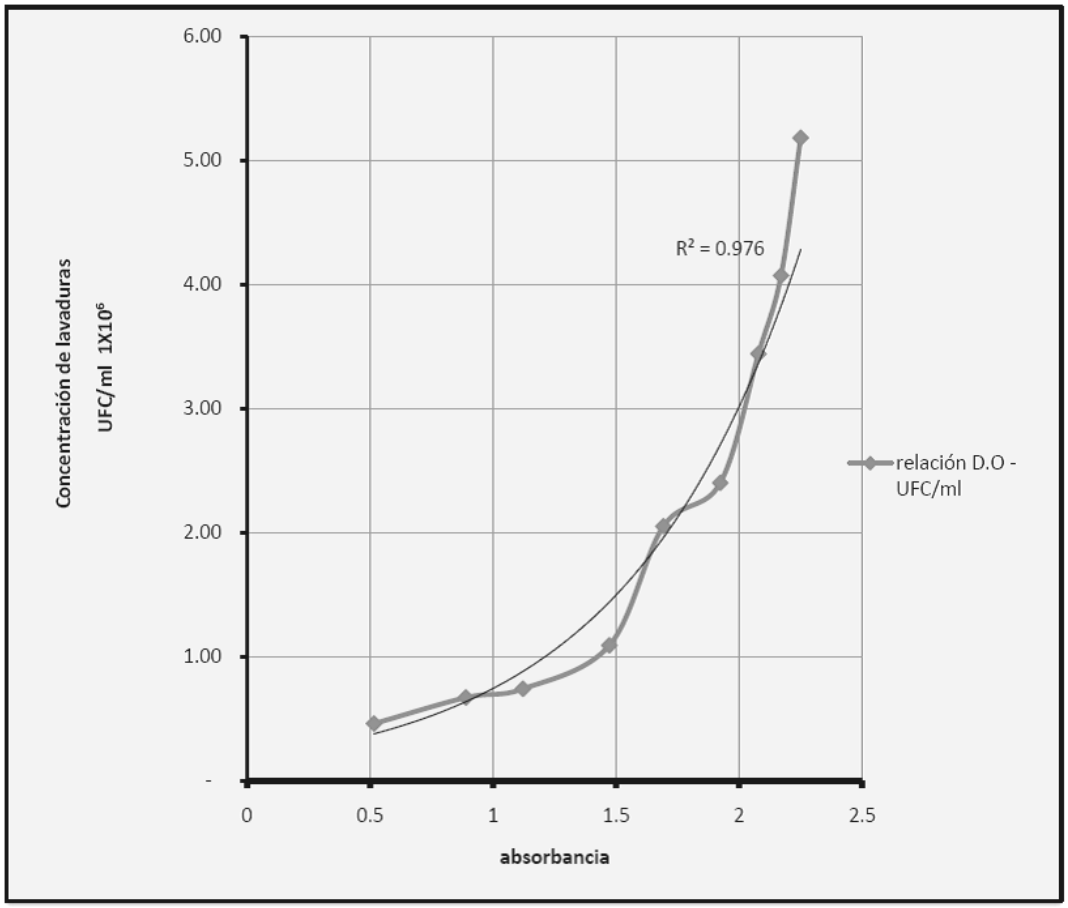
En la gráfica 1 se muestra la curva patrón de levaduras de *C. albicans*, se observa que el coeficiente de correlación (R^2) tienen un valor de 0.976 por lo que pude ser usada para los fines que fue desarrollada (determinar la concentración de UFC/ml).

Tabla 15. Nefelómetro con levaduras de *C. albicans* ATCC10231.

Tubo #	abs McFarland	Abs Levaduras	UFC/ml ($1X10^6$)
1	0.5271	0.5163	4.6
2	0.9040	0.8898	6.7
3	1.0976	1.1219	7.4
4	1.5020	1.4729	10.9
5	1.6953	1.6926	20.5
6	1.9273	1.9239	24.0
7	2.0805	2.0791	34.4
8	2.1764	2.1707	40.6
9	2.2086	2.2505	51.6

Se determinaron las UFC/mL de levaduras a los mismos valores de absorbancia del nefelómetro de McFarland.

Gráfica 1. Curva patrón que relaciona la turbidez (absorción) con las UFC/ml de levaduras de *C. albicans* ATCC10231.

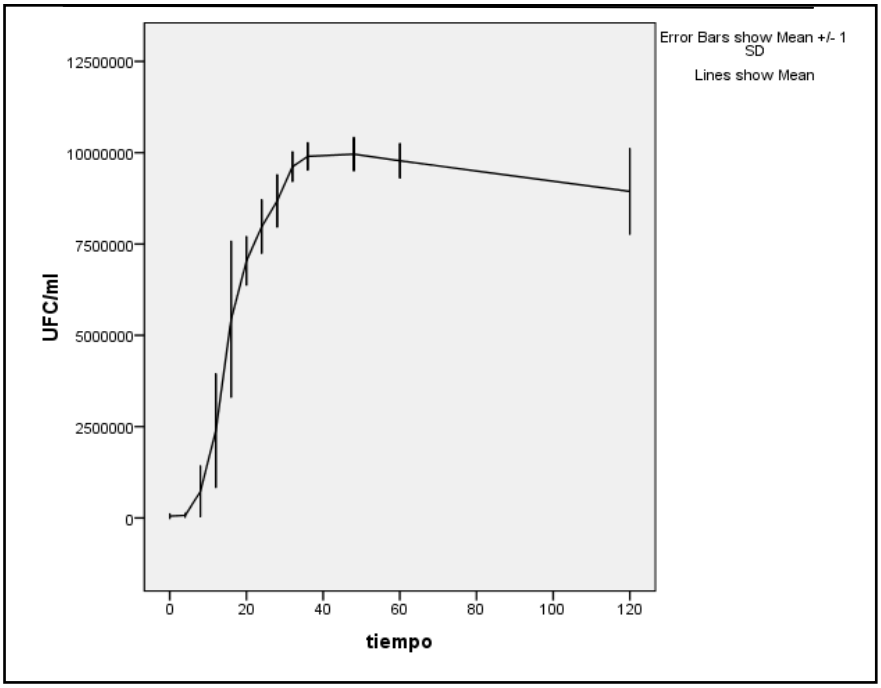


Gráfica de turbidez (absorción) contra UFC/ml de levaduras, obtenida por cuenta estándar.

4. Determinación mediante el método de microdilución en caldo de la CMI en *Candida albicans* del NSLCL conteniendo Ketoconazol y comparación contra la CMI de Ketoconazol en solución.

En la gráfica 2 se muestra la curva tipo o característica de la cepa ATCC 10231 de *C.albicans*, la gráfica se elaboró con el programa informático SPSS®17.

Gráfica 2. Curva de crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231.



La gráfica muestra el crecimiento de la cepa de referencia. Se graficó UFC/ml contra tiempo en horas.

La curva de crecimiento fue elaborada con la media de cinco cinéticas diferentes. La tabla 16 muestra los valores de absorbancia y concentración de UFC/ml. Se siguió las cinéticas durante 120 h con muestreo cada dos horas.

En la tabla 16 se muestran también los valores de concentración de cinéticas de crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de KTZ disuelto en metanol al 80%.

Tabla 16. Tabla de valores de concentración de levaduras en presencia de KTZ.

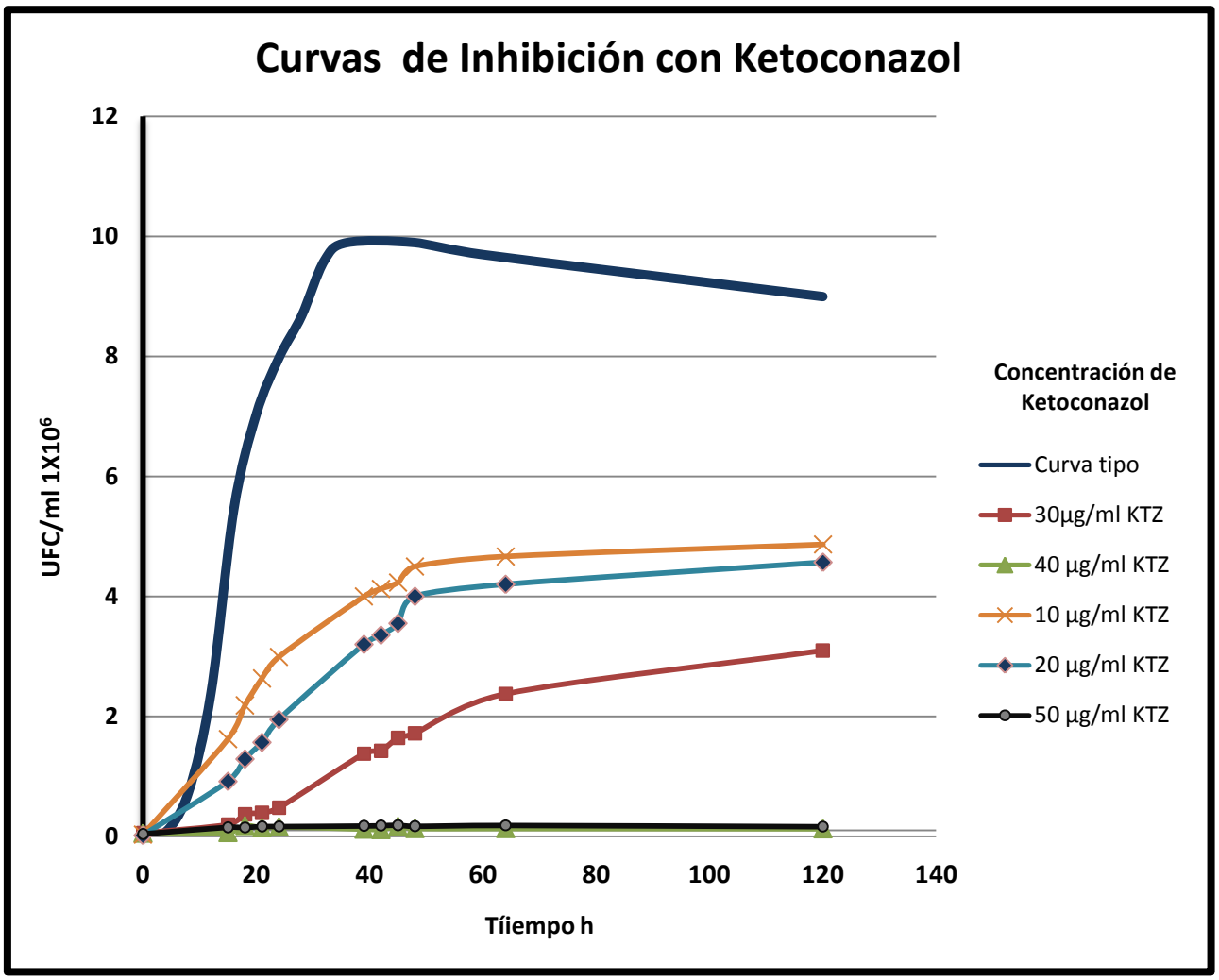
KTZ	10 µg/ml		20µg/ml		30µg/ml		40µg/ml		50µg/ml	
tiempo	UFC/ml	DE	UFC/ml	DE	UFC/ml	DE	UFC/ml	DE	UFC/ml	DE
h	10^6		10^6		10^6		10^6		10^6	
0	0.03	0.01	0.02	0.00	0.05	0.02	0.05	0.00	0.04	0.00
15	1.62	0.19	0.92	0.20	0.19	0.07	0.06	0.11	0.15	0.00
18	2.18	0.18	1.29	0.17	0.36	0.02	0.18	0.10	0.15	0.01
21	2.63	0.06	1.57	0.11	0.39	0.05	0.14	0.05	0.17	0.01
24	2.99	0.09	1.95	0.11	0.48	0.09	0.16	0.06	0.16	0.01
39	4.00	0.10	3.20	0.12	1.38	0.28	0.12	0.06	0.17	0.00
42	4.13	0.05	3.35	0.11	1.42	0.32	0.11	0.05	0.18	0.01
45	4.23	0.23	3.55	0.14	1.64	0.33	0.17	0.11	0.18	0.00
48	4.50	0.00	4.00	0.00	1.72	0.31	0.13	0.00	0.17	0.00
64	4.67	0.06	4.20	0.00	2.37	0.28	0.13	0.03	0.18	0.00
120	4.87	0.06	4.57	0.20	3.10	0.16	0.13	0.10	0.16	0.01

Valores de la concentración de levaduras *C. albicans* ATCC 10231 (UFC/ml), en presencia de KTZ, se analizaron por triplicado, la tabla muestra la media y la desviación estándar.

Los valores de concentración de levaduras (UFC/ml) fueron determinadas comparando los valores de absorbancia medidos con la curva patrón obtenida con el nefelómetro.

La gráfica 3 muestra las curvas de inhibición del crecimiento de levaduras en presencia de KTZ. Se adicionaron al medio de cultivo cinco diferentes concentraciones de KTZ previamente disuelto en metanol. Estos datos se usaron como datos de referencia del efecto inhibitorio del KTZ.

