



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Línea de Investigación

Diseño y Evaluación de Formas Farmacéuticas

“Evaluación de la estabilidad cinética y liberación de ketoconazol a partir de una crema tópica que contiene cristales líquidos liotrópicos”

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

PRESENTA

Q.F.B. Guillermo Abraham Romero Ochoa

Matrícula: 2162800180

COMITÉ TUTORAL

Tutor: Dr. Abraham Faustino Vega Vo.Bo. _____

Asesor: Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda Vo.Bo. _____

Asesor: Dr. Víctor Hugo Lara Corona Vo.Bo. _____

Diciembre, 2018

Evaluación de la estabilidad cinética y liberación de ketoconazol a partir de una crema tópica que contiene cristales líquidos liotrópicos

COMITÉ TUTORAL

Tutor: Dr. Abraham Faustino Vega

Vo.Bo. _____

Asesor: Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda

Vo.Bo. _____

Asesor: Dr. Víctor Hugo Lara Corona

Vo.Bo. _____

Alumno: Q.F.B. Guillermo Abraham Romero Ochoa

Matrícula: 2162800180

Firma: _____

**Evaluación de la estabilidad cinética y liberación de ketoconazol a partir de
una crema tópica que contiene cristales líquidos liotrópicos**

Jurado del Examen de Grado

Presidente: Dr. Luis Medina Torres

Vocal: Dr. José Juan Escobar Chávez

Secretario: Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda

Resumen

Las emulsiones son sistemas dispersos heterogéneos, muy útiles en el campo de la Farmacia, sus características permiten que puedan ser deglutidas fácilmente o poder ser aplicadas de manera tópica. Su desventaja radica en que son sistemas termodinámicamente inestables, por lo que con el tiempo tienden a una separación de fases. Por lo tanto, es necesario formular a las emulsiones de tal manera que conserven sus propiedades iniciales, como distribución de tamaño de partícula, durante el mayor tiempo posible, es decir, que tengan estabilidad cinética; para este cometido se han usado cristales líquidos liotrópicos; éstos son sistemas nanoparticulados que al ser agregados como una fase dispersante, pueden proveer de una mayor estabilidad a la emulsión, ya que actúan como una barrera contra la coalescencia, además tienen otras ventajas como el constituir en sí mismos sistemas para la liberación modificada de fármacos. Por lo tanto, el objetivo de la presente tesis fue evaluar la estabilidad cinética y el perfil de liberación de una emulsión tipo crema conteniendo cristales líquidos liotrópicos cargados con ketoconazol.

Para lo anterior, se elaboró una crema en emulsión agua/aceite de uso tópico, cuya fase externa consistió en un sistema nanoestructurado líquido-cristalino conteniendo ketoconazol; habiendo previamente obtenido éste conforme a la composición y procedimiento definidos en la solicitud de patente del Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada de la UAM-X y éste fue caracterizado mediante distintas técnicas analíticas. La crema resultante fue sometida a un protocolo de estabilidad conforme la NOM-073-SSA1-2015, habiendo realizado pruebas como resistencia a la centrifugación y análisis reológicos de flujo tipo oscilatorio de pequeña amplitud de deformación; y siendo comparada con una formulación convencional.

Las cremas con el sistema líquido-cristalino tuvieron una menor variación de distribución de tamaño de partícula con el tiempo; habiendo soportado hasta 19420 G x 2 horas y, en los barridos de flujo oscilatorio, exhibieron un comportamiento viscoelástico donde el módulo elástico es predominante sobre el viscoso en el rango de frecuencias estudiado 0.1 a 10 rad/s. Además, presentaron una liberación modificada del principio activo, con un mecanismo de difusión anómala, y una liberación del 13% del ketoconazol a las 8 h.

Agradecimientos Institucionales

Primero el agradecimiento a mi alma mater, la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, ya son seis años de abrirme las puertas, siempre me he sentido muy a gusto en esta casa de estudio, y pienso que las oportunidades e ideas que surgen ella son de gran valor para el país.

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada (CVU becario:763070), ya que brindaron su confianza para la realización del proyecto realizado.

Agradezco a la UAM-I, que también da la oportunidad de aprender a los alumnos de otras unidades en sus aulas y permiten el uso el uso de sus equipos, como es el laboratorio de Rayos-X, ubicado en el edificio R, cuyo titular el Doctor Víctor Hugo Lara Corona, también fue mi asesor.

Agradezco a la Dra. María de los Ángeles Cornejo Villegas por el análisis y caracterización reológica de las muestras, cremas con diferentes tratamientos, en el reómetro Anton Paar modelo MCR-102 en el Laboratorio CFATA-UNAM. UIM FES-Cuautitlán campo 4.

Se agradece a la empresa Químicos Lyontec S. de R. L. de C.V., cuyas donaciones de excipientes, de la marca Gattefossé, permiten la formación de los sistemas nanoestructurados de este proyecto.

Agradecimientos personales

Es importante para mí comenzar agradeciendo a mis padres, que siempre me han dado su apoyo y cariño, siempre han respetado mis decisiones, me han dado sus valiosos consejos y sus enseñanzas, su experiencia en la vida ahora también es parte de mí. En general quisiera agradecer a mi familia por estar en los buenos y malos tiempos, por tolerarme a pesar del carácter que tengo y ser pacientes.

Para mis mentores, el Doctor Abraham Faustino Vega, el Doctor Carlos Quirino Barreda, el Doctor Víctor Hugo Lara Corona y al Maestro César Gazga Urioste: gracias por su infinita paciencia, siempre veo el esfuerzo que hacen por transmitir su conocimiento, el esfuerzo que hacen por el alcanzar un objetivo, realmente es inspirador verlos hacer su trabajo y ver el tiempo que dedican a ello.

Mis agradecimientos a Miriam Morales, Juan Cervantes, Carlos Solís, Carlos Tapia, Luís Martínez, Miguel Lucio e Ignacio Vázquez: primero eran colegas, ahora son amigos, gracias por compartir su tiempo conmigo, en el salón de clases, en el laboratorio o el tiempo de esparcimiento, compartimos muy buenos recuerdos y espero sigamos compartiendo con los años venideros.

A todos los que he conocido es esta etapa de mi vida, a mis amigos de la preparatoria, a Paul Daniel Romero, para algunos ya son años de conocerlos, unos son nuevos y espero seguir teniéndolos en mi vida, para todos los que han tocado mi vida por bueno o malo que haya sido, viven en mi memoria.

CONTENIDO	Página
ÍNDICE DE FÍGURAS	I, II, III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ABREVIATURAS	V, VI
1. ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.	1
2. ANTECEDENTES	2
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1 Sistemas dispersos heterogéneos	3
3.1.1 Emulsiones	5
3.1.2 Formación y termodinámica de las emulsiones	6
3.1.3 Estabilidad cinética de las emulsiones	6
3.2 Tipos de inestabilidad en las emulsiones	8
3.2.1 Separación gravitacional	8
3.2.2 Floculación	8
3.2.3 Maduramiento de Ostwald	9
3.2.4 Coalescencia	10
3.3 Estabilización de las emulsiones	11
3.3.1 Estabilización estérica	11
3.3.1.a Mecanismo de la estabilización estérica	12
3.3.1.b Criterios para una estabilización estérica efectiva	14
3.4 Estabilización de emulsiones por formación de cristales líquidos	15
3.5 Propiedades de los cristales líquidos	15
3.6 Aplicaciones de cristales líquidos en formulaciones farmacéuticas y cosméticas	18
4. Función y estructura de la piel	19
5. Ketoconazol	22
6. Caracterización de los cristales líquidos liotrópicos (CLL)	23

6.1	Análisis del tamaño de la distribución de tamaño de partícula, DTP	23
6.2	Difracción de luz láser	25
6.2.1	Modelos teóricos para determinación del tamaño de partícula	27
6.3	Rayos X	28
6.3.1	Difracción de Rayos X	30
6.3.2	Difracción de rayos X de ángulo bajo	32
6.4	Reología	38
6.4.1	Comportamiento viscoelásticos de sistemas dispersos y geles	45
7.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	46
8.	HIPÓTESIS	46
9.	OBJETIVO GENERAL	47
9.1.	Objetivos particulares	47
10.	MATERIALES Y MÉTODOS	47
10.1	Obtención de los Cristales Líquidos Liotrópicos (CLL)	47
10.2	Caracterización de los Cristales Líquidos Liotrópicos	48
10.2.1	Tamaño de partícula	48
10.2.2	Caracterización de los CLL mediante difracción de los rayos X de ángulo amplio	48
10.2.3	Caracterización de los CLL mediante difracción de los rayos X de ángulo bajo	49
10.3	Validación del método analítico para la cuantificación del ketoconazol	49
10.4	Generación de productos de degradación del ketoconazol	49
10.5	Obtención de las cremas que contienen Cristales Líquidos cargados con Ketoconazol (CLLK) o agua	50
10.6	Protocolo de estabilidad acelerada e intermedia para los CLLK y la crema/CLLK	52
10.6.1	Determinación del pH en los CLLK y en las formulaciones de crema	53
10.6.2	Determinación del signo de la emulsión	53
10.6.3	Determinación del tamaño de partícula de la emulsión	53

10.7 Estabilidad a la centrifugación de las cremas	53
10.8 Análisis reológico de las cremas que contienen CLLK	54
10.9 Liberación del ketoconazol y permeación <i>in vitro</i> a partir de la crema	54
10.9.1 Cinética de liberación de ketoconazol desde la crema que contiene a los CLLK	54
10.9.2 Permeación del ketoconazol a partir de la crema/CLLK	55
11. RESULTADOS	56
11.1 Obtención de los Cristales Líquidos Placebo (CLLP) y los cargados con Ketoconazol (CLLK)	56
11.2 Tamaño de partícula de los CLLK	57
11.3 Caracterización de los CLL mediante difracción de los rayos X de ángulo amplio	57
11.4 Caracterización de los CLL mediante difracción de los rayos X de ángulo bajo (SAXS)	58
11.5 Validación del método analítico para la determinación del ketoconazol	61
11.6 Generación de productos de degradación del ketoconazol	62
11.7 Protocolo de estabilidad de los CLLK	62
11.7.1 Apariencia de los lotes de CLLK	62
11.7.2 Tamaño de partícula de los CLLK	63
11.7.3 Valor de pH de los CLLK	64
11.7.4 Valoración del ketoconazol en los CLLK	65
11.8 Protocolo de estabilidad de la crema/CLLK	66
11.8.1 Signo de la emulsión	66
11.8.2 Tamaño de partícula de las cremas	67
11.8.3 Apariencia de las cremas	69
11.8.4 Valor de pH de las cremas	70
11.8.5 Valoración de los lotes de crema	71
11.9 Estabilidad de las cremas frente a la centrifugación	73
11.10 Análisis reológico de las cremas	74
11.11 Cinética de la liberación de ketoconazol desde la crema que contiene a los CLLK	78
11.12 Permeación del ketoconazol a partir de la crema/CLLK	81
12. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	81

12.1 Obtención de los CLLP y CLLK	81
12.1.1 Tamaño de partícula de los CLLP y CLLK	82
12.1.2 Caracterización de los CLL mediante difracción de los rayos X de ángulo amplio	83
12.1.3 Caracterización de los CLL mediante difracción de los rayos X de ángulo bajo	83
12.2 Validación del método analítico para la determinación del ketoconazol	85
12.3 Generación de productos de degradación del ketoconazol	86
12.4 Protocolo de estabilidad de los CLLK	87
12.4.1 Apariencia de los CLLK y de las cremas que los contienen	87
12.4.2 Tamaño de partícula de los CLLK	87
12.4.3 Valor de pH de los CLLK	88
12.4.4 Valoración del ketoconazol en los CLLK	89
12.5 Protocolo de estabilidad de la crema/CLLK	90
12.5.1 Signo de la emulsión	90
12.5.2 Tamaño de partícula de las cremas	90
12.5.3 Valor de pH de las cremas	91
12.5.4 Valoración de los lotes de crema	92
12.6 Estabilidad de las cremas frente a la centrifugación	92
12.7 Análisis reológico de las cremas que contienen CLLK	93
12.8 Cinética de liberación de ketoconazol desde la crema que contiene a los CLLK	96
12.9 Permeación del ketoconazol a partir de la crema/CLLK	98
13. CONCLUSIONES	99
14. PERSPECTIVAS FUTURAS	100
15. REFERENCIAS	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1	Representación esquemática de la interacción entre partículas que cuentan con capas de polímeros adsorbidos	13
Figura 2	Fases líquido-cristalinas. a) fase laminar. b) fase hexagonal. c) fase cúbica	17
Figura 3	Capas de la piel y algunos anexos	20
Figura 4	Estructura molecular del ketoconazol	23
Figura 5	El factor de forma $P(q)$ de una partícula o de un sistema de partículas	26
Figura 6	Dispersión de la luz por partículas grandes	26
Figura 7	Ángulo de dispersión	27
Figura 8	Simplificación del sistema óptico	26
Figura 9	En términos formalmente geométricos (ley de Bragg)	31
Figura 10	Patrón de difracción del fosfato de calcio	32
Figura 11	Componentes de un instrumento para SAXS	33
Figura 12	Representación de la intensidad I en función del vector de difracción q	33
Figura 13	Grafica de Guinier para determinar el R_g de la partícula	34
Figura 14	Gráfica de Kratky, en este caso aplicado para determinar el orden de una proteína	36
Figura 15	Cada una de las regiones con la respectiva característica que se puede determinar	37
Figura 16	Claves dentro de las gráficas de distribución de pares-distancia	38
Figura 17	Flujo laminar de un líquido contenido entre dos placas paralelas	39
Figura 18	Reogramas que representan cada uno de los comportamientos de los materiales	41
Figura 19	a) Tixotropía positiva b) Tixotropía negativa	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 20	Ondas sinusoidales que muestran un retraso entre la onda de tensión y la de deformación durante una prueba de viscosidad dinámica	43
Figura 21	a) barrido de amplitud b) barrido de amplitud de gel c) barrido de amplitud de un fluido newtoniano	44
Figura 22	Reograma de un barrido de frecuencia de dos dispersiones ($\tan \delta$ no representada)	45
Figura 23	Protocolo de estabilidad para los CLLK, la crema/CLLK y la crema/agua	52
Figura 24	a) CLL con una ligera tonalidad azul b) CLL con una ligera tonalidad rojiza al ser observados a contraluz	56
Figura 25	Patrones de difracción característicos de los CLLP, CLLK, ketoconazol y la placa de platino	57
Figura 26	Gráfica de Kratky para las muestras CLLP Y CLLK	58
Figura 27	Gráfica de Porod para la determinación de la dimensión fractal	59
Figura 28	Distribución de pares-distancia de las muestras	60
Figura 29	a) Curva de calibración/linealidad del sistema b) Curva utilizada para linealidad del método	62
Figura 30	Muestras de CLLK en PP en condiciones intermedias (Izquierda) y condiciones aceleradas de estabilidad, después de 3 meses	63
Figura 31	pH de los CLLK en las diferentes condiciones de estabilidad	65
Figura 32	Valoración de las muestras de CLLK a los 3 meses de estabilidad acelera e intermedia	65
Figura 33	Valoración de las muestras de CLLK a los 5 meses de estabilidad acelerada e intermedia	66
Figura 34	Crema/agua, aumento 40x	67
Figura 35	Crema/CLLK, aumento 40x	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 36	Seguimiento del tamaño de partícula para las cremas en condiciones aceleradas de estabilidad	68
Figura 37	Seguimiento del tamaño de partícula para las cremas en condiciones intermedias de estabilidad	68
Figura 38	Dos muestras de crema/CLLK (lado izquierdo) y dos muestras de crema/agua (lado derecho) en PBDE, después de 3 meses a 40°C	69
Figura 39	Seguimiento del pH para las condiciones de estabilidad acelerada. (1C, 2C, 3C: Número de lote de Crema)	70
Figura 40	Seguimiento del pH para las condiciones de estabilidad intermedia. (1C, 2C, 3C: Número de lote de Crema)	71
Figura 41	Valoración de las muestras de crema/agua y crema/CLLK a condiciones, a los 3 meses en condiciones de estabilidad intermedia	72
Figura 42	Valoración de las muestras de crema/agua y crema/CLLK a condiciones, a los 3 meses en condiciones de estabilidad acelerada	72
Figura 43	Barrido de amplitud para las muestras de crema/CLLK y la crema/agua	74
Figura 44	Barrido de temperatura para las muestras de crema/CLLK y la crema/agua	75
Figura 45	Barrido de frecuencia para la crema/CLLK y la crema/agua en PBDE	76
Figura 46	Barrido de frecuencia para la crema/CLLK y la crema/agua en PP	76
Figura 47	Barrido de frecuencia para la crema/CLLK y la crema/agua en VD	77
Figura 48	a) Perfil de liberación de la crema/CLLK, b) Perfil de liberación de la crema/CLLP, c) Perfil de liberación de la crema/agua	79
Figura 49	a) Comparación de líneas de regresión entre crema/CLLK y la crema/CLLP, b) Comparación de líneas de regresión entre crema/CLLK y Crema/agua	80

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1	Clasificación de sistemas dispersos con base en el tamaño de partícula de la fase dispersa	3
Tabla 2	Clasificación de los sistemas dispersos con base en el estado físico de la fase dispersa y fase dispersante	4
Tabla 3	Condiciones para generación de productos de degradación en KTZ puro y crema con CLLK	50
Tabla 4	Componentes de la formulación para 50 gramos de crema	51
Tabla 5	Tamaño de partícula de Lotes de CLLK para lotes de 1 kg	57
Tabla 6	Criterios establecidos para valoración mediante CLAR y resultados obtenidos	61
Tabla 7	Tamaño de partícula para las muestras de CLLK a tiempo cero de estabilidad	64
Tabla 8	Resultados para estabilidad a la centrifugación de las muestras de crema	73
Tabla 9	Pendientes de G' de cada una de las muestras de crema, en el barrido de frecuencia	77
Tabla 10	Modelos de liberación	80

ABREVIATURAS

% v/v	Porcentaje volumen-volumen
AIC	Criterio de información de Akaike
% p/v	Porcentaje peso-volumen
% m/m	Porcentaje masa/masa
DTP	Distribución de tamaño de partícula
CLL	Cristales Líquidos Liotrópicos
CLLP	Cristales Líquidos Liotrópicos Placebo
CLLK	Cristales Líquidos Liotrópicos cargados con Ketoconazol
CV	Coefficiente de variación
RPM	Revoluciones Por Minuto
KTZ	Ketoconazol
%HR	Porcentaje de Humedad Relativa
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
PBDE	Polietileno de Baja Densidad
PP	Polipropileno
VD	Vidrio
CCR	Campo Centrifugo Relativo
IVL	Intervalo Viscoelástico Lineal
kDa	KiloDaltons
O/W	Emulsión aceite en agua
W/O	Emulsión agua en aceite
W/O/W	Emulsión agua en aceite en agua
G	Gravedades
SAXS	Dispersión de rayos X de ángulo bajo
DLAB	Dispersión de luz láser de ángulo bajo
G´	Módulo elástico
G´´	Módulo viscoso
kV	Kilovolts
mA	Miliamperios

CV	Coeficiente de variación
r^2	Coeficiente de determinación
nm	Nanómetros
μm	Micrómetros
$CV_{y/x}$	Coeficiente de variación de la regresión
$IC(\beta_1)$	Intervalo de confianza para la pendiente poblacional
$IC(\beta_0)$	Intervalo de confianza para la ordenada al origen poblacional
$IC(\mu)$	Intervalo de confianza para media poblacional
Crema/CLLK	Crema con cristales líquidos liotrópicos cargados con ketoconazol como fase dispersante
Crema/agua	Crema con agua como fase dispersante, con ketoconazol agregado en los componentes oleosos de la crema durante la preparación
Crema/CLLP	Crema con cristales líquidos placebo como fase dispersante, con ketoconazol agregado en los componentes oleosos de la crema durante la preparación

INTRODUCCIÓN

La estabilidad de las emulsiones es de vital importancia dentro de la industria farmacéutica y cuando se trata de la estabilidad de éstas en Farmacia, no solamente se refiere a la estabilidad química del fármaco, sino también a una estabilidad cinética del sistema en dispersión. Así, cuando se habla de estabilidad cinética, hablamos también de propiedades físicas de la emulsión, en concreto se espera que no haya separación de fases de la emulsión o algún otro cambio físico: color, tamaño de glóbulo, viscosidad, etcétera; todo lo cual puede cambiar la aceptación del paciente.

Por lo tanto, al diseñar una emulsión, se persigue que las propiedades físicas no cambien drásticamente con el tiempo o se mantengan tiempo suficiente: desde que se encuentra en un anaquel para su venta, hasta que es utilizada para un tratamiento. Lo anterior significa que, en el caso de las emulsiones, las pruebas de estabilidad a las que son sometidas deben demostrar que con el tiempo no hay separación de fases, ni cambios importantes en la distribución del tamaño de partícula y que las propiedades reológicas sean aceptables bajo acción de flujo.

Uno de los enfoques tecnológicos recientes que se ha tomado para mantener la estabilidad cinética de las emulsiones, es el uso de los Cristales Líquidos Liotrópicos (CLL), ya que éstos no solamente dotan a la formulación de una mayor estabilidad física, si no que permiten también la liberación controlada de fármacos.

Los resultados de este proyecto mostraron que la crema que contiene los Cristales Líquidos Liotrópicos (crema/CLLK) y la crema convencional (crema/agua) son similares, respecto a reología de flujo oscilatoria, pero diferentes en cuanto a la distribución del tamaño de partícula con el tiempo y la temperatura; además de que la crema con el sistema líquido cristalino no muestra separación de fases después de ser sometida a 19,420 G x 2 h en centrifugación.

La crema con el sistema líquido cristalino tiene una liberación del 12 % del ketoconazol, con difusión del tipo anómalo; siendo el perfil de liberación significativamente diferente de la fórmula convencional. También se da primera evidencia de la permeación del ketoconazol en piel de cerdo a partir de la crema.

2. ANTECEDENTES

Los Cristales Líquidos Liotrópicos tienen características que los hacen útiles en Farmacia; algunas de éstas es su capacidad para la liberación controlada de fármacos (Chávez *et al.*, 2013) al mimetizarse con la estructura de los lípidos del *stratum corneum* (SC) de la piel (Kim *et al.*, 2009); por lo que de una emulsión que contiene cristales líquidos se espera un comportamiento similar. Sin embargo, además de las propiedades mencionadas, en el aspecto tecnológico resulta de interés la capacidad que han mostrado las fases líquido-cristalinas para estabilizar emulsiones.

Entre la evidencia obtenida para respaldar lo anterior, se ha encontrado que las emulsiones O/W que contienen sistemas líquido cristalinos, muestran tixotropía, estructuras birrefringentes y gotas secundarias que ayudan a estabilizar la emulsión (Lavaselli *et al.*, 2012). También se ha descubierto evidencia mediante microscopia de luz polarizada, de estructuras líquido-cristalinas en emulsiones tipo W/O/W, manteniéndose invariable el tamaño de partícula de la emulsión después de 60 días (Toshifumi *et al.*, 2012).

Otros investigadores han utilizado la reología oscilatoria para determinar la estabilidad en una emulsión O/W; así, mediante barridos de frecuencia, se demuestra que la crema presenta una buena estabilidad, ya que el módulo elástico domina sobre el viscoso en todo el intervalo de frecuencia (Zhang & Liu, 2013).

La mayor estabilidad de las emulsiones con fases líquido-cristalinas ha sido atribuida al incremento de la fuerza mecánica de la interfase de la emulsión y a la fijación de las estructuras líquido-cristalinas a las gotas de la emulsión. La estructura que rodea a la gota de la emulsión reduce las interacciones de van der Waals entre las gotas de la emulsión, por lo que los cristales líquidos actúan como barrera contra la coalescencia (Lavaselli *et al.*, 2012).

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Sistemas dispersos heterogéneos

Cuando un compuesto “A” es soluble en otro “B”, es posible formar una disolución verdadera de “A” en “B”; mezcla en que las partículas del soluto se encuentran dispersas a nivel molecular. Además, se asume que las moléculas de disolvente y de soluto poseen un tamaño similar y que éstas se han distribuido uniformemente en el disolvente. En cambio, si la sustancia “A” es insoluble en “B”, lo que puede hacer es dividir “A” en unidades muy pequeñas y distribuir las en el seno de la sustancia “B”. Por lo cual se entiende que se ha obtenido un sistema disperso heterogéneo, debido a que las unidades de “A” tienen tamaño mucho mayor que las del disolvente “B”. Los sistemas dispersos heterogéneos, son aquellos en los que una sustancia “A” (la fase dispersa o discontinua) se encuentra en el seno de otra segunda “B” (la fase dispersante o continua); así, por lo general el tamaño para distinguir un sistema disperso heterogéneo de una disolución verdadera (dispersión molecular) es el tamaño (Tabla 1), ya que ésta última tiene un intervalo de tamaño menor a 1 nm (Banker, 2002; Martin, Sinko, & Singh, 2011; Vila Jato & Lastres García, 1997).

Tabla 1.- Clasificación de sistemas dispersos con base en el tamaño de partícula de la fase dispersa. Modificado de *Martin et al., 2011*

Categoría	Intervalo de tamaño de partícula	Características del sistema	Ejemplos
Disolución verdadera (dispersión molecular)	<1 nm	Partículas invisibles por microscopía de electrones; pasan a través de membranas semipermeables; generalmente difunde rápido	Moléculas de oxígeno, algún tipo de ion disuelto en agua
Dispersión coloidal	1 nm-1 µm	Partículas que no se observan con microscopía convencional, pero si por microscopía de electrones; pasan por un papel filtro, pero no por una membrana semipermeable; generalmente difunden lentamente	Plata coloidal, micelas de tensoactivos en una fase acuosa
Dispersión gruesa	> 1 µm	Partículas visibles por microscopía ordinaria; no pasan un filtro ordinario o membranas semipermeables	Suspensiones y emulsiones

Un caso especial de sistemas dispersos heterogéneos son los sistemas coloidales. En los estos sistemas coloidales se encuentran partículas en el que algunas de sus dimensiones se encuentran en un tamaño por lo menos de un nanómetro y un micrómetro. Los sistemas coloidales se pueden clasificar en dos categorías, coloides liofílicos y coloides liofóbicos. Los coloides liofílicos contienen partículas que interactúan extensamente con el medio de dispersión y debido a esta afinidad por el medio, ciertos materiales forman coloides o soles al ser dispersados con relativa facilidad en una fase dispersante. En cambio, los coloides liofóbicos tienen poca atracción por cualquier fase dispersante, por lo que para formar estos sistemas se necesita de un gran aporte de energía (Martin *et al.*, 2011).

Adicionalmente los sistemas dispersos heterogéneos se pueden clasificar basándose en el estado físico que constituye a cada una de las fases (Tabla 2).

Tabla 2.- Clasificación de los sistemas dispersos con base en el estado físico de la fase dispersa y fase dispersante. Modificado de *Martin et al., 2011*

Fase dispersa	Fase o medio dispersante		
	Sólido	Líquido	Gas
Sólido	Suspensión solida (pasta de óxido de zinc)	Suspensión (suspensiones orales)	Aerosoles sólidos (aerosol de epinefrina para inhalar, humo)
Líquido	Emulsión solida (petrolato hidrofílico)	Emulsiones (Emulsiones orales, cremas tópicas)	Aerosoles líquidos (spray nasal, nieblas)
Gas	Espumas plásticas, espumas sólidas	Espuma, sales efervescentes en agua	ninguno

Muchas veces los intervalos de tamaño en los sistemas dispersos son arbitrarios ya que no hay límites específicos entre las categorías. Por ejemplo, una emulsión puede exhibir propiedades coloidales, a pesar de un tamaño promedio que puede ser mayor a 1 μm . Esto ejemplifica el hecho de que la mayoría de los sistemas dispersos son heterogéneos en relación con su distribución de tamaño de partícula (DTP).

Los sistemas dispersos heterogéneos han encontrado una variedad de aplicaciones en Farmacia. Las dispersiones líquidas, como las suspensiones y las emulsiones, han tenido la ventaja de ser fácilmente deglutidas y de poder fraccionar las dosis comparadas con las formas orales sólidas. Esto es particularmente importante en el caso de pacientes infantes y de adultos mayores. Adicionalmente, el tamaño pequeño de partícula de la fase dispersa tiene como resultado una gran área superficial; esto permite una velocidad alta de disolución del fármaco y una mayor biodisponibilidad comparada con las formas orales sólidas; dotando a este tipo de sistemas de mayor importancia en el caso de fármacos poco solubles. En el caso de los sistemas dispersos farmacéuticos de tamaño coloidal, la expansión de su uso ha aumentado con el tiempo. Algunas aplicaciones son como germicidas (plata coloidal) y agentes en medicina diagnóstica (oro coloidal). Otros sistemas desarrollados son el cobre coloidal (anticancerígeno), así como diversos sistemas de liberación de fármacos, como los liposomas, cristales líquidos, microemulsiones, etcétera, presentando como ventaja adicional, su capacidad para la liberación controlada de fármacos, así como prolongar su estabilidad.

En esta tesis se revisará la importancia de dos tipos de sistema dispersos heterogéneos clasificados en relación con su tamaño: la emulsión y un sistema coloidal (Cristales Líquidos Liotrópicos). Un aspecto crítico en ambos es su estabilidad física; la cual se ve influenciada por la elevada proporción superficie/volumen de la fase dispersa. Dicho de otro modo, el área de contacto entre el medio y las partículas (área interfacial) es muy elevada y aumenta a medida que disminuye el tamaño de la fase dispersa. En esta interfaz, las propiedades superficiales cobran mayor relevancia, por lo que es de gran importancia el estudio de la energía asociada con la creación y mantenimiento de la interfaz, ya que de esto dependerá que las partículas se mantengan dispersas.

3.1.1 Emulsiones

Las emulsiones son sistemas dispersos heterogéneos, los cuales consisten en dos líquidos inmiscibles. Las gotas de un líquido (fase dispersa) están dispersas en otro medio líquido (la fase continua); cabe mencionar, que la mayoría de las veces, la fase continua está en mayor proporción que la fase dispersa. Para dispersar los dos

líquidos inmiscibles, se necesita de componentes adicionales llamados emulsificantes, entre los que se encuentran los *tensoactivos* (Vila Jato & Lastres García, 1997).

Dada la naturaleza fisicoquímica de las emulsiones, que por definición son termodinámicamente inestables, inevitablemente sufrirán la separación de sus fases con el tiempo. Aunque existen excepciones como es el caso de las microemulsiones (Vila Jato & Lastres García, 1997). Es así como el fenómeno de inestabilidad de las emulsiones es un problema que no puede desaparecer debido a su naturaleza, pero se puede retardar conociendo el fenómeno fisicoquímico detrás de ésta y con ello optimizar la formulación.

3.1.2 Formación y termodinámica de las emulsiones

Considerando dos líquidos inmiscibles, en donde el primero es una gran gota con un área A_1 inmerso en un segundo líquido B, la gota A_1 es ahora subdividida en un gran número de gotas, ahora con un área A_2 , por lo que ahora el área $A_2 \gg A_1$. El cambio de energía libre (ΔG^{form}) de ir de un estado A_1 a un estado A_2 , viene dado en la siguiente ecuación (Tadros, 2016):

$$\Delta G^{form} = \Delta A\gamma_{12} - T\Delta S^{conf} \quad [\text{Ec. 1}]$$

Donde:

$\Delta A\gamma_{12}$ = Término de energía libre superficial o el trabajo necesario para cambiar el área A de la interfase A - B; siendo γ la tensión interfacial generada entre A y B.

$-T\Delta S^{conf}$ = es el cambio de la entropía debida al aumento del número de gotas a un valor definido de temperatura T .

La mayoría de las veces $\Delta A\gamma_{12} \gg -T\Delta S^{conf}$, por lo que se deduce que ΔG^{form} es positivo, por lo cual la formación de las emulsiones no es espontánea y el sistema es termodinámicamente inestable (Tadros, 2016).

3.1.3 Estabilidad cinética de las emulsiones

En las emulsiones, la reducción del área interfacial por coalescencia, reduce la energía del sistema, este proceso es favorecido termodinámicamente, por lo que el sistema tenderá progresivamente a disminuir en el número de gotas y aumentará el

tamaño de la gota, llevando finalmente al sistema a separarse en sus fases oleosa y acuosa (Lachman & Liebermann, 2013).

Se ha definido una emulsión termodinámicamente estable como aquella que “mantendría el mismo número y tamaño de partículas en la fase dispersa por unidad de volumen-peso de la fase continua. De acuerdo con esta definición, el valor total de la energía interfacial debe ser invariante con el tiempo (Lachman & Liebermann, 2013) y si bien esto último no es posible, se suele recurrir a una propuesta de formulación de estabilidad farmacéutica aceptable, que es una forma de dosificación que no requiere estabilidad termodinámica, pero ello no conlleva necesariamente a la aceptación por parte del paciente. Así, por ejemplo, si una emulsión sufre de cremado, ésta puede seguir siendo farmacéuticamente aceptable siempre y cuando pueda reconstituirse mediante una ligera agitación, debiendo cumplir también otros parámetros que tienen que ver con su aceptación por el paciente. Por lo que se debe evaluar el periodo de vida útil en que la formulación conserva la mayoría de sus propiedades y de ser posible, se buscará extenderlo.

El periodo de vida útil de un producto puede estar directamente relacionado con su estabilidad “cinética”. Esto significa que las propiedades fisicoquímicas de una emulsión no cambiarán considerablemente durante un tiempo razonable. Por lo que el formulador enfrenta dos problemas: ¿cuál es el periodo de vida aceptable de la emulsión? y ¿cuáles son los indicadores predictivos del periodo de vida útil? Por lo tanto, se han desarrollado métodos para evaluar la inestabilidad y periodo de vida útil de las emulsiones.

Existen dos caminos para evaluar la inestabilidad de las emulsiones: uno es esperar por periodos largos a las condiciones normales del medio ambiente e ir evaluando las propiedades de la emulsión y la otra manera es someter a la emulsión a condiciones de estrés drástico y en tiempos cortos para acelerar su inestabilidad (Lachman & Liebermann, 2013). Dado que esto último es más útil, las formulaciones se someten a protocolos de estabilidad acelerada, los cuales pueden ser ciclos de frío-calor, temperatura elevada, estabilidad a la centrifugación, los cuales son de gran utilidad para evaluar la inestabilidad de una formulación.

3.2 Tipos de inestabilidad en las emulsiones

La inestabilidad de las emulsiones se clasifica de acuerdo con el mecanismo que ésta siga. La inestabilidad puede comenzar por alguno de todos los mecanismos o ser una combinación de ellos y finalmente terminar en la separación de las fases de la emulsión (McClements, 2007).

Los mecanismos de inestabilidad son los siguientes: separación gravitacional (cremado/sedimentación), floculación, coalescencia y maduración de Ostwald.

3.2.1 Separación gravitacional

La separación gravitacional es un fenómeno dentro de los sistemas dispersos heterogéneos, donde las gotas de la fase discontinua se mueven hacia arriba (cremado) porque tienen una densidad más baja que la fase que las rodea, o puede ir también hacia abajo (sedimentación) por efecto de una densidad mayor al de la fase continua. La velocidad de cremado o sedimentación de las partículas esféricas puede ser estimada a partir de la ley de Stokes [Ec. 2] (Martin *et al.*, 2011):

$$v = \frac{2r^2(\rho - \rho_o)g}{9\eta_o} \quad [\text{Ec.2}]$$

Donde:

r : Radio de la partícula

ρ : Densidad de las partículas esféricas (fase discontinua)

ρ_o : Densidad del medio (fase continua)

g : Aceleración debida a la gravedad

η_o : Viscosidad del medio (fase continua)

De la ley de Stokes surgen ciertas aseveraciones útiles para formular, por ejemplo, la separación gravitacional puede ser inhibida por tamaños pequeños de gota, una viscosidad alta de la fase continua y una diferencia baja de densidades.

3.2.2 Floculación

La floculación es un proceso en donde las gotas se “pegan” formando un agregado de gotas, pero todas mantienen su integridad. Este fenómeno se genera por la atracción de van der Waals, en específico una de sus componentes, las interacciones

de dispersión de London. Las fuerzas de dispersión de London surgen de la fluctuación de las cargas eléctricas en la interfase. Ya que los átomos y moléculas consisten en núcleos con sus electrones rotando constantemente a su alrededor, se crea un dipolo temporal como resultado de la fluctuación de las cargas. Este dipolo temporal induce otro dipolo en la molécula u átomo adyacente.

La interacción de energía entre dos átomos o moléculas (G_a) es de corto alcance y es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia de separación (r) entre átomos y moléculas [Ec. 3]:

$$G_a = -(\beta/r^6) \quad [\text{Ec. 3}]$$

Donde β es la constante de dispersión de London que es determinada por la polarización del átomo o molécula.

Se ha sugerido que las interacciones de dispersión de London entre átomos y moléculas en cuerpos macroscópicos (como las gotas en una emulsión) pueden ser aditivas, dando como resultados en grandes fuertes atracciones de van der Waals (Tadros, 2016). A distancias pequeñas, el solapamiento de los orbitales electrónicos de las moléculas origina el predominio de las fuerzas repulsivas que, sin embargo, decaen rápidamente con la duodécima potencia de la distancia (Vila Jato & Lastres García, 1997).

3.2.3 Maduramiento de Ostwald

El maduramiento de Ostwald es un proceso donde las gotas grandes crecen a expensas de las gotas pequeñas (McClements, 2007). Esto es así, debido a que las gotas de menor tamaño son más solubles que las grandes, por lo que tienden a disolverse en ellas, mientras que las grandes, más insolubles y estables, tienden a aumentar de tamaño a costa de las moléculas de las gotas más pequeñas (Vila Jato & Lastres García, 1997).

La fuerza conductora de este fenómeno como se dijo anteriormente es la solubilidad de las gotas pequeñas. Esto puede ser fácilmente reconocido en la ecuación de Kelvin [Ec. 4], la cual relaciona la solubilidad de una partícula o gota $S(r)$ con aquella partícula o gota con radio infinito $S(\infty)$:

$$S(r) = S(\infty) \exp\left(\frac{2\gamma V_m}{rRT}\right) \quad [\text{Ec. 4}]$$

Donde γ es la tensión interfacial, V_m es el volumen molar de la fase dispersa, R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta. La solubilidad de las gotas incrementa rápidamente con la disminución del radio, particularmente cuando $r < 100$ nm.

Con el tiempo, la difusión molecular puede ocurrir entre gotas pequeñas y grandes, con la desaparición al final de las primeras. Esto resulta en un cambio de distribución de los tamaños de gota durante el almacenamiento de las emulsiones. Para evitar este proceso, se debe obtener una distribución de tamaños homogénea (McClements, 2007).

3.2.4 Coalescencia

La coalescencia envuelve algunos fenómenos sucesivos: dos gotas se encuentran; se forma una capa delgada entre ellas; la capa se vuelve más delgada; y si la capa se vuelve más delgada se puede romper, el último evento inicia la coalescencia de las dos gotas.

Un concepto muy útil para explicar lo anterior fue introducido por Deryaguin, quien sugiere que “una presión de separación” $\pi(h)$ es producido en la capa delgada entre las gotas para balancear el exceso de presión normal [Ec. 5]:

$$\pi(h) = P(h) - P_0 \quad [\text{Ec. 5}]$$

Donde $P(h)$ es la presión de una capa con grosor h , y P_0 es la presión de una película lo suficientemente gruesa para que la energía libre de interacción neta sea cero. El término $\pi(h)$, a su vez compuesto de tres contribuciones [Ec. 6], la repulsión electrostática (π_E), la repulsión estérica (π_s) y las atracciones de van der Waals (π_A):

$$\pi(h) = \pi_E + \pi_s + \pi_A \quad [\text{Ec. 6}]$$

Para producir una película estable, la suma de π_E y π_s debe ser mayor a π_A , y esto por lo tanto es la fuerza conductora para la prevención de la coalescencia, que puede ser alcanzada por la mejora de dos mecanismos o una combinación de ellos: 1) incrementar la repulsión estérica y electrostática o 2) disminuir el tamaño de partícula; sobre esto último, en general, las gotas más pequeñas son menos propensas a las fluctuaciones de superficie.

Una de las maneras en que se puede alcanzar lo anterior es mediante la formación de fases líquido-cristalinas laminares en la interfase de las emulsiones O/W, como se tratará en las siguientes secciones.

3.3 Estabilización de las emulsiones

Con base a los mecanismos de inestabilidad antes expuestos, se puede afirmar que para que una emulsión sea estable por tiempos apreciables, habrá que impedir la unión de las gotas, por lo cual se podrá recurrir a uno de los siguientes mecanismos de estabilización (Vila Jato & Lastres García, 1997):

1.- Estabilización electrostática, que consiste en proporcionar una carga eléctrica a las partículas, de forma que al tener la misma carga se repelan entre sí. Para esto se pueden modificar valores como la fuerza iónica, la adsorción de contraiones, etcétera. Esto puede entenderse sobre las bases del conocimiento del potencial zeta (ζ).

2.- Estabilización estérica que consiste en recubrir las partículas con una capa adsorbida de material (como un polímero, un sólido anfipático finamente dividido o cristales líquidos) que evita que se acerquen mucho. Cuando las capas del polímero se acercan, se producirá una repulsión entre las mismas; así, las partículas no podrán acercarse a distancias menores de dos veces el grosor de la capa de polímero adsorbido. También, debido a que se requiere energía para desplazar a estas partículas de la interfaz, se dificulta la coalescencia de las gotas (Vila Jato & Lastres García, 1997).

Dentro de la estabilización estérica también se puede considerar a la estabilización con cristales líquidos liotrópicos, ya que se ha mostrado un incremento en la estabilidad de las emulsiones que presentan en la fase continua la formación de dichos cristales.

3.3.1 Estabilización estérica

Las partículas coloidales siempre muestran movimiento browniano y frecuentemente colisionan unas con otras. La estabilidad de los coloides entonces es determinada por la interacción entre las partículas durante dicha colisión. Cuando la atracción domina, las partículas pueden adherirse con otra y finalmente la dispersión puede

separarse (coalescencia). Cuando la repulsión domina, el sistema puede mantenerse estable y permanecer en un estado disperso.

Como se mencionó anteriormente en el apartado de floculación, las fuerzas de van der Waals son universales en todos los sistemas dispersos y son la principal fuerza de atracción entre partículas coloidales. Por lo tanto, se puede decir que una dispersión coloidal es estable cuando una fuerza repulsiva suficientemente fuerte se opone a las atracciones de van der Waals.

Dado que en los sistemas coloidales hay siempre fuerzas atractivas de largo alcance, es necesario proveer una repulsión de largo alcance entre las partículas para impartirles estabilidad. La repulsión impartida debe ser tan fuerte como la fuerza atractiva y comparable en alcance a las interacciones atractivas (Shin, 2002). En el caso de la estabilización estérica, los polímeros naturales y sintéticos (colectivamente llamados tensoactivos poliméricos) cobran gran importancia, ya sea para estabilizar emulsiones o suspensiones (Tadros, 2014; Tadros 2016).

Los tensoactivos poliméricos usados para la estabilización estérica son principalmente copolímeros. Los anteriores, a su vez son polímeros que tienen dos diferentes monómeros incorporados en la misma cadena polimérica; además adquieren el nombre de tensoactivos poliméricos en el momento en que un monómero, denominado "A", que lo conforma es hidrofílico y el otro monómero "B" en hidrofóbico. Los copolímeros se pueden dividir en tres tipos:

Copolímeros aleatorios: en los cuales las unidades de un monómero y de otro no tienen un orden definido.

Copolímeros en bloque: Los bloques de polímero tienen largos segmentos o bloques de un monómero seguido de un segundo bloque de monómero.

Copolímeros de injerto: En este caso, las cadenas de un monómero están "injertadas" sobre cadenas principales de otro monómero (Shin, 2002).

3.3.1.a Mecanismo de la estabilización estérica

Cuando dos partículas, una con radio R y con una capa de polímeros adsorbidos con un grosor hidrodinámico δ_H , se aproximan a una distancia de separación h que es menor que $2\delta_H$, entonces las capas interactúan entre ellas, con dos principales

consecuencias (Tadros, 2014; Tadros 2016): 1) las cadenas de polímeros se traslapan entre ellas y 2) las capas de polímeros sufren algo de compresión (fig. 1).

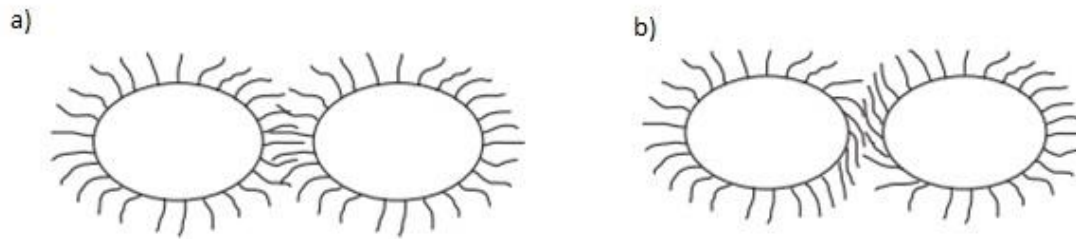


Figura 1.- Representación esquemática de la interacción entre partículas que cuentan con capas de polímeros adsorbidos. a) Interpenetración sin compresión; b) Compresión sin interpenetración. Modificado de Tadros, 2016

La situación real tal vez esté entre los dos casos mencionados, sin embargo, en ambos casos habrá un aumento en la densidad local de las cadenas de polímeros en la región de interacción.

Suponiendo que las cadenas del polímero (los monómeros A de los copolímeros) que interactúan con la fase dispersante están en un buen disolvente, esto permitiría un incremento local de la densidad en la zona de interacción resultando en una fuerte repulsión por los dos efectos principales:

- 1) Un incremento en la presión osmótica en la región traslapada como resultado de la mezcla desfavorable de las cadenas A, cuando éstos están en un buen disolvente; esto se ha denominado repulsión osmótica o interacción de mezclado, y es descrito como la energía libre de interacción G_{mix} .
- 2) Una reducción en la entropía configuracional de las cadenas en la zona de interacción; esto resulta de un descenso en el volumen disponible para las cadenas A cuando éstas están traslapadas o comprimidas. Esto es referido como la interacción del volumen de restricción, interacción entrópica o interacción elástica, y es descrito por una energía libre de interacción G_{el} .

La combinación de G_{mix} y G_{el} es usualmente referida como energía libre de interacción estérica G_s [Ec. 7]:

$$G_s = G_{mix} + G_{el} \quad [\text{Ec. 7}]$$

El signo de G_{mix} depende de la interacción de las cadenas A del polímero con el disolvente o fase dispersante (Tadros, 2014; Tadros 2016). La medida del grado de interacción entre un polímero y el disolvente se denomina parámetro de interacción de Flory–Huggins, este parámetro se representa mediante χ , cuando $\chi < 0.5$ indica que el disolvente tiene gran afinidad por las cadenas polímero, hinchándolo; mientras que valores para $\chi > 0.5$ el disolvente no tiene afinidad por las cadenas del polímero, haciendo que se encojan (Polymerdatabase, 2018). Los valores anteriores influyen en G_{mix} , los valores para polímeros donde $\chi < 0.5$ hacen que G_{mix} sea positivo y que la interacción de mezclado tienda a la repulsión. En contraste, si $\chi > 0.5$, G_{mix} será negativo y la interacción de mezclado se volvería atractiva. En el caso de G_{el} , es siempre positivo, por lo que algunas dispersiones estables pueden ser producidas incluso en disolventes que no tienen afinidad por las cadenas del polímero (Tadros, 2014; Tadros 2016).

3.3.1.b Criterios para una estabilización estérica efectiva

- 1) Las partículas deben de estar completamente cubiertas por el polímero. Cualquier parte en la partícula que no esté cubierta puede causar floculación debido a las atracciones de van der Waals.
- 2) El polímero debe de estar fuertemente “anclado” a la superficie de la partícula para prevenir cualquier desplazamiento durante la aproximación de las partículas; esto es particularmente importante para dispersiones concentradas. Para este propósito, los copolímeros en bloque y los copolímeros de injerto son los más adecuados.

La elección del copolímero para brindar estabilización a la emulsión dependerá de su signo, O/W o W/O. Un ejemplo de uso amplio en Farmacia es el uso del poloxámero 407, el cual se utiliza para estabilizar dispersiones acuosas ya que está compuesto

por una cadena de anclaje hidrofóbica conformado por polipropilenglicol y flanqueada por dos cadenas de estabilizantes de polietilenglicol.

3.4 Estabilización de emulsiones por formación de cristales líquidos

La formación de fases líquido-cristalinas, en las emulsiones suele ser común cuando la formulación contiene ciertos sistemas de mezclas de tensoactivos (como son lauril sulfato de sodio-alcohol cetílico; alcohol cetoestearílico con varios n-alkil sulfatos de sodio, entre otros). La evidencia indirecta ha sido provista por estudios reológicos, los cuales han demostrado la presencia de una red viscoelástica en la fase continua de algunas emulsiones. Otros estudios han mostrado más evidencia vía microscopía óptica con luz polarizada o técnicas de contraste diferencial de interferencia. Recientemente la criomicroscopía electrónica de transmisión ha hecho posible una mayor resolución de manera más directa (Lieberman, 1996).

Dejando de lado la posible formación espontánea de cristales líquidos en la emulsión, éstos también pueden ser agregados en la emulsión para promover la estabilidad de la emulsión y para proveer una matriz que los contenga; así, se ha publicado que el mecanismo de estabilización por los cristales líquidos depende del método de emulsificación. Con una emulsificación suave, los cristales líquidos forman “una piel” alrededor de las gotas. Este tipo de estabilización por cristales líquidos es la más reportada. Finalmente, una emulsificación intensiva da lugar a vesículas líquido-cristalinas las cuales pueden estabilizar a la emulsión (Sjöblom, 2001).

3.5 Propiedades de los cristales líquidos

Los tensoactivos en sistemas agua/aceite forman gran variedad de estructuras de asociación entre las cuales se encuentran los cristales líquidos (Chávez *et al.*, 2013). Éstos también son conocidos como mesofases, fases intermedias, o semisólidos y a diferencia de los líquidos ordinarios, las moléculas o iones que los forman se disponen de manera relativamente ordenada, dando origen a un estado mesomórfico que posee un orden de largo alcance con lo que respecta a la orientación molecular y un orden parcial, o bien desorden, en lo referente a posición de las moléculas. De

acuerdo con el origen de su formación, las fases líquido-cristalinas se clasifican en 2 grandes grupos: termotrópicas y liotrópicas.

Los cristales líquidos termotrópicos (del griego *thérme*, calor, y *tropé*, cambio) se forman al calentar ciertos sólidos a una temperatura característica para cada sustancia. A otra temperatura, mayor y definida, desaparece el orden a nivel molecular y el sistema presenta características de un líquido ordinario (Pasquali *et al.*, 2018).

Los líquidos liotrópicos (del latín *lyo*, desleír), en cambio, se presentan en cierto intervalo de temperatura cuando algunas sustancias se dispersan en un líquido. Para una temperatura fija, este tipo de cristal líquido aparece en un intervalo de concentración. Los sistemas liotrópicos más comunes están constituidos por dispersiones de tensoactivos en agua, aunque también pueden formar parte de estos sistemas otras sustancias anfifílicas como ácidos grasos y esteroides.

La principal fuerza conductora para la formación de los cristales líquidos liotrópicos, es el efecto hidrofóbico, que actúa minimizando las interacciones entre las colas hidrocarbonadas de las moléculas anfifílicas y el ambiente acuoso. Las variaciones en las regiones hidrofílicas e hidrofóbicas pueden favorecer la formación de fases termodinámicamente estables con una curvatura interfacial de magnitud incrementada, reflejado en el incremento de la dimensionalidad de las fases formadas (Mulet *et al.*, 2013). Las características físicoquímicas de la cabeza y cola de las moléculas anfifílicas contribuyen a la forma de la estructura formada en el agua.

En los sistemas líquido cristalinos liotrópicos existen 3 fases bien caracterizadas (fig. 2), cada una con algunas variantes y las cuales tienen diferentes características estructurales y de fluidez, que son:

Fase laminar: ésta se caracteriza por las bicapas que forman los tensoactivos, parecidas a las membranas celulares, alternadas y que tienen una anchura bien definida, pero no una estructura dentro de las capas. Poseen una relativa fluidez y son birrefringentes.

Fase hexagonal: aquí las moléculas de los tensoactivos aparentemente forman estructuras cilíndricas, en las que las cabezas polares pueden estar orientadas hacia fuera de la estructura hexagonal (fase hexagonal normal), o hacia dentro de la estructura (fase hexagonal inversa). Estos cilindros se alinean en arreglos hexagonales con el agua entre ellos. No fluyen por acción de la gravedad y son birrefringentes.

Fase cúbica: en esta fase las moléculas de los tensoactivos están ensambladas formando esferas, que a su vez son empaquetadas en estructuras más grandes en forma de esferas. No presenta birrefringencia y es muy viscosa.

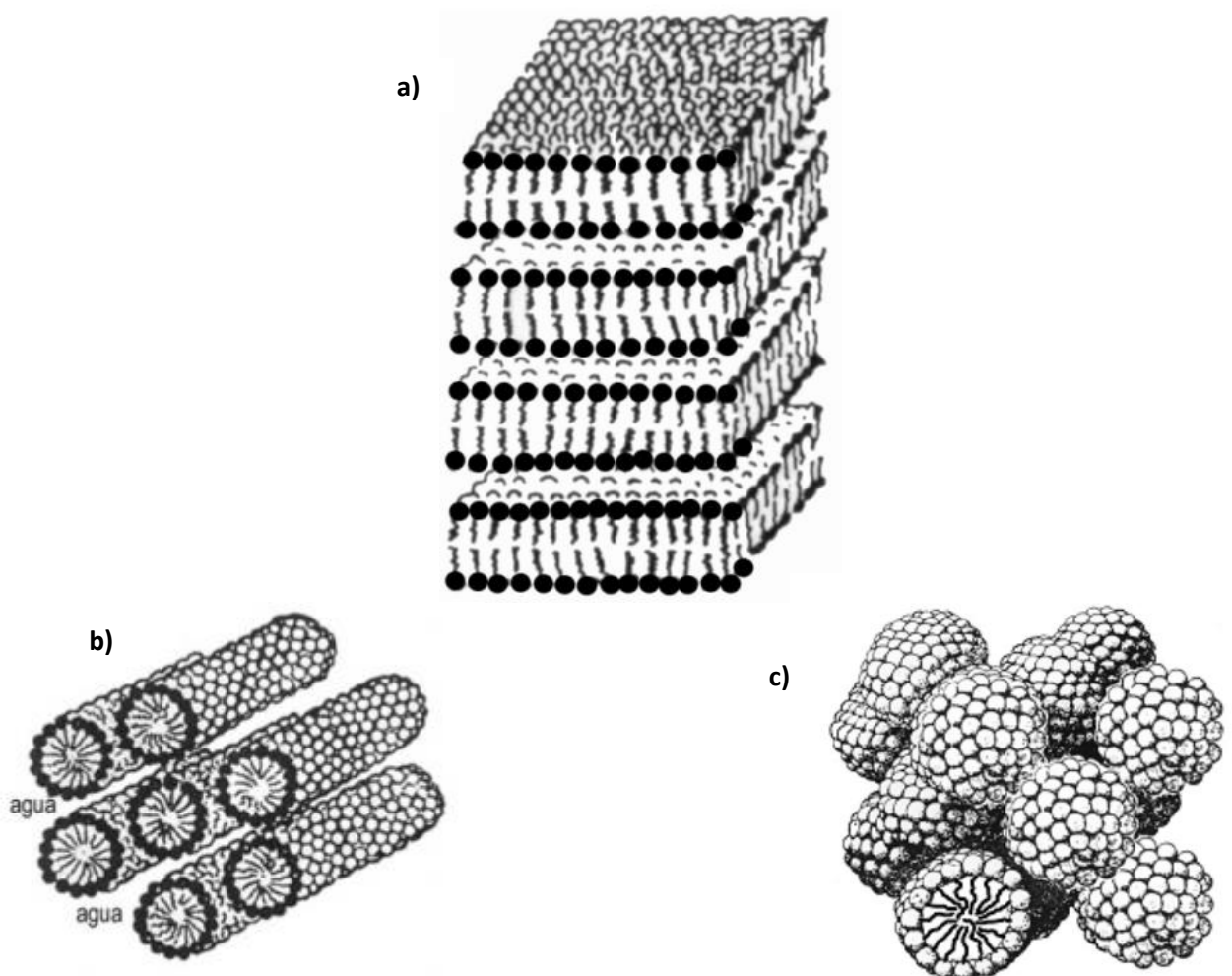


Figura 2.- Fases líquido-cristalinas. a) fase laminar. b) fase hexagonal. c) fase cúbica. Tomado de Pasquali *et al.*, 2018

3.6 Aplicaciones de cristales líquidos en formulaciones farmacéuticas y cosméticas

La posibilidad de disponer de formulaciones con cristales líquidos de transparencia óptica y apariencia gelificada, es altamente apreciada en diferentes campos de aplicación tales como la farmacéutica y la cosmética, en la que se aprecia la capacidad de producción de emulsiones con gotas muy pequeñas, la formación de emulsiones con agrupaciones de gotas y la capacidad de limpieza de cremas usadas en la eliminación de maquillajes (Chávez *et al.*, 2013). En este sentido, se valora las propiedades de flujo, apariencia (asociada al tamaño de glóbulo y densidad), así como los distintos posibles mecanismos de liberación modificada de principios activos que pueden dar lugar.

Los cristales líquidos liotrópicos resultan adecuados como sistemas de liberación controlada de principios activos, debido a sus viscosidades altas y a su capacidad para disolver tanto fármacos hidrosolubles como liposolubles. El sistema más estudiado con este fin es el formado por el monooleato de glicerilo y agua que a temperatura ambiente presenta fase laminar. Otro ejemplo es la formación *in situ* de una fase cúbica de viscosidad alta cuando se pone en contacto el monooleato de glicerilo con el agua de las mucosas, lo que la hace adecuada para la administración de medicamentos bioadhesivos (Pascuali, 2006).

Debido a que las fases hexagonales y cúbicas de cristales líquidos comúnmente son muy viscosas y que por ello se hacen difíciles de manejar, limitando su aplicación y en ciertos casos pueden causar irritación cuando se ponen en contacto con el epitelio biológico, se ha empleado como una estrategia innovadora dispersar la mesofase original en agua en forma de partículas pequeñas (Guo *et al.*, 2010; Yaghmur & Glatter, 2009); pero una característica de gran relevancia es asegurar que el sistema mesofásico inicial de interés (hexagonal o cúbico, por ejemplo), mantenga su estructura intacta al diluirse (dispersarse) en el medio acuoso (Amar-Yuli *et al.*, 2007).

Cuando los cristales líquidos liotrópicos cúbicos o hexagonales se dispersan en un exceso de agua, pueden estabilizarse mediante la adición de agentes como

copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno: Poloxámero o Pluronic®, con lo cual forman dispersiones coloidales que son conocidas como cubosomas y hexosomas, respectivamente. En general, los métodos de preparación de los cristales líquidos liotrópicos cúbicos y hexagonales son más sencillos que los de sus dispersiones. Así, por ejemplo, los primeros pueden ser preparados al mezclar fases lipídicas anfifílicas y acuosas con un vórtex; en contraste, la fabricación de cubosomas o hexosomas es más complicada.

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

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

4. Función y estructura de la piel

La piel humana se combina con las mucosas de los aparatos urogenital, digestivo y respiratorio para proteger la estructura corporal interna de un ambiente externo hostil, ya que estamos expuestos a contaminación, temperatura, humedad y radiación. La piel salvaguarda los órganos internos, limita la entrada y salida de sustancias

químicas, estabiliza la presión arterial, la temperatura, además de medir las sensaciones de calor, el frío y el dolor. Al ser el órgano más externo, también hay enfermedades que la pueden dañar, por lo que se han descrito más de 1000 enfermedades relacionadas con esta. La accesibilidad de la piel, aunada a su gran área, la hacen un blanco atractivo para la administración de fármacos (Aulton, 2004; Lai-Cheong & McGrath, 2009; Mota *et al.*, 2017).

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, con una superficie que va de los 1.5 a 2 m² y es un 15% del peso en un adulto. La piel se puede dividir en tres partes (fig. 3): la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo (Lai-Cheong & McGrath, 2009).