Gráfica 3. Cinéticas de inhibición de Ketoconazol sobre levaduras de *C. albicans.*

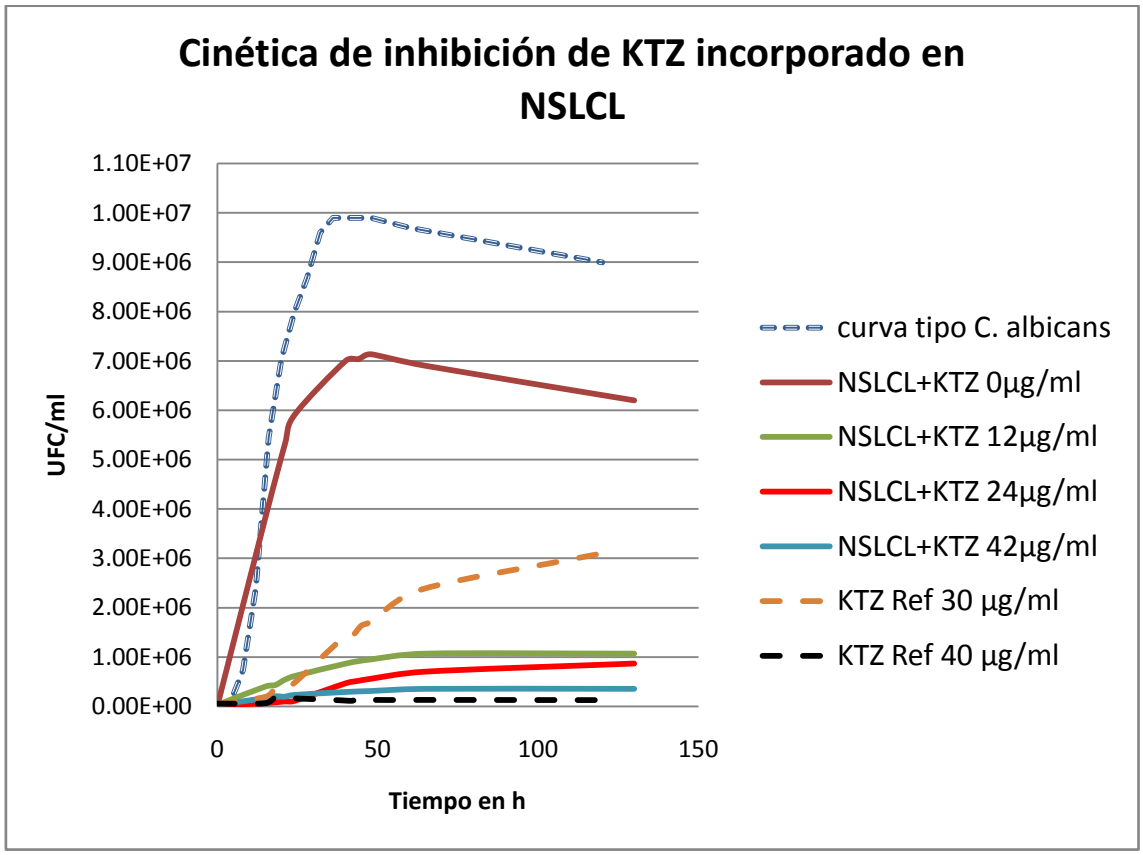


Se muestran las curvas de inhibición de KTZ, se analizaron cinco diferentes concentraciones de Ketoconazol disuelto en metanol al 80%, y se comparan con la curva de crecimiento patrón de la cepa ATCC 10231.

Para determinar el efecto antifúngico del Ketoconazol incorporado en el NSLCL se llevaron a cabo las cinéticas de inhibición, la gráfica 4 y 5 muestran las curvas de inhibición del KTZ incorporado en NSLCL en diferentes concentraciones. Las diferentes concentraciones se lograron adicionando diferentes cantidades en la formulación de un mismo lote de NSLCL en el medio de cultivo.

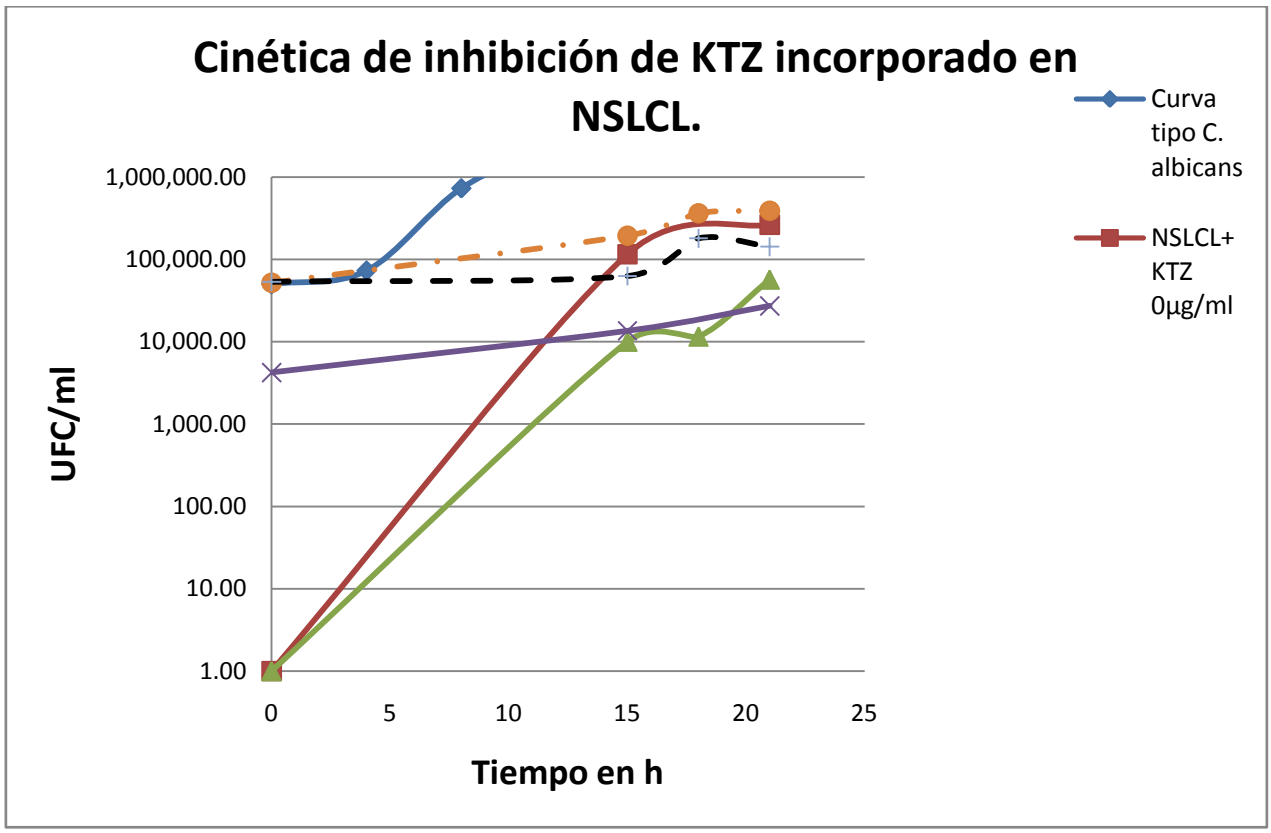
La gráfica 6 muestra cinéticas de inhibición de NSLCL, en este caso se colocó un mililitro de cada lote, esta vez los lotes contenían diferentes concentraciones de KTZ, es decir se mantuvo constante la cantidad de NSLCL lo que varió fue la concentración de KTZ en el lote.

Gráfica 4. Cinética de de inhibición del KTZ en NSLCL a diferentes concentraciones.



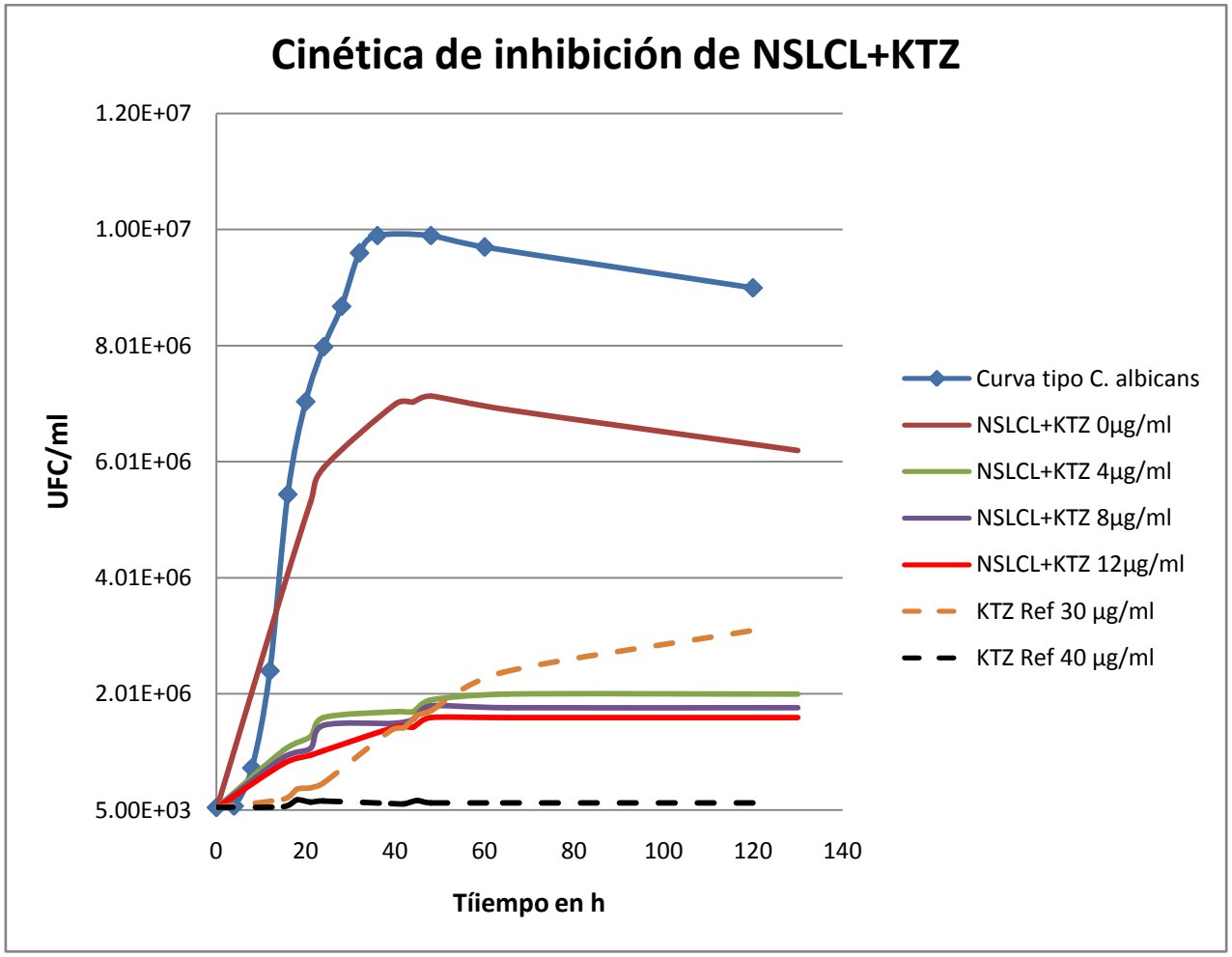
La concentración 0 µg/ml se agregó 5ml de NSLCL testigo (NS4); La concentración 12 µg/ml, se agregó 1 ml de NSLCL (NS1); La concentración 24 µg/ml, se agregó 2 ml de NSLCL (NS1)
La concentración 42 µg/ml, se agregó 3.5 ml de NSLCL (NS1).

Gráfica 5. Cinética de de inhibición del KTZ en NSLCL fase exponencial.



Cinética de inhibición de Ketoconazol incorporado en NSLCL en la fase exponencial del crecimiento de *C. albicans*, la escala logarítmica permite observar la diferencia en las pendientes, la cual representa la velocidad de crecimiento de la levadura, por lo que a menor pendiente mayor efecto antimicótico. Pendiente NSLCL 0 =11000, NSLCL 12= 1800, NSLCL 24=1000, Referencia KTZ 40=4700.

Gráfica 6. Cinética de inhibición NSLCL sobre C albicans de diferentes lotes.



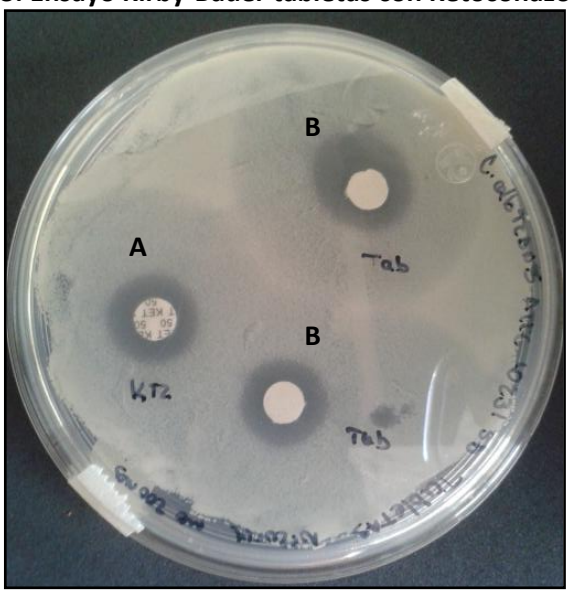
La concentración 0 µg/ml se agregó 5ml de NSLCL testigo (NS4), La concentración 4 µg/ml, se agregó 1 ml de NSLCL (NS6); La concentración 8 µg/ml, se agregó 1 ml de NSLCL (NS7); La concentración 12 µg/ml, se agregó 1 ml de NSLCL (NS8).