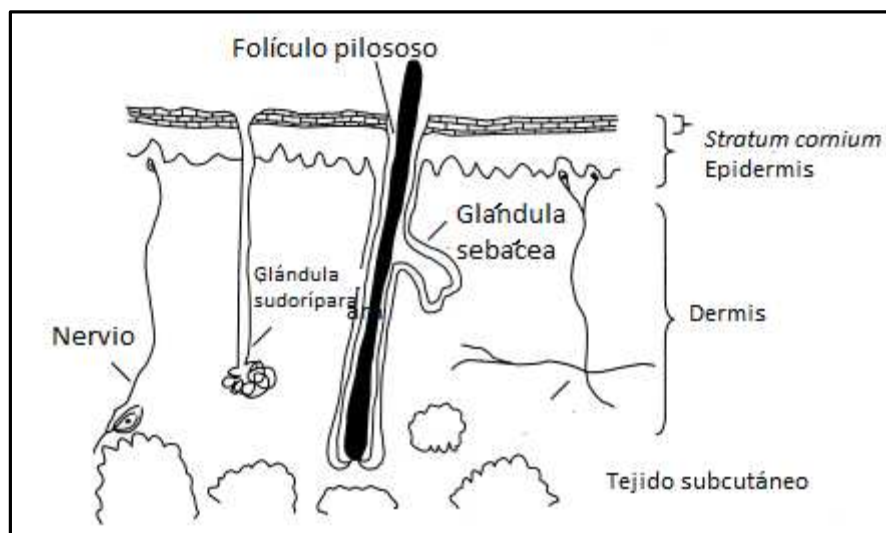


Figura 3.- Capas de la piel y algunos anexos

La epidermis es la capa más externa de la piel, esta a su vez se divide *stratum corneum*, *stratum lucidum* (capa exclusiva de las palmas de las manos y plantas de los pies), *stratum granulosum*, *stratum spinosum* y *stratum basale* (Mota *et al.*, 2017). Las células que principalmente componen a la epidermis son los queratinocitos (95% de las células), el resto de las células son los melanocitos, células de Langerhans y las células de Merkel. El *stratum basale* consiste en una capa de queratinocitos, melanocitos y células de Merkel, estas células con características tales como ser columnares, cuboidales y mitóticamente activas, se dividen continuamente para una diferenciación que termina en la formación del *stratum corneum*, tomando de 2 a 3

semanas la migración y diferenciación de los queratinocitos. Otra de las características importantes de los queratinocitos es su forma de ladrillo, que es provista por un citoesqueleto de filamentos intermedios de queratina. Mientras la epidermis se va diferenciando, los queratinocitos se vuelven más delgados como resultado de la acción de flagrina, un componente de proteína de gránulos de queratohialina, sobre los filamentos de queratina.

El *stratum spinosum* es la capa más larga de la epidermis. Está compuesta de varias capas de queratinocitos poliédricos irregulares con citoplasmas grandes unidos por desmosomas y cuerpos de Odland.

El *stratum granulosum* está compuesto de 3 a 5 capas de queratinocitos y consisten también en los precursores de los lípidos intracelulares del *stratum corneum*. Aquí los cuerpos de Odland son cuerpos aplanados y laminares ricos en lípidos, estos migran del citoplasma a la membrana, fusionándose con ella para después liberar su contenido a la interfase del *stratum corneum* y *stratum granulosum*.

El *stratum corneum*, está formado por corneocitos no viables, también llamadas células queratinizadas, que en algún momento fueron queratinocitos, los cuales perdieron su núcleo y organelos citoplasmáticos. Las células queratinizadas contienen colesterol, ceramidas y ácidos grasos que juegan un rol importante en la función de barrera (Mota *et al.*, 2017). A pesar de su grosor que va de 10 a 20 μm , es una barrera formidable para evitar el paso libre de solutos y agua. Pero a pesar de ser la barrera física más importante para el paso de agentes externos, el *stratum corneum* también puede ser propenso a infecciones, muchas de ellas causadas por hongos, las llamadas micosis superficiales, causadas por dermatofitos, hongos parásitos de la queratina (Arenas Guzmán, 2000).

La dermis es una capa de 3 a 5 mm de grosor, consta de una matriz de tejido conjuntivo que contiene proteínas fibrosas entrelazadas (colágeno, elastina y reticulina) embebidas de una sustancia fundamental amorfa de mucopolisacáridos. Los nervios, los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos atraviesan la matriz y los anejos cutáneos (glándulas sudoríparas ecrinas, glándulas apocrinas y unidades pilosebáceas) se engarzan en ella. La dermis necesita un aporte sanguíneo eficiente

para transportar nutrientes, eliminar los productos de desecho, regular la presión y la temperatura, movilizar defensas y contribuir al color de la piel (Aulton, 2004).

El tejido subcutáneo (hipodermis) contiene a la grasa subcutánea que proporciona una almohadilla mecánica y una barrera térmica; esta capa también está compuesta por tejido conectivo, conectando a la dermis a los músculos o huesos circundantes. Los adipocitos que componen principalmente a esta capa están especializados en almacenar energía en forma de grasa.

La piel no está libre de enfermedades, como ya se ha mencionado, y como ejemplo se describió el caso de las dermatofitosis que invaden a la epidermis. Por lo que es necesario tener a nuestra disposición de una variedad de fármacos para el tratamiento de las dermatofitosis. Dentro de los fármacos utilizados se encuentran la griseofulvina, la terbinafina y el grupo más amplio para el tratamiento de las micosis, los azoles, como el fluconazol, el itraconazol y el ketoconazol, por mencionar algunos.

5. Ketoconazol

El ketoconazol (fig. 4) es un antifúngico de amplio espectro e incluye en su actividad varias infecciones causadas por *Candida*. Posee actividad fungicida y fungistática con respecto a dermatofitos, levaduras, hongos dimorfos y eumicetos. Es usado contra infecciones fúngicas superficiales, candidiasis genital y candidiasis mucocutánea crónica. Su actividad, al igual que todos los derivados del imidazol, es explicada por su capacidad para inhibir selectivamente la membrana celular de los hongos, interfiriendo con la biosíntesis del ergosterol (Vardanyan & Hruby, 2006).

A pesar de su espectro amplio contra hongos, el uso de ketoconazol por vía oral presenta problemas. La FDA (Food and Drug Administration) ha emitido un comunicado de seguridad para limitar su uso, ya que el uso de ketoconazol por vía oral (Nizoral®) puede causar varios problemas en el hígado y glándulas adrenales, además de las interacciones que tiene con otros medicamentos. Por lo tanto, el ketoconazol por vía oral no debe ser la primera vía de tratamiento si hay alternativas de mayor eficacia y seguridad. Por lo anterior el ketoconazol queda restringido a su aplicación por vía tópica, en cremas, champú y geles (Research, 2018).

El ketoconazol pertenece al grupo II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, de baja solubilidad y alta permeabilidad (Tsume *et al.*, 2014); por lo que tiene problemas de solubilidad en medio acuoso, reflejándose principalmente en condiciones de pH de neutros a básico, mientras que la solubilidad se ve aumentada a pH ácidos (Skiba *et al.*, 2000). La masa molecular del ketoconazol es de 531.44 g/mol. Presenta dos grupos básicos, una piperazida y un imidazol, con dos pK_a: de 2.94 y 6.51 respectivamente (Viseras *et al.*, 1995), además un log P de 4.3 (Tsume *et al.*, 2014).

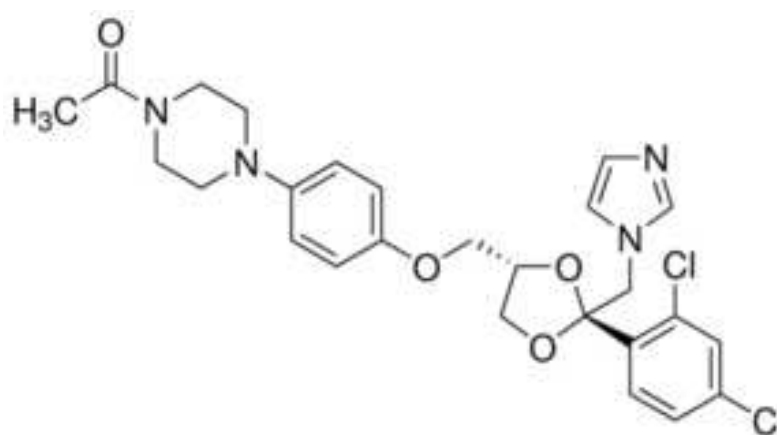


Figura 4.- Estructura molecular del ketoconazol.

6. Caracterización de los cristales líquidos liotrópicos (CLL)

6.1 Análisis del tamaño de la distribución de tamaño de partícula, DTP

La información de la DTP es muy importante para muchos procesos de investigación e industriales, de ahí surge la necesidad de diversas técnicas encargadas del análisis de ese aspecto, por lo que también es necesario entender qué es una partícula.

La definición de partícula depende de la disciplina y perspectiva desde la que estamos hablando. En el caso de la física de las partículas, se estudian los bloques de materia, radiación y sus interacciones; aunque generalmente se estudian las partículas más pequeñas que son detectables y las interacciones necesarias para explicar su comportamiento (Nature, 2018).

Se ha definido a la partícula como una cantidad discreta de materia que tiene una interfase con el ambiente que la rodea. Muy a menudo se tiene la idea de que una partícula es un sólido que tiene una interfase con un gas o líquido que lo rodea. Sin embargo, las partículas también pueden ser gotas de líquidos en el aire, burbujas en el agua o emulsiones.

Además, hay que tener en cuenta que no hay una regla específica de que tan pequeña o grande puede ser una partícula; algunas definiciones dicen que pueden ir de unos cuantos nanómetros a un milímetro. No obstante, el tamaño de una partícula es de vital importancia, ya que existen fenómenos fisicoquímicos que lo relacionan con la mencionada interfase. Mientras la partícula se vuelve más pequeña en tamaño y grande en número, estas muestran una mayor interfase en relación con su masa. La interfase entre las partículas y el medio que las rodea exhibe propiedades marcadamente diferentes a las de la mayoría del material. De esto se puede tomar mucha información para explicar diversos fenómenos, como puede ser la estabilidad de las emulsiones o las suspensiones. El otro reto es entender cómo es que se lleva a cabo el análisis del tamaño de las partículas (*PERC, 2018*).

Para el análisis de tamaño de la partícula se deben hacer ciertos supuestos, debido a que en general, se trata de describir el tamaño de la partícula mediante una sola cantidad, como el diámetro, el volumen o el área superficial. La DTP es una gráfica del número de partículas que tienen un valor único de la cantidad elegida o bien una distribución acumulada que representa la fracción de partículas más grandes o más pequeñas que un tamaño característico.

Debido a que el único objeto tridimensional que se describe con una sola cantidad es una esfera, a partir del diámetro de ésta se puede calcular con exactitud su área superficial y su volumen; en los métodos usuales para analizar el tamaño de partícula, se presupone que las partículas son esféricas, y se puede convertir la cantidad medida a la de una esfera equivalente. Esto trae consigo un concepto muy importante, el factor de forma, el cual es necesario entender el porqué de la aplicabilidad del modelo de la esfera para la determinación del tamaño de la partícula.

El factor de forma $P(q)$ es la difracción de la luz, que resulta de la forma de una partícula o partículas. La difracción de la luz de una partícula puede ser explicada como un patrón de interferencia producido por todas las ondas de luz que son mandadas al detector por cada electrón o átomo que componen la partícula. Sumando todas las amplitudes de onda (E) en el detector y elevando al cuadrado el resultado de la suma anterior, resulta en un patrón de interferencia. Este patrón oscila de una manera que es característica de la forma de la partícula (fig. 5). Además, es un “factor”, porque debe de ser escalado con un orden constante para coincidir con las unidades de intensidad experimentales (Heimo & Singh, 2013).

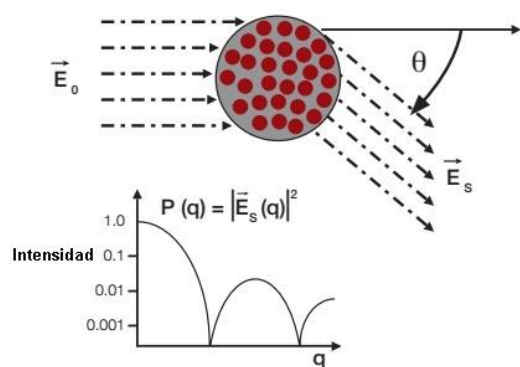


Figura 5.- El factor de forma $P(q)$ de una partícula o de un sistema de partículas, es un patrón de interferencia de las ondas de luz que inciden sobre ella o ellas. Donde E_0 es la luz incidente con una amplitud y E_s es la luz incidente difractada a una longitud del vector de difracción. Tomado de *Heimo and Singh, 2013*

En las aplicaciones prácticas, varias partículas son iluminadas al mismo tiempo y el patrón de difracción observado corresponde al factor de forma de una partícula, solo:

1. Si las partículas son todas idénticas en forma y tamaño (muestras monodispersas)
2. Si las partículas están muy alejadas una de otra (muestras diluidas).

Si el sistema tiene diferentes tamaños (muestras polidispersas), entonces los factores de formas de todas las partículas son sumados para obtener un patrón de difracción promedio de toda la muestra.

6.2 Difracción de luz láser

La técnica de difracción de luz láser, también llamada dispersión de luz láser de ángulo bajo (DLAB), es uno de los métodos más comunes para medir el tamaño y DTP comprendido en el intervalo de $0.1 \mu\text{m}$ a los $2,000 \mu\text{m}$. Esta técnica es popular debido a su amplio intervalo dinámico, su precisión, su facilidad de uso y su

adaptabilidad a una variedad de muestras (suspensiones, emulsiones y polvos) (Skoog *et al.*, 2010). El fenómeno de la difracción de la luz ocurre sobre la superficie de las partículas y se puede pensar que sucede como la flexión de ondas de luz por la superficie de la partícula. La difracción surge debido a las diferencias pequeñas en la longitud de la trayectoria de las ondas de luz creadas por la interacción con la superficie de la partícula. Estas diferencias en la longitud de la trayectoria causan interferencia constructiva y destructiva entre las ondas senoidales de la luz, las ondas difractadas son entonces dispersadas en varias direcciones, dejando un patrón de difracción de luz característico (Jillavenkatesa *et al.*, 2001). Como se muestra en la Figura 4, para partículas grandes, los rayos emitidos hacia atrás observados en el punto D pueden interferir de manera destructiva, debido a la gran diferencia de la trayectoria de las rutas SXD y SYD . Los rayos emitidos en la dirección directa observada en la posición D' , que viajen en la ruta SXD' y SYD' , tienen mayor posibilidad de interferir de manera constructiva como resultado de la diferencia de trayectoria más pequeña (Figura 6). El ángulo de dispersión θ mostrado en la figura 7, es el que existe entre los rayos incidente y dispersado con potencias radiantes P_0 y P_{sc} respectivamente; por lo que θ es 0° para la dispersión directa y 180° para la dispersión que se dirige hacia atrás (Skoog *et al.*, 2010). En la relación del tamaño de las partículas con el ángulo de dispersión, todo se reduce a que las partículas pequeñas difractan débilmente a ángulos amplios y las partículas grandes difractan intensamente a ángulos estrechos (HORIBA, 2017).

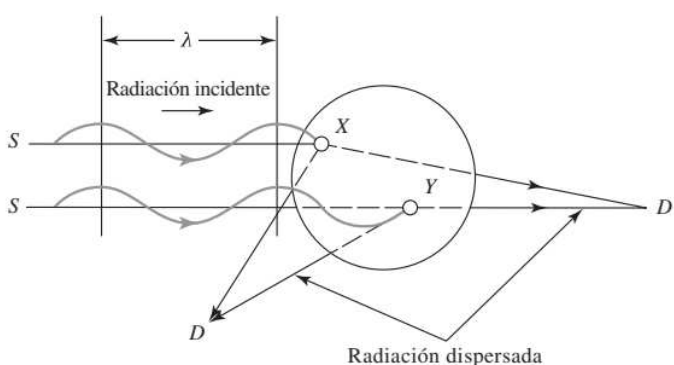


Figura 6.- Dispersión de la luz por partículas grandes. Modificado de Skoog, 2010

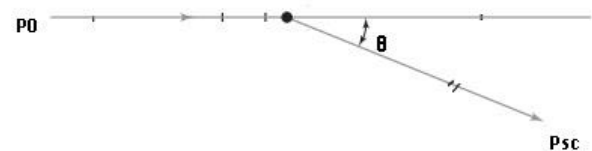


Figura 7- Ángulo de dispersión. Modificado de Skoog, 2010

En sus comienzos el equipo consistía en una fuente de luz láser roja (lámpara de Helio-Neón) de bajo poder ($\lambda=650$ nm), elementos para colimar el haz de luz incidente, una celda para la muestra. La luz difractada por la muestra es enfocada sobre el sistema de detección, el cual puede constar de varios detectores puestos en diferentes lugares (fig. 8). En la actualidad se ha agregado una segunda fuente de luz (azul $\lambda= 405$ nm) ya que la exactitud para medir partículas pequeñas es dependiente de la longitud de onda. Algunos instrumentos integran sonicadores o agitadores para poder homogeneizar la muestra y evitar la aglomeración de las partículas ya que los equipos no pueden distinguir aglomerados de las partículas individuales (HORIBA, 2017; Jillavenkatesa *et al.*, 2001; Skoog *et al.*, 2010).

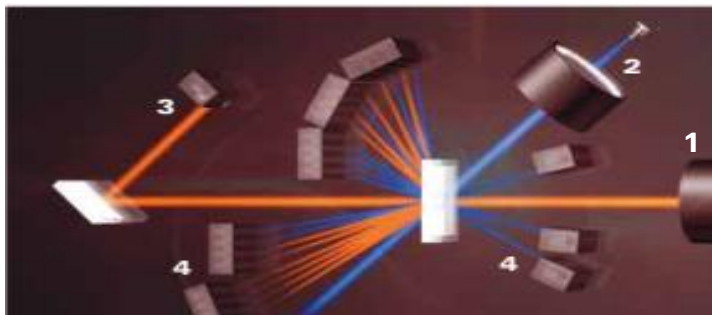


Figura 8.- Simplificación del sistema óptico: (1) Lámpara de luz láser roja para partículas mayores a los 500 nm, (2) lámpara de luz láser azul para partículas menores a los 500 nm, (3) detectores para partículas grandes, (4) detectores para ángulos amplios (adaptado de (HORIBA, 2017)

Los detectores convierten la intensidad de la luz incidente que fue difractada por la muestra, en señales eléctricas que son procesadas para obtener información acerca del tamaño de partícula y DTP. La conversión del patrón de difracción a una distribución de tamaños requiere el uso de modelos físicomatemáticos y su procesamiento mediante software para su determinación (Jillavenkatesa *et al.*, 2001).

6.2.1 Modelos teóricos para determinación del tamaño de partícula

En la actualidad, la mayor parte de los equipos para difracción láser usan modelos ópticos en su software de análisis que se basan en la teoría de dispersión de Mie o de difracción de Fraunhofer. La teoría de Mie provee una solución completa de dispersión de luz mediante la analogía de la esfera, la cual incluye sensibilidad a tamaños pequeños (difracción en ángulos pequeños), un amplio intervalo de

opacidad (absorción de la luz) y el usuario solamente necesita proveer el índice de refracción de la partícula y del medio dispersante (Jillavenkatesa *et al.*, 2001).

En el caso del modelo de difracción de Fraunhofer es más fácil de poner en práctica, ya que éste trata a las partículas como objetos opacos circulares que obstruyen la luz, también asume que la difracción es equivalente a ángulos pequeños y ángulos amplios. Por lo general el modelo de Fraunhofer está limitado y la hacen una mala elección para medir con exactitud tamaños de partícula menores de 20 μm .

Uno de los motivos por los cuales la teoría de Mie es superior a la teoría de Fraunhofer, es su uso del índice de refracción. El fenómeno de la refracción se da cuando la luz entra en una sustancia más densa, las ondas de luz interactúan con los átomos de la sustancia en la interfase y a través del grueso de la sustancia. Estas interacciones modifican ondas de luz por absorción de energía, resultando en ondas más cercanas por reducción de la velocidad y longitudes de onda más cortas (Martin *et al.*, 2011).

Mientras que el modelo de Fraunhofer es independiente de las propiedades del material, el modelo de Mie es mucho más dependiente de las propiedades ópticas, y entonces requiere el uso de los componentes reales e imaginarios del índice de refracción. El modelo de Fraunhofer es preferido cuando se analizan sistemas de polvos que contienen mezclas de diferentes materiales, o cuando se analizan partículas con densidad heterogénea inherente (Jillavenkatesa *et al.*, 2001).

6.3 Rayos X

Los rayos X son ondas electromagnéticas con una longitud de onda menor a los 0.3 nm; estos están compuestos por un campo eléctrico (E) y un campo magnético (H), los cuales están constantemente alternando. El campo eléctrico, el campo magnético y la dirección de propagación están siempre en ángulos rectos con respecto el uno del otro.

Lo anterior es la perspectiva clásica de una linealidad polarizada, una onda plana electromagnética. Desde una perspectiva de la mecánica cuántica, un haz monocromático puede ser cuantizado como partículas denominadas fotones. Por lo

tanto, cada interacción entre la luz y la materia puede ser descrita por dos modelos, el modelo oscilador (onda) y el modelo de impulso-transferencia (fotón) (Als-Nielsen & McMorrow, 2017).

Hay dos tipos de interacción de rayos X con la materia:

- a) Absorción: un átomo que es irradiado con rayos X puede perder un electrón; por lo que la energía del rayo X es usada y por lo tanto hay fotones absorbidos. La pérdida del electrón deja al átomo inestable y, para restaurar su configuración original, los electrones restantes del átomo se arreglan para llenar el espacio vacío. Como resultado de esto, los átomos emiten radiación para alcanzar su nivel de energía más bajo, por ejemplo, con rayos X con otra longitud de onda que la radiación incidente.
- b) Difracción: este fenómeno ocurre cuando una onda electromagnética es desviada de su trayectoria por el campo electromagnético emitido por la materia. Este fenómeno puede ocurrir de dos maneras.
 - 1) Difracción de Compton: en este fenómeno, la radiación difractada tiene una longitud de onda diferente a la radiación incidente. Lo anterior es debido a que hay una transferencia de energía hacia los electrones de la materia con que se interactúa, por lo que este tipo de difracción no tiene relación de fase (difracción incoherente) con el incidente y no puede producir fenómeno de interferencias, por lo tanto, no lleva información estructural.
 - 2) Difracción de Rayleigh y Thompson: este tipo de difracción ocurre cuando la radiación que incide sobre la materia no transfiere energía. En este fenómeno los electrones de materia comienzan a oscilar con la misma frecuencia que la radiación incidente, por lo que los electrones emiten radiación con la misma frecuencia. Como todos los átomos de la materia oscilan sincronizados, producen difracción coherente. La cual es capaz de interferir en un detector, este patrón de interferencia lleva información de la estructura de la partícula (Heimo & Singh, 2013).

6.3.1 Difracción de Rayos X

Los efectos de difracción se observan cuando la radiación electromagnética incide en estructuras periódicas con variaciones geométricas en la escala de la longitud onda de la radiación. Las distancias interatómicas en cristales y moléculas ascienden a 0.15-0.4 nm, que corresponden en el espectro electromagnético, con la longitud de onda de los rayos X que tienen energías de fotones entre 3 y 8 keV. En consecuencia, los fenómenos como la interferencia constructiva y destructiva deben ser observables cuando las estructuras cristalinas y moleculares están expuestas a los rayos X.

La difracción de rayos X es una técnica analítica que se utiliza para determinar el arreglo de los átomos en los compuestos, así como para medir las longitudes y sus ángulos de enlace.

La técnica de difracción de rayos X hace uso del fenómeno de interferencia de la radiación, cuando dos o más ondas pasan por la misma región del espacio, se observa dicho fenómeno como un aumento o una disminución de la amplitud total de la onda (Atkins & Jones, 2013).

Cuando un haz de rayos X incide sobre un material cristalino, los electrones de los átomos que constituyen un compuesto oscilan con la misma frecuencia que la radiación incidente. Cada uno de los electrones es considerado un oscilador independiente; su amplitud es muy débil si se le compara con la onda incidente, pero todas esas fuentes coherentes interfieren entre sí para dar una onda correspondiente al átomo. Al final el haz difractado en una dirección dada es el resultado de las ondas provenientes de cada uno de los átomos del compuesto (Botch & Corona, 2017).

Si las ondas difractadas en alguna dirección están en fase, se da la denominada "interferencia constructiva", una suma de las amplitudes, por lo que hay una intensidad resultante grande. Pero si hay una diferencia de fase entre las ondas difractadas, las ondas elementales se anulan entre sí, y hay una disminución de amplitud de onda resultante, por lo tanto, también hay una disminución de intensidad (Atkins & Jones, 2013).

La intensidad de los rayos X difractados por algún compuesto tiene ciertas direcciones en que la intensidad es muy alta. El modelo de Bragg es el utilizado para predecir la posición de los máximos de intensidad. Para este modelo se considera que un compuesto que tiene un grado de orden entre sus átomos (como un cristal), tiene planos de átomos que actúan casi como espejos casi transparentes que reflejan parte de la radiación incidente con una dirección (Botch & Corona, 2017).

En términos geométricos, el espacio entre los planos reflejantes es d y el ángulo reflejante del haz de rayos x incidente es θ , la diferencia de trayectoria para las ondas reflejadas por los planos sucesivos es $2d \text{ sen } \theta$. Por lo tanto, la condición para la difracción es $n\lambda = 2d \text{ sen } \theta$, donde n es un entero y λ es la longitud de la onda (Bragg, 1968). Para que la diferencia sea constructiva, es decir, para que se observe un pico de difracción en el difractograma, la diferencia de recorrido debe ser igual a un número entero de veces la longitud de onda de la radiación, es decir, igual a $n\lambda$ (fig. 9) (Botch & Corona, 2017).

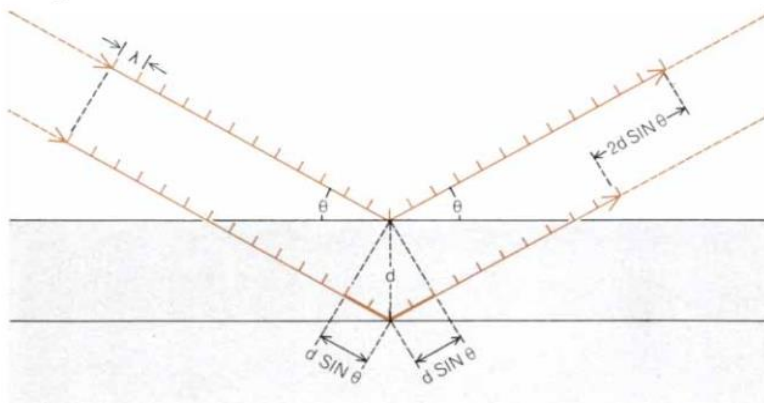


Figura 9.- En términos formalmente geométricos, si el espacio entre los planos reflejantes de átomos es d y el ángulo de vista del rayo X incidente es ϑ , la diferencia de fases para las ondas reflejadas por planos sucesivos es $2d \text{ sen } \vartheta$ (figura tomada de Bragg, 1968).

En el difractómetro se obtiene al final una gráfica de intensidades en función del ángulo 2θ , el cual se denomina difractograma o patrón de difracción. Este difractograma se debe no sólo a la identidad de los átomos presentes en la muestra, sino a los planos cristalinos que difractan los rayos X, es decir, el orden o desorden parcial de dichos átomos en el espacio, por lo que un difractograma, para una sustancia dada, es una huella digital (fig. 10) de dicha sustancia (Botch & Corona, 2017).

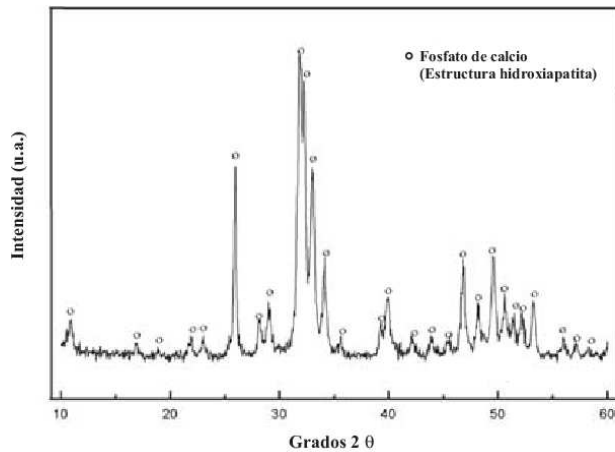


Figura 10.- Patrón de difracción del fosfato de calcio

Aunque la difracción de rayos X es una herramienta muy útil para ciertos aspectos de interés en las propiedades de la materia, hay otros que se pueden dilucidar con algunas de sus variantes como son la difracción de rayos X de ángulo bajo, en donde se pueden calcular el tamaño de las heterogeneidades de los materiales, así como características de éstos, como lo es el tamaño y forma de las partículas.

6.3.2 Difracción de rayos X de ángulo bajo

La técnica de difracción de rayos X de ángulo bajo o SAXS, por sus siglas en inglés (Small Angle X-ray Scattering), provee un análisis detallado de la estructura e información física para una variedad de sistemas de partículas más allá de un tamaño entre 1 y 100 nm, para caracterizar tamaños y formas promedio de las partículas (Boldon *et al.*, 2015). Los materiales pueden ser sólidos o líquidos, y a su vez, pueden contener dominios sólidos, líquidos o gaseosos del mismo u otro material en cualquier combinación (Heimo & Singh, 2013).

En un experimento de SAXS, la muestra se coloca en un capilar de cuarzo (si está en disolución), en ella se hace incidir un haz de rayos X monocromático colimado, la intensidad de los rayos X difractados es grabado por un detector de rayos X. El patrón de difracción del disolvente puro también es colectado y sustraído de la disolución muestra dejando solamente la señal de las partículas de interés (fig. 11). El patrón

de difracción resultante está relacionado con la forma y tamaño total de las partículas bajo análisis (Kikhney & Svergun, 2015).

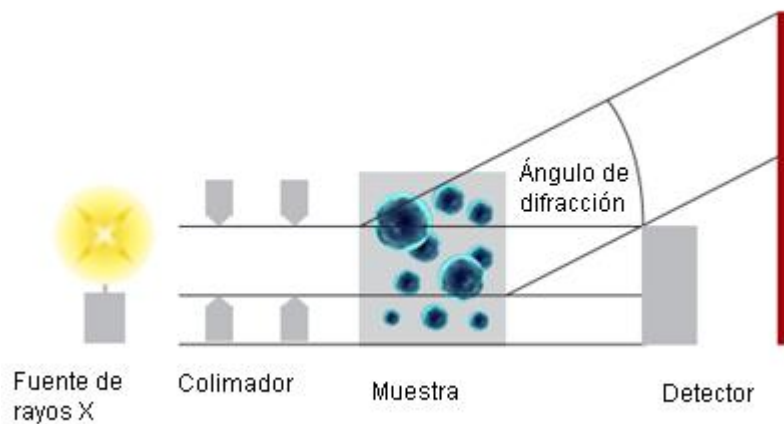


Figura 11.- Componentes de un instrumento para SAXS. Figura tomada de *Heimo & Singh, 2013*

Cabe destacar que en la técnica de SAXS, la intensidad (I) es expresada como función del vector de difracción (q, s, h), que resulta de un fotón (a una longitud de onda λ) difractado fuera de la muestra a un ángulo 2θ (fig. 12).