5. Comparación del efecto inhibitorio del Ketoconazol incorporado en el NSLCL con el de formas farmacéuticas comerciales.

5.1 Determinación del efecto antimicótico de formas farmacéuticas comerciales con Ketoconazol por el método Kirby-Bauer

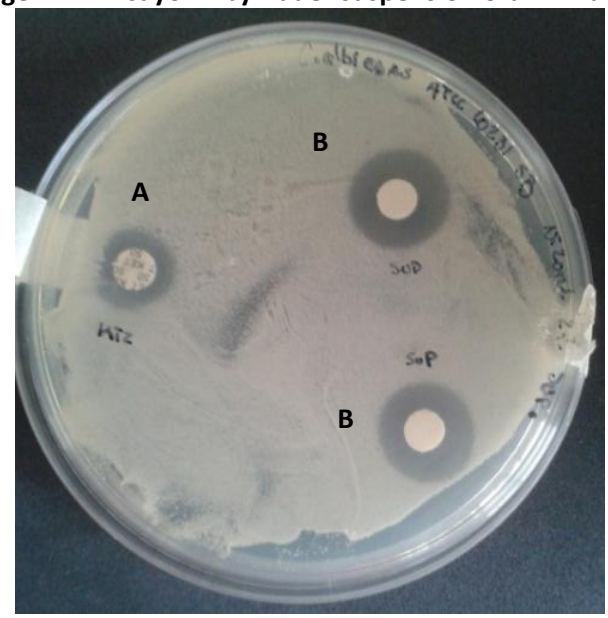
El efecto antimicótico de dos formas farmacéuticas comerciales conteniendo Ketoconazol se muestra en la tabla 17, los medicamentos analizados fueron Nizoral[c] tabletas de 200 mg y Nizoral[d] suspensión oral al 2%, ambas del laboratorio Jannsen-cilag. Los halos de inhibición de los medicamentos son semejantes a los halos que presentan los discos de referencia Bio-Rad, tal como se aprecia en las imagenes 13 y 14. La referencia es un disco con 50 µg KTZ.

Imagen 13. Ensayo Kirby-Bauer tabletas con Ketoconazol 200 mg.



Fotografía del en ensayo Kirby-Bauer con tabletas Nizoral 200 mg de Ketoconazol. Se aprecian los halos de inhibición del crecimiento A) Disco Bio-Rad de referencia 50 µg. B) discos de KTZ tabletas.

Imagen 14. Ensayo Kirby-Bauer suspensión oral KTZ al 2%.



Fotografía del en ensayo Kirby-Bauer con suspensión Nizoral 2% de KTZ. Se aprecian los halos de inhibición del crecimiento A) Disco Bio-Rad de referencia 50 µg. B) discos de KTZl suspensión.

Tabla 17. Diámetros de áreas de inhibición de medicamentos comerciales[c,d]

NIZORAL® TABLETAS		NIZORAL® SUSPENSIÓN ORAL	
muestra	**Ø mm**	**muestra**	**Ø mm**
Ref Bio-Rad	**13**	**Ref Bio-Rad**	**13**
1	**14**	**1**	**16**
2	**13**	**2**	**15**
3	**13**	**3**	**18**
4	**11**	**4**	**18**
5	**14**	**5**	**17**
6	**13**	**6**	**14**

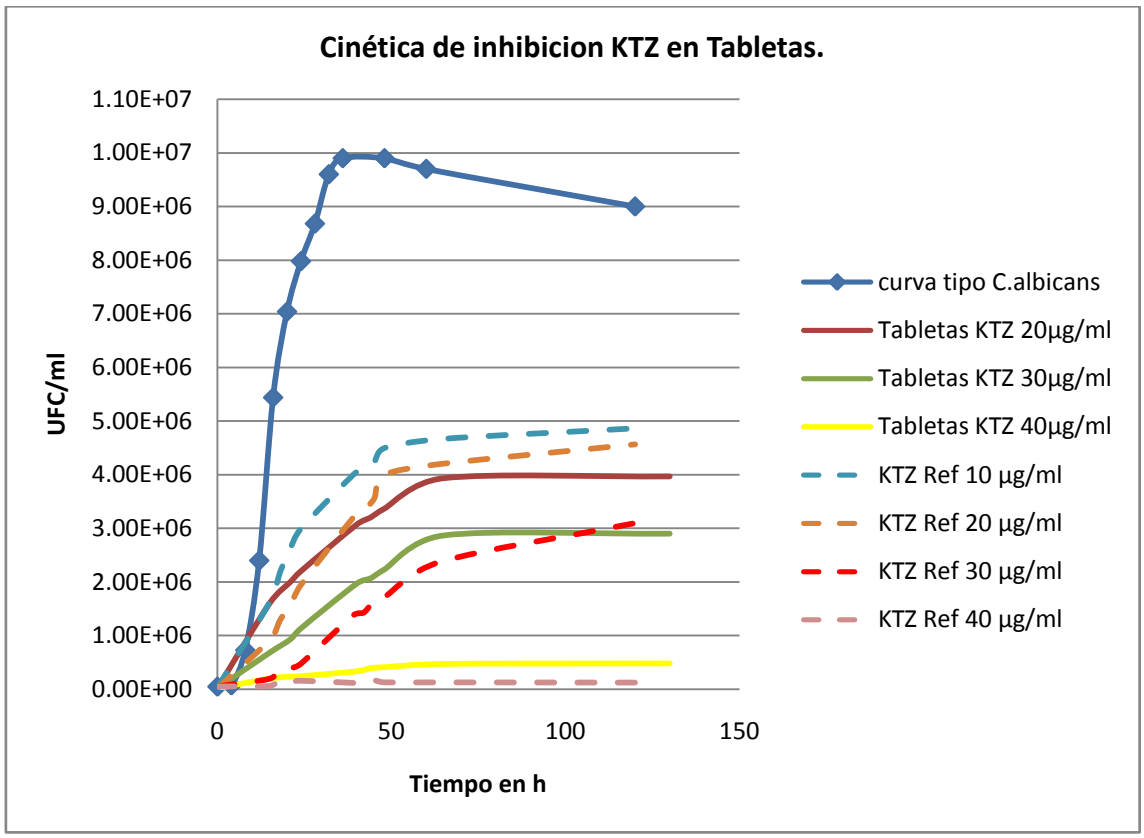
Se muestran los diámetros de cada muestra analizada, el comportamiento es muy parecido al del disco de referencia, los medicamentos se disolvieron en metanol al 80% y solo se separaron de los excipientes insolubles en metanol-agua. C) Tabletas Nizoral 200 mg laboratorio Janssen-cilag. d) Nizoral Suspensión oral al 2% laboratorio Janssen- cilag.

5.2 Determinación del efecto antimicótico de formas farmacéuticas comerciales con Ketoconazol por el método de microdilución en caldo

Las gráficas 7 y 8 muestran el efecto inhibitorio de las formas farmacéuticas comerciales, la 7 de tabletas y la 8 de una suspensión oral, con estos resultados podríamos comparar el efecto inhibitorio de las formas farmacéuticas que contienen KTZ con el efecto encontrado con el KTZ disuelto en metanol-agua incorporado al medio de cultivo. Se muestra un promedio de tres ensayos. En la gráfica 9 se muestra la comparación del efecto inhibitorio sobre levaduras de *C.albicans* del KTZ en los diferentes vehículos analizados por la técnica de microdilución en caldo. Con esto se puede observar el comportamiento del KTZ en las diferentes formas de incorporarlo al medio de cultivo.

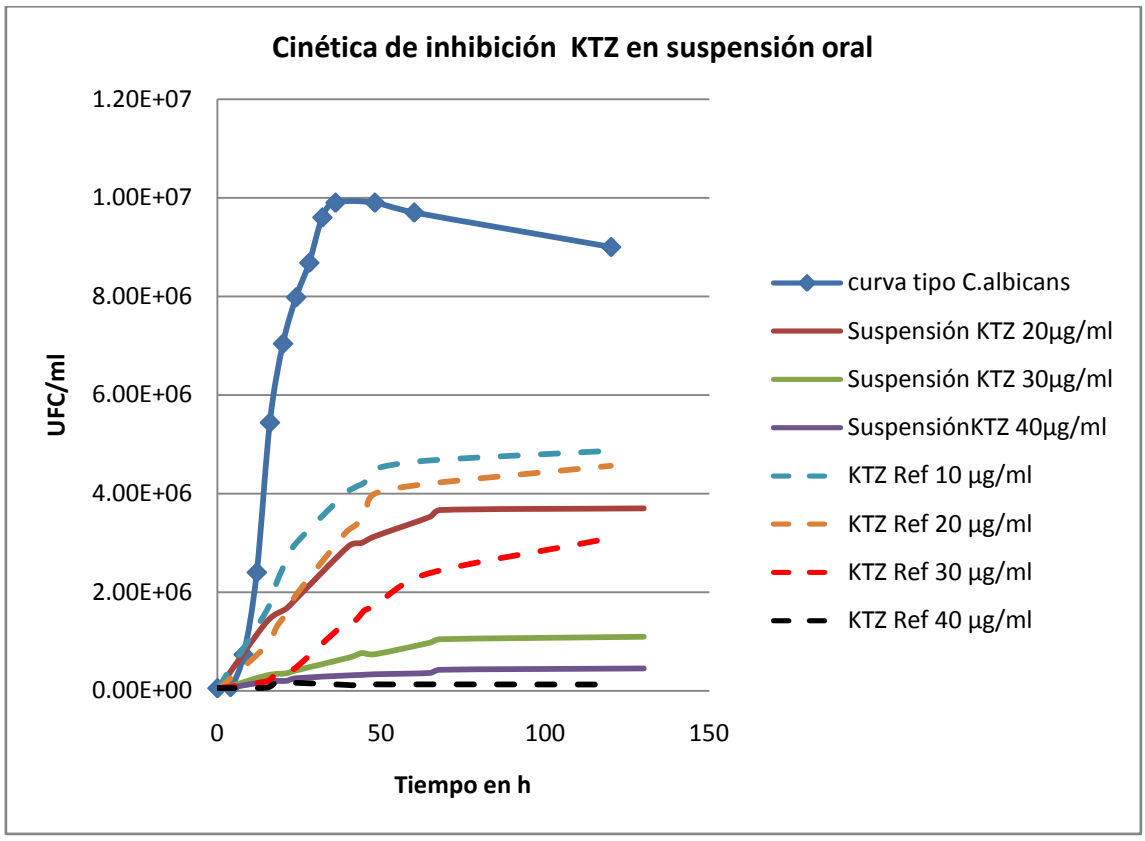
En la gráfica 9 hizo un acercamiento para que se observe el comportamiento de las cinéticas, por lo que solo de muestra un fragmento de la gráfica de la curva tipo de *C. albicans.*

Gráfica 7. Efecto inhibitorio de Nizoral tabletas sobre el crecimiento de *C. albicans*.



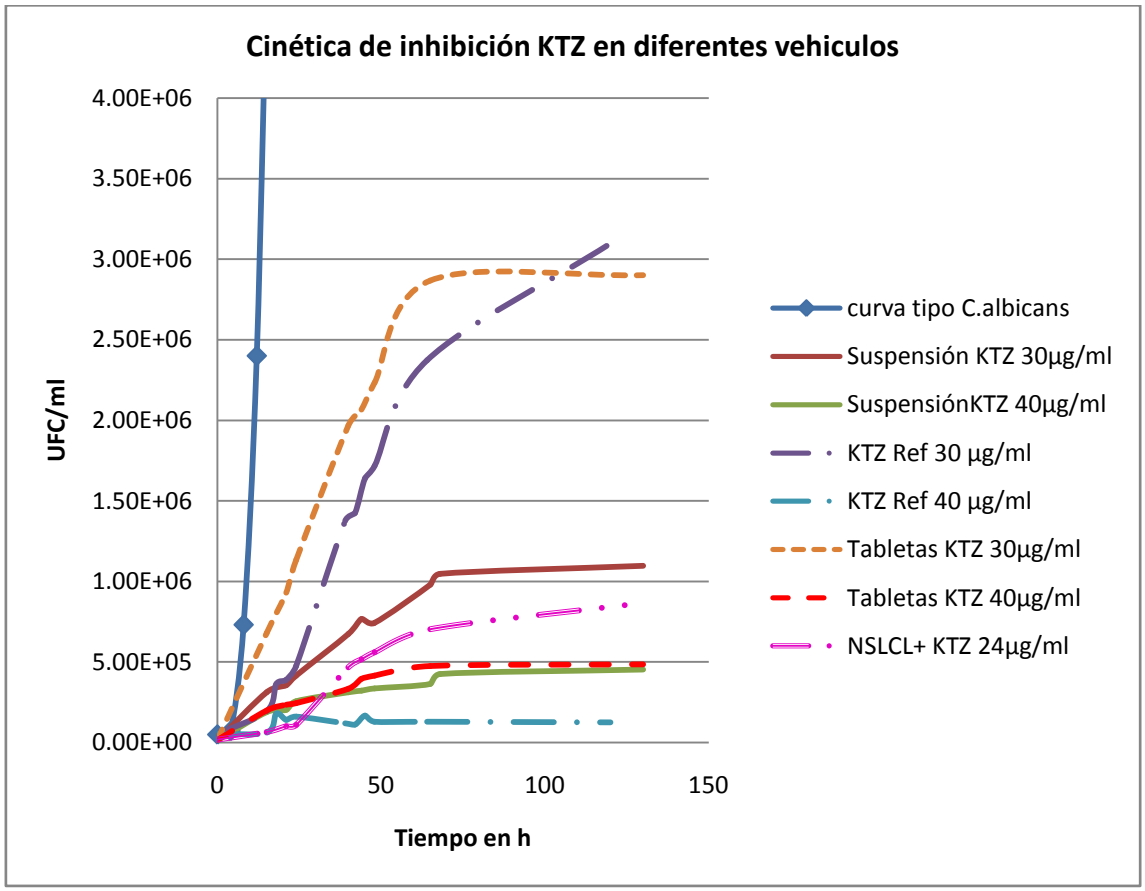
La gráfica muestra el efecto inhibitorio del KTZ en tabletas, se compara contra el KTZ disuelto en metanol-agua las líneas puenteadas representan el KTZ de referencia.