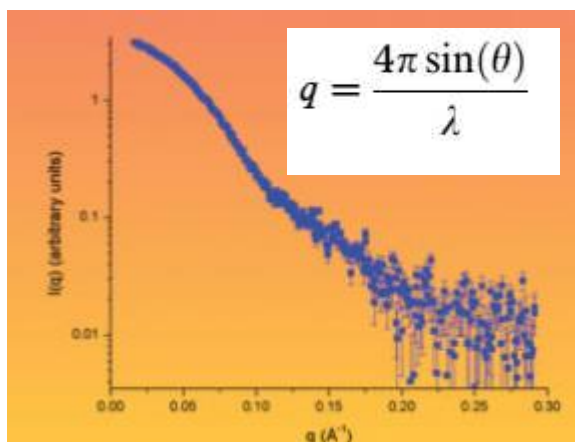


Figura 12.- Representación de la intensidad I en función del vector de difracción q . Figura tomada *Heimo & Singh, 2013*

Convencionalmente, la intensidad dispersada se suele analizar utilizando dos aproximaciones. Por un lado, se ha propuesto una ecuación exponencial y, por otro lado, una fórmula polinomial. La primera se conoce como ley de Guinier que coincide bien con los datos experimentales en los ángulos muy pequeños, por lo que será muy útil si las heterogeneidades dispersoras son relativamente grandes, mientras que la

ley de Porod es la más adecuada para ajustar la parte más alejada de la intensidad (Botch & Corona, 2017).

La región de Guinier: en esta región, el radio de giro experimental (R_g) provee una medida del tamaño total de la macromolécula. El R_g es la raíz cuadrada de la distancia promedio al centro de densidad en la molécula, ponderada por la densidad de la longitud de la dispersión (Kikhney & Svergun, 2015).

El R_g puede ser estimado usando la ley de Guinier, expresada como:

$$I(q) = \exp(-R_g^2 q^2) \quad [\text{Ec. 8}]$$

Donde q es el vector de difracción, R_g es el radio de giro y se determina fácilmente a partir de la pendiente de la curva de $\ln I(q)$ en función de q^2 (fig. 13):

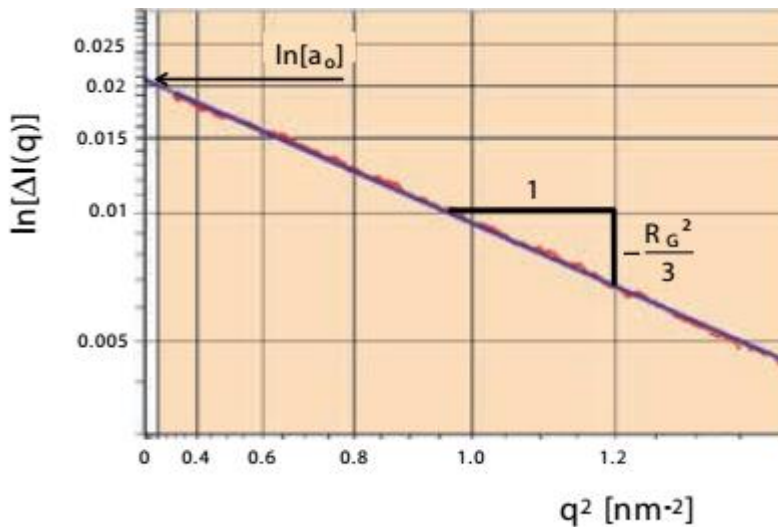


Figura 13.- Gráfica de Guinier para determinar el R_g de la partícula. Figura tomada de Heimo & Singh, 2013

Este valor resulta especialmente útil para determinar el tamaño promedio de una partícula, pero sin hacer hipótesis de la forma. Si las partículas fueran esféricas y de radio a , entonces se puede estimar su radio mediante la siguiente fórmula (Botch & Corona, 2017):

$$R_g = a \left(\frac{3}{5}\right)^{\frac{1}{2}} \quad [\text{Ec. 9}]$$

La región de Porod: provee información sobre la superficie de las partículas, como es la relación de la superficie con su volumen (Baldon *et al.*, 2015).

Si la colimación usada es puntual, la ley de Porod se expresa como (Botch & Corona, 2017):

$$I(q) = Aq^4 \quad [\text{Ec. 10}]$$

Cuando la colimación es lineal se utiliza la siguiente expresión:

$$I(q) = \frac{A}{q^3} + B \quad [\text{Ec. 11}]$$

En cada uno de los casos representando $I(q)$ contra q^4 o q^3 , respectivamente, se obtiene A , que es la ordenada al origen y resulta de ser:

$$A = S(\rho - \rho_0)^2 / 8\pi^3 \quad [\text{Ec. 12}]$$

Donde ρ y ρ_0 son las densidades: una corresponde a las partículas y la otra al medio en el que se encuentran. La constante A es proporcional a S , que es el área específica, entendida como el área de las partículas dispersoras por gramo de muestra. Porod demostró que esta fórmula es válida sin importar la forma de las partículas dispersoras, siempre y cuando no tengan un diámetro nulo en ninguna dirección, es decir que no sean discos o bastoncillos; además las partículas no deben de estar ordenadas. Esta aproximación no hace ninguna hipótesis de forma.

La ley de Porod, como se ha expresado anteriormente, se cumple cuando la frontera entre el medio y la partícula dispersora es nítida, si no se presentan fluctuaciones en la densidad electrónica localmente, se dice que hay desviaciones de la ley de Porod, por lo que la ley se vuelve:

$$I(q) = A/q^D \quad [\text{Ec. 13}]$$

Esta ecuación es válida para $1/q$ con valores en el intervalo del R_g . Por lo tanto, de la pendiente de la gráfica $\text{Log } I(q)$ en función de q , se obtiene la dimensión fractal (D) de las partículas dispersoras.

La gráfica de Kratky es otra herramienta útil para medir el orden que hay en las partículas, en ella se representa $q^2 I(q)$ en función de q . Si la curva obtenida es una parábola, las heterogeneidades son esféricas, si se obtiene una recta, la forma es fibrilar o cilíndrica; si es media parábola se trata de láminas (fig. 14).

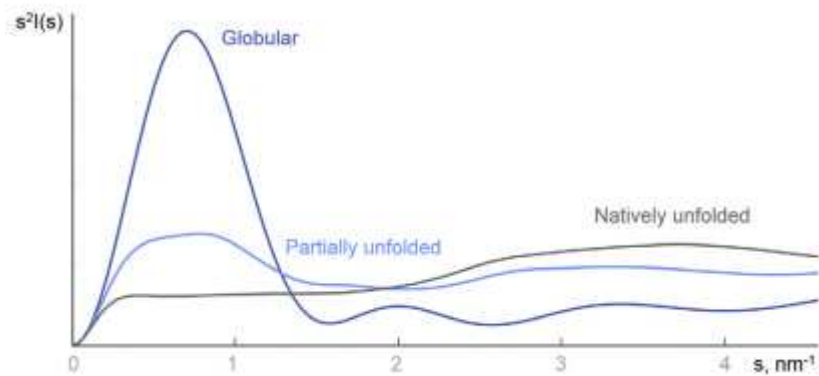


Figura 14.- Gráfica de Kratky, en este caso aplicado para determinar el orden de una proteína, la forma globular tiene un mayor orden ya que presenta una parábola. Tomada de *Heimo & Singh, 2013*

Forma de la partícula mediante SAXS: La información acerca de la forma está situada en la parte media de la sección del factor de forma (Heimo & Singh, 2013).

Una clasificación de la forma, tales como, glóbulos, cilindros y láminas (con radios axiales mayores de 5) pueden llevarse a cabo rápidamente si se investiga la ley de los exponentes del factor de forma a ángulos bajos.

En una gráfica de doble logaritmo, una pendiente inicial de 0,-1 y -2 indica forma globular, cilíndrica y laminar, respectivamente. Si la pendiente es más pequeña, por ejemplo -3 o -4, entonces las partículas son más grandes que el límite de resolución y la región de Porod es la única parte del factor de forma que puede ser observado (fig. 15).

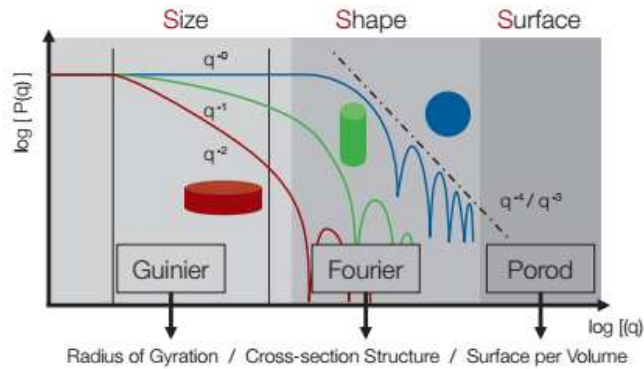


Figura 15.- Cada una de las regiones con la respectiva característica que se puede determinar, así como el alcance de la ley de las potencias para dilucidar la forma de las partículas. Figura tomada de *Heimo & Singh, 2013*.

A pesar de que $I(q)$ contra q está relacionado con la forma de la partícula, el perfil no es intuitivamente informativo, como se mencionó anteriormente. Por lo que, para la interpretación del perfil de difracción en términos de estructura, es necesario aplicar la transformada de Fourier sobre el perfil de difracción de las partículas para obtener la función de distribución de pares-distancia $p(r)$ (Jacques & Trehwella, 2010). Éste es un histograma de las distancias entre todos los posibles pares de átomos dentro de una partícula. La función de distribución es considerada lisa y no negativa, aproximándose a cero en la máxima dimensión de partícula. El patrón de difracción de una partícula $I(q)$ es una transformada de Fourier de la función $p(r)$ y viceversa (Rober, 2018). De tal manera que la forma de las partículas puede ser rápidamente clasificada dentro de las simetrías esféricas, alargadas o cilíndricas y laminar. Las partículas globulares pueden ser identificadas por una forma de campana, casi un pico simétrico. Las partículas cilíndricas son identificadas por un pequeño sobreexceso que representa el diámetro del cilindro y una cola lineal que representa el largo del cilindro. En el caso de las partículas laminares, se asemejan a las globulares, difiriendo en la caída prolongada a cero (fig. 16), debido a su gran diámetro.

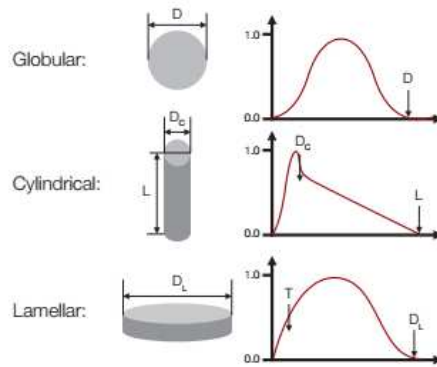


Figura 16.- Claves dentro de las gráficas de distribución de pares-distancia, que son indicativas de la forma de la partícula. Figura tomada de *Heimo & Singh, 2013*.

6.4 Reología

La Reología, es la ciencia que describe el flujo y la deformación de los materiales, cuando se les aplica una fuerza.

La importancia de la Reología radica en su uso dentro de muchas etapas de los procesos industriales; está directamente relacionada con la elaboración de productos como pinturas, cosméticos, alimentos y productos farmacéuticos. En el caso de la industria farmacéutica el entendimiento de la reología es de vital importancia, en procesos que van desde el llenado de tubos, la aplicación sobre la piel de cremas, pomadas, polvos entre otras. Así mismo, es importante para el aseguramiento de la calidad de los productos antes mencionados, ya que las propiedades de flujo están relacionadas con su estabilidad fisicoquímica, y por lo tanto con su vida útil (Lachman & Liebermann, 2013; Martin *et al.*, 2011).

Para comprender el fenómeno reológico, es importante comprender el fenómeno de la aplicación de una fuerza tangencial a un elemento de volumen y como consecuencia, la deformación del elemento de volumen. El modelo de las dos placas (fig. 15) es el más utilizado, en éste, la placa superior con un área A es puesta en movimiento por la fuerza F y es medida la velocidad v resultante. La placa más baja se mantiene estacionada ($v=0$). Entre las placas hay una distancia h , por lo que se establece un gradiente de velocidad entre los planos superior e inferior. El gradiente de velocidad también es llamado velocidad de corte γ [Ec. 14] y la fuerza aplicada a

un área A denominada esfuerzo de corte σ [Ec. 15]. Una vez que la fuerza se deja de aplicar, pueden darse varias situaciones: que el material retorne a su forma original (componente sólida), que permanezcan en su nueva posición (la energía aplicada se sigue disipando) o que se recobren parcialmente (plásticos). Se podría pensar que todos los materiales se ajustan a estas características, pero la realidad indica que pueden comportarse de una u otra manera dependiendo de la escala de tiempo empleada en la aplicación de la fuerza y en la medida de la deformación (Vila Jato & Lastres García, 1997).

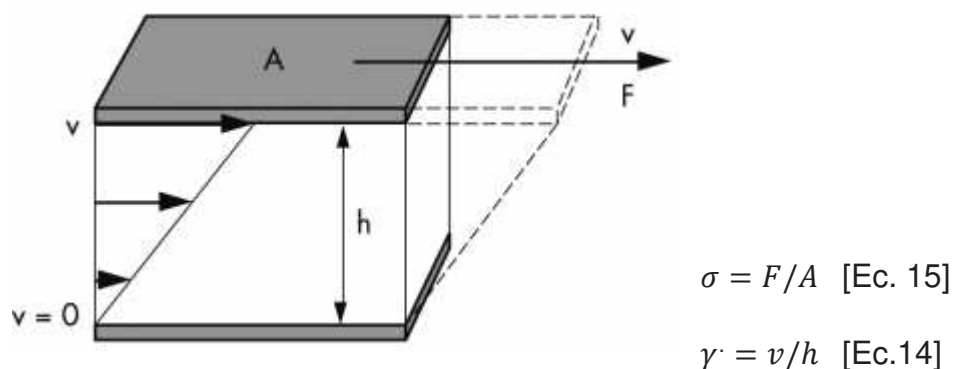


Figura 17.- Flujo laminar de un líquido contenido entre dos placas paralelas

Por lo anterior, cualquier sistema se comportará como un sólido (elástico) si el tiempo de medida es lo suficientemente pequeño, mientras que a tiempos suficientemente largos se comportará como un líquido y fluirá. También existen los comportamientos intermedios en los cuales los materiales poseen propiedades elásticas y viscosas a la vez, los llamados viscoelásticos (Vila Jato & Lastres García, 1997). Considerando algún material al que se le aplica un esfuerzo (deformación), nosotros podremos almacenar energía en él, porque su estructura fue perturbada y las moléculas están en un estado de energía más alto. Tan pronto dejemos de aplicar el esfuerzo para mantenerlo en esta nueva forma, las moléculas difundirán energía al medio hasta alcanzar un nivel de energía más bajo equivalente a la inicial, ahora con el mismo material, pero sin la forma original que este tenía. Nosotros podemos definir el tiempo (t) característico para este proceso, en el que ocurra un tiempo de relajación (λ), el

cociente de estos términos nos da el denominado número de Deborah (D_e) [Ec. 16] (Goodwin & Hughes, 2008):

$$D_e = \lambda / t \quad [\text{Ec. 16}]$$

El número de Deborah es muy útil para clasificar a los materiales de acuerdo con tres categorías, sólido ($D_e \gg 1$), viscoelástico ($D_e \approx 1$) y líquidos ($D_e \ll 1$).

Existe por lo tanto una clasificación de los materiales de acuerdo con el comportamiento fluido que exhiben:

1.- Fluidos newtonianos: se denomina así a los fluidos en los que la velocidad de corte ($\dot{\gamma}$) es directamente proporcional al esfuerzo de corte (fig. 18), la constante de proporcionalidad es el coeficiente de viscosidad (η). El agua, aceites minerales, etcétera se encuentran dentro de esta clasificación (Aulton, 2004; Schramm, 2004; Thomas, 2014; Vila Jato & Lastres García, 1997).

2.- Fluidos no newtonianos: son los fluidos que se desvían de la idealidad de la ley de Newton, por lo que la velocidad de corte no incrementa proporcionalmente con el esfuerzo de corte (fig. 18).

a) Pseudoplásticos: dentro de estos se encuentran aquellos líquidos en donde la velocidad de corte disminuye cuando el esfuerzo de corte se incrementa. Muchos son sistemas dispersos heterogéneos, como las emulsiones y suspensiones.

b) Plásticos: este tipo de materiales se comporta como un sólido (elástico), es decir, no fluyen a esfuerzos de corte menores de cierto valor denominado "punto de cedencia". Entre estos se encuentran algunos productos como las pastas de dientes.

c) Dilatantes: en estos casos se da un aumento de la resistencia al flujo cuando aumenta la velocidad de corte. Este comportamiento no es tan común como el comportamiento pseudoplástico, pero puede tener graves consecuencias en tecnología farmacéutica, ya que estos pueden causar daños en los diversos equipos utilizados, como son mezcladoras y bombas (Aulton, 2004; Schramm, 2004; Thomas, 2014; Vila Jato & Lastres García, 1997).

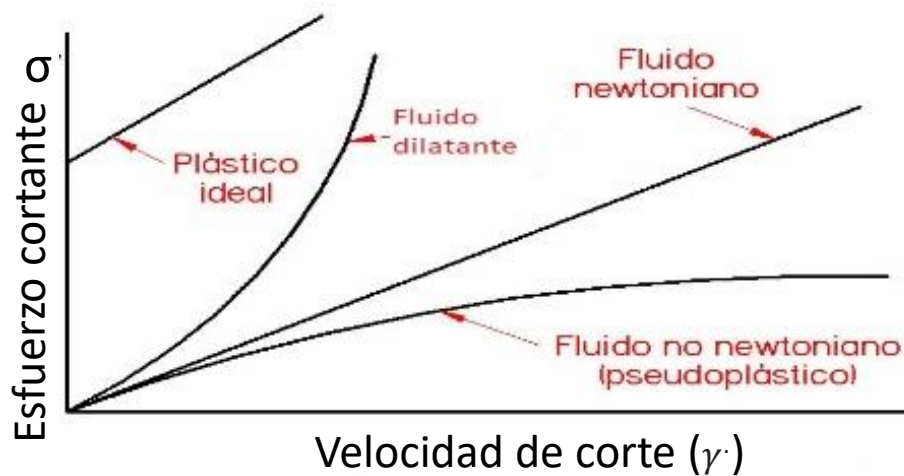


Figura 16.- Reograma que representan cada uno de los comportamientos de los materiales.
Tomada de Vila Jato & Lastres García, 1997.

Dentro del grupo de los materiales no newtonianos se encuentran muchas veces aquellos que presentan un comportamiento tiempo dependiente, es decir aquellos materiales que presentan una variación mayor o menor en su estructura, no sólo cuando se les aplique una velocidad de corte, sino el tiempo que dure la aplicación de la velocidad de corte (Aulton, 2004; Schramm, 2004; Thomas, 2014; Vila Jato & Lastres García, 1997).

Cuando un sistema en equilibrio se somete a un cambio repentino de las condiciones externas, tarda cierto tiempo en adaptarse a ellas. Este tiempo necesario para la adaptación es lo que se llama “tiempo de relajación”. Por lo general, se entiende que hay comportamiento tiempo-independiente, si el tiempo de relajación es pequeño, se han reportado de 10^{-3} s. En otros casos puede ocurrir que la magnitud del tiempo de relajación del sistema sea del mismo orden que del tiempo de medida, como ocurre muchas veces con los sistemas coloidales y dispersos (Vila Jato & Lastres García, 1997).

Hay dos razones por la cuales un sistema puede exhibir este comportamiento tiempo-dependiente, la primera tiene que ver con una orientación de las partículas que conforman cierto tipo de sistema, las cuales al estar en reposo tienen una orientación en la que necesitan un mayor esfuerzo de corte al inicio para alcanzar una velocidad

de flujo, pero con el tiempo las partículas se orientan de manera que sea menor el esfuerzo de corte para alcanzar la velocidad. La segunda razón es la estructura del sistema, algunos sistemas particulados también pueden formar estructuras tipo gel, en los que hay redes de partículas, cuando a la red se le aplica un esfuerzo de corte, la red se destruye, por lo que se requiere un menor esfuerzo de corte para alcanzar una velocidad. Por lo general, en cualquiera de los dos casos anteriores, el sistema puede recuperar su estructura, aunque puede tardar cierto tiempo en hacerlo, a este fenómeno se le conoce generalmente con el nombre de tixotropía. Para detectar si existe tixotropía, se determina la velocidad de corte en ciclos en los que se aumenta o disminuye el esfuerzo de corte, si las curvas de obtenidas en cada dirección son diferentes, se obtiene un ciclo de histéresis, el área contenida entre las curvas se denomina área de histéresis y da una idea de que tan rápido se reestructura el sistema. Cuando el reograma descendente se sitúa debajo del ascendente, ello indica que la estructura se recupera lentamente, el fenómeno tiene el nombre de tixotropía positiva. Existe también el fenómeno de la tixotropía negativa, para materiales dilatantes, en los cuales la curva descendente se sitúa por encima de la curva ascendente (fig. 19).

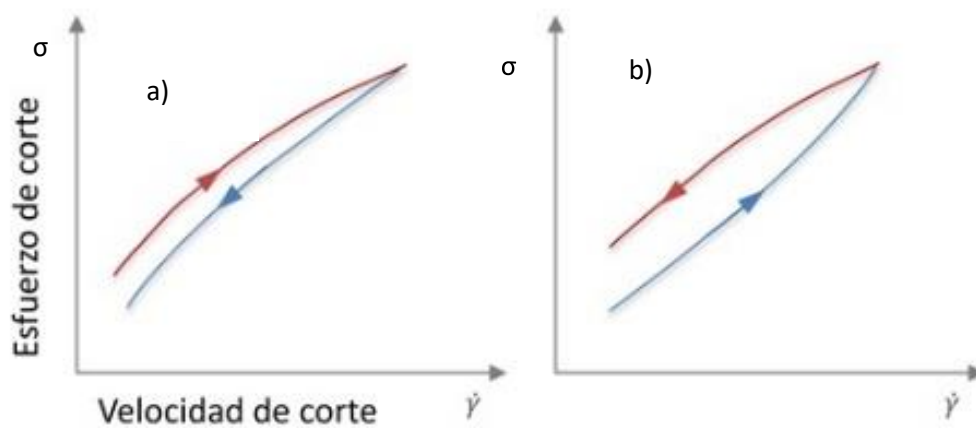


Figura 19.- a) Tixotropía positiva b) Tixotropía negativa.

Para estudiar los materiales viscoelásticos se hace uso de los reómetros, estos tienen la capacidad de medir la deformación en forma tiempo-dependiente; permitiendo proveer diferentes aproximaciones en comparación con las pruebas de arrastre y recuperación que se hacen con los viscosímetros (Schramm, 2004).

En los reómetros se expone la muestra a una oscilación sinusoidal constante y se mide la tensión transmitida. También en este caso, si no se supera el límite viscoelástico lineal, la tensión fluctuará de forma sinusoidal. Sin embargo, dada la naturaleza del material, se perderá energía, de modo que la onda de tensión tendrá menos amplitud que la onda de deformación y habrá una diferencia de fase entre estas (fig. 20). Si se puede medir el cociente entre las amplitudes y el retraso entre las fases, la elasticidad o módulo de almacenamiento (G') se puede calcular, al igual que el módulo de pérdida (G''), que es la parte líquida o que se deforma de un material (Aulton, 2004).

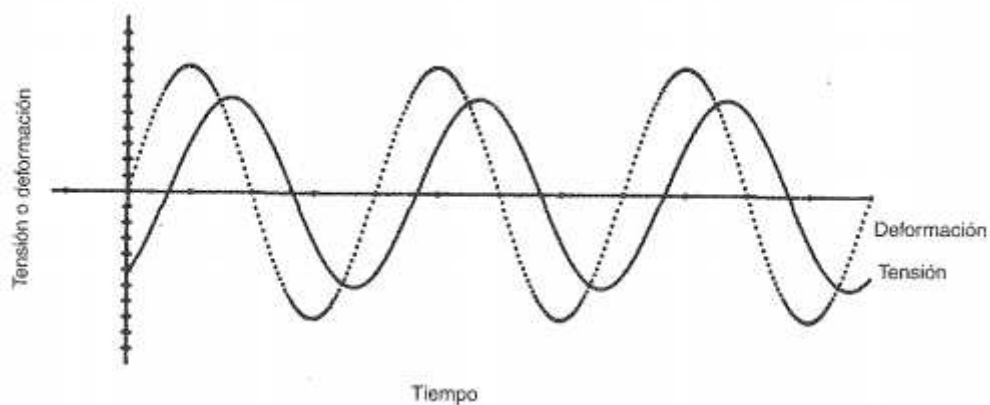


Figura 20.-Ondas sinusoidales que muestran un retraso entre la onda de tensión y la de deformación durante una prueba de viscosidad dinámica. Modificado de Aulton, 2004

El factor de pérdida [Ec. 17], es un valor muy útil que nos dice cuál es el comportamiento que predomina en el material, si el valor es menor a 1, el comportamiento elástico predomina, igual a cero son materiales tipo sol/gel y materiales con un valor mayor a 1, el material es predominantemente viscoso.

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad [\text{Ec. 17}]$$

Donde, $\tan \delta$ es el factor de pérdida

En los experimentos oscilatorios generalmente se evalúan los parámetros G' , G'' y η en función de la amplitud de deformación (a una frecuencia fija). Hay dos pruebas en los reómetros oscilantes que llevan un orden, con la intención de determinar ciertos parámetros importantes sobre los materiales analizar, estas pruebas son el barrido de amplitud y el barrido de frecuencia (Aulton, 2004).

Barrido de amplitud: en esta primera prueba se comienza a incrementar la amplitud de deformación (a frecuencia fija) con el tiempo. Mediante esta prueba se busca saber cuál componente predomina si G' o G'' . El siguiente objetivo de esta prueba es determinar el Intervalo Viscoelástico Lineal (IVL), a bajas amplitudes ninguno de los módulos predomina y hay una linealidad en los valores (fig. 21). Esto es importante ya que nos habla de un momento del material en el que la estructura interna no tiene cambios significativos y que sólo cambiará en el momento en que la frecuencia aumente, por lo que éste es el intervalo de trabajo para la siguiente prueba (Thomas, 2014).

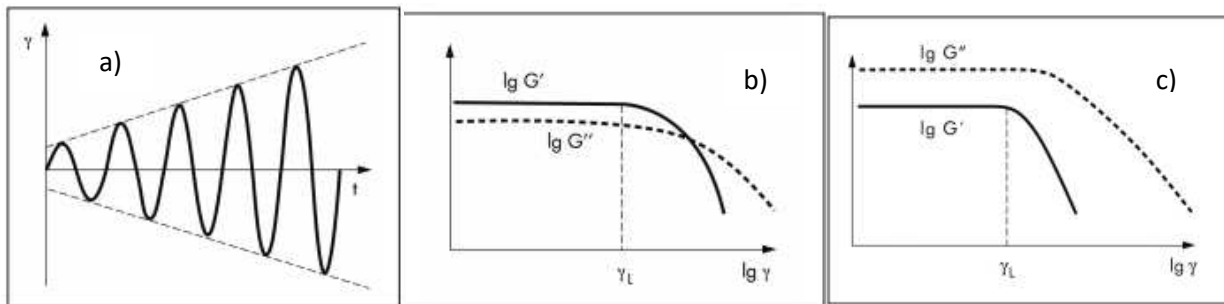


Figura 21.-a) Barrido de amplitud b) Barrido de amplitud de una muestra que tiene características de gel c) Barrido de amplitud de un fluido newtoniano. Tomado de Thomas, 2014

Barrido de frecuencia: la prueba se lleva a cabo a frecuencias variables, manteniendo la amplitud a valor constante. Esta prueba es usada para investigar el comportamiento de la deformación en forma tiempo-dependiente considerando que la frecuencia es el valor inverso del tiempo. El comportamiento a término corto es simulado por el movimiento rápido, por ejemplo, a frecuencias altas, mientras que a término largo es simulado por el movimiento lento, por ejemplo, a frecuencias bajas. En el barrido de frecuencia se representa los módulos G' , G'' y $\tan \delta$ en función de la frecuencia (fig. 20) que va en aumento (Thomas, 2014).

El uso de los reómetros oscilatorios puede demostrar dos tipos de comportamientos en los materiales, los denominados líquidos viscoelásticos y los sólidos viscoelásticos. Aquellos tipos de materiales que se mantienen parcialmente deformadas cuando se les aplica un esfuerzo de corte, se denominan líquidos viscoelásticos. La extensión de la reformación representa la porción elástica, y la extensión de lo que quedó permanentemente deformado, es la porción viscosa. Hay una deformación permanentemente irreversible desde que el material ocurre un cambio de forma al final del proceso porque su reformación no es completa, inclusive después de un periodo largo. Estos materiales se comportan esencialmente como líquidos (Thomas, 2014).

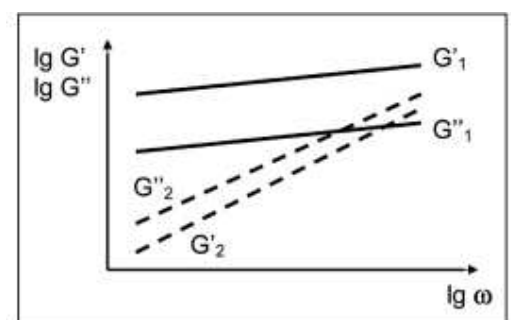
Los sólidos viscoelásticos muestran una recuperación completa, pero lenta, después de que se han sido deformados. Hay un proceso reversible de deformación tomando lugar ya que al final de la prueba no hay un cambio de forma. Este tipo de materiales se comportan esencialmente como sólidos.

6.4.1 Comportamiento viscoelástico de sistemas dispersos y geles

En las dispersiones (incluidas cremas y suspensiones) y geles estables, las fuerzas de interacción intermoleculares están constituyendo una red tridimensional de fuerzas. Este tipo de materiales muestran $G' > G''$ en todo el intervalo de frecuencias. Por lo tanto, el comportamiento elástico domina al viscoso. A menudo las curvas de G' y G'' son líneas rectas paralelas (fig. 22) con una ligera pendiente solamente (idealmente ser paralela al eje de la frecuencia, $\lg \omega$).

Cuando se realizan pruebas reológicas, las fuerzas estructurales de la red pueden ser analizadas. Mientras que el IVL no se exceda, la red estructural exhibirá una relativa fuerza estructural constante.