Gráfica 8. Efecto inhibitorio de Nizoral suspensión oral sobre el crecimiento de *C albicans*.



La gráfica muestra el efecto inhibitorio del KTZ en Suspensión oral, se compara contra el KTZ disuelto en metanol-agua las líneas puenteadas representan el KTZ de referencia.

Gráfica 9. Efecto inhibitorio KTZ incorporado en diferentes vehículos sobre el crecimiento de C albicans.

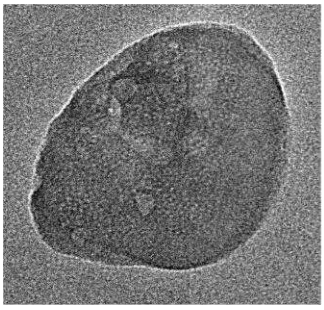


La gráfica muestra la comparación del efecto inhibitorio del KTZ según el vehículo en el que se incorpore, se contrasta el efecto de 4 vehículos, me observa que cuando esta incorporado en el NSLCL presenta un mayor efecto antimicótico en las primeras 20 horas de incubación, es decir durante la fase exponencial del crecimiento de *C.albicans.*

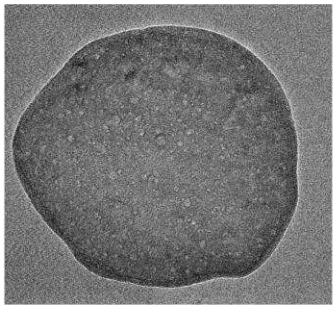
6. Determinación por microscopía electrónica de transmisión el efecto de NSLCL con KTZ sobre la morfología de las levaduras de *C. albicans.*

Las microfotografías obtenidas por MET del efecto del KTZ en NSLCL muestran cambios morfológicos en las levaduras de *C albicans.* La imagen 15 muestra la morfología más representativa del efecto que causa el KTZ sobre levaduras. En total se procesaron 5 diferentes muestras. Levaduras libres, levaduras crecidas en presencia de NSLCL a concentraciones de 0, 4,8 y 12 µg/ml.

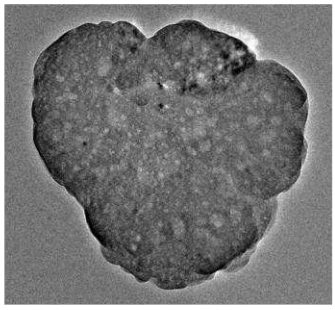
Imagen 15. Microfotografías de levaduras de *C albicans* en presencia de diferentes concentraciones de KTZ en NSLCL.



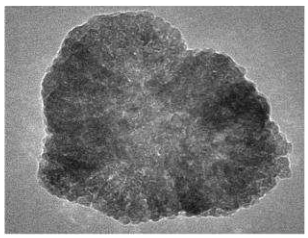
Microfotografía TEM levadura C albicans ATCC 10231 sin KTZ



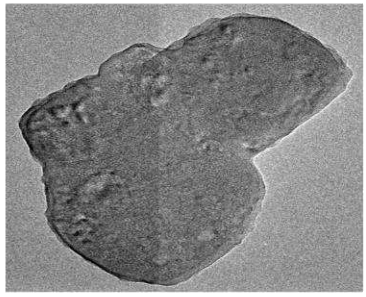
Microfotografía TEM levadura C albicans ATCC 10231 0 µgKTZ en NSLCL NS4



Microfotografía TEM levadura C albicans ATCC 10231 4 µg KTZ/ml en NSLCL NS6



Microfotografía TEM levadura C albicans ATCC 10231 8µgKTZ/ml en NSLCL NS7



Microfotografía TEM levadura C albicans ATCC 10231 12 µgKTZ/ml en NSLCL NS8

Las fotografías muestran el efecto del KTZ incorporado en NSLCL, se aprecia la deformación de las levaduras por el efecto de este.

Discusión

Los resultados de la caracterización del sistema líquido cristalino liotrópico, confirman que efectivamente estamos trabajando con un sistema nanométrico, esto se puede afirmar gracias a los reportes de difractometría de luz láser o determinación de tamaño de partícula que se realizó en el equipo HORIBA. De estos análisis se determinó que el tamaño de partícula promedio es de 80 nanómetros, cabe mencionar que las diferentes medidas de tendencia central como son media (81), moda (85), etc., tienen un comportamiento y un valor similar al promedio, así mismo la polidispersidad que muestra el NSLCL es compacta, es decir la amplitud o variación de los tamaños de partículas dentro de cada uno de los lotes producidos es muy reducida. Por lo tanto, es correcto afirmar que estamos trabajando con un sistema de dimensiones nanométricas en el NSLCL. Por otro lado tenemos que el análisis elemental que se realizó con la ayuda del espectrómetro de masas acoplado al microscopio electrónico de transmisión, en donde se observó que el KTZ se encuentra incorporado en el NSLCL. La dificultad de observar la estructura del mismo, nos llevó a marcar al KTZ con un elemento que fuera más fácilmente observable en la MET, por lo cual se optó por hacer el seguimiento de una de las impurezas que contenía el KTZ, (impureza que viene de fábrica). Este elemento fue el SILICIO, elemento cuyos átomos contienen mayor masa que los componentes del KTZ. El Silicio se encontró en el KTZ desde el análisis elemental de la materia prima, y al realizar el análisis de las nanoestructuras se encontró formando parte de ellas, como se puede ver en los diferentes espectros de masas que se realizaron, es decir en el Ketoconazol se encuentra presente Silicio, más no en los componentes anfifílicos de los cristales líquidos, pero una vez más encontramos Silicio en los cristales líquidos cuando se ha incorporado el KTZ en su elaboración, por lo tanto, el Ketoconazol está formando parte de NSLCL.

Ahora bien en cuanto a la morfología, es importante saber qué tipo de estructura se forma en el sistema nanométrico, para lo cual, se observaron las muestras en MET a 80kV y al contrastarlas con acetato de uranilo, se encontraron de forma hexosómica, forma que coincide con la literatura, pero más allá de solo confirmar la morfología de las nano estructuras, la trascendencia de estos resultados radica en la confirmación de que se puede

incorporar un fármaco en estas moléculas, en este caso Ketoconazol, y además, se pone de manifiesto que la forma, la estabilidad y el tamaño de las nanoestructuras se mantienen estables aun con el fármaco dentro de ellas. Después en un intento por observar la estructura interna del NSLCL, se analizaron las muestras en un microscopio electrónico de alta resolución, a 200kV, el acercamiento es mucho mayor a los 50000 aumentos, pero en este caso las técnicas normales de observación no permitieron una buena resolución, esto debido a que están diseñadas y probadas para materiales sólidos, se esperaba poder ver la estructura interna pues en este tipo de microscopios pueden observarse estructuras mucho más pequeñas como los nanotúbulos de carbono por ejemplo, cuyo tamaño es menor a 10nm. Sin embargo la naturaleza líquida de las muestras no permitió una óptima preparación y observación. A pesar de no haber podido observar con claridad la estructura interna de las nanopartículas si se pueden observar las estructuras cristalinas.

Las pruebas de sensibilidad al KTZ y la determinación de CMI en placa de agar SB demostraron dos situaciones; primero la cepa de referencia es sensible a este fármaco y segundo que esta característica puede ser empleada para observar concentraciones y difusión del fármaco. Por otro lado, la necesidad de hacer otros tipos de pruebas como vaciado en placa y cilindro/placa, nos lleva a afirmar que tanto el KTZ como los diferentes vehículos en los que se incorpora, presentan serias dificultades para difundir libremente en el agar, resultando en la necesidad de implementar otras metodologías que permitieran observar el efecto antimicótico del KTZ. Esta necesidad nos llevó a desarrollar y estandarizar una técnica basada en nefelometría, ésta es muy usada en la cuantificación de bacterias, al día de hoy la información sobre el uso y estandarización de ésta en cinéticas de crecimiento o inhibición con levaduras de *C albicans* u otras levaduras es muy escasa. Son varias las ventajas asociadas a la técnica como son: su precisión, reproducibilidad, rapidez y sencillez, pues otrosmétodos disponibles como son la cuenta estándar o conteo en cámara de NeuBauer, son lentos y presentan una amplia variabilidad en los resultados, además requieren mucho tiempo

para llevarlas a cabo, en cambio la toma de muestra y su lectura en el espectrofotómetro, es un método rápido y tiene una alta reproducibilidad.

Con esta técnica nos fue posible procesar una gran cantidad de muestras y realizar varias cinéticas al mismo tiempo, por lo que es de gran ayuda para la cuantificación de UFC en un cultivo líquido. Así mismo, como la muestra es procesada en pocos minutos, esta técnica incluso puede ser utilizada para desarrollar métodos semicuantitativos de antimicóticos por su acción inhibitoria.

Al analizar la potencia inhibitoria del KTZ, las cinéticas de crecimiento mostraron que el KTZ en vehículos convencionales presenta un comportamiento dosis dependiente, es decir claramente se observa que a mayor dosis, mayor efecto inhibitorio, encontrándose como CMI 40 µg/ml, al hacer la comparación de las concentraciones calculadas en las formas farmacéuticas comerciales, se encontraron por este método concentraciones muy parecidas, mostrando diferencias entre las referencias y los medicamentos analizados que no son estadísticamente significativas ($P>0.05$). Hasta este punto el comportamiento es como se esperaba. En cambio al probar el efecto inhibitorio del KTZ incorporado dentro del NSLCL se observó un amplio aumento en la actividad antimicótica de éste. Por otro lado el perfil de inhibición del NSLCL a las diferentes concentraciones muestra una alta uniformidad, es decir a pesar de haber aumentos en la concentración de KTZ de 100 y 200% no se observa el marcado comportamiento dosis dependiente que sí se observa en vehículos convencionales. Entonces se puede decir que la liberación del KTZ se ve modificada. Este comportamiento fue reportado en otros trabajos con nanopartículas transportadoras de fármacos, en donde se reporta que sistemas líquidos cristalinos formados con poloxámero presentan un patrón de liberación sostenida de fármacos (Cafeína) [78]. Cabe aclarar que en esos trabajos se midió la liberación en celdas de Franz, y no se probó la potencia del fármaco, en nuestro caso con los resultados que obtuvimos se demuestran dos aspectos; primero, que el fármaco es capaz de liberarse del interior de la nanoestructura, y segundo y más importante; se incrementa sustancialmente la potencia del antifúngico cuando es incorporado en el NSLCL comparando su efecto contra el fármaco en forma libre. Este aumento no se debe a los componentes que forman las nanoestructuras, pues se

analizó el perfil de inhibición del NSLCL sin KTZ a una concentración cinco veces mayor que la concentración del NSLCL con KTZ, este perfil no mostró un alto efecto inhibitorio, no se acercó siquiera al que presenta la concentración de 10 µg KTZ/ml. Otra ventaja del NSLCL es su capacidad de fluir. Mientras que por un lado se investigan y desarrollan liposomas flexibles o deformables que incrementen la penetrabilidad en la piel y mucosas [71,72], un NSLCL por su naturaleza, es un fluido, y tiene propiedades muy similares a los liposomas flexibles. Sumado a esto la diferencia en el proceso de elaboración de NSLCL, proporciona enormes ventajas sobre casi todos los nanos acarreadores, pues no se necesitan fuertes solventes ni largos tiempo de formación como con los liposomas y otras nanopartículas.

Por otro lado, la MET que se realizó sobre levaduras de *C albicans*, comprobó que el efecto antifúngico que se observó fue debido al KTZ incorporado en el NSLCL, pues en las fotografías se observa claramente el cambio morfológico de las levaduras debido a la acción del KTZ ya que actúa sobre la síntesis del ergosterol, la falta de éste provoca la inestabilidad de la membrana en la levadura. Esta inestabilidad provoca deformaciones y afecta la viabilidad de las levaduras. En células de *C albicans* cultivadas sin la presencia de KTZ no se ve ningún cambio en su morfología, aunque si se haya colocado el testigo del NSLCL.

En conclusión, se logró mejorar el efecto antimicótico del Ketoconazol al incorporarlo dentro de un NSLCL, y éste proporciona grandes ventajas sobre otros nanoacarreadores, al ser mucho más sencilla su elaboración, proporciona la ventaja de la fluidez de su estructura y modifica el patrón de liberación de los fármacos, todo esto con una alta penetración en piel y mucosas por su tamaño nanométrico y por su carácter anfifílico, característica que le ayuda a su efecto antifúngico sobre enfermedades mucocutáneas. Por lo que un NSLCL es una buena opción como sistema acarreador de fármacos.

CONCLUSIONES

1. Se logró elaborar un sistema líquido cristalino e incorporar KTZ en él. La caracterización del sistema confirmó que es un sistema en escala nanométrica (NSLCL).

2. La evaluación del efecto antimicótico del KTZ en los diferentes sistemas por medio del ensayo Kirby-Bauer mostró que es en disolución cuando el KTZ tiene mayor efecto. Al mismo tiempo se demostró que hay problemas de difusión en el agar con el NSLCL.

3. El método de cuantificación de levaduras utilizando el espectrofotómetro desarrollado en este proyecto mostró ser eficaz para el seguimiento de cinéticas de crecimiento microbiano, además proporciona resultados rápidos y es sencillo de utilizar.

4. La CMI del KTZ incorporado en el NSLCL fue de 24 µg/ml, mientras que la CMI del KTZ en solución fue de 40 µg/ml, ésta diferencia indica un aumento en la potencia antimicótica del KTZ por la acción del NSLCL como acarreador del fármaco.

5. Al comparar la CMI del KTZ incorporado en el NSLCL (24 µg/ml) con la del KTZ incorporado en vehículos convencionales (formas farmacéuticas comerciales: 40 µg/ml) se demostró que el uso del NSLCL aumenta la potencia del fármaco.

6. La microscopía electrónica muestra la modificación de la morfología de las levaduras de *C. albicans* por la acción del KTZ incorporado en NSLCL el cual modifica la estabilidad de la membrana, lo que puede afecta la estructura y funcionalidad de la pared celular del hongo.

Perspectivas del proyecto

- Realizar estudios *in vivo* del NSLCL.
- Estudiar la posibilidad de uso en otras vías de administración
- Desarrollar una técnica para la visualización de las estructuras del NSLCL interactuando con las levaduras.
- Estudiar la cinética de liberación mediante celdas de Franz.
- Determinar la acción individual de los componentes sobre *C albicans.*
- Utilizar este sistema nanoestructurado con péptidos estimuladores del sistema inmunológico.
- Estudiar *in vitro* la actividad biológica sobre las formas filamentosas del hongo (mohos).

Bibliografía

1. Restrepo A. Enfermedades infecciosas. 6ª edición. Colombia: Fondo editorial CIB; 2004, Cap 3: 259-270.
2. Guía práctica diagnóstico y tratamiento de tiñas y onicomicosis en el primer nivel de atención. México, Secretaría de Salud 2008: 710-711.
3. Bonifaz A. Micología básica. 4ª edición. México: Ed McGraw Hill; 2012, p.583-584.
4. Lopez-Martinez R. Principios de Micología Medica: Clínica, diagnóstico y terapéutica 2009: 271 ISBNN 978667765075.
5. WHO Model prescribing information: Drugs used in skin diseases. World Health Organization 1997: 17-22.
6. Divins M. Antimicoticos, terapia tópica y oral. Farmacia profesional 2012; 26 (6):22-31.
7. Arenas R. Dermatofitosis en México. Rev Iberoam Micol 2002; (19):63-67
8. Información epidemiológica de morbilidad. Anuario 2009. Secretaria de salud. México 2009: 30-31
9. Lurá C, González A. Introducción al estudio de la micología. Centro de publicaciones U de NL 1997, 10ª edición cap 11: 11-20.
10. Davis B, Dulbecco R. Tratado de Microbiología. 4ª edición España: Ed Masson; 1998, p.707-736.
11. Rocha R, Lozano P, Laguna Y. Modelos de la patogénesis de las enfermedades infeccionas. BUAP 1ª edición México 2005: 50-80.
12. Guzel AB, Ilkit M, Akar T, Burgut R, Demir SC. Evaluation of risk factors in patients with vulvovaginal candidiasis and the value of chromID Candida agar versus CHROMagar Candida for recovery and presumptive identification of vaginal yeast species. Med Mycol 2011; 49(1):16-25.
13. Vázquez JA, Sobel JD. Candidiasis. Essentials of Clinical Mycology, 2011: 167-206.
14. Rangel C, Moro-Morales H, Flores A. Aislamiento y caracterización bioquímica de la α- glucosidasa ll del hongo patógeno *Candida albicans*. Acta Universitaria de la Universidad de Guanajuato 2011; 21 (2): 5-10.

15. Yung J, Leal F, Navarrete M. Efecto del secado en punto crítico y secado en terbutanol en el tamaño de levaduras y eritrocitos humanos. Biomedica 1995; (4):189-196
16. Bylund G. Manual de industrias lácteas. 1ª. Ed. España: Mundi-prensa 2000, cap 4:59.
17. Calderone R, Fonzi, W. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2001, 9 (7): 327-333.
18. Klis, F, de Groot P. Hellingwerf K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* 2001; 39 Suppl 1: 1-8.
19. De la Calle-Rodríguez N, Santa-Vélez C, Cardona-Castro N. Virulence factors of *Candida albicans* and dermatophytes in keratinized tissues infection. Rev CES Med 2012; 26(1): 43-55.
20. Palma-Ramos A, Castrillón-Rivera LE, Becerril-Parra DE, Zamora-Alvarado R. Estimulación de células mononucleares humanas *in vitro* con extracto total y péptidos liberados al medio por *Candida albicans*. Dermatol Rev Mex 2012; 56 (6):377-384.
21. González-Pedraza A, Ortiz C. Vaginal candidiasis: diagnosis and treatment in a primary care clinic. Sociedad Española de Medicina Familiar y Comunitaria 1998; 21 (6): 395-398.
22. Granados-Perales D, Ugalde-Fernández J. Successfully evolution of premature triplets with systemic neonatal candidiasis treated with caspofungin. Bol Med Hosp Infant mex 2010; 67 ene- feb: 52-57.
23. Flores-Paz R, Rivera-Sánchez R, García-Jiménez E, Arriaga-Alba M. Etiology of cervicovaginal infection in Mexican women. Salud Pública Mex 2003; 45 suppl 5:S694-S697.
24. Hernández-Hernández F, Córdova-Martínez E, Manzano-Gayosso P, López-Alvarez R, Bazán-Mora E, López-Martínez R. Frequency of mycoses in immunosuppressed patients in a regional hospital in Mexico City. Salud Pública Mex 2003; 45:455-460.
25. Vazquez–del Mercado E, Arenas R. Onicomicosis en niños: Estudio retrospectivo de 233 casos mexicanos. Gac Med Méx vol 2008; 144 (1):20-25.

26. Reséndiz-Sánchez J, Morales-Aguirre J. Risk factors associated with mortality due to *candida sp*. infections in children. Bol Med Hosp Infant mex 2007; 64 Mar-Abr: 91-98.
27. Gennaro A. Remington's Pharmaceuticals Sciences. 18a. Edition. New York: Mack Publishing Company; 1990, cap 9:1842-1855.
28. Lorenzo P, y col. Velázquez Farmacología Básica y Clínica. 18ª edición. México: Editorial Medica Panamericana; 2009, Capítulo 55: 957-972.
29. Gennaro R. Remington Farmacia Tomo 2. 20ª. Edición. México: Editorial Medica Panamericana México; 2003 p.1824-1854.
30. Gregory B. Structure and activity of the antifungal agents. Rev Cubana Farm 2005; 39(2):1-16.
31. Carrillo-Muñoz A, Pemán J, Gobernado M. Nuevos antifúngicos, presente y futuro. Revista Española de Quimioterapia Septiembre 1999; 12 (3): 25-31.
32. Berger T, Stiller M. Onicomicosis: nuevas terapias. Rev Atención Medica 16 (4): 18-27.
33. Lian Zuo W, Morris M, Jinchi W. New technologies and clinical applications of nanomedicine. Med Clin N Am 2007; 91: 845-861.
34. Samitier J. La nanomedicina: nuevas tecnologías aplicadas al diagnostico y la terapia. Revista oficial del colegio de físicos. 2000; 44: 1-3.
35. Irache JM. Nanomedicine: nanoparticles with medical applications. An Sist Sanit Navar 2008; 31(1): 75-82.
36. Brewer M, Zhuag T,Dong W. Future approaches to nanomedicine in clinical science. Med Clin N Am 2007; 91: 963-1015.
37. De Silva MN. Nanotechnology and nanomedicine: a new horizon for medical diagnostics and treatment. ARCH SOC ESP OFTALMOL 2007; 82: 331-334.
38. Hoffmas A. The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems. J Control Release 2008; 132: 153-163.
39. Sonke S. Clinical translation of nanomedicines. Curr Opin Solid State Mater Sci 2012; 16: 287-294.
40. Torchilin V. Multifunctional nanocarriers. Adv Drug Deliv Rev 2006; 58: 1532-1555.

41. Alonso MJ, Nanomedicines for overcoming biological barriers. Biomed. Pharmacother. 2004; 58: 168–172.
42. Mnhanraj V, Chen Y. Nanoparticules: a review. Trop J Pharm Res 2006; 5: 561-573.
43. Lembo D, Cavalli R. Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs. Antivir Chem Chemother 2010; 21: 53-70.
44. Sonke S. Clinical translation of nanomedicines. Curr Opin Solid State Mater Sci 2012; 16: 287-294.
45. Beija M, Salvayre R. Lauth-de Viguerie N, Marty JD. Colloidal systems for drugdelivery: from design to therapy. Trends Biotechnol 2012; 30:485–96.
46. Fleige E, Quadir MA, Haag R. Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: concepts and applications. Adv Drug Deliv Rev 2012; 64:866–84.
47. Mahajan S, Aalinkeel R, Law W, Reynolds J, Nair B, Sykes D, Yong K, Roy I, Prasad P, Schwartz S. Anti-HIV-1 nanotherapeutics: promises and challenges for the future. Int J Nanomed 2012; 7: 5301–5314.
48. Lara H, Ayala-Nuñez N, Ixtepan-Turrent L, Rodriguez-Padilla C. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. J Nanobiotechnol 2010; 8: 1.
49. Alukda D, Sturgis T, Youan B. Formulation of tenofovir-loaded functionalized solid lipid nanoparticles intended for HIV prevention. J Pharm Sci 2011; 100: 3345–3356.
50. Sheva N, Mousa J, Faramarz E, Raymond K, Khademhosseini A, chen P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivrery. J Control Release 2013; 166: 182-194.
51. Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. Adv Drug Deliv Rev 2001; 47:165-196.
52. Vanic Z, Skalko-Basnet N. Nanopharmaceuticals for improved topical therapy: can they deliver? EUR J Pharma Sci 2013; 50: 29-41.
53. Domingo C, Saurina J. An overview of the analytical characterization of nanostructured drug delivery sytems: towars green and sustainable pharmaceuticals: A review. Anal Chim Acta 2012; 744: 8-22.

54. Bilensoy E, Rouf M, Vural I, Hincal A. Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal gel for clotrimazole: b-cyclodextrin complex. AAPS Pharm Sci Tech 2006; 7:E1–E7.
55. Francois M, Snoeckx E, Putteman P, Wouters F, De Proost E, Delaet U, Peeters J, Brewster M. A mucoadhesive, cyclodextrin-based vaginal cream formulation of itraconazole. AAPS Pharm Sci Tech 2003; 5: 1–5.
56. Kim Y, Shin B, Garripelli V, Kim J, Davaa E, Jo S, Park J. A thermosensitive vaginal gel formulation with HPcCD for the pH-dependent release and solubilization of amphotericin B. Eur J Pharm Sci 2010; 41: 399–406.
57. Yang H, Parniak A, Isaacs C, Hillier S, Rohan L. Characterization of cyclodextrin inclusion complexes of the anti-HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor UC781. AAPS J 2008; 10: 606–613.
58. Sankhyan A, Pawar P. Recent trends in niosomes as vesicular drug delivery system. J Appl Pharm Sci 2012; 2: 20–32.
59. Ning M, Guo Y, Pan H, Chen X, Gu Z. Preparation in vitro and in vivo evaluation of liposomal/niosomal gel delivery systems for clotrimazole. Drug Dev Ind Pharm 2005; 31: 375–383.
60. Patel G, Patel P. Novel vaginal anti-HIV drug delivery system of tenofovir disoproxil fumarate. Am J PharmTech Res 2011; 1: 366–383.
61. Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. 2004. Formation and stability of nano-emulsions. Adv Colloid Interface Sci 2004: 303–318.
62. D'Cruz O, Samuel P, Uckun F. Conceival a novel noncontraceptive vaginal vehicle for lipophilic microbicides. AAPS Pharm Sci Tech 2005; 6: E56–E64.
63. D'Cruz O, Uckun F. Gel-microemulsions as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles. Contraception 2001; 64: 113–123.
64. Bachhav Y, Patravale V. Microemulsion-based vaginal gel of clotrimazole: formulation, in vitro evaluation and stability studies. AAPS Pharm Sci Tech 2009; 10: 476–481.
65. Gong E, Matthews B, McCarthy T, Chu J, Holan G, Raff J, Sacks S. Evaluation of dendrimer SPL7013, a lead microbicide candidate against herpes simplex viruses. Antviral Res 2005; 68: 139–146.