Figura 22.- Reograma de un barrido de frecuencia de dos dispersiones ($\tan \delta$ no representada). La dispersión 1 muestra que $G' > G''$ (son paralelas) y por lo tanto estructura es una estructura es un semisólido y tiene estabilidad física a todas las frecuencias. La dispersión 2 (línea punteada) muestra que $G'' > G'$ y por lo tanto se comporta más como líquido que tiende a la separación. Figura de Thomas, 2014



7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los principales problemas que enfrenta el formulador cuando elabora una emulsión, es la inestabilidad a la que está sujeta este sistema, ya que termodinámicamente la formación de una emulsión está desfavorecida. Por lo que invariablemente la emulsión se separará con el tiempo.

La opción que se tiene entonces es conferirle a la emulsión nuevas propiedades fisicoquímicas, que le den una estabilidad cinética, es decir que prolonguen el periodo de vida útil de la emulsión.

Una de las formas de prolongar el periodo de vida de anaquel de una emulsión es mediante la “estabilización estérica”, la cual impide el acercamiento entre las gotas de la fase dispersa. La estabilización por cristales líquidos liotrópicos, se basa en el mismo principio, aunque ha sido de las menos exploradas. La estabilización de emulsiones, con base en cristales líquidos liotrópicos añadidos a la formulación, tiene la posibilidad de extender el periodo de vida útil de la emulsión, además de modificar la liberación de fármacos a partir de las emulsiones. Es importante mencionar que ya se tiene un antecedente en el desarrollo de una formulación de crema que contiene cristales líquidos liotrópicos cargados con ketoconazol (*Romero-Ochoa, 2015*), ésta ha sido caracterizada en aspectos como tamaño de gota, pH, extensibilidad, signo de la emulsión; pero esta formulación no ha sido caracterizada en aspectos como estabilidad cinética, características de flujo y el perfil de liberación del principio activo en un periodo más extenso; por lo que es importante completar la caracterización, para contar con mayores elementos que puedan conducir a comprender y predecir fenómenos de inestabilidad presentes en este tipo de preparados; siendo esto último el propósito de la presente investigación.

8. HIPÓTESIS

La formulación de una crema tópica que contenga cristales líquidos cargados con ketoconazol tendrá una mayor estabilidad cinética y presentará una liberación modificada del principio activo en comparación con la misma formulación de crema, pero sin la inclusión de los cristales líquidos.

9. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la estabilidad cinética y perfil de liberación del activo a partir de una emulsión tipo crema que contenga cristales líquidos liotrópicos cargados con ketoconazol, para conocer si es diferente a una emulsión tipo crema convencional.

9.1 Objetivos particulares

- Elaborar lotes de cristales líquidos liotrópicos cargados con ketoconazol a partir de una formulación y procedimiento establecido en el Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada de la UAM-X.
- Caracterizar el sistema líquido cristalino obtenido, determinando propiedades como tamaño de partícula y tipo de fase líquido-cristalina.
- Evaluar la estabilidad del sistema líquido cristalino.
- Elaborar lotes de una crema tópica que contenga cristales líquidos, a partir de la fórmula y procedimiento establecido en el Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada.
- Caracterizar los cristales líquidos contenidos en la crema tópica.
- Evaluar la estabilidad mecánica al flujo de la crema tópica con cristales líquidos.
- Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación del ketoconazol contenido en la crema con el sistema líquido cristalino.
- Determinar el perfil de liberación del ketoconazol en el sistema líquido cristalino y el contenido en la crema con los cristales líquidos.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Obtención de los Cristales Líquidos Liotrópicos (CLL)

Las dispersiones de Cristales Líquidos Liotrópicos consistieron en lotes placebo (CLLP) y dispersiones con ketoconazol (CLLK) al 0.3% m/m.

Para la obtención de las dispersiones de cristales líquidos liotrópicos se empleó la fórmula y el método desarrollado en el Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada de la UAM-X bajo la solicitud de patente en trámite “Composición tópica con base en cristales líquidos liotrópicos. IMPI. No. Expediente: MX/a/2015/009845; Folio: MX/E/2015/054803. De fecha 30 de julio, 2015. Autores: Quirino-Barreda, C.T., Noguez-Méndez, N.A., Rivera-Becerril, E., Gazga-Urioste, C., Pérez-Hernández, G., Maldonado-Campos, J.F.J., Palma-Ramos, A., Castrillón-Rivera, L.E., Juárez-Sandoval, J.J., Santiago-Téllez, A., Faustino-Vega, A., Gutiérrez-Zamora, A.C., Macín-Cabrera, S.A., Rubio-Martínez, A., Ramírez-Palma, J.A. y Campos-Terán, J.”

10.2 Caracterización de los Cristales Líquidos Liotrópicos

10.2.1 Tamaño de partícula

El tamaño de los CLL se determinó mediante un analizador de tamaño de partícula de difracción láser marca HORIBA, modelo LA-950. Para esto se depositan aproximadamente 20 mL del sistema disperso de cristales líquidos liotrópicos en la celda de fracción del analizador; se utilizó agua destilada como blanco para la lectura y un índice de refracción de 1.6.

10.2.2 Caracterización de los CLL mediante difracción de los rayos X de ángulo amplio

La integración de los componentes para la formación de los CLLP y CLLK se determinó mediante difracción de rayos X, el equipo utilizado fue Bruker Mod. D8, la radiación usada fue de Cu- K_{α} .

La muestra fue colocada sobre una placa de Rodio-Platino. Las condiciones del experimento fueron 25 kV de potencia, 35 mA de energía y temperatura ambiente. El análisis de la muestra fue de los 0° a $70^{\circ} 2\theta$.

10.2.3 Caracterización de los CLL mediante difracción de los rayos X de ángulo bajo

Mediante esta técnica se determinaron la forma, dimensión fractal y distribución de partículas en los CLLP y CLLK.

El equipo utilizado Generador SIEMENS 5000, equipado con cámara de Kratky, filtros de aluminio, el capilar donde colocó la muestra fue de cuarzo. La fuente de radiación fue de Cu- K_{α} y las condiciones de operación fueron 30 kV de potencia, 25 mA de energía, y temperatura ambiente.

10.3 Validación del método analítico para la cuantificación del ketoconazol

Para la cuantificación del ketoconazol en las pruebas de liberación en membranas de diálisis, permeación en las celdas de Franz y valoración durante las pruebas de estabilidad, se hizo uso de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). El medio de disolución o medio receptor en las diferentes pruebas fue buffer de acetatos pH 5/metanol 1:1 v/v.

Equipo y condiciones utilizadas en CLAR para la validación del método.

El cromatógrafo utilizado es de la marca Agilent®, modelo 1260 Infinity Quaternry LC, el detector UV-Vis con arreglo de diodos operó a una $\lambda = 220$ nm. El equipo incluye una bomba cuaternaria, automuestreador, y compartimento termoregulado para la columna. La columna utilizada fue una C18, 2.7 μm , 4.6 mm x 50 mm (Marca Agilent). La fase móvil consta de una mezcla de trietilamina:metanol 1:500 v/v y acetato de amonio:agua 1:200 m/v, en una proporción 70:30 a flujo isocrático. El flujo fue de 1 mL/min. El volumen de la inyección fue de 5 μL . La validación del método fue de acuerdo con Guía de Validación del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos A. C.

10.4 Generación de productos de la degradación del ketoconazol

Se prepararon diversas disoluciones que contuvieran a la crema con CLLK y al ketoconazol en estado puro. Los volúmenes de las disoluciones, así como las condiciones para la degradación de las muestras se observan en la Tabla 3. Posteriormente se evaluó mediante CLAR, picos extras al del ketoconazol.

Tabla 3.- Condiciones para generación de productos de degradación en KTZ puro y crema con CLLK

Condición de estrés	Muestra	Tratamiento de la muestra	Volumen	Solvente	Tiempo de estrés
Ácida	Crema CLLP (3 g) Crema CLLK (3 g) KTZ puro (300 mg)	Muestras expuestas directamente a la solución	100 mL	HCl 10%/metanol 1:1	4 días
Alcalina				NaOH 10%/metanol 1:1	3 días
Oxidantes				H ₂ O ₂ 3%/metanol 1:1	
Fotólisis	Crema CLLP (3 g) Crema CLLK (3 g) KTZ puro (300 mg)	EL ketoconazol puro se disolvió directamente, mientras que las cremas se disolvieron después de los tiempos de exposición a la luz	50 mL	Metanol	3 días de exposición a transiciones luz-oscuridad. Después, 2 periodos de luz UV a $\lambda=239$ nm
Esterilización	Crema CLLP (3 g) Crema CLLK (3 g) KTZ puro (300 mg)	Las muestras se colocaron en matraces, se expusieron a condiciones determinadas (121 °C y 15 lb de presión) y se procedió a disolverlas	50 mL	metanol	20 minutos

10.5 Obtención de las cremas que contienen Cristales Líquidos cargados con Ketoconazol (CLLK) o agua

La formulación implementada para la crema vaginal contiene los componentes y proporciones que se enlistan en la tabla 4; todo para 50 gramos de crema.

Tabla 4.- Componentes de la formulación para 50 gramos de crema

No. de componente	Cantidad (g)	Excipiente
1	10	Propilenglicol
2	4	Alcohol estearílico
3	1	Alcohol cetílico
4	1	Span 60®
5	0.75	Tween 60®
6	0.5	Miristato de isopropilo
7	0.1	Sulfito de sodio anhidro
8	32.6 (equivalente a 97.8 mg de ketoconazol)	Agua o fase líquida cristalina (CLLK)

Preparación de las cremas (crema/CLLK y crema/agua):

- 1.- Se incorporan los componentes 1 a 6 en un recipiente; se calientan a baño María a 70 °C y se asegura que todos los componentes se fundan por completo. Mantener a la temperatura de 70 °C.
- 2.- El componente 8 (95%) se calienta en otro recipiente al mismo tiempo a 70 °C. Una vez alcanzada la temperatura se agregan en el paso 1 y se realiza un mezclado-homogenización utilizando un Ultraturrax® a 3000 RPM durante 10 minutos y manteniendo la temperatura constante.
- 3.- Los componentes 7 y 8 (5%) se mezclan por separado y se agregan a la mezcla obtenida en el paso 2 después de 10 minutos de mezclado, la agitación debe mantenerse por 10 minutos más. Después de que pasan 20 minutos de mezclado total, se detiene el mezclado y se deja enfriar a temperatura ambiente.

Al final se puede obtener una crema que tiene como fase continua el sistema líquido-cristalino cargado con ketoconazol (crema/CLLK) o una crema que contiene como fase continua agua (crema/agua).

10.6 Protocolo de estabilidad acelerada e intermedia para los CLLK y la crema/CLLK

El protocolo de estabilidad se llevó a cabo siguiendo varios de los lineamientos de la NOM-073-SSA1-2015. Se tomaron las condiciones de estabilidad acelerada y estabilidad intermedia para empaques semipermeables, además de tres materiales de empaque: Vidrio (VD); Polietileno de baja densidad (PEBD) y polipropileno (PP). La Figura 23 muestra el esquema general de las condiciones que se utilizaron para las pruebas de estabilidad, así como los materiales de empaque probados. Los tiempos de prueba fueron 0, 3 y 5 meses. El protocolo de estabilidad se aplicó sobre:

- Los CLLK; un lote para cada una de las condiciones de estabilidad
- Crema con CLLK como fase dispersante; tres lotes en cada una de las condiciones de estabilidad
- Crema con agua como fase dispersante y ketoconazol agregado en la fase oleosa; un lote por cada una de las condiciones de estabilidad

Las pruebas que se realizaron sobre las muestras de CLLK fueron: inspección visual (color, olor), pH, tamaño de partícula y valoración del principio activo.

Las pruebas para las cremas fueron: inspección visual (color, olor), pH, tamaño de partícula, valoración del principio activo (solamente a tiempo 0 y 3 meses) y análisis reológico a tiempo 0 en un lote de crema/CLLK y un lote de crema/agua.

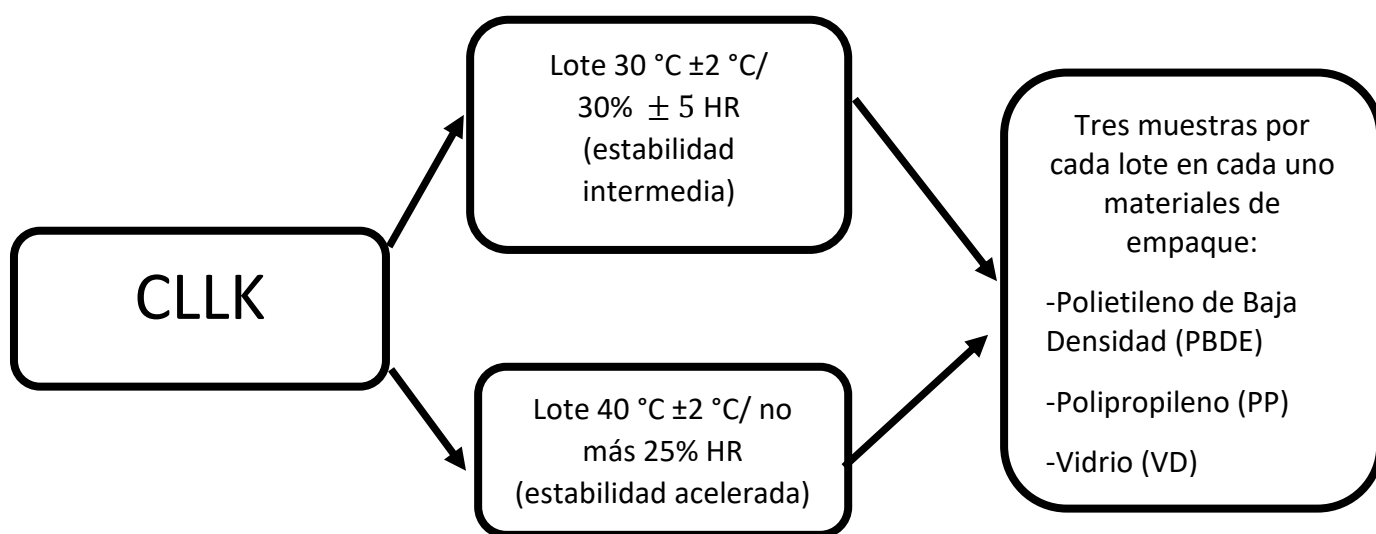


Figura 23.- Protocolo de estabilidad para los CLLK, la crema/CLLK y la crema/agua

10.6.1 Determinación del pH en los CLLK y en las formulaciones de crema

La determinación del pH en los CLLK se realizó con un potenciómetro CORNING® Mod. M540. La determinación se realizó directamente sobre los CLLK por triplicado, para cada una de las muestras en los tiempos antes mencionados.

Para la determinación del pH en la crema/CLLK se tomaron 5 g de cada una de las formulaciones de crema y se dispersaron en 45 mL de agua destilada, después se procedió a realizar la medición por triplicado.

10.6.2 Determinación del signo de la emulsión

Para esta prueba se coloca una gota de la crema en un portaobjetos y se adiciona una gota de azul de metileno al 0.1%. Se observa en un microscopio óptico con el objetivo de 40X. Si se observan las gotas teñidas de azul se considera como una emulsión W/O, por el contrario, si lo que se tiñe es la fase externa entonces lo que se tiene es una emulsión tipo O/W. Adicionalmente se tomó una pequeña cantidad de crema y se colocó en 50 mL de agua desionizada, con una agitación no vigorosa se intentó dispersar la crema. Las cremas con signo O/W se dispersan inmediatamente, mientras las de signo W/O no se dispersan.

10.6.3 Determinación del tamaño de partícula de la emulsión

El tamaño de partícula o gota se determinó mediante la metodología de difracción de luz láser mencionada anteriormente para los CLLK. La determinación se realizó en una dispersión de 20 mL de la crema con una concentración de 0.032 g/mL.

10.7 Estabilidad a la centrifugación de las cremas

Las cremas que contienen los CLLK fueron evaluadas por medio de centrifugación. Las muestras se sometieron a tres Campos Centrífgos Relativos (CCR) y fueron comparadas con las cremas en donde la fase continua fue agua (Crema/agua). Las muestras que fueron estables a las condiciones utilizadas se guardaron por 7 días más para verificar alguna separación de fases con el tiempo. Además, se llevó a cabo una prueba confirmatoria en la crema con CLLK en el CCR propuesto más elevado donde todavía no había separación de fases.

El equipo fue una centrífuga marca Beckman Coulter® modelo Avanti J30I. Las condiciones fueron 2158 G, 8631 G y 19400 G; el tiempo y temperatura de exposición al CCR fue de 2 h y 25 °C, respectivamente.

10.8 Análisis reológico de las cremas que contienen CLLK

Las propiedades viscoelásticas de las cremas fueron determinadas mediante un equipo de reología oscilante Marca Anton Paar® Mod. MCR102 (esfuerzos controlados), la geometría utilizada fue de platos paralelos (25 mm de diámetro). El reómetro estaba equipado con una unidad de control de temperatura Peltier®. La cantidad de muestra fue aproximadamente 1 g.

Primero se determinó el Intervalo Viscoelástico Lineal (IVL) mediante un barrido de amplitud que fue de 0.02% a 1%. Dentro del ILV se realizó un barrido de frecuencia de los 0.1 a 5 rad/s. De manera adicional, se realizó un barrido de temperatura de los 20 °C hasta 60 °C y en sentido inverso. Los datos obtenidos en cada prueba son G' , G'' , así como $\tan(\delta)$. Los datos se graficaron con el programa OriginPro® 8.6, y a partir de las curvas obtenidas se determinaron las pendientes de G' con el mismo programa.

10.9 Liberación del ketoconazol y permeación *in vitro* a partir de la crema

El análisis de liberación y permeación del ketoconazol a partir de la crema se llevó a cabo siguiendo algunas de las indicaciones de la guía (OECD, 2004) de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD, por sus siglas en inglés) y de una tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas (Gazga, 2015).

10.9.1 Cinética de liberación de ketoconazol desde la crema que contiene a los CLLK

El estudio de liberación del ketoconazol a partir de la crema que contiene los CLLK, se llevó a cabo en membranas de diálisis (Spectra/Por® Dialysis) con un tamaño de poro de 12-14 kDa. La formulación de crema que contiene los CLLK se comparó contra:

- Crema con agua como fase dispersante, con ketoconazol añadido en la fase oleosa durante su elaboración.
- Crema con CLLP como fase dispersante, con ketoconazol añadido en la fase oleosa durante su elaboración.

Las diferentes formulaciones se pesaron exactamente en la membrana de diálisis y sujetas a los vástagos para canastilla con un hilo. El medio receptor fueron 150 mL de amortiguador de acetatos pH 5/metanol 1:1 v/v a 32 ± 1 °C. El disolutor utilizado fue VanKel modelo VK7000, con una agitación de 50 RPM, con toma de muestra a las 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 h con reposición de medio. Todas las muestras se filtraron por membranas de 0.45 μm de nylon y colocadas en viales para su posterior valoración mediante CLAR

Los modelos a los que se ajustan las cinéticas de liberación del ketoconazol, se determinaron mediante el complemento DDSolver para Office. Mediante Statgraphics® Centurion XV.II se compararon los perfiles de liberación ajustados, para encontrar diferencias.

10.9.2 Permeación del ketoconazol a partir de la crema/CLLK

Se determinó la permeación del ketoconazol a partir de la crema/CLLK, para esto se usó el modelo de las celdas de difusión de Franz.

La membrana receptora fue piel de oreja de cerdo de aproximadamente 2 mm de ancho. La piel se obtuvo quirúrgicamente, el pelo de la oreja tiene que ser removido con cuidado, de la piel solamente se obtiene la epidermis y la dermis, además de quitar excesos de tejido subcutáneo; la piel congelada se dejaba atemperar y se hidrataba con el medio receptor por 10 minutos antes de ser utilizada. La membrana fue pesada junto con el aditamento que limita el volumen de la muestra, posteriormente se colocó la muestra de crema con una espátula y se procedió a pesar todo, por diferencia de pesos se determinó la cantidad de muestra colocada.

El equipo utilizado fue un Diffusion Cell 58-001-802 (Hanson Research Corporation, USA) y como medio receptor una solución amortiguadora de acetatos pH 5/metanol 1:1 v/v a 32 °C. La agitación fue de 400 RPM, con toma de muestra a las 0, 0.5, 1, 2,

3, 4, 5, 6, 8 h con reposición de medio. Una vez pasadas las horas, cada una de las membranas era cortada en pequeños trozos y se procedía a colocar los trozos en 25 mL de buffer acetatos/metanol, posteriormente se ponía en agitación por 24 h, al término del tiempo se filtraban las muestras por gravedad con papel Whatman #5, a partir del filtrado se tomó una muestra que se pasó por filtros de 0.45 μm para guardarlas en viales para su valoración por CLAR.

11. RESULTADOS

11.1 Obtención de los Cristales Líquidos Placebo (CLLP) y los cargados con Ketoconazol (CLLK)

Las formulaciones obtenidas de los cristales líquidos liotrópicos, tanto el placebo (CLLP), como las cargadas con ketoconazol (CLLK), en ambos casos las dispersiones obtenidas muestran un característico color blanco y opaco, además de una ligera tonalidad azul (fig. 24a) que pasa a un color ligeramente rojo cuando se observan a contraluz (fig. 24b). Ambas formulaciones no pueden ser diferenciadas a simple vista.

Además del color característico de las dispersiones, también presentan una fluidez alta.

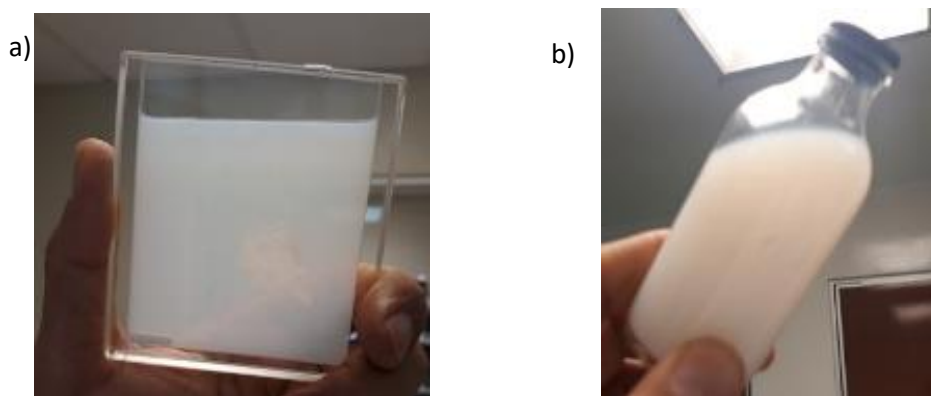


Figura 24.- a) CLL con una ligera tonalidad azul b) CLL con una ligera tonalidad rojiza al ser observados a contraluz

11.2 Tamaño de partícula de los CLLK

Mediante el analizador de tamaño de partícula se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla 5. Como se puede observar el tamaño promedio de 86.08 ± 6.55 nm.

Tabla 5.- Tamaño de partícula de Lotes de CLLK para lotes de 1 kg

<i>LOTES con ketoconazol</i>	Diámetro promedio (nm)	Desviación estándar (nm)	CV (%)
1	86.28	6.60	7.64
2	85.96	6.50	7.56
3	86.30	6.60	7.68
4	85.88	6.50	7.56
5	86.11	6.60	7.66
6	85.98	6.50	7.57
Promedio	86.08	6.55	7.61

11.3 Caracterización de los CLL mediante difracción de los rayos X de ángulo amplio

En la Figura 25 se muestran los patrones de difracción de una dispersión de CLLP y CLLK, en ambos casos las muestras se muestran amorfas con regiones microcristalinas.

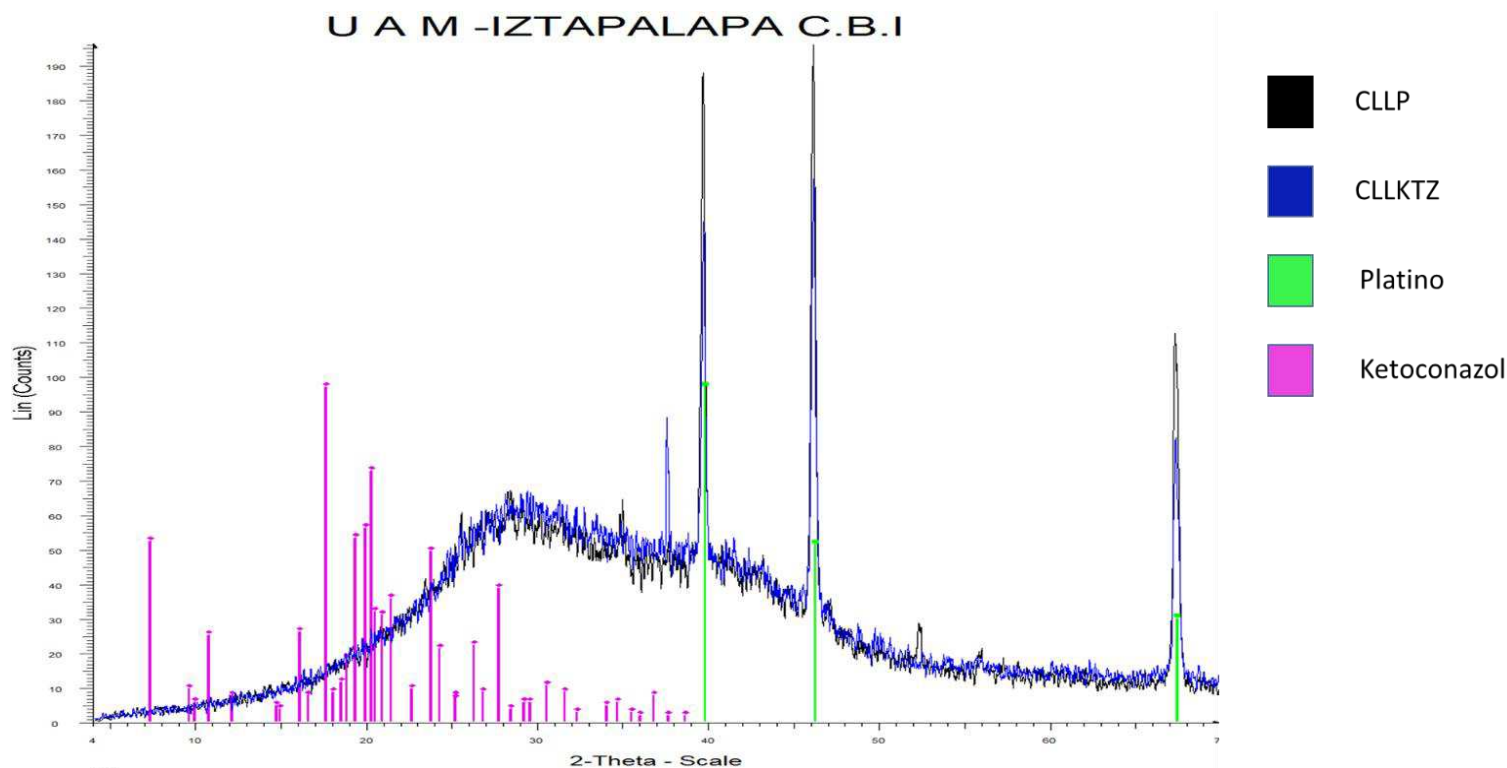


Figura 23.- Patrones de difracción característicos de los CLLP, CLLK, ketoconazol y la placa de platino

Los picos que aparecen entre 39-40°, 46° y 67-68° corresponden a la placa de platino. En la muestra de CLLP se muestra un pequeño pico característico a 52-53° y en la muestra de CLLK se muestra un pico muy definido a los 38°. En la figura también se muestra el patrón de difracción del ketoconazol, como se puede observar, no hay picos que coincidan con las reflexiones del ketoconazol.

11.4 Caracterización de los CLL mediante difracción de los rayos X de ángulo bajo (SAXS)

Uno de los principales propósitos en el uso de esta técnica fue caracterizar la forma de las partículas dispersadas, para ello se usó la gráfica de Kratky (fig. 24), como se observa, la muestra de CLLP comienza como una curva que rápidamente entra a una meseta; mientras que para la muestra CLLK se observa una media parábola.

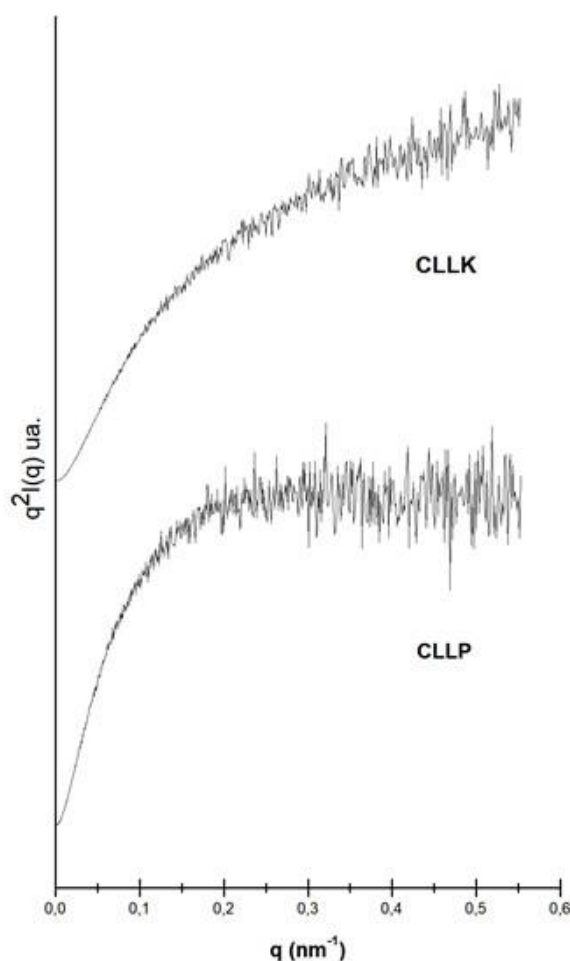


Figura 26.- Gráfica de Kratky para las muestras CLLP Y CLLK

En el caso de la dimensión fractal, se obtuvo un exponente de -2.09 y -1.63, para la muestra de CLLP y CLLK respectivamente (fig. 27).