66. Svenson S, Tomalia D. Dendrimers in biomedical applications-reflections on the field. Adv Drug Deliv Rev 2005; 57: 2106–2129.
67. Rojo J, Delgado R. Dendrimers and dendritic polymers as anti-infective agents: new antimicrobial strategies for therapeutic drugs. AntiInfective Agents Med Chem 2007; 6: 151–174.
68. Tulu M. Aghatabay NM, Senel M, Dizman C, Parali T, Dulger B. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of water soluble dendritic macromolecules. Eur J Med Chem 2009; 44: 1093–1099.
69. Janiszewska J, Sowin'ska M, Rajnisz A, Solecka J, Ła˛cka I, Milewski S, Urban´ czyk-Lipkowska Z. Novel dendrimeric lipopeptides with antifungal activity. Bioorg Med Chem Lett 2012; 22: 1388–1393.
70. Nobuhiro N, Kazunori K. Currente state, achievements and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drugs and gene delivery. Pharmacology & therapeutics 2006; 112: 630-648.
71. Rastogi R, Anand S, Koul V. Fexible polymerosomes an alternative vehicle for topical delivery. Colloids Surf B: Biointerfaces 2009; 72: 161-166.
72. Pavelic´ Zˇ, Škalko-Basnet N, Jalšenjak I. Liposomes for treatment of vaginal infections. Eur J Pharm Sci 1999; 8: 345–351.
73. Pavelic´ Zˇ, Škalko-Basnet N, Jalšenjak I. Liposomal gel with chloramphenicol: characterization and in vitro release. Acta Pharm 2004; 54: 319–330.
74. Ning M, Y Guo, Y-Z Pan, HZ Yu, HM Gu, ZW. Preparation and evaluation of proliposomes containing clotrimazole. Chem Pharm Bull 2005; 53: 620–624.
75. Vanic´ Zˇ, Hafner A, Bego M, Škalko-Basnet N, 2013. Characterization of various deformable liposomes with metronidazole. Drug Dev Ind Pharm 2013; 39: 481–488.
76. Elsayed M, Abdallah O, Naggar V, Khalafallah N. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. Int J Pharm 2007; 332: 1–16.
77. Soltero J, Cota L, Gonzalez-Romero V. Caracterización reologíca de dispersiones de cristales líquidos liotrópicos. Tecnol Ciencia 1989; 4 (1):1-9.

78. Pasquali R, Bregni C. Structure of the main liquid crystalline lyotropic Phases. *Acta Farm Bonaerense 2005;* 24 (3): 453-457.
79. Vaca F. Estudio mediante resonancia magnetica de efectos pretransicionales en cristales líquidos. Tesis doctoral facultad de matemáticas, Astronomía y Física. 2002; 7-8.
80. Cordobés F, Moros J, Franco J. Linear viscoelasticity of liquid crystalline phases for a ethoxylated nonylphenol nonionic surfactant/watersystem. Grasas y Aceites 2002; 53 (2):167-172.
81. García J, Canton R. Procedimientos en microbiología clínica. Soc Española de enfermendades infecciosas 2000; 18:1-4.
82. Pasquiali R, Chiappetta D. Release of caffeine from two liquid-crystalline systems. *Lat Am J Pharm* 2007; 26 (3):387-93.
83. Maldonado-Campos J. Incorporación de Ketoconazol a dispersiones de cristales líquidos liotrópicos. Tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas UAM-Xochimilco. México; 2012: p, 3-58.
84. Ramírez–palma J. Efecto de la proporción de componentes en la formación y estabilidad física de cristales líquidos liotrópicos conteniendo Ketoconazol. Tesis de licenciatura QFB UAM Unidad Xochimilco. México; 2013: 1-100.
85. Hielsher T. Ultrasonic production of nano-size dispersions and emulsions. ENS' 5 Francia; 2005: 1-6.
86. Lewis P, Knight D. Cytochemical Staining Methods for Electron Microscopy. 1ª Edición. EE.UU. Elsiver science; 1992: 199.

ANEXOS

Constancia de participación en el V Congresso Ibero-Americano de Ciências Farmacéuticas e VIII Conferência Nacional de EducaçàoFarmacéutica. Brasilia, BRASIL. Junio de 2013.

Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Otorga la presente

Constancia

a: Alfonso Santiago Téllez

Educación Continua

ECCBS

Por *participar en el:* **Programa de Seminarios del Trimestre 14-Invierno** de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas, *con el tema:* **Determinación del efecto antimicótico de ketoconazol incorporado en cristales líquidos liotrópicos en C albicans**, realizado en esta Universidad el 15 de enero de 2014.

Dr. Fernando de León González
Director
División de CBS

Dra. Laura E. Castrillón Rivera
Coordinadora de la Maestría
Ciencias Farmacéuticas

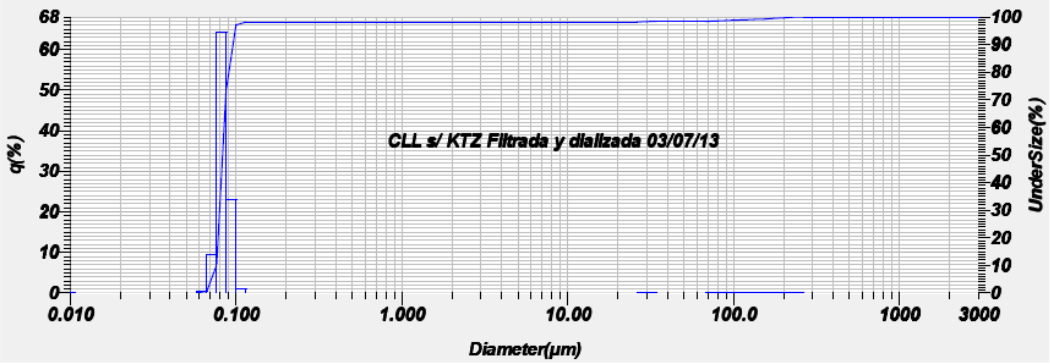
Reporte de análisis de tamaño de partícula DLS NSLCL N1

2013.07.03 14:46:08

HORIBA Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950

ID#	: 201307031445789	Median Size	: 0.08300(µm)
Transmittance(R)	: 48.7(%)	Mean Size	: 2.62629(µm)
Transmittance(B)	: 1.1(%)	Std.Dev.	: 20.4449(µm)
Ultra Sonic	: OFF	Geo.Mean Size	: 0.0954(µm)
Circulation Speed	: OFF	Geo.Std.Dev.	: 2.6877(µm)
Agitation Speed	: OFF	Mode Size	: 0.0828(µm)
Form of Distribution	: Auto	Span	: OFF
Distribution Base	: Volume	Diameter on Cumulative %	: (2)10.00 (%)- 0.0763(µm)
Refractive Index (R)	: 1.6-0i in Water[RI=1.60(1.600 - 0.000i),Water(1		
Refractive Index (B)	: 1.6-0i in Water[RI=1.60(1.600 - 0.000i),Water(1		
Sample Name	: CLL s/ KTZ Filtrada y dializada		

Data Name	Graph Type	Transmittance(R)	CV	Median Size	Std.Dev.
201307031445789		48.7(%)	778.4706(%)	0.08300(µm)	20.4449(µm)



No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diamete
1	0.011	0.000	0.000	24	0.259	0.000	98.122	47	5.867	0.000	98.122	70	133.103	0.125	99.041	93	3000.
2	0.013	0.000	0.000	25	0.296	0.000	98.122	48	6.720	0.000	98.122	71	152.463	0.161	99.202		
3	0.015	0.000	0.000	26	0.339	0.000	98.122	49	7.697	0.000	98.122	72	174.616	0.201	99.402		
4	0.017	0.000	0.000	27	0.389	0.000	98.122	50	8.816	0.000	98.122	73	200.000	0.226	99.628		
5	0.020	0.000	0.000	28	0.445	0.000	98.122	51	10.097	0.000	98.122	74	229.075	0.213	99.841		
6	0.022	0.000	0.000	29	0.510	0.000	98.122	52	11.565	0.000	98.122	75	262.376	0.159	100.000		
7	0.026	0.000	0.000	30	0.584	0.000	98.122	53	13.246	0.000	98.122	76	300.518	0.000	100.000		
8	0.029	0.000	0.000	31	0.669	0.000	98.122	54	15.172	0.000	98.122	77	344.206	0.000	100.000		
9	0.034	0.000	0.000	32	0.766	0.000	98.122	55	17.377	0.000	98.122	78	394.244	0.000	100.000		
10	0.039	0.000	0.000	33	0.877	0.000	98.122	56	19.904	0.000	98.122	79	451.556	0.000	100.000		
11	0.044	0.000	0.000	34	1.005	0.000	98.122	57	22.797	0.000	98.122	80	517.200	0.000	100.000		
12	0.051	0.000	0.000	35	1.151	0.000	98.122	58	26.111	0.000	98.122	81	592.387	0.000	100.000		
13	0.058	0.000	0.000	36	1.318	0.000	98.122	59	29.907	0.129	98.251	82	678.504	0.000	100.000		
14	0.067	0.508	0.508	37	1.510	0.000	98.122	60	34.255	0.125	98.377	83	777.141	0.000	100.000		
15	0.076	9.297	9.805	38	1.729	0.000	98.122	61	39.234	0.000	98.377	84	890.116	0.000	100.000		
16	0.087	64.091	73.897	39	1.981	0.000	98.122	62	44.938	0.000	98.377	85	1019.515	0.000	100.000		
17	0.100	23.128	97.024	40	2.269	0.000	98.122	63	51.471	0.000	98.377	86	1167.725	0.000	100.000		
18	0.115	1.098	98.122	41	2.599	0.000	98.122	64	58.953	0.000	98.377	87	1337.481	0.000	100.000		
19	0.131	0.000	98.122	42	2.976	0.000	98.122	65	67.523	0.000	98.377	88	1531.914	0.000	100.000		
20	0.150	0.000	98.122	43	3.409	0.000	98.122	66	77.339	0.111	98.488	89	1754.613	0.000	100.000		
21	0.172	0.000	98.122	44	3.905	0.000	98.122	67	88.583	0.135	98.622	90	2009.687	0.000	100.000		
22	0.197	0.000	98.122	45	4.472	0.000	98.122	68	101.460	0.158	98.780	91	2301.841	0.000	100.000		
23	0.226	0.000	98.122	46	5.122	0.000	98.122	69	116.210	0.136	98.915	92	2636.467	0.000	100.000		

1 / 1

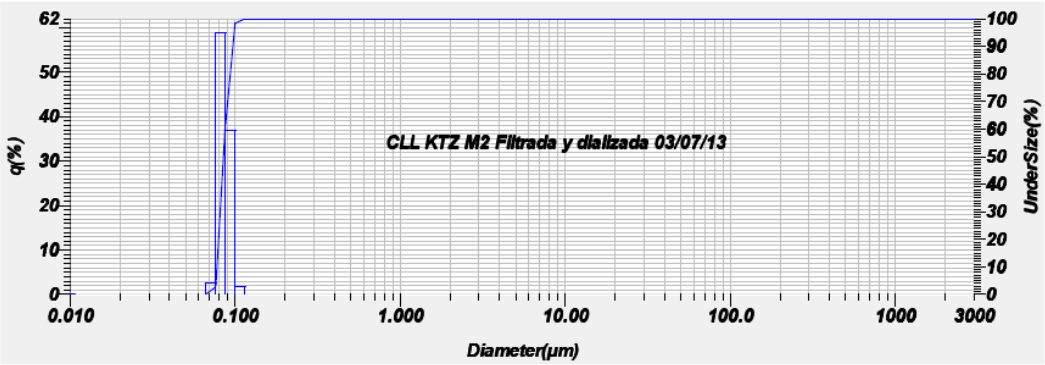
Reporte de análisis de tamaño de partícula DLS NSLCL N2

2013.07.03 14:38:17

HORIBA Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950

ID#	: 201307031437788	Median Size	: 0.08504(µm)
Transmittance(R)	: 37.3(%)	Mean Size	: 0.08612(µm)
Transmittance(B)	: 0.2(%)	Std.Dev.	: 0.0067(µm)
Ultra Sonic	: OFF	Geo.Mean Size	: 0.0859(µm)
Circulation Speed	: OFF	Geo.Std.Dev.	: 1.0800(µm)
Agitation Speed	: OFF	Mode Size	: 0.0849(µm)
Form of Distribution	: Auto	Span	: OFF
Distribution Base	: Volume	Diameter on Cumulative %	: (2)10.00 (%)- 0.0775(µm)
Refractive Index (R)	: 1.6-0i in Water[RI=1.60(1.600 - 0.000i),Water(1		
Refractive Index (B)	: 1.6-0i in Water[RI=1.60(1.600 - 0.000i),Water(1		
Sample Name	: CLL KTZ M2 Filtrada y dializada		

Data Name	Graph Type	Transmittance(R)	CV	Median Size	Std.Dev.
201307031437788		37.3(%)	7.8090(%)	0.08504(µm)	0.0067(µm)



No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diamete
1	0.011	0.000	0.000	24	0.259	0.000	100.000	47	5.867	0.000	100.000	70	133.103	0.000	100.000	93	3000.
2	0.013	0.000	0.000	25	0.296	0.000	100.000	48	6.720	0.000	100.000	71	152.453	0.000	100.000		
3	0.015	0.000	0.000	26	0.339	0.000	100.000	49	7.697	0.000	100.000	72	174.616	0.000	100.000		
4	0.017	0.000	0.000	27	0.389	0.000	100.000	50	8.816	0.000	100.000	73	200.000	0.000	100.000		
5	0.020	0.000	0.000	28	0.445	0.000	100.000	51	10.097	0.000	100.000	74	229.075	0.000	100.000		
6	0.022	0.000	0.000	29	0.510	0.000	100.000	52	11.565	0.000	100.000	75	262.376	0.000	100.000		
7	0.026	0.000	0.000	30	0.584	0.000	100.000	53	13.246	0.000	100.000	76	300.518	0.000	100.000		
8	0.029	0.000	0.000	31	0.669	0.000	100.000	54	15.172	0.000	100.000	77	344.206	0.000	100.000		
9	0.034	0.000	0.000	32	0.766	0.000	100.000	55	17.377	0.000	100.000	78	394.244	0.000	100.000		
10	0.039	0.000	0.000	33	0.877	0.000	100.000	56	19.904	0.000	100.000	79	451.556	0.000	100.000		
11	0.044	0.000	0.000	34	1.005	0.000	100.000	57	22.797	0.000	100.000	80	517.200	0.000	100.000		
12	0.051	0.000	0.000	35	1.151	0.000	100.000	58	26.111	0.000	100.000	81	592.387	0.000	100.000		
13	0.058	0.000	0.000	36	1.318	0.000	100.000	59	29.907	0.000	100.000	82	678.504	0.000	100.000		
14	0.067	0.000	0.000	37	1.510	0.000	100.000	60	34.255	0.000	100.000	83	777.141	0.000	100.000		
15	0.076	2.634	2.634	38	1.729	0.000	100.000	61	39.234	0.000	100.000	84	890.116	0.000	100.000		
16	0.087	58.770	61.405	39	1.981	0.000	100.000	62	44.938	0.000	100.000	85	1019.515	0.000	100.000		
17	0.100	36.876	98.281	40	2.269	0.000	100.000	63	51.471	0.000	100.000	86	1167.725	0.000	100.000		
18	0.115	1.719	100.000	41	2.599	0.000	100.000	64	58.953	0.000	100.000	87	1337.481	0.000	100.000		
19	0.131	0.000	100.000	42	2.976	0.000	100.000	65	67.523	0.000	100.000	88	1531.914	0.000	100.000		
20	0.150	0.000	100.000	43	3.409	0.000	100.000	66	77.339	0.000	100.000	89	1754.613	0.000	100.000		
21	0.172	0.000	100.000	44	3.905	0.000	100.000	67	88.583	0.000	100.000	90	2009.687	0.000	100.000		
22	0.197	0.000	100.000	45	4.472	0.000	100.000	68	101.460	0.000	100.000	91	2301.841	0.000	100.000		
23	0.226	0.000	100.000	46	5.122	0.000	100.000	69	116.210	0.000	100.000	92	2636.467	0.000	100.000		

1 / 1

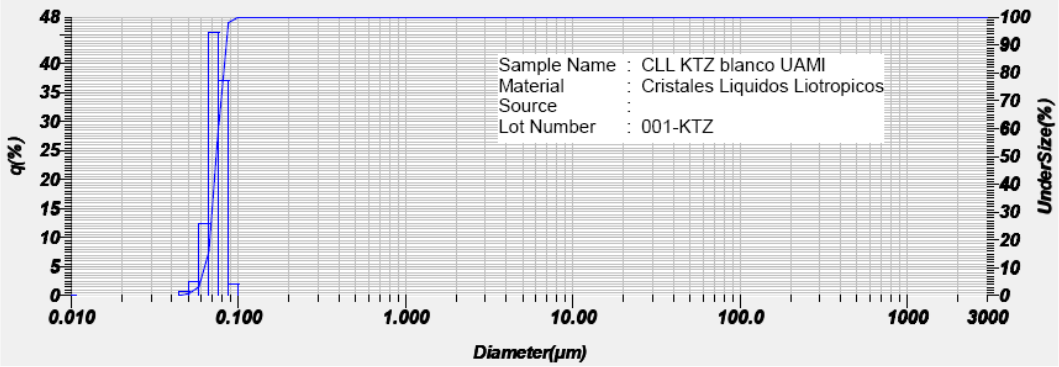
Reporte de análisis de tamaño de partícula DLS NSLCL N4

2013.08.28 14:53:36

HORIBA Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950

ID#	: 201308281452187	Median Size	: 0.07380(µm)
Transmittance(R)	: 68.5(%)	Mean Size	: 0.07384(µm)
Transmittance(B)	: 4.7(%)	Std.Dev.	: 0.0080(µm)
Ultra Sonic	: OFF	Geo.Mean Size	: 0.0734(µm)
Circulation Speed	: OFF	Geo.Std.Dev.	: 1.1187(µm)
Agitation Speed	: OFF	Mode Size	: 0.0739(µm)
Form of Distribution	: Auto	Span	: OFF
Distribution Base	: Volume	Diameter on Cumulative %	: (2)10.00 (%)- 0.0627(µm)
Refractive Index (R)	: 1.6-0i in Water[RI=1.60(1.600 - 0.000i),Water(1		
Refractive Index (B)	: 1.6-0i in Water[RI=1.60(1.600 - 0.000i),Water(1		
Sample Name	: CLL KTZ blanco UAMI		

Data Name	*Graph Type*	*Transmittance(R)*	*CV*	*Median Size*	*Std.Dev.*
201308281452187		*68.5(%)*	*10.8144(%)*	*0.07380(µm)*	*0.0080(µm)*



No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diamete
1	0.011	0.000	0.000	24	0.259	0.000	100.000	47	5.867	0.000	100.000	70	133.103	0.000	100.000	93	3000.
2	0.013	0.000	0.000	25	0.296	0.000	100.000	48	6.720	0.000	100.000	71	152.453	0.000	100.000		
3	0.015	0.000	0.000	26	0.339	0.000	100.000	49	7.697	0.000	100.000	72	174.616	0.000	100.000		
4	0.017	0.000	0.000	27	0.389	0.000	100.000	50	8.816	0.000	100.000	73	200.000	0.000	100.000		
5	0.020	0.000	0.000	28	0.445	0.000	100.000	51	10.097	0.000	100.000	74	229.075	0.000	100.000		
6	0.022	0.000	0.000	29	0.510	0.000	100.000	52	11.565	0.000	100.000	75	262.376	0.000	100.000		
7	0.026	0.000	0.000	30	0.584	0.000	100.000	53	13.246	0.000	100.000	76	300.518	0.000	100.000		
8	0.029	0.000	0.000	31	0.669	0.000	100.000	54	15.172	0.000	100.000	77	344.206	0.000	100.000		
9	0.034	0.000	0.000	32	0.766	0.000	100.000	55	17.377	0.000	100.000	78	394.244	0.000	100.000		
10	0.039	0.000	0.000	33	0.877	0.000	100.000	56	19.904	0.000	100.000	79	451.556	0.000	100.000		
11	0.044	0.000	0.000	34	1.005	0.000	100.000	57	22.797	0.000	100.000	80	517.200	0.000	100.000		
12	0.051	0.641	0.641	35	1.151	0.000	100.000	58	26.111	0.000	100.000	81	592.387	0.000	100.000		
13	0.058	2.436	3.077	36	1.318	0.000	100.000	59	29.907	0.000	100.000	82	678.504	0.000	100.000		
14	0.067	12.366	15.443	37	1.510	0.000	100.000	60	34.255	0.000	100.000	83	777.141	0.000	100.000		
15	0.076	45.391	60.835	38	1.729	0.000	100.000	61	39.234	0.000	100.000	84	890.116	0.000	100.000		
16	0.087	37.125	97.960	39	1.981	0.000	100.000	62	44.938	0.000	100.000	85	1019.515	0.000	100.000		
17	0.100	2.040	100.000	40	2.269	0.000	100.000	63	51.471	0.000	100.000	86	1167.725	0.000	100.000		
18	0.115	0.000	100.000	41	2.599	0.000	100.000	64	58.953	0.000	100.000	87	1337.481	0.000	100.000		
19	0.131	0.000	100.000	42	2.976	0.000	100.000	65	67.523	0.000	100.000	88	1531.914	0.000	100.000		
20	0.150	0.000	100.000	43	3.409	0.000	100.000	66	77.339	0.000	100.000	89	1754.613	0.000	100.000		
21	0.172	0.000	100.000	44	3.905	0.000	100.000	67	88.583	0.000	100.000	90	2009.687	0.000	100.000		
22	0.197	0.000	100.000	45	4.472	0.000	100.000	68	101.460	0.000	100.000	91	2301.841	0.000	100.000		
23	0.226	0.000	100.000	46	5.122	0.000	100.000	69	116.210	0.000	100.000	92	2636.467	0.000	100.000		

1 / 1

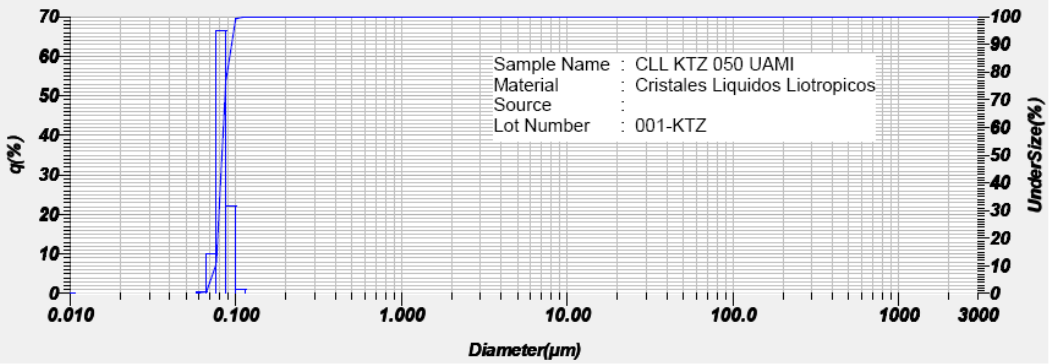
Reporte de análisis de tamaño de partícula DLS NSLCL N6

2013.08.28 14:56:53

HORIBA Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950

ID#	: 201308281456188		
Transmittance(R)	: 53.9(%)		
Transmittance(B)	: 1.0(%)		
Ultra Sonic	: OFF		
Circulation Speed	: OFF		
Agitation Speed	: OFF		
Form of Distribution	: Auto		
Distribution Base	: Volume		
Refractive Index (R)	: 1.6-0i in Water[RI=1.60(1.600 - 0.000i),Water(1		
Refractive Index (B)	: 1.6-0i in Water[RI=1.60(1.600 - 0.000i),Water(1		
Sample Name	: CLL KTZ 050 UAMI		
Median Size	: 0.08263(µm)		
Mean Size	: 0.08330(µm)		
Std.Dev.	: 0.0068(µm)		
Geo.Mean Size	: 0.0830(µm)		
Geo.Std.Dev.	: 1.0848(µm)		
Mode Size	: 0.0826(µm)		
Span	: OFF		
Diameter on Cumulative %	: (2)10.00 (%)- 0.0758(µm)		

Data Name	*Graph Type*	*Transmittance(R)*	*CV*	*Median Size*	*Std.Dev.*
201308281456188		*53.9(%)*	*8.1817(%)*	*0.08263(µm)*	*0.0068(µm)*



No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diamete
1	0.011	0.000	0.000	24	0.259	0.000	100.000	47	5.867	0.000	100.000	70	133.103	0.000	100.000	93	3000.
2	0.013	0.000	0.000	25	0.296	0.000	100.000	48	6.720	0.000	100.000	71	152.453	0.000	100.000		
3	0.015	0.000	0.000	26	0.339	0.000	100.000	49	7.697	0.000	100.000	72	174.616	0.000	100.000		
4	0.017	0.000	0.000	27	0.389	0.000	100.000	50	8.816	0.000	100.000	73	200.000	0.000	100.000		
5	0.020	0.000	0.000	28	0.446	0.000	100.000	51	10.097	0.000	100.000	74	229.075	0.000	100.000		
6	0.022	0.000	0.000	29	0.510	0.000	100.000	52	11.565	0.000	100.000	75	262.376	0.000	100.000		
7	0.026	0.000	0.000	30	0.584	0.000	100.000	53	13.246	0.000	100.000	76	300.518	0.000	100.000		
8	0.029	0.000	0.000	31	0.669	0.000	100.000	54	15.172	0.000	100.000	77	344.206	0.000	100.000		
9	0.034	0.000	0.000	32	0.766	0.000	100.000	55	17.377	0.000	100.000	78	394.244	0.000	100.000		
10	0.039	0.000	0.000	33	0.877	0.000	100.000	56	19.904	0.000	100.000	79	451.556	0.000	100.000		
11	0.044	0.000	0.000	34	1.005	0.000	100.000	57	22.797	0.000	100.000	80	517.200	0.000	100.000		
12	0.051	0.000	0.000	35	1.151	0.000	100.000	58	26.111	0.000	100.000	81	592.387	0.000	100.000		
13	0.058	0.000	0.000	36	1.318	0.000	100.000	59	29.907	0.000	100.000	82	678.504	0.000	100.000		
14	0.067	0.540	0.540	37	1.510	0.000	100.000	60	34.255	0.000	100.000	83	777.141	0.000	100.000		
15	0.076	9.884	10.425	38	1.729	0.000	100.000	61	39.234	0.000	100.000	84	890.116	0.000	100.000		
16	0.087	66.561	76.985	39	1.981	0.000	100.000	62	44.938	0.000	100.000	85	1019.515	0.000	100.000		
17	0.100	22.146	99.131	40	2.269	0.000	100.000	63	51.471	0.000	100.000	86	1167.725	0.000	100.000		
18	0.115	0.869	100.000	41	2.599	0.000	100.000	64	58.953	0.000	100.000	87	1337.481	0.000	100.000		
19	0.131	0.000	100.000	42	2.976	0.000	100.000	65	67.523	0.000	100.000	88	1531.914	0.000	100.000		
20	0.150	0.000	100.000	43	3.409	0.000	100.000	66	77.339	0.000	100.000	89	1754.613	0.000	100.000		
21	0.172	0.000	100.000	44	3.905	0.000	100.000	67	88.583	0.000	100.000	90	2009.687	0.000	100.000		
22	0.197	0.000	100.000	45	4.472	0.000	100.000	68	101.460	0.000	100.000	91	2301.841	0.000	100.000		
23	0.226	0.000	100.000	46	5.122	0.000	100.000	69	116.210	0.000	100.000	92	2636.467	0.000	100.000		