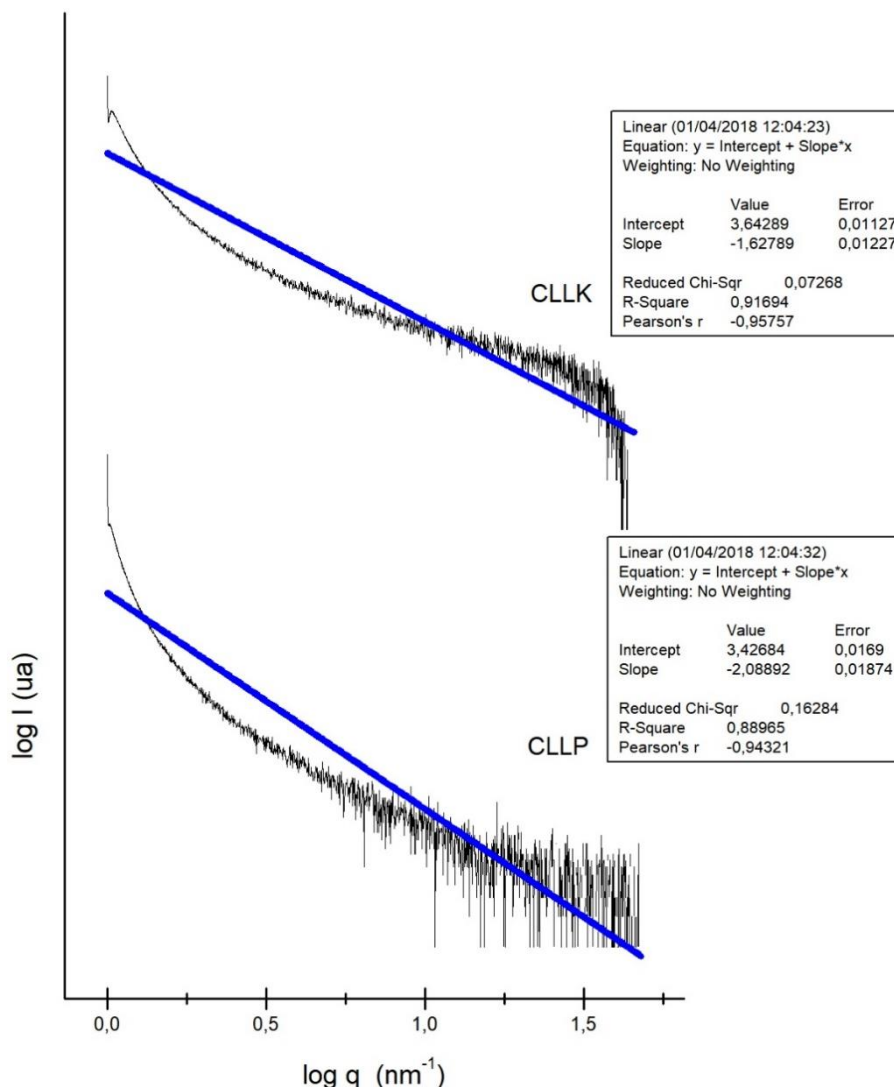


Figura 27.- Gráfica de Porod para la determinación de la dimensión fractal

La información obtenida mediante la gráfica de distribución de pares-distancia (fig. 28) para los CLLP muestra una distribución bimodal con radios de 10 nm y 22.5 nm para cada una de las modas, además de un radio máximo aproximadamente a los 30 nm; las formas de las curvas también son representativas de la forma de las partículas, para los CLLP, la forma de la curva presenta las características de

estructuras laminares, con un descenso hacia su radio máximo, para cada una de las modas.

Los CLLK presentan una distribución bimodal con radios de aproximadamente 2.5 nm y 32.5 nm, el radio máximo se encuentra a los 42.5 nm; para la primera moda encontrada, la forma de la curva se asemeja a lo descrito en las partículas cilíndricas debido a la cola lineal de la curva, mientras que, para la segunda moda, la forma de la curva nos muestra características de láminas debido a la última parte de la curva hacia su radio más grande.

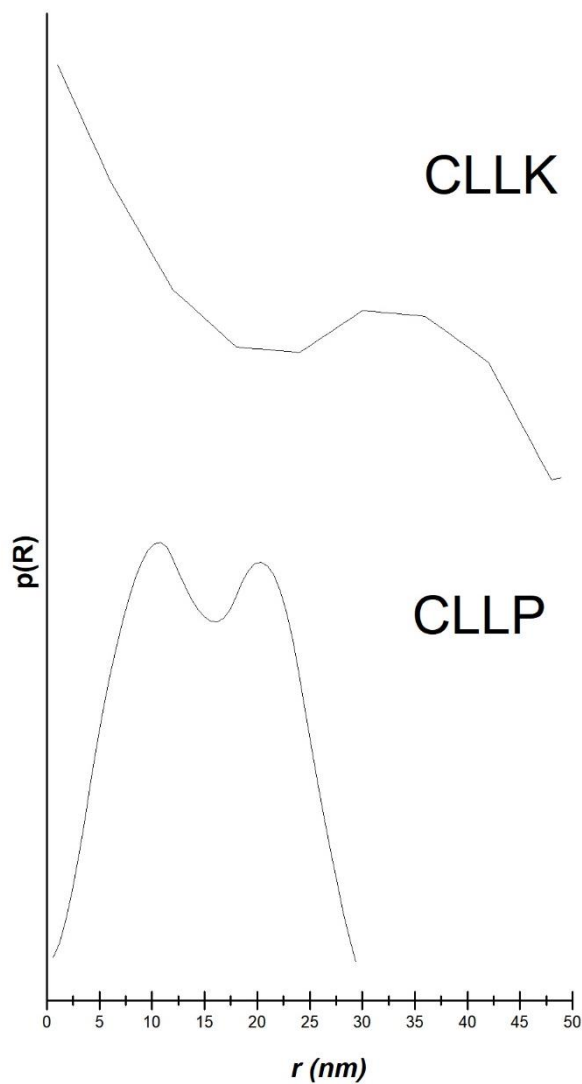


Figura 28.- Distribución de pares-distancia de las muestras

11.5 Validación del método analítico para la determinación del ketoconazol

Los parámetros para validar del método analítico se refieren a aquellos relacionados con valoración o potencia. El resumen de los criterios establecidos por la Guía de Validación y los resultados obtenidos para la valoración del ketoconazol se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6.- Criterios establecidos para valoración mediante CLAR y resultados obtenidos

Linealidad del sistema	
Criterios de aceptación	Resultados obtenidos
$r^2 \geq 0.98$	0.99993
IC(β_1) al 97.5%, no debe incluir el cero	22985.0429, 25058.6829
Precisión del sistema y adecuabilidad	
CV% 1.5	0.3139%
Linealidad del método, exactitud y repetibilidad	
IC(β_1) debe incluir la unidad	0.98024 a 1.087968
IC(β_0) debe incluir el cero	-239.4816 a 105.7222
CV _{y/x} no mayor del 2%	No es mayor de 2 para ninguno de los casos
$r^2 \geq 0.98$	0.9977
CV no mayor del 2%	1.0115335
IC(μ) 98-102%	99.4 a 102

Además, se incluyen la curva de calibración para la linealidad del sistema (Figura 29a), así como la curva de la cantidad adicionada contra la cantidad recuperada (Figura 29b), necesaria para la validación del parámetro linealidad del método.

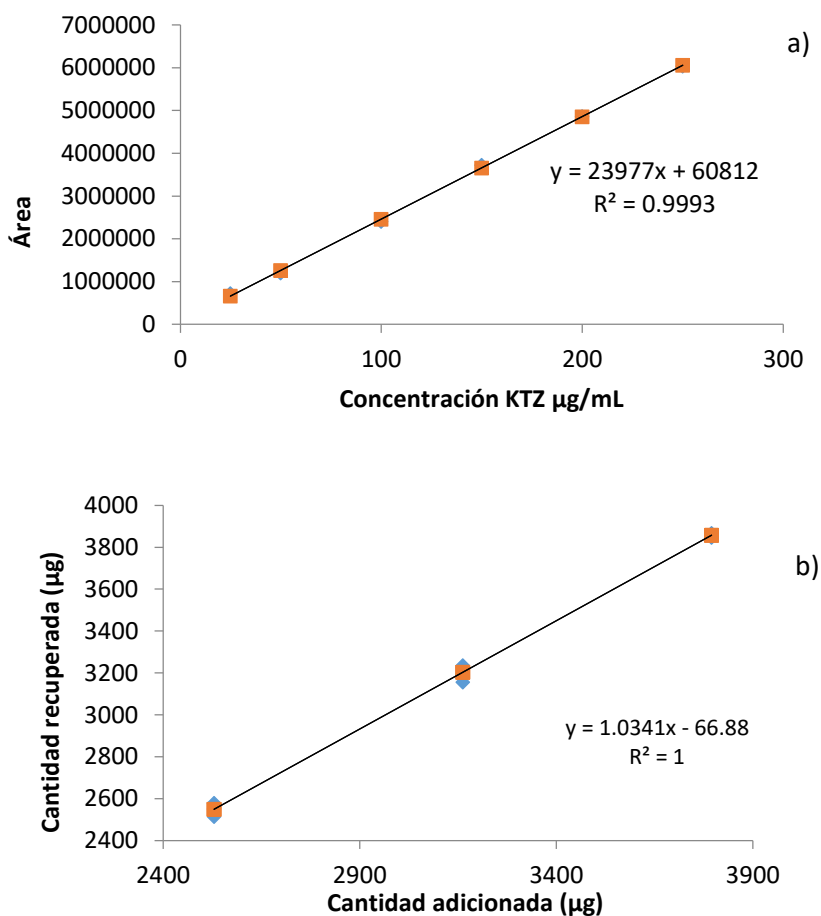


Figura 29.- a) Curva de calibración/linealidad del sistema b) Curva utilizada para linealidad del método

11.6 Generación de productos de degradación del ketoconazol

Entre las condiciones establecidas para la generación de los productos de degradación, las condiciones ácidas fueron las únicas que resultaron en picos extras en los cromatogramas.

11.7 Protocolo de estabilidad de los CLLK

11.7.1 Apariencia de los lotes de CLLK

Los lotes a tiempo cero de estabilidad muestran las mismas características de color y olor que las reportadas cuando se elaboraron (11.1 Obtención de los CLLP y CLLK).

Después de 3 meses, las muestras de CLLK, en sus respectivos materiales de empaque y en cada una de las condiciones de estabilidad, presentaron una coloración rosa, la coloración fue más intensa en las muestras en las condiciones de estabilidad acelerada (fig. 29). En relación con los materiales, se observó que en las muestras contenidas en VD, la coloración se observó menos intensa. En cuanto a una percepción en olor, no se percibió algún cambio en el aroma para ninguna de las muestras.



Figura 30.- Muestras de CLLK en PP en condiciones intermedias (Izquierda) y condiciones aceleradas de estabilidad, después de 3 meses

Después de 5 meses, las muestras presentaron la misma coloración rosa, aunque ahora se perciben todas las muestras con la misma intensidad de color en todos los materiales. En cuanto al olor no se percibió ningún cambio al cabo de los 5 meses de estabilidad.

11.7.2 Tamaño de partícula de los CLLK

En la Tabla 7 se muestran los tamaños de partícula para los CLLK, en cada uno de los materiales de empaque empleados, todo a tiempo cero. Como se puede observar, los tamaños de partícula son muy homogéneos y tienen coeficientes de variación muy pequeños.

Tabla 7.- Tamaño de partícula para las muestras de CLLK a tiempo cero de estabilidad

Muestra T0	MEDIANA (nm)	MEDIA	MODA	D.STA	CV (%)
PBDE 40 °C	83.68	84.72	83.6	6.2	7.32
PP 40 °C	83.12	84.03	83.1	5.9	7.06
VD 40 °C	83.71	84.67	83.7	6.2	7.32
PBDE 30 °C	84.27	85.4	84.1	6.9	8.08
PP 30 °C	83.67	84.67	83.6	7	8.22
VD 30 °C	82.08	82.51	82.1	7.1	8.58

Después de 3 y 5 meses, el tamaño de partícula ya no se puede determinar por difracción láser.

11.7.3 Valor de pH de los CLLK

Los resultados del pH se muestran en la Figura 31, se puede ver como los lotes a tiempo cero (T_0), en las dos condiciones de estabilidad, tienen un pH de ± 5.5 . A los 3 meses, el pH para las dos condiciones de estabilidad disminuye a valores ligeramente más ácidos, el comportamiento es más marcado en los materiales PBDE y PP; respecto a la temperatura, los valores de pH son ligeramente ácidos a los 40 °C con valores de ± 4.6 .

Después de los 5 meses de estabilidad se puede observar que, para las dos condiciones de estabilidad, el pH en todos los materiales aumenta hasta valores muy cercanos a los originales; de nueva cuenta los CLLK almacenados a 40 °C en PBDE y PP, son los que tienen valores más ácidos, mientras que aquellos a 30 °C en VD son los que tienen valores más básicos de pH.

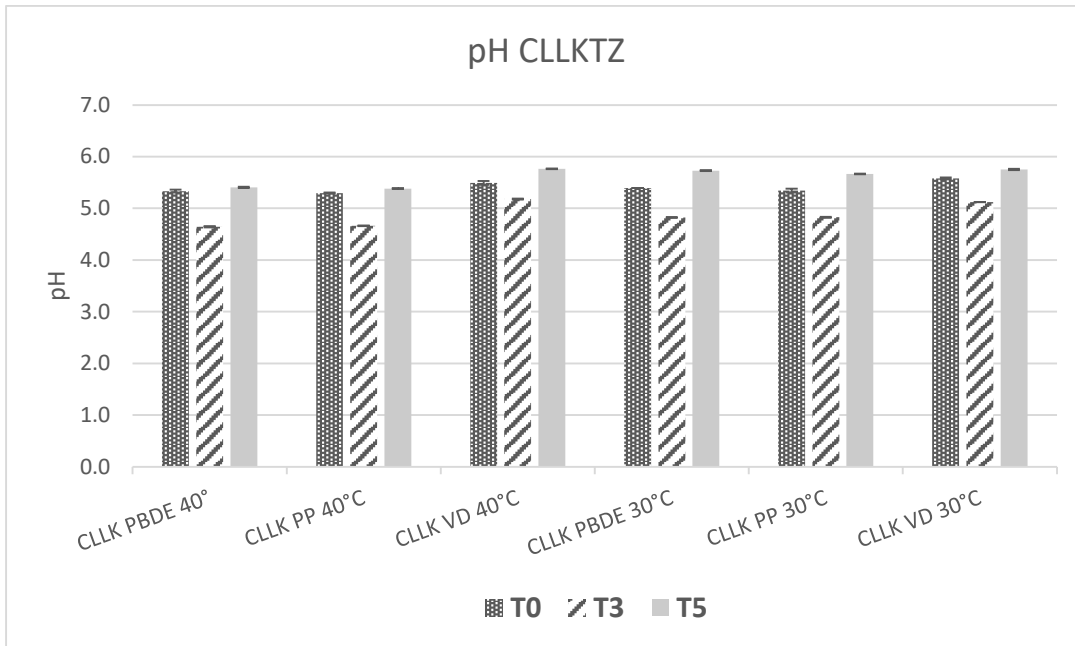
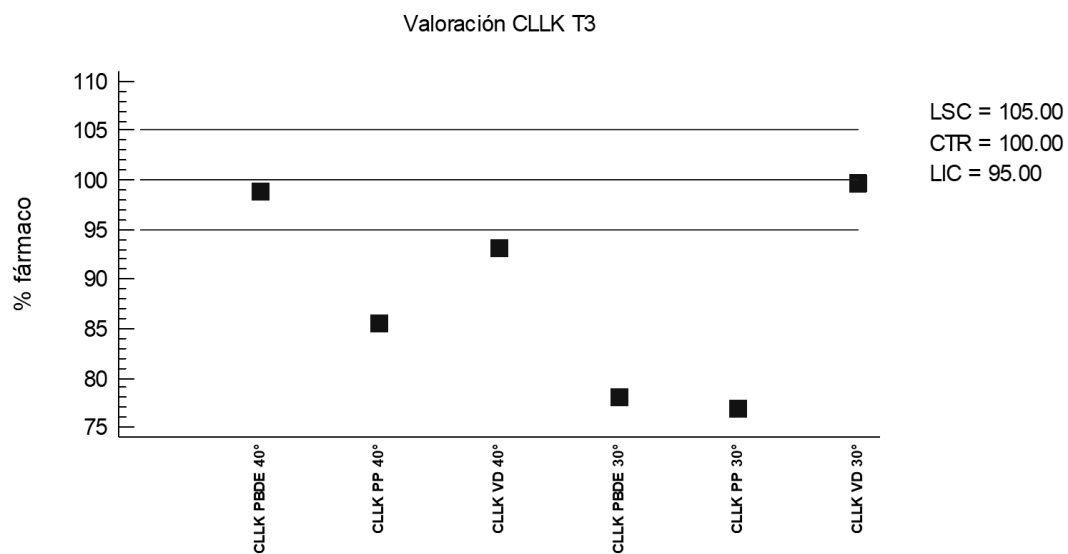


Figura 31.- Valor de pH de los CLLK en las diferentes condiciones de estabilidad

11.7.4 Valoración del ketoconazol en los CLLK

La valoración del ketoconazol en los CLLK se muestra en la Figuras 32 y 33, para los 3 meses y 5 meses de estabilidad respectivamente. Como se puede observar a los 3 meses solamente dos de las muestras, CLLK PBDE a 40 °C y la muestra de CLLK VD a 30 °C, se encuentran dentro del intervalo del $\pm 5\%$ de potencia o valoración. Las muestras en PBDE y PP a 30 °C muestran valores menores al 80% de potencia. Mientras las muestras a 40 °C en PP y VD muestran valores del 85 y 93 % de potencia aproximadamente.

Figura. 32- Valoración de las muestras de CLLK a los 3 meses (T3) de estabilidad acelera (40 °C) e intermedia (30 °C). Se incluyen los datos en porcentaje de los límites superior e inferior de confianza (LSC y LIC, respectivamente).



A los 5 meses, en las dos condiciones de estabilidad, casi todas las muestras en sus respectivos materiales estuvieron fuera del intervalo del 5% de potencia, solamente la muestra en VD 30 °C se encontró dentro del intervalo de la valoración. Respecto a las muestras a 30 °C en PBDE y PP, solamente tuvieron un ligero descenso comparadas con los 3 meses de estabilidad. A 40 °C las muestras en PBDE y VD bajaron su potencia aproximadamente al 85%, solamente la muestra en PP se encontró en el mismo valor que a los 3 meses.

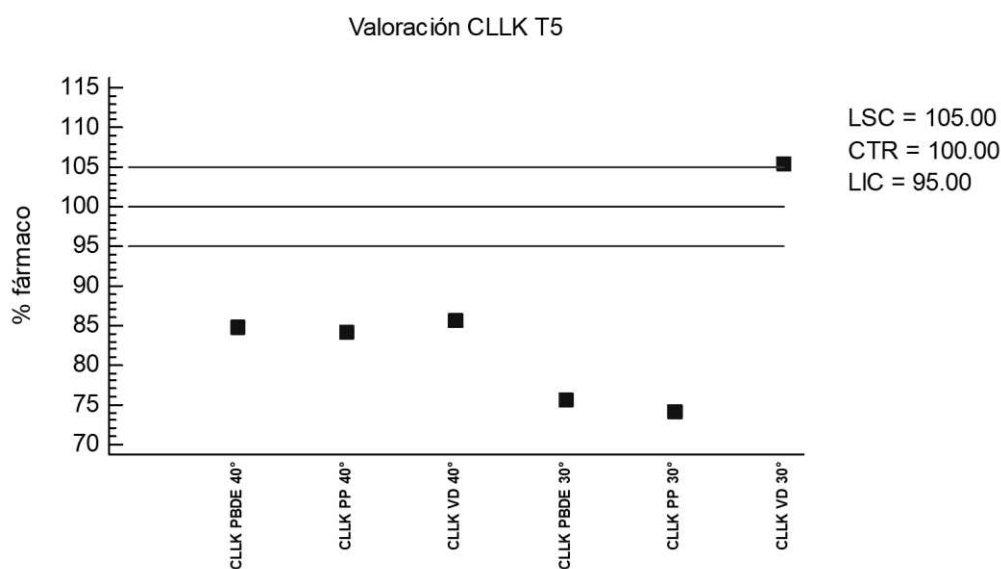


Figura 33.- Valoración de las muestras de CLLK a los 5 meses (T5) de estabilidad acelerada (40°C) e intermedia (30°C). Se incluyen los datos en porcentaje de los límites superior e inferior de confianza (LSC y LIC, respectivamente).

11.8 Protocolo de estabilidad de la crema/CLLK

11.8.1 Signo de la emulsión

Como se muestra en las Figuras 34 y 35, se observa que la crema/CLLK y la crema/agua presentan una fase continua de tonalidad azul, mientras que las gotículas no absorbieron el colorante azul, por lo que para ambos casos las cremas

fueron O/W. Además, para ambas formulaciones en crema, también se dispersaron cuando se colocaron en un exceso de agua, lo que confirmó el signo de las mismas.

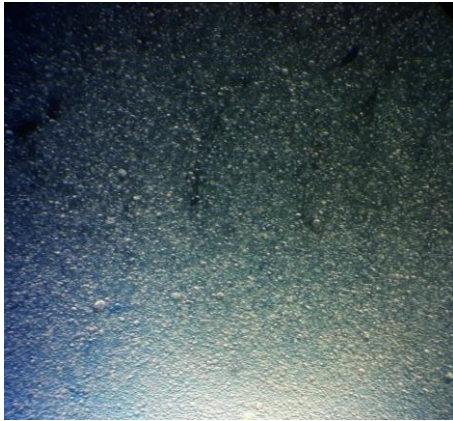


Figura 34.- Crema/agua, aumento 40x



Figura 35.- Crema/CLLK, aumento 40x

11.8.2 Tamaño de la partícula de las cremas

En la Figura 36 se muestran los datos de tamaño de la partícula promedio para las muestras de crema a 40 °C. La crema/agua comienza con tamaños de partícula que no van más allá de los 80 μm a tiempo cero, a los 3 meses hay un decremento del tamaño, para tener un importante aumento a los 5 meses de estabilidad. En el caso de la crema/CLLK, inicialmente no hay tamaños que vayan más allá de los 60 μm , mientras que, a los 3 meses en algunos casos, hay un incremento del tamaño de partícula, y para algunas muestras hay una disminución del tamaño, aunque sin algún orden específico para los materiales de empaque; después de los 5 meses, se nota un incremento en el tamaño de la partícula para la mayoría de las muestras, aunque no de una manera tan evidente como en la crema/agua.

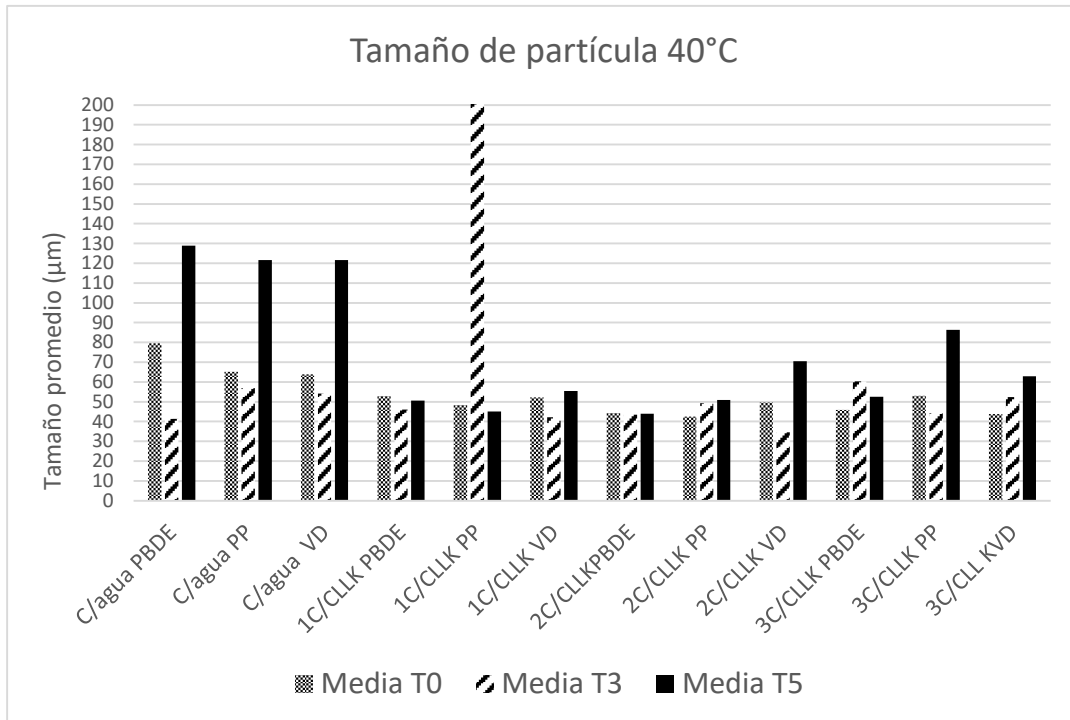


Figura 36.- Seguimiento del tamaño de partícula para las cremas contenidas en distintos materiales de envase (VD, PDBD y PP), en condiciones aceleradas 40°C de estabilidad, desde el inicio (T0) y a 3 (T3) y 5 (T5) meses.

En la estabilidad intermedia (fig. 37), se observa que la crema/agua, a los 3 y 5 meses, en casi todos los casos presenta tendencia hacia el aumento de tamaño

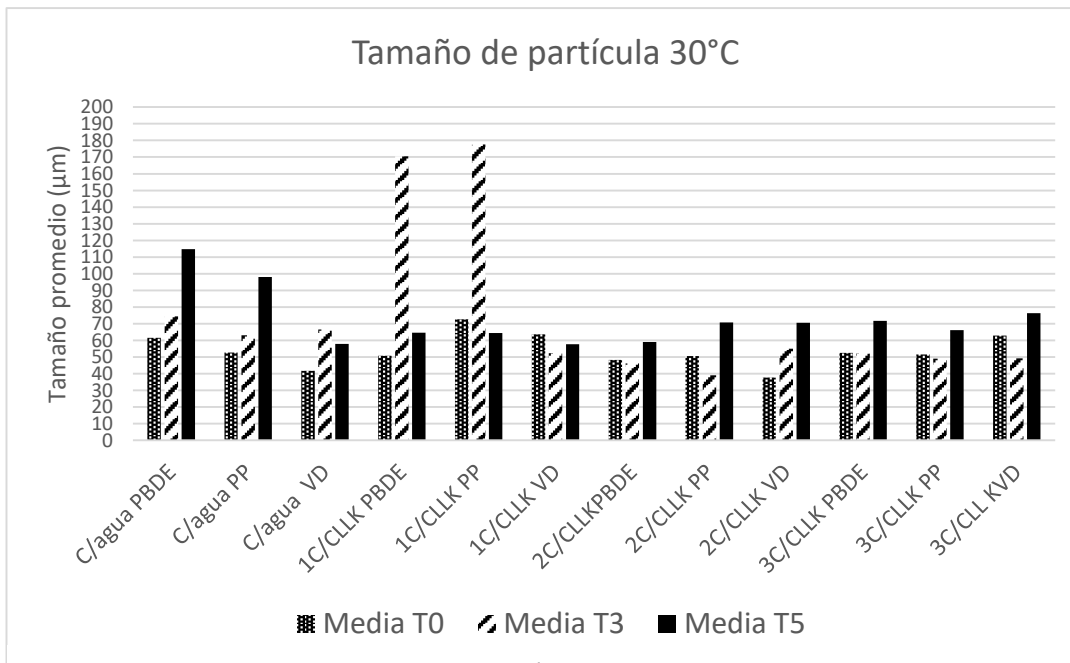


Figura 37.- Seguimiento del tamaño de partícula para las cremas contenidas en distintos materiales de envase (VD, PDBD y PP), en condiciones intermedias 30°C de estabilidad, desde el inicio (T0) y a 3 (T3) y 5 (T5) meses.

de partícula, aunque en menor caso que a los 40 °C. Mientras que para los lotes de crema/CLLK, en la mayoría de los casos hay una tendencia hacia el aumento de tamaño de partícula, pero también casos en los que hay un aumento muy evidente a los 3 meses, pero al final, todas las muestras presentan un tamaño de partícula en el intervalo de 80-60 μm .

11.8.3 Apariencia de las cremas

A tiempo cero de estabilidad, la crema/agua y la crema/CLLK, presentaron una coloración blanca y fueron inodoras. Después de los 3 meses, la cremas/CLLK a 40 °C en PBDE tuvieron una tonalidad rosa pálida (fig. 38), mientras que las demás muestras, en las dos condiciones de estabilidad e incluyendo las formulaciones de crema/agua en los diferentes materiales, seguían siendo blancas. En cuanto a la percepción de la “viscosidad” de las cremas, las cremas/agua presentaron en general una mayor viscosidad, mientras que las cremas/CLLK fueron más fluidas. En cuanto al olor, ninguna muestra tuvo un cambio evidente de olor.



Figura 38.- Dos muestras de crema/CLLK (lado izquierdo) y dos muestras de crema/agua (lado derecho) en PBDE, después de 3 meses a 40 °C

Transcurridos los 5 meses, las muestras de crema/CLLK en el envase de PP y VD, a los 40 °C comenzaron a mostrar una tonalidad rosa pálida que no se presentó a los 3 meses, mientras que la muestra en PBDE mostró un color rosa más intenso a la temperatura antes mencionada; en cuanto a su viscosidad, estas muestras se deformaban fácilmente. Las muestras de crema/agua a 40 °C en los diferentes materiales no mostraron un cambio evidente de color u olor; en cuanto a su viscosidad, presentaron mayor resistencia a la deformación.

Las muestras de crema/CLLK colocadas a 30 °C por 5 meses, no mostraron cambios evidentes en el color u olor, con excepción de la muestra en PBDE que comenzó a mostrar el color rosa pálido.

11.8.4 Valor de pH de las cremas

Las muestras de crema en las condiciones aceleradas e intermedias inicialmente tenían un pH de ± 7 . Después de los 3 meses a 40 °C, los valores de pH disminuyeron a valores cercanos de entre 5 y 6, principalmente en las dos muestras de crema/CLLK en VD; a los 5 meses, algunas muestras comenzaron a incrementar sus valores de pH, como es el caso de algunas muestras en PBDE y PP. En el caso opuesto, las muestras en VD continuaron disminuyendo sus valores (fig. 39).

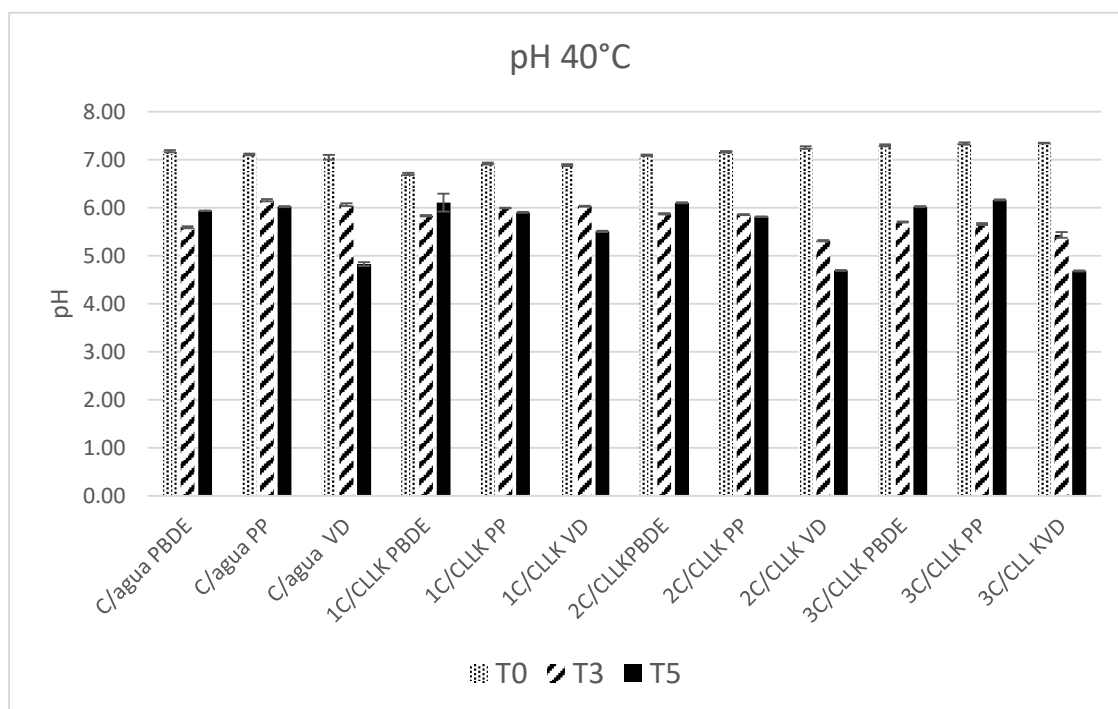


Figura 39.- Seguimiento del pH para las condiciones de estabilidad acelerada. (1C, 2C, 3C: Número de lote de Crema)

Después de los 3 y 5 meses a 30 °C, las muestras de crema/agua disminuyen ligeramente en sus valores de pH, manteniéndose en valores ligeramente ácidos. En el caso de las muestras de crema/CLLK, los valores de pH también disminuyeron, pero no tanto como en las condiciones aceleradas de estabilidad, ya que la mayoría de las muestras se mantuvieron en un pH de ± 6 , solamente las muestras en VD fueron inferiores al valor antes mencionado. Es de llamar la atención que, en las

condiciones intermedias de estabilidad, después de los 5 meses, también algunas muestras almacenadas en PBDE y PP aumentaron su pH (fig. 40).

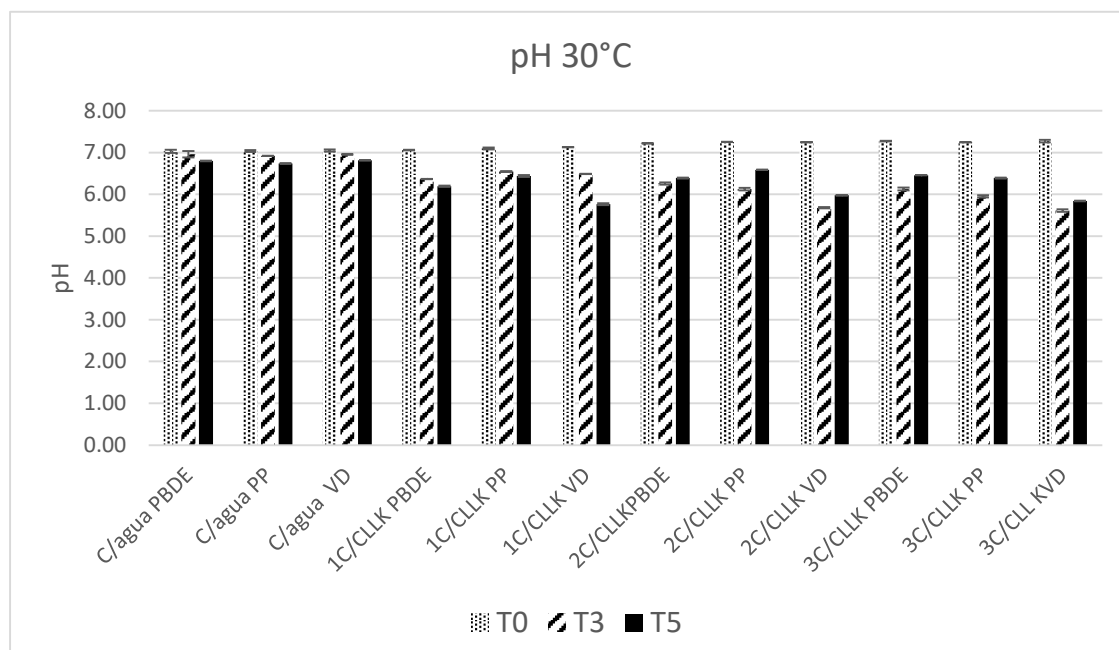


Figura 40.- Seguimiento del pH para las condiciones de estabilidad intermedia. (1C, 2C, 3C: Número de lote de Crema)

11.8.5 Valoración de los lotes de crema

Las valoraciones de las cremas a los 3 meses de la estabilidad intermedia se muestran en la Figura 41. Comenzando con las muestras de crema/agua, se observa cómo se mantienen en el intervalo de potencia del 5%. Mientras que las muestras de los diferentes lotes de crema/CLK, se salen de la especificación, principalmente las muestras contenidas en VD son las que muestran valores muy inferiores al LIC; mientras que solamente una muestra en PP se encuentra dentro de la especificación.

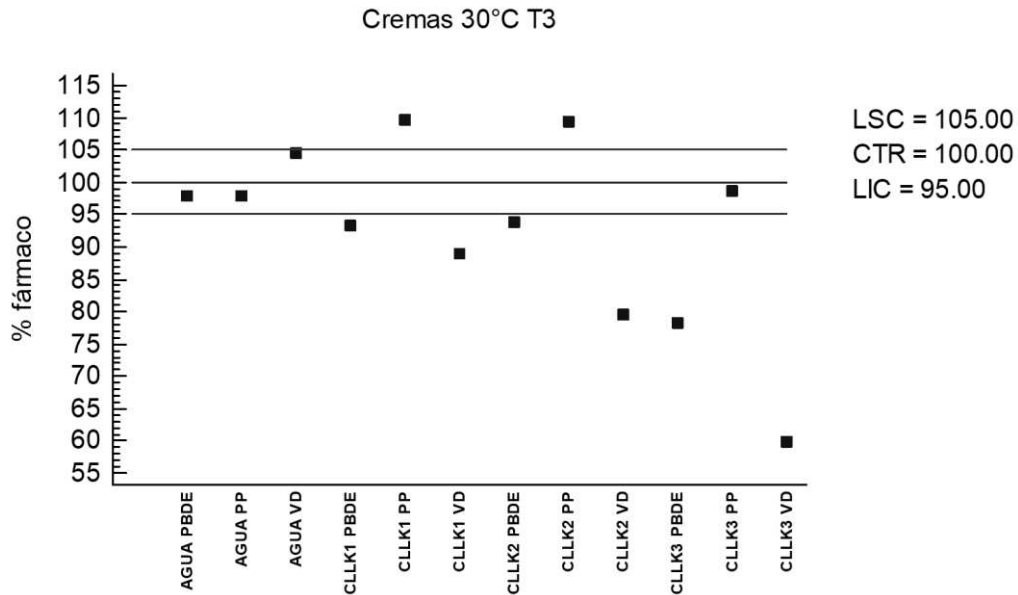


Figura 41.- Valoración de las muestras de crema/agua y crema/CLLK a condiciones de estabilidad intermedia 30°C, a los 3 meses T3). Se incluyen los datos en porcentaje de los límites superior e inferior de confianza (LSC y LIC, respectivamente).

La estabilidad acelerada de las cremas en la Figura 42 muestra cómo, para el caso de la crema/agua, la muestra contenida en PBDE se encuentra dentro de la especificación. En el caso de las cremas/CLLK, ninguna de las muestras está dentro de la especificación, e incluso algunas muestras a estabilidad intermedia ya se encuentran lejos de los límites de la especificación, aquí se encuentran aún más

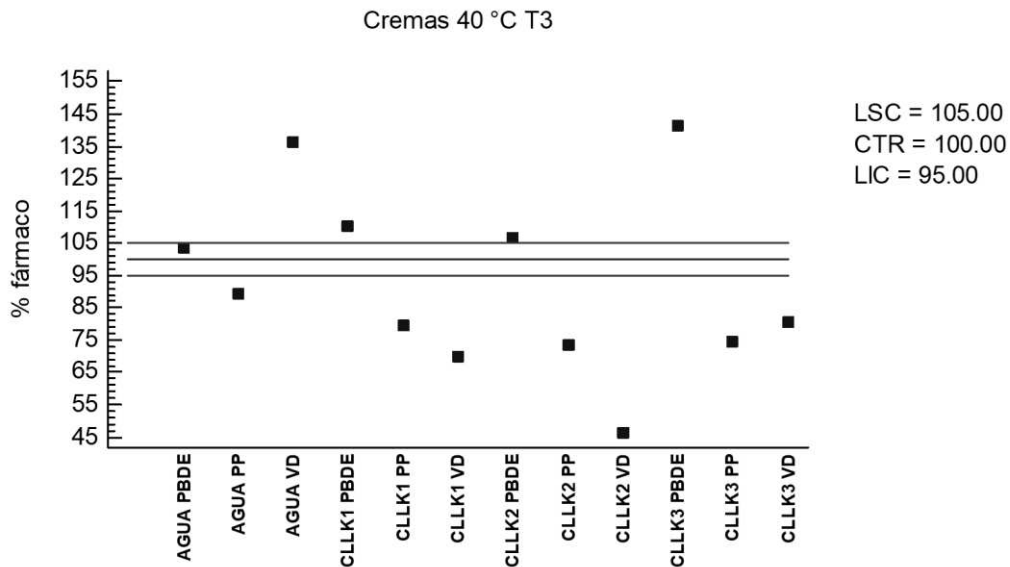


Figura 42.- Valoración de las muestras de crema/agua y crema/CLLK a condiciones de estabilidad acelerada 40°C, a los 3 meses T3. Se incluyen los datos en porcentaje de los límites superior e inferior de confianza (LSC y LIC, respectivamente).

alejadas, como ejemplo, una de las muestras en VD que llega a valores de 45 % de potencia.

11.9 Estabilidad de las cremas frente a la centrifugación

En el caso de la caracterización de la estabilidad a la centrifugación, se presentan los resultados en la Tabla 8. Como se puede observar, para la crema/CLLK y la crema/agua, en ambos casos soportan las dos condiciones iniciales de centrifugación propuestas e inclusive después de 7 días las muestras no muestran alguna separación de fases evidente. La separación de fases se muestra en la última condición de centrifugación (CCR 19420 G), donde la muestra de crema/agua sufre una separación de fases, en el que la fase lipídica se encuentra en la parte superior de los tubos, mientras que en la parte inferior se encuentra la fase acuosa completamente clara; por el contrario, la crema/CLLK no sufrió separación de fases al término del periodo de centrifugación en las últimas condiciones descritas o después de ser guardada por siete días.

Tabla 8.- Resultados para estabilidad a la centrifugación de las muestras de crema

Muestra y CFR		
Muestra (2158 G)	Inicial	Después de 7 días
Muestra placebo	Estable	Estable
Muestra con CLL (con KTZ)	Estable	Estable
Muestras (8631 G)		
Muestra placebo	Estable	Estable
Muestra con CLL (con KTZ)	Estable	Estable
Muestras (19420 G)		
Muestra placebo	Inestable (cremado)	
Muestra con CLL (con KTZ)	Estable	Estable

11.10 Análisis reológico de las cremas

De acuerdo con el orden en que se realizan las pruebas reológicas de flujo oscilatorio, en la Figura 43 se presenta **el barrido de amplitud**, prueba necesaria para determinar el Intervalo Viscoelástico Lineal (IVL), como se puede observar, el módulo G' (de almacenamiento) predomina sobre el G'' (de pérdida). Así mismo, también hay una disminución de los valores de los módulos G' y G'' a 0.3 de amplitud para todas las muestras, por lo que se eligió el valor 0.08% de amplitud para llevar a cabo los barridos de temperatura y barridos de flujo bajo frecuencia. Además, se puede observar como los valores de las diferentes muestras son paralelas entre sí.

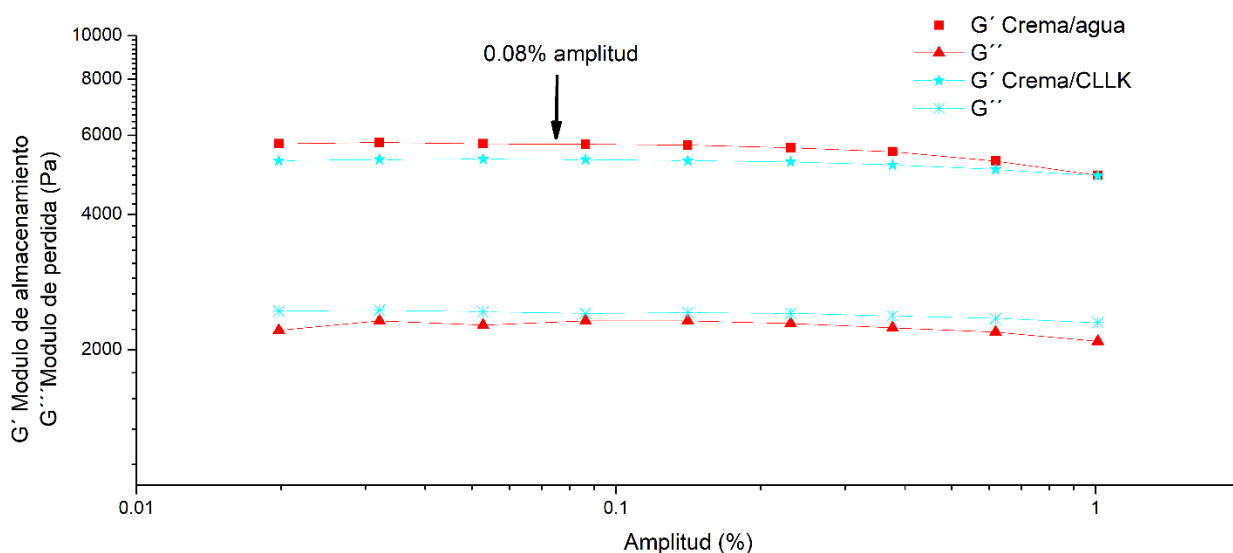


Figura 43.- Barrido de amplitud para las muestras de crema/CLLK y la crema/agua

Barrido de temperatura: en la Figura 44 se muestra el comportamiento de la crema/CLLK y la crema/agua cuando es sometida a una elevación gradual de la temperatura dentro del ILV.

Como se puede observar para la crema/agua, el módulo G' predomina sobre la G'' hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente $47.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, valor donde comienzan a disminuir ambos módulos de manera constante, también es importante observar la $\tan(\delta)$, que también se mantiene constante de los 25° hasta los $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ donde se da un incremento importante en su valor.

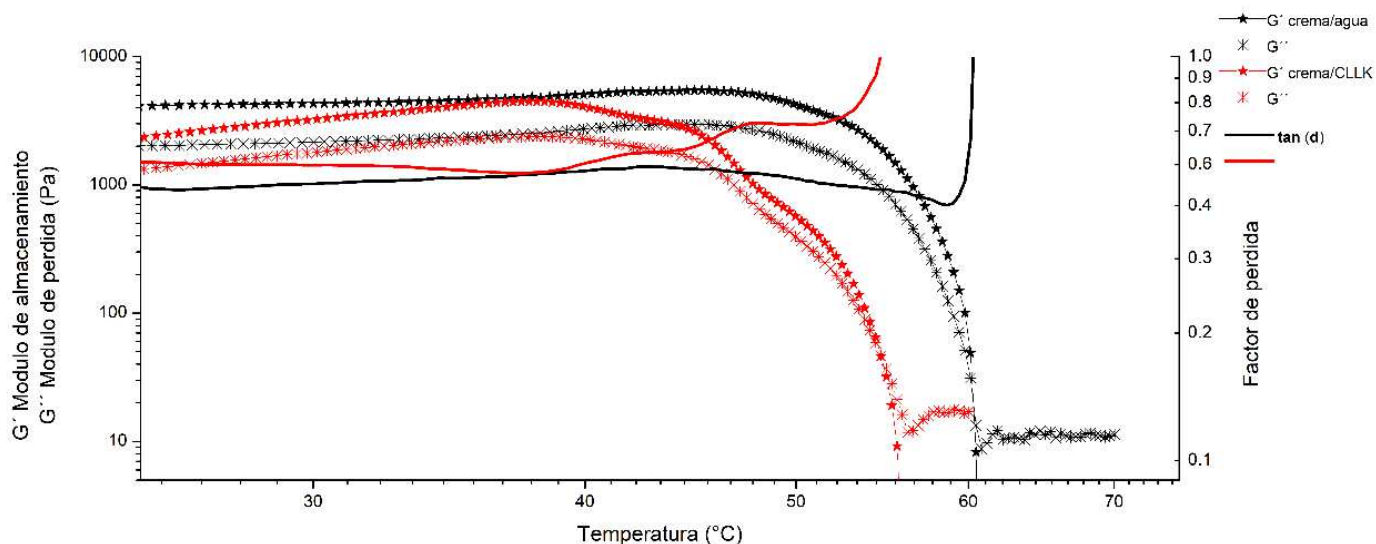


Figura 44.- Barrido de temperatura para las muestras de crema/CLLK (líneas de color rojo) y la crema/agua (líneas de color negro)

En el caso de la crema/CLLK, también se observa el predominio de G' sobre G'' y se mantiene de los $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta aproximadamente $37.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, a partir de ese valor hay una caída discontinua en los valores de los módulos, en el caso de la $\tan(\delta)$ no se mantiene constante como en la de la crema/agua, ya que se comienza a observar subidas escalonadas en sus valores, hasta alcanzar un valor máximo.

Barrido de frecuencia: Se llevó a cabo el barrido de frecuencia en las muestras de crema/CLLK y crema/agua en los materiales de envasado PBDE (fig. 45), PP (fig. 46) y VD (fig. 47). Se puede observar para todos los casos que el módulo elástico predomina sobre el viscoso, además, hay un incremento de los valores de los módulos dependiente de la frecuencia; los valores de las pendientes de G' de los módulos elásticos para cada muestra en su respectivo material se presentan en la Tabla 9, como se puede observar, en todos los materiales, la crema/agua tiene una

mayor pendiente que la crema/CLLK. Para la $\tan(\delta)$, dentro del intervalo de frecuencias utilizado, en todos los casos se mostró un comportamiento tipo gel, pero a frecuencias bajas, la $\tan(\delta)$ tiende a aumentar y a frecuencias altas tiende a disminuir.

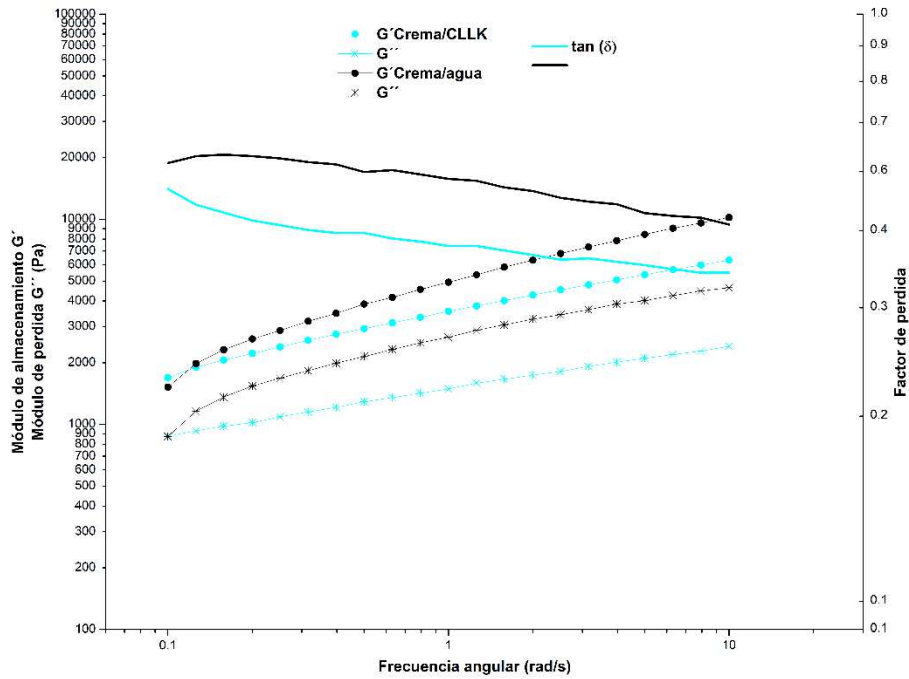


Figura 45.- Barrido de frecuencia para la crema/CLLK y la crema/agua en PBDE

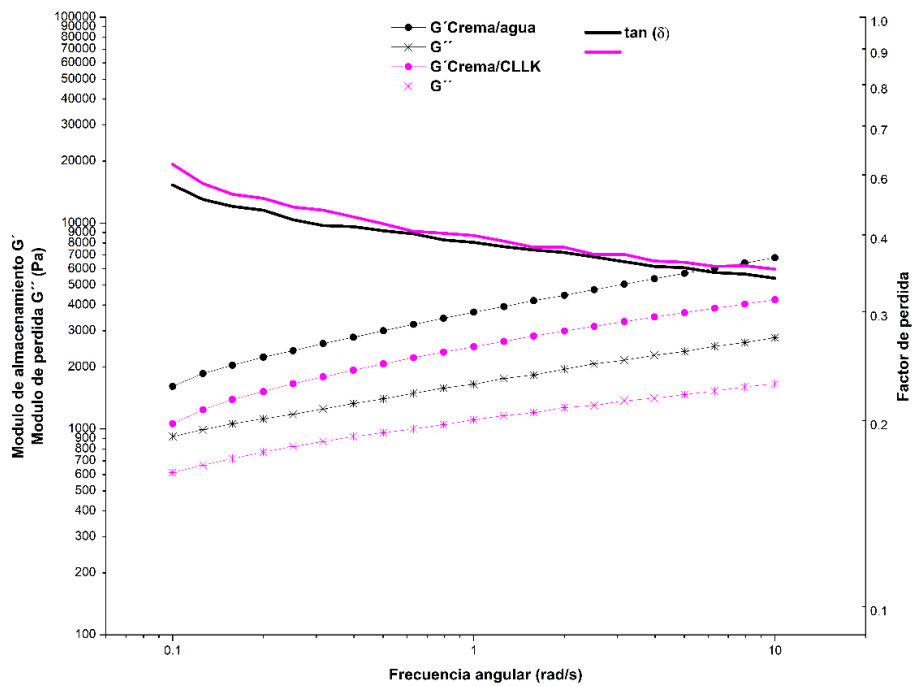


Figura 46.- Barrido de frecuencia para la crema/CLLK y la crema/agua en PP

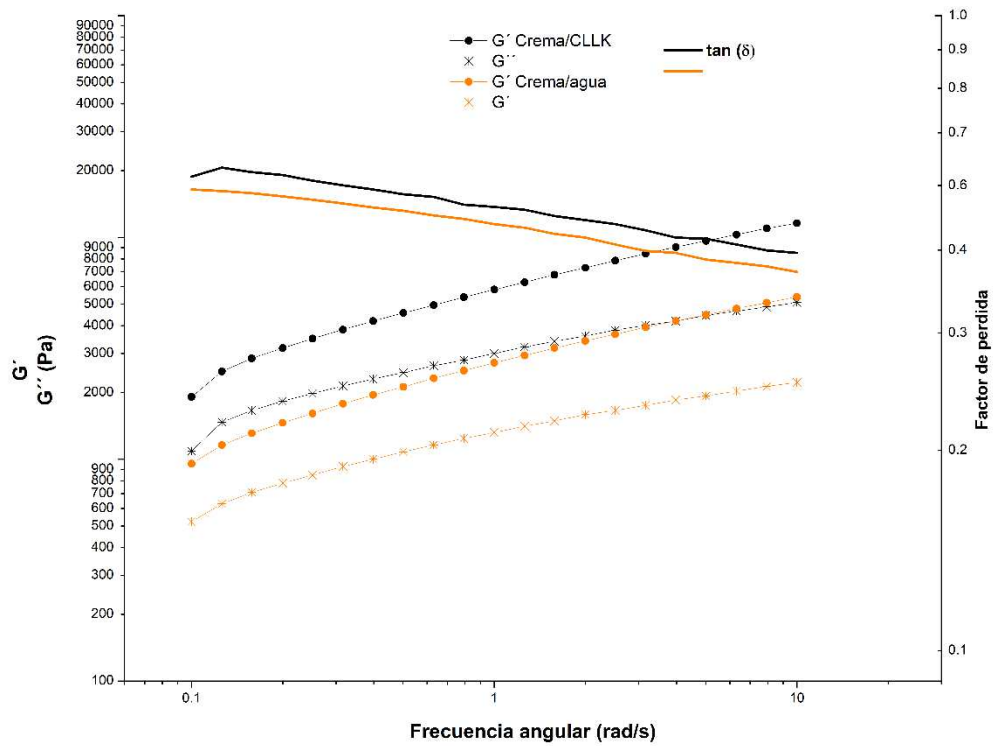


Figura 47.- Barrido de frecuencia para la crema/CLLK y la crema/agua en VD

Tabla 9.- Pendientes de G' de cada una de las muestras de crema, en el barrido de frecuencia

Lote	Pendiente
Crema/agua PBDE	0.3813
Crema/CLLK PBDE	0.2775
Crema/agua PP	0.2983
Crema/CLLK PP	0.2825
Crema/agua VD	0.3599
Crema/CLLK VD	0.3569

11.11 Cinética de la liberación de ketoconazol desde la crema que contiene a los CLLK

La cinética de liberación para la crema/CLLK y de la crema/agua se puede observar en la Figura 47, también se adicionó una formulación de crema/CLLP con la intención de observar si la liberación solamente está en función del sistema líquido cristalino.

Como se puede observar para la crema/CLLK y la crema/CLLP se alcanza una liberación del ketoconazol de aproximadamente 12% y 13% respectivamente a las 8 horas; en cambio la crema/agua libera aproximadamente el 20% del fármaco en ese mismo tiempo. Para determinar si no hay diferencias significativas entre los diferentes perfiles de liberación a partir de las formulaciones se realizó una comparación de líneas de regresión.

Los resultados a partir de las líneas de regresión ajustadas del perfil de liberación (fig. 48) entre la crema/CLLK y la crema/CLLP no muestran diferencias significativas en la pendiente, ya que se obtuvo una $p=0.9287$ con un nivel de confianza del 99%; para el intercepto no hubo diferencias, dado que $p=0.1696$ con un nivel de confianza del 99%. La comparación de la formulación de crema/CLLK y crema/agua muestra diferencia significativa, ya que para la pendiente se obtuvo una $p=0.0387$ con un nivel de confianza del 95%, mientras que para el intercepto se tiene una $p=0.00$ con una confianza del 99%.

La cinética de la liberación que siguieron las diferentes formulaciones de crema se ajustó a los diferentes modelos como se muestra en la Tabla 10, se tomaron los modelos que cumplieran con los criterios: 1) coeficientes de correlación ajustados (R^2 ajustada) con los valores altos y 2) Criterio de Información de Akaike (AIC) bajo. Los tres modelos que se ajustaron mejor para las tres formulaciones de crema son el de Weibull, Korsmeyer-Peppas y Higuchi.