1 / 1

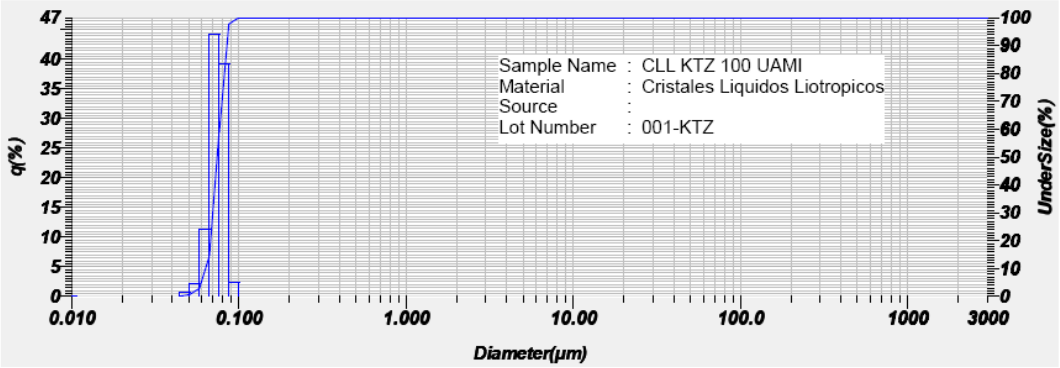
Reporte de análisis de tamaño de partícula DLS NSLCL N7

2013.08.28 14:59:35

HORIBA Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950

ID#	: 201308281459189	Median Size	: 0.07427(µm)
Transmittance(R)	: 70.9(%)	Mean Size	: 0.07426(µm)
Transmittance(B)	: 4.5(%)	Std.Dev.	: 0.0080(µm)
Ultra Sonic	: OFF	Geo.Mean Size	: 0.0738(µm)
Circulation Speed	: OFF	Geo.Std.Dev.	: 1.1178(µm)
Agitation Speed	: OFF	Mode Size	: 0.0743(µm)
Form of Distribution	: Auto	Span	: OFF
Distribution Base	: Volume	Diameter on Cumulative %	: (2)10.00 (%)- 0.0633(µm)
Refractive Index (R)	: 1.6-0i in Water[RI=1.60(1.600 - 0.000i),Water(1		
Refractive Index (B)	: 1.6-0i in Water[RI=1.60(1.600 - 0.000i),Water(1		
Sample Name	: CLL KTZ 100 UAMI		

Data Name	Graph Type	Transmittance(R)	CV	Median Size	Std.Dev.
201308281459189		70.9(%)	10.7282(%)	0.07427(µm)	0.0080(µm)



No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diamete
1	0.011	0.000	0.000	24	0.259	0.000	100.000	47	5.867	0.000	100.000	70	133.103	0.000	100.000	93	3000.
2	0.013	0.000	0.000	25	0.296	0.000	100.000	48	6.720	0.000	100.000	71	152.453	0.000	100.000		
3	0.015	0.000	0.000	26	0.339	0.000	100.000	49	7.697	0.000	100.000	72	174.616	0.000	100.000		
4	0.017	0.000	0.000	27	0.389	0.000	100.000	50	8.816	0.000	100.000	73	200.000	0.000	100.000		
5	0.020	0.000	0.000	28	0.445	0.000	100.000	51	10.097	0.000	100.000	74	229.075	0.000	100.000		
6	0.022	0.000	0.000	29	0.510	0.000	100.000	52	11.565	0.000	100.000	75	262.376	0.000	100.000		
7	0.026	0.000	0.000	30	0.584	0.000	100.000	53	13.246	0.000	100.000	76	300.518	0.000	100.000		
8	0.029	0.000	0.000	31	0.669	0.000	100.000	54	15.172	0.000	100.000	77	344.206	0.000	100.000		
9	0.034	0.000	0.000	32	0.766	0.000	100.000	55	17.377	0.000	100.000	78	394.244	0.000	100.000		
10	0.039	0.000	0.000	33	0.877	0.000	100.000	56	19.904	0.000	100.000	79	451.556	0.000	100.000		
11	0.044	0.000	0.000	34	1.005	0.000	100.000	57	22.797	0.000	100.000	80	517.200	0.000	100.000		
12	0.051	0.593	0.593	35	1.151	0.000	100.000	58	26.111	0.000	100.000	81	592.387	0.000	100.000		
13	0.058	2.216	2.810	36	1.318	0.000	100.000	59	29.907	0.000	100.000	82	678.504	0.000	100.000		
14	0.067	11.390	14.199	37	1.510	0.000	100.000	60	34.255	0.000	100.000	83	777.141	0.000	100.000		
15	0.076	44.258	58.457	38	1.729	0.000	100.000	61	39.234	0.000	100.000	84	890.116	0.000	100.000		
16	0.087	39.184	97.641	39	1.981	0.000	100.000	62	44.938	0.000	100.000	85	1019.515	0.000	100.000		
17	0.100	2.360	100.000	40	2.269	0.000	100.000	63	51.471	0.000	100.000	86	1167.725	0.000	100.000		
18	0.115	0.000	100.000	41	2.599	0.000	100.000	64	58.953	0.000	100.000	87	1337.481	0.000	100.000		
19	0.131	0.000	100.000	42	2.976	0.000	100.000	65	67.523	0.000	100.000	88	1531.914	0.000	100.000		
20	0.150	0.000	100.000	43	3.409	0.000	100.000	66	77.339	0.000	100.000	89	1754.613	0.000	100.000		
21	0.172	0.000	100.000	44	3.905	0.000	100.000	67	88.583	0.000	100.000	90	2009.687	0.000	100.000		
22	0.197	0.000	100.000	45	4.472	0.000	100.000	68	101.460	0.000	100.000	91	2301.841	0.000	100.000		
23	0.226	0.000	100.000	46	5.122	0.000	100.000	69	116.210	0.000	100.000	92	2636.467	0.000	100.000		

1 / 1

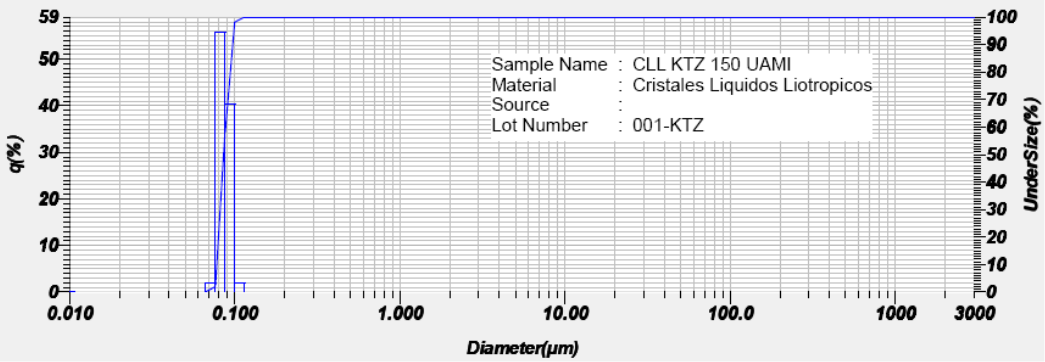
Reporte de análisis de tamaño de partícula DLS NSLCL N8

2013.08.28 15:01:54

HORIBA Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950

ID#	: 201308281501190		
Transmittance(R)	: 21.8(%)		
Transmittance(B)	: 0.1(%)		
Ultra Sonic	: OFF		
Circulation Speed	: OFF		
Agitation Speed	: OFF		
Form of Distribution	: Auto		
Distribution Base	: Volume		
Refractive Index (R)	: 1.6-0i in Water[RI=1.60(1.600 - 0.000i),Water(1		
Refractive Index (B)	: 1.6-0i in Water[RI=1.60(1.600 - 0.000i),Water(1		
Sample Name	: CLL KTZ 150 UAMI		
		Median Size	: 0.08570(µm)
		Mean Size	: 0.08668(µm)
		Std.Dev.	: 0.0067(µm)
		Geo.Mean Size	: 0.0864(µm)
		Geo.Std.Dev.	: 1.0798(µm)
		Mode Size	: 0.0855(µm)
		Span	: OFF
		Diameter on Cumulative %	: (2)10.00 (%)- 0.0778(µm)

Data Name	*Graph Type*	*Transmittance(R)*	*CV*	*Median Size*	*Std.Dev.*
201308281501190		*21.8(%)*	*7.7761(%)*	*0.08570(µm)*	*0.0067(µm)*



No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diamete
1	0.011	0.000	0.000	24	0.259	0.000	100.000	47	5.867	0.000	100.000	70	133.103	0.000	100.000	93	3000.
2	0.013	0.000	0.000	25	0.296	0.000	100.000	48	6.720	0.000	100.000	71	152.453	0.000	100.000		
3	0.015	0.000	0.000	26	0.339	0.000	100.000	49	7.697	0.000	100.000	72	174.616	0.000	100.000		
4	0.017	0.000	0.000	27	0.389	0.000	100.000	50	8.816	0.000	100.000	73	200.000	0.000	100.000		
5	0.020	0.000	0.000	28	0.445	0.000	100.000	51	10.097	0.000	100.000	74	229.075	0.000	100.000		
6	0.022	0.000	0.000	29	0.510	0.000	100.000	52	11.565	0.000	100.000	75	262.376	0.000	100.000		
7	0.026	0.000	0.000	30	0.584	0.000	100.000	53	13.246	0.000	100.000	76	300.518	0.000	100.000		
8	0.029	0.000	0.000	31	0.669	0.000	100.000	54	15.172	0.000	100.000	77	344.206	0.000	100.000		
9	0.034	0.000	0.000	32	0.766	0.000	100.000	55	17.377	0.000	100.000	78	394.244	0.000	100.000		
10	0.039	0.000	0.000	33	0.877	0.000	100.000	56	19.904	0.000	100.000	79	451.556	0.000	100.000		
11	0.044	0.000	0.000	34	1.005	0.000	100.000	57	22.797	0.000	100.000	80	517.200	0.000	100.000		
12	0.051	0.000	0.000	35	1.151	0.000	100.000	58	26.111	0.000	100.000	81	592.387	0.000	100.000		
13	0.058	0.000	0.000	36	1.318	0.000	100.000	59	29.907	0.000	100.000	82	678.504	0.000	100.000		
14	0.067	0.000	0.000	37	1.510	0.000	100.000	60	34.255	0.000	100.000	83	777.141	0.000	100.000		
15	0.076	1.847	1.847	38	1.729	0.000	100.000	61	39.234	0.000	100.000	84	890.116	0.000	100.000		
16	0.087	55.787	57.633	39	1.981	0.000	100.000	62	44.938	0.000	100.000	85	1019.515	0.000	100.000		
17	0.100	40.424	98.058	40	2.269	0.000	100.000	63	51.471	0.000	100.000	86	1167.725	0.000	100.000		
18	0.115	1.942	100.000	41	2.599	0.000	100.000	64	58.953	0.000	100.000	87	1337.481	0.000	100.000		
19	0.131	0.000	100.000	42	2.976	0.000	100.000	65	67.523	0.000	100.000	88	1531.914	0.000	100.000		
20	0.150	0.000	100.000	43	3.409	0.000	100.000	66	77.339	0.000	100.000	89	1754.613	0.000	100.000		
21	0.172	0.000	100.000	44	3.905	0.000	100.000	67	88.583	0.000	100.000	90	2009.687	0.000	100.000		
22	0.197	0.000	100.000	45	4.472	0.000	100.000	68	101.460	0.000	100.000	91	2301.841	0.000	100.000		
23	0.226	0.000	100.000	46	5.122	0.000	100.000	69	116.210	0.000	100.000	92	2636.467	0.000	100.000		

1 / 1

Dedicato a tutti quelli che stanno aspettando.
Forti e degni.