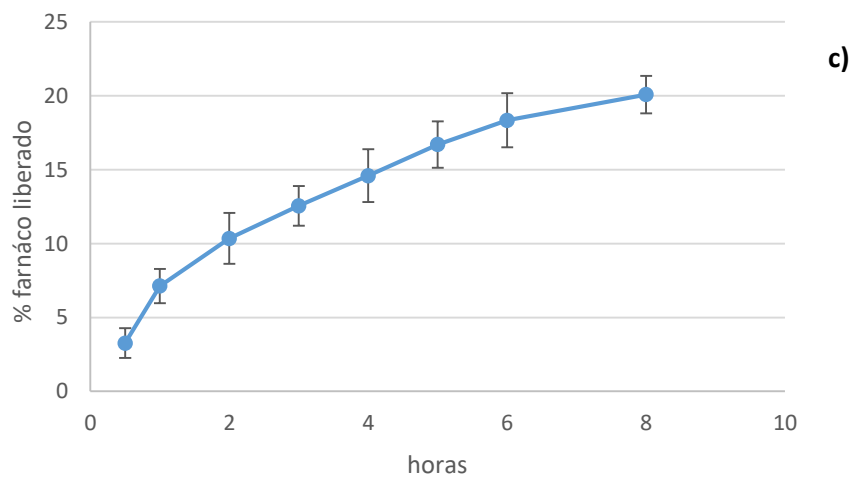
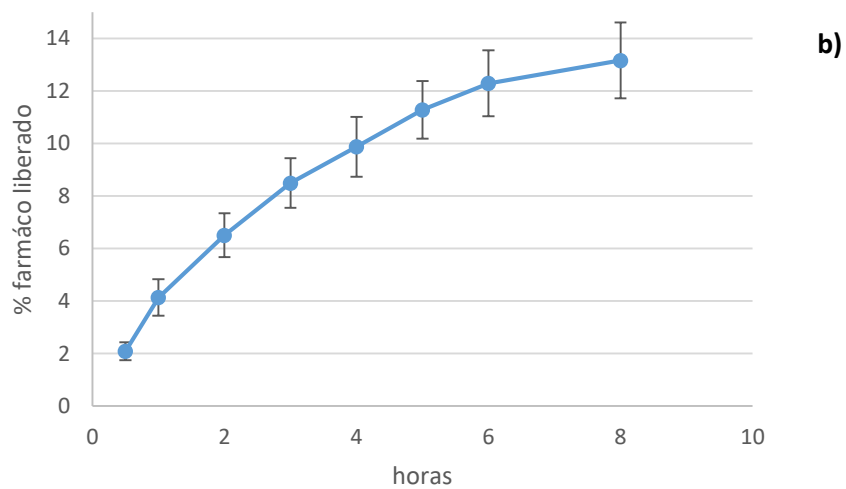
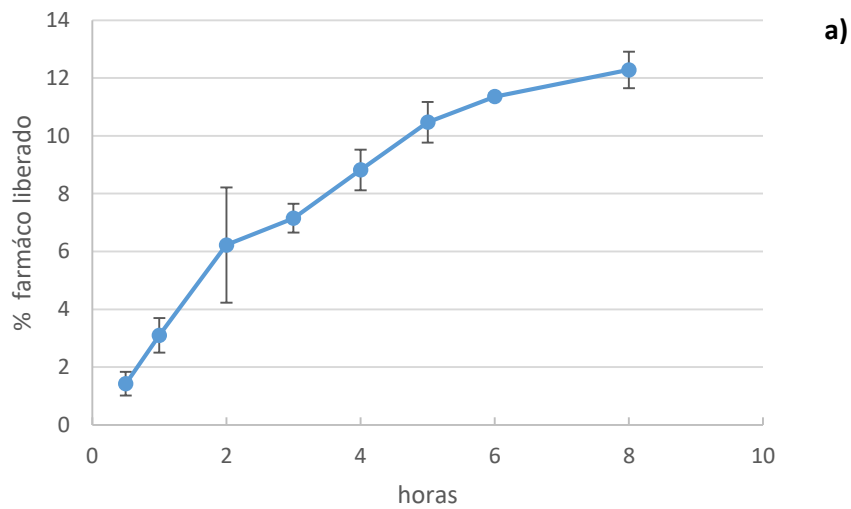


Figura 48.- a) Perfil de liberación de la crema/CLLK, b) Perfil de liberación de la crema/CLLP, c) Perfil de liberación de la crema/agua. n=3

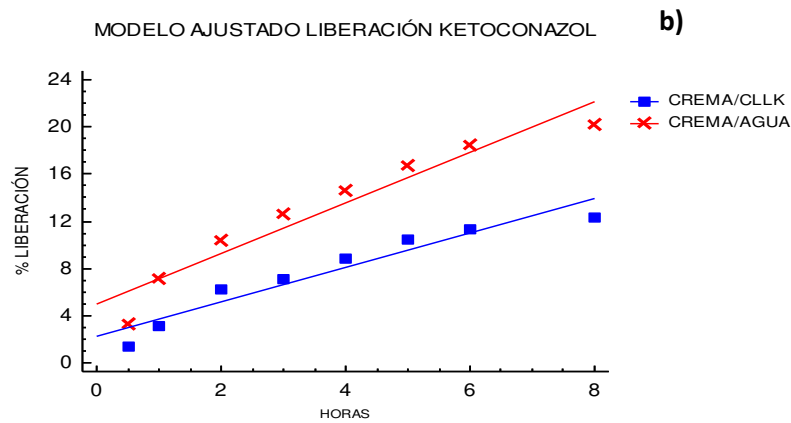
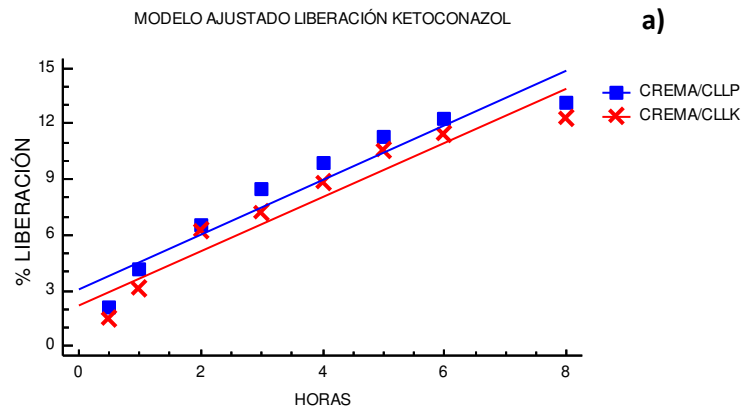


Figura 49.- a) Comparación de líneas de regresión entre crema/CLK y la crema/CLLP, b) Comparación de líneas de regresión entre crema/CLK y Crema/agua

Tabla 10.- Modelos de liberación. *Modelos mejor ajustados

Modelo	Orden Zero	Primer orden	Weibull*	Hixson-Crowell	Korsmeyer-Peppas*	Higuchi*
crema/CLK						
R ² ajustada	0.81	0.84	0.99	0.83	0.97 n=0.62	0.95
AIC	26.18	24.66	4.88	25.17	12.63	15.62
crema/CLLP						
R ² ajustada	0.72	0.76	1.00	0.75	0.98 n=0.56	0.97
AIC	29.51	28.02	-6.01	28.52	10.46	11.00
crema/agua						
R ² ajustada	0.67	0.75	1.00	0.73	0.98 n=0.54	0.98
AIC	36.59	34.39	3.70	35.14	14.08	13.62

11.12 Permeación del ketoconazol a partir de la crema/CLLK.

Mediante las áreas obtenidas por CLAR, para cada una de las siete membranas de piel de cerdo, se determinó si las membranas habían retenido y permeado al ketoconazol.

Para algunas de las membranas se comienzan a obtener picos a partir de las 3, 4 o 5 horas, y en algunos casos no se observaban ningún pico o respuesta. En cambio, para la cuantificación del fármaco retenido por las membranas, se obtuvieron en todas las membranas picos debidos al ketoconazol. Todas las áreas resultaron en concentraciones negativas una vez interpoladas a la curva de calibración validada, al obtener concentraciones negativas, no se siguió con el procesamiento de los datos para su análisis.

12. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

12.1 Obtención de las cremas que contienen Cristales Líquidos cargados con Ketoconazol (CLLK) o agua

Una de las primeras consideraciones que se evalúan cuando se quiere obtener una dispersión líquido-cristalina es su apariencia, ya que los fenómenos ópticos que manifiestan pueden estar asociados con este tipo de sistema dispersos heterogéneos.

Las características visuales de las muestras obtenidas coinciden con la opacidad y el aspecto “lechoso” de los hexosomas y cubosomas obtenidos con el estabilizante poloxámero 407 (Amar-Yuli *et al.*, 2007; Nakano *et al.*, 2002); Las características de las dispersiones líquido-cristalinas obtenidas y las reportadas, son explicadas por los efectos ópticos de las dispersiones de tamaño coloidal. La opacidad o transparencia de las muestras está relacionada con su tamaño de partícula, en el caso de las partículas con un radio menor que la longitud de onda de la luz (< 400 nm), tienden a ser sistemas ópticamente transparentes (McClements, 2011), como es el caso de las microemulsiones y de las nanoemulsiones, recordando que la diferencia entre los dos tipos sistemas es que la primera se forma espontáneamente y es por lo tanto termodinámicamente estable, mientras que la segunda requiere de un aporte de

energía para su formación y por lo tanto solo son cinéticamente estables. Las características de color de las dispersiones líquido-cristalinas obtenidas, son explicadas por los efectos ópticos de las dispersiones de tamaño coloidal (ley de Rayleigh), la tonalidad azul corresponde con una longitud de onda corta ($\lambda = \pm 470$ nm) que es difractada intensamente, mientras que la luz roja ($\lambda = 700$ nm) observada solamente a contraluz es de menor intensidad (Martin *et al.*, 2011). La fluidez alta de las dispersiones líquido-cristalinas, es debida a que una gran proporción de la formulación es agua.

Por lo tanto, las características visuales de las dispersiones líquido-cristalina obtenidas, están relacionadas con un tamaño de partícula nanométrico y presenta los efectos ópticos relacionados con ese tamaño.

12.1.1 Tamaño de la partícula de los CLLP y CLLK

La DTP es una de las características más importantes de una dispersión líquido-cristalina, ya que muchas de sus propiedades, como son los efectos ópticos antes mencionados, así como de su estabilidad mecánica al flujo, son de gran importancia; por ejemplo, la estabilidad de una dispersión coloidal frente a la fuerza gravitacional, regularmente incrementa cuando el radio de la partícula es menor de 90 nm y por lo tanto, el movimiento browniano domina a la fuerza gravitacional (McClements, 2011).

El tamaño de partícula de las dispersiones líquido-cristalinas obtenidas, fue de un promedio de ≈ 80 nm para los CLLK y los CLLP, se encuentra dentro de lo reportado para este tipo de sistemas lípidicos (Muller *et al.*, 2013). Se han reportado tamaños de los 75 a 320 nm, cualquier tamaño menor de < 20 nm es resultado de un periodo de sonicación largo; tamaños de 1500-2600 nm, son resultado de inestabilidad debida a la poca cantidad de polímero para estabilizar la partícula (Amar-Yuli *et al.*, 2007); un aspecto importante a señalar, es que los investigadores que realizaron los trabajos reportados, utilizaron técnicas como Dispersión de la Luz Dinámica (DDL), técnica que difiere en el principio utilizado para determinar el tamaño, por lo que se debe ser cuidadoso en la interpretación de los resultados entre una y otra técnica.

Se determinó el tamaño promedio de partículas de las dispersiones líquido-cristalinas de ± 80 nm, las cuales se encuentran en rango de tamaño reportado para este tipo de sistemas.

12.1.2 Caracterización de los CLL mediante difracción de los rayos X de ángulo amplio

La dispersión de rayos X de ángulo amplio (WAXS) permite distinguir los arreglos periódicos de los átomos en un material, por lo que proporciona información valiosa a cerca de los cambios estructurales que puede sufrir en un determinado proceso.

Las muestras obtenidas son dispersiones acuosas, cuya proporción de agua es de aproximadamente 95%, por lo que las curvas características de estos sistemas líquido-cristalinos, indican que las muestras son mayoritariamente amorfas y con regiones microcristalinas, además, los picos no están bien definidos en el difractograma y por lo tanto no presentan un orden periódico alto (Apiwongngam *et al.*, 2018; Martínez *et al.*, 2017). El patrón de difracción del ketoconazol no presenta picos que coincidan con las con los patrones de los CLLP y CLLK, por lo tanto, se puede inferir que el ketoconazol ha sido integrado en la estructura líquido-cristalina. Los picos pequeños y la curva característica descritos, al ser particulares de este material, constituyen la huella dactilar de las muestras (Botch & Corona, 2017).

12.1.3 Caracterización de los CLL mediante difracción de los rayos X de ángulo bajo

Esta técnica es útil para obtener información estructural en escalas del orden de 1 a 1000 nm; a pesar de que no provee información acerca de los arreglos periódicos de los átomos en una muestra, es mejor describirla como una técnica que provee información de precisión alta para el tamaño y la forma. El perfil de difracción obtenido, por sí solo, no es intuitivamente informativo, por lo que a partir del procesamiento de la información del perfil de difracción se debe obtener la información sobre el tamaño y la forma de las partículas dispersadas.

En la gráfica de Kratky obtenida, la curva descrita para los CLLP, es característica de las partículas laminares; mientras que para la muestra de CLLK, la curva es característica de una forma cilíndrica. La transición de forma con la introducción de algún componente en una formulación de CLL ya se ha reportado (Bitan-Cherbakovsky *et al.*, 2013), en donde se ha demostrado que con la introducción de un nuevo componente a una fase laminar se da una transición a una fase hexagonal; es importante recordar que la forma de los sistemas líquido-cristalinos depende de los cambios de la curvatura que se dan en una interfase, estos cambios dependen de las características fisicoquímicas del tensoactivo en primera instancia (Mulet *et al.*, 2013), pero hay que tener en cuenta que la curvatura puede cambiar si se introducen moléculas nuevas como los lípidos o algún fármaco, en este caso el ketoconazol, cuya naturaleza lipofílica puede hacer que interactúe con las cadenas alifáticas del tensoactivo. Una vez que se determinó la forma de las partículas, es necesario entender cómo interactúan entre ellas, en caso de que formen agregados, para eso se determina la dimensión fractal del sistema.

La dimensión fractal está relacionada con un incremento en las dimensiones de agregados de partículas, en el caso de la muestra de CLLP presenta un valor de -2.09, en cambio los CLLK presentaron un valor de -1.63. En el caso de objetos de baja dimensionalidad como láminas y cilindros dispuestos aleatoriamente, se han reportado dimensiones fractales de -2 y -1 respectivamente (Beaucage, 1996). En el caso de los CLLP, coinciden con láminas; en cambio, los CLLK se pueden asumir cilindros, y el aumento del valor de la dimensión fractal puede estar relacionado con una mayor cantidad de partículas agregadas, permitiendo a su vez que el agregado de partículas comience a incrementar en sus dimensiones (Lazzari, *et al.* 2016).

Hay que recordar que en realidad la distribución de pares-distancia está conectada con la intensidad difractada (q) por una transformada de Fourier, los datos obtenidos son una representación geométrica en espacio real de las especies difractantes (Heimo & Singh, 2013).

En el caso de la gráfica de distribución de pares-distancia para la muestra de CLLP, los datos obtenidos apoyan a los resultados obtenidos con la gráfica de Kratky, ya

que son indicativos de una forma laminar con una distribución bimodal. Para la muestra de CLLK, la curva indica que, en la primera moda presentada, hay partículas dispersoras de forma cilíndrica, lo cual también es apoyado por la gráfica de Kratky, aunque en este caso también parece que en la muestra de CLLK conviven partículas cilíndricas con partículas laminares, esto es debido a la segunda moda que aparece con un mayor radio.

Los datos obtenidos para los CLLP y los CLLK, muestran que son agregados de partículas coloidales con cierta dimensionalidad, pero que difieren en su forma, ya que los CLLP son láminas, mientras que los CLLK tienen una estructura cilíndrica.

12.2 Validación del método analítico para la determinación del ketoconazol

La finalidad de utilizar la CLAR fue para separar y cuantificar el ketoconazol de los demás componentes de la matriz, la cual es una crema constituida por varios excipientes, además de los componentes de las membranas de piel de cerdo utilizadas en las pruebas de permeabilidad.

Existen reportes sobre la detección de ketoconazol en medicamentos mediante CLAR; Abdel-Moety *et al.*, (2003) lograron la determinación del ketoconazol en formulaciones comerciales de crema y tabletas, lo lograron usando estándar internos como fluconazol y clorotrimazol. A pesar de que es difícil la comparación de los métodos analíticos, se pueden marcar las ventajas de uno u otro método. La ventaja del método desarrollado en este trabajo, es la utilización de un disolvente permitido para las pruebas de permeación en las membranas de la piel de cerdo

El método analítico distingue al ketoconazol de los componentes de la crema/CLL y la piel de cerdo, por lo que el método es selectivo y lineal en los tres niveles de cuantificación. Además, cumplió con los criterios establecidos en la guía de validación para la valoración o potencia.

12.3 Generación de productos de degradación del ketoconazol

La identificación de los productos de la degradación del ketoconazol es necesaria, ya que, al estar relacionados estructuralmente con el activo, pueden interferir con la cuantificación del analito de interés.

En las condiciones de degradación ácida al cual fue sometido el fármaco, en el cromatograma se observó un pico diferente al de ketoconazol, las condiciones ácidas ya habían sido reportadas como un factor para la degradación del ketoconazol (Mhaske & Sahasrabudhe, 2011; Skiba *et al.*, 2000). El producto de degradación del ketoconazol en las condiciones ácidas ha sido identificado como la impureza D del ketoconazol, indicada en la monografía correspondiente, en la farmacopea británica (Mhaske & Sahasrabudhe, 2011); además, otro producto de la degradación identificado por estos investigadores fue el producto de la oxidación del ketoconazol, un N-óxido, en este caso se usó H₂O₂ al 30% para lograr la degradación del ketoconazol, mientras que en el trabajo presente, se usó una disolución de H₂O₂ 3%/metanol 1:1, una disolución con una menor concentración, por lo que no fue posible generar ese producto. En el caso de la fotodegradación, los investigadores encontraron que la radiación de $\lambda=254$ nm durante 24 horas logra degradar al ketoconazol en disolución hasta aproximadamente 80% de su concentración original (Staub *et al.*, 2010); las condiciones de la exposición a la luz UV no fue constante, además de que las condiciones en la CLAR fueron muy diferentes a las usadas por los autores antes mencionados.

Por lo anterior, en las condiciones ácidas que fueron utilizadas durante el presente trabajo, se logró generar un producto de degradación del ketoconazol, que posiblemente pudiera interferir con la cuantificación del ketoconazol en pruebas posteriores.

12.4 Protocolo de estabilidad de los CLLK

12.4.1 Apariencia de los CLLK y de las cremas que los contienen

Uno de los aspectos más importantes que se marcan en la NOM-073 son las características organolépticas de las formulaciones probadas, ya que esto puede influir en la aceptación por parte del paciente.

El cambio más evidente en los CLLK es el cambio de color rosa que se presentó con el tiempo. El cambio de color en el champú y en la disolución que contienen ketoconazol, se ha reportado que es debido a la exposición a la luz del día (Staub *et al.*, 2010); a pesar de que, durante el presente trabajo, las muestras no fueron expuestas directamente a la luz, las condiciones de pH y exposición al oxígeno, probablemente ocasionaron como resultado algún subproducto del ketoconazol que esté dando como resultado ese cambio de coloración. Dentro de las condiciones químicas, el ketoconazol es sensible al pH, sufre degradación en condiciones ácidas; así mismo, es sensible a la oxidación como se mencionó en la sección sobre productos de degradación del ketoconazol. El cambio de coloración, similar al de los CLLK, se observa en las formulaciones de crema con los CLLK y también puede ser atribuida a las causas antes mencionadas, como es la fotosensibilidad y la oxidación; aunque sería necesario investigar si el producto de degradación causante de la formulación es común en ambos casos.

Una de las inestabilidades caracterizadas en las dispersiones líquido-cristalinas con ketoconazol y las cremas que los contienen, es un cambio de color, por lo que habría que trabajar en identificar la causa del cambio de color para solucionarlo con algún conservador.

12.4.2 Tamaño de partícula de los CLLK

Recalcando la importancia del tamaño de partícula en los sistemas dispersos heterogéneos, estos pueden ser sometidos también a diferentes condiciones de estabilidad, en los que se puede variar principalmente la temperatura, para saber no solamente si el principio activo se descompone con el tiempo, si no tener un acercamiento a los posibles cambios referentes a una posible separación de fases, cambios en el tamaño de partícula, etcétera; aunque es importante tener en cuenta

que estas pruebas pueden desencadenar procesos que no se ven a condiciones estándar (25 °C), como lo por lo que hay tener cuidado en su interpretación.

Como se había observado anteriormente en la sección de la obtención de los CLLK, los tamaños se encuentran en el mismo intervalo en los 8 lotes de 1 Kg, además, el tamaño de partícula de las CLLK se encuentra dentro de lo esperado para una dispersión líquido-cristalina.

Después de 3 y 5 meses ya no se pudo determinar el tamaño mediante la técnica de difracción de luz láser utilizada. El no poder determinar el tamaño de partícula es uno de los criterios para señalar inestabilidad dentro del sistema de CLLK. Una de las razones por la que se puede dar esto, es que se superen los límites de detección del equipo utilizado, debido a un cambio en el tamaño de partícula. Otra de las razones puede ser debida a que la coloración rosa antes mencionada, pudo provocar que no se alcanzara la suficiente transmitancia para poder determinar el tamaño.

Entonces para los lotes de las dispersiones líquido-cristalinas obtenidas se encontró que no son estables con el tiempo, a ninguna de las temperaturas probadas y en ninguno de los materiales utilizados.

12.4.3 Valor de pH de los CLLK

El pH de una formulación es una de características que hay que tener en cuenta, por lo que el formulador tendrá que buscar la compatibilidad de la fórmula, el ketoconazol tiene una estabilidad máxima en un pH de 5-9 (Skiba *et al.*, 2000), y la vía de aplicación al que es destinada, todo para no causar irritación o cualquier otro perjuicio.

La disminución de los valores de pH en las muestras de CLLK es uno de los cambios más evidentes, y cuya tendencia se observa principalmente en los materiales de PBDE y PP. La disminución en el pH de las muestras que contienen ketoconazol, ya ha sido reportado; Skiba *et al.*, (2000) determinaron la estabilidad del ketoconazol en disoluciones acuosas, observaron que hay una disminución del pH para las disoluciones alcalinas y un aumento del pH para las disoluciones ácidas, tendiendo hacia valores de ≈ 5 , para después aumentar sus valores nuevamente, aunque ellos

no discuten sobre el porqué de esta tendencia; no es de extrañar que en el caso de los CLLK se dé esta tendencia, ya que aproximadamente el 95% de la formulación es agua. A pesar del cambio de pH, este tipo de dispersiones líquido-cristalinas son muchas veces destinadas a la aplicación tópica, y en el caso de la piel, ésta puede soportar mejor el pH ácido (pH 3-9, en sus límites) que el alcalino (Aulton, 2004). En el caso de los valores mayores de pH en las formulaciones de VD, pueden deberse, a que durante la fabricación del VD, se utilizan sustancias alcalinas, las cuales dejan trazas que pueden ser cedidas a medios acuosos subiendo el pH; el vidrio Tipo III es el que puede causar lo antes mencionado, pero normalmente solamente constituye un factor importante cuando se trata de disoluciones inyectables, en ese caso se utiliza el vidrio tipo I y II (Vila Jato & Lastres García, 2009). A diferencia del VD, los materiales plásticos utilizados no contienen sustancias alcalinas que contrarresten la disminución del pH en las cremas.

El pH de la dispersión líquido-cristalina en estudio (CLLK y CLLP) se ve alterada con el tiempo, hacia valores ácidos de ≈ 5 para los materiales de PBDE y PP.

12.4.4 Valoración del ketoconazol en los CLLK

Uno de los principales factores para la degradación del ketoconazol, al igual que para la mayoría de las moléculas, es la temperatura. La temperatura es un factor muy importante en el caso de las formulaciones que son acuosas, como es el caso de los CLLK.

En los resultados obtenidos, no se observa el efecto esperado de la temperatura sobre la potencia, ya que a los 3 y 5 meses se esperaría una mayor caída de la potencia en las muestras que se observan a estabilidad acelerada, sin embargo, en las muestras en estabilidad intermedia se observa en general una menor potencia a medida que transcurre el tiempo. De acuerdo con la NOM 073, un cambio del $\pm 5\%$ de potencia es indicativo de inestabilidad, pero faltaría revisar si las concentraciones del ketoconazol más bajas que se obtuvieron (70%) son aún activas contra algún tipo de hongo, lo cual justificaría su uso.

La potencia del ketoconazol en las dispersiones líquido-cristalinas disminuyen hasta un 70%, principalmente en las condiciones intermedias de estabilidad.

12.5 Protocolo de estabilidad de la crema/CLLK

12.5.1 Signo de la emulsión

Algunas de las características de las emulsiones son dadas por el tipo de signo que tienen, por ejemplo, las emulsiones W/O son más emolientes, pero difícilmente lavables, mientras que las emulsiones O/W son más agradables al tacto y más lavables (Vila Jato & Lastres García, 2009).

Dada la cantidad y el tipo de excipientes (alcohol cetílico, alcohol estearílico, propilenglicol, etcétera) usados para la formulación de las cremas, es normal que su naturaleza sea O/W. Los excipientes de este tipo de formulaciones hacen que no sean oclusivas, pero la inclusión de hidrótrofos que retardan la evaporación del agua y que a la vez permitan una mejora en la permeación en la piel, les da grandes beneficios (Vila Jato & Lastres García, 2009). En este caso el propilenglicol permite las dos características, ser un hidrótrofo y además mejora la permeación pasiva de los fármacos, que se explica con base en el parámetro de solubilidad en el estrato córneo, por ejemplo, se ha reportado que el propilenglicol incrementa la permeación del metromidazol, ya que el parámetro de solubilidad del estrato córneo ($9.8 \text{ cal/cm}^3)^{1/2}$ es desplazado en dirección del parámetro de solubilidad del fármaco ($13.8 \text{ cal/cm}^3)^{1/2}$, por el propilenglicol (parámetro de solubilidad $14 \text{ (cal/cm}^3)^{1/2}$) (Moser *et al.*, 2001).

Los excipientes que dan a las cremas su signo característico la hacen más aceptable para su aplicación, además de la posibilidad de mejorar la permeación del ketoconazol en la piel.

12.5.2 Tamaño de la partícula de las cremas

El tamaño de partícula de una emulsión aporta información sobre su estabilidad cinética y consecuentemente sobre si hay alguna separación de las fases, por lo que éste es una de las principales caracterizaciones en los sistemas dispersos heterogéneos.

Los resultados obtenidos mostraron en general para ambas formulaciones y en las dos condiciones de estabilidad, fluctuaciones en el tamaño de la partícula, a pesar de esto se pueden hacer observaciones interesantes. Una de ellas, es que el tamaño de la gota de la crema/agua tiende a incrementar al final del periodo de estabilidad, esta tendencia se observa principalmente en las condiciones de estabilidad acelerada y en menor grado en las condiciones intermedias. Una de las principales causas por las que se da este comportamiento, puede deberse a la temperatura; ya que ésta afecta directamente a la viscosidad, y ésta a su vez afecta a la velocidad de sedimentación o cremado de las partículas (McClements, 2007), generalmente, la viscosidad disminuye si la muestra es calentada (Thomas, 2014), y esto puede promover un cambio en la velocidad de sedimentación o cremado de las gotas de la emulsión, permitiendo que haya una mayor interacción entre ellas y que algunas crezcan a expensas de otras. Para la crema/CLLK, como se mencionó anteriormente, la mayor estabilidad de la gota de emulsión puede ser atribuida al incremento de la fuerza mecánica de la interfase aceite/agua y la fijación de las gotas de la emulsión a la fase líquido cristalina (Lavaselli *et al.*, 2012).

En todo caso, al final del periodo de estabilidad, las muestras de crema/CLLK contienen partículas con un tamaño en un intervalo que todavía es aceptable para su uso.

12.5.3 Valor de pH de las cremas

Al igual que las dispersiones líquido-cristalinas, las cremas también son destinadas a su uso por vía tópica, por lo que es un factor a analizar.

En el caso de las muestras de crema/agua y crema/CLLK, al igual que para las muestras de CLLK, también disminuyeron en el pH con el paso del tiempo. Una de las principales observaciones es que a diferencia de las muestras de crema/CLLK a condiciones intermedias, las muestras de crema/agua tienen una menor variación del pH con el tiempo. En todo caso la variación del pH de las formulaciones para la aplicación tópica resulta en un problema cuando estas formulaciones son alcalinas y pueden causar irritación.

La NOM-073 indica que, para las formulaciones semisólidas, el pH solamente debe cumplir con el criterio para su aplicación, en este caso para la aplicación tópica, el pH al final del periodo de estabilidad estuvo de acuerdo con lo reportado en la literatura.

12.5.4 Valoración de los lotes de crema

Uno de los aspectos más importantes para la estabilidad de los fármacos es el pH, por lo que a veces la degradación del principio activo va de la mano de este factor.

Se sabe que el ketoconazol es sensible a la degradación a pH ácidos. Durante el seguimiento del pH de las muestras de crema/agua, éste varió ligeramente en las condiciones intermedias de estabilidad, y eso también se ve reflejado en la valoración del ketoconazol, la cual se encuentra dentro del intervalo de potencia; por el contrario, a las muestras de crema/agua en condiciones aceleradas, donde solamente una muestra se encuentra dentro del intervalo, dado que también la degradación del ketoconazol depende de la temperatura (Skiba *et al.*, 2000). En los ensayos de estabilidad intermedia, las muestras de crema/CLLK no resisten estas condiciones, ya que casi todas las muestras salen del intervalo de potencia, con un 60% para la muestra más baja y 110 % para la más baja; lo mismo sucede en las condiciones aceleradas, donde se alejan aún más del intervalo de potencia, 45% en el valor más bajo y 145% en el más alto. Además de que ketoconazol es sensible al pH, también hay otros factores que afectan a la degradación de éste, como es la oxidación y que se pueden estar sumando a la degradación del ketoconazol.

Las muestras de crema sometidas a las condiciones de estabilidad acelerada e intermedia, pierden más del 5% de potencia que es marcada como límite por la NOM 073.

12.6 Estabilidad de las cremas frente a la centrifugación

El uso de una centrifuga permite acelerar la velocidad de formación del cremado o sedimentos, por lo que esta prueba sirve para predecir la estabilidad preliminar de una emulsión. Generalmente se proponen condiciones estándar para este ensayo, como son las revoluciones por minuto, el tiempo y la temperatura, al final se considera que la emulsión es estable si no hay separación de las fases.

Los CCR utilizados no son lo suficientemente fuertes para desestabilizar la crema/CLLK mientras que la crema/agua se desestabilizó a 19420 G. La estabilidad de la crema/CLLK se puede explicar por la presencia de los CLL en la emulsión, el incremento de la estabilidad es atribuida al incremento de la fuerza mecánica de la interface y la fijación de las gotas de la emulsión a la fase líquido-cristalina (Lavaselli *et al.*, 2012).

La inestabilidad de la crema/agua entonces puede ser debida a la falta de la fase líquido-cristalina. Mientras que toda la estabilidad que muestra en las dos primeras condiciones de centrifugación puede ser resultado de un tamaño de gota monodisperso. Las emulsiones consistentes en gotas “monodispersas” con radios mayores a 1 μm se separan en dos capas distintas con las gotas formando una crema o sedimento dejando un supernadante líquido o capa de “suero” usualmente transparente por que no contiene gotas que dispersen la luz, situación que es observada raramente en la práctica, (McClements, 2007; Tadros, 2016) aunque fue el caso de la crema/agua.

La crema que contiene a los CLLK como fase dispersante muestra una mayor estabilidad en las pruebas de centrifugación, en comparación con la crema que contiene agua como fase dispersante.

12.7 Análisis reológico de las cremas que contienen CLLK

Los análisis reológicos brindan información más allá de las propiedades bajo flujo y deformación de los materiales, ya que mediante la reología de flujo oscilatorio de pequeña amplitud de deformación también es posible obtener información sobre la estabilidad cinética de los diferentes sistemas dispersos heterogéneos, entre ellos las emulsiones.

En los resultados del barrido de amplitud se obtuvo el IVL, necesario para llevar a cabo las siguientes pruebas, además muestra los primeros indicios de la estabilidad; todas las muestras de crema muestran un predominio de G' sobre G'' , un comportamiento normal de las dispersiones con una consistencia tipo gel, en este tipo de materiales se espera cierta firmeza y estabilidad, incluso si tienen una

estructura de un gel débil (Thomas, 2014). Para tener mayor certeza en cuanto a la estabilidad, se realizan los barridos de temperatura y de flujo oscilatorio (frecuencia).

El barrido de temperatura se enfoca principalmente en obtener información adicional sobre el ablandamiento y fusión de las muestras, para relacionarlo con el tipo de estructura.

En el caso de las formulaciones de crema, debido a que básicamente las gotas que forman la emulsión forman una red molecular (debido a las fuerzas de Van der Waals) que no está químicamente unida, se espera que el aumento de la temperatura haga que las cremas se comporten como un polímero amorfo. En los polímeros amorfos, las cadenas de moléculas no están químicamente unidas y muestran una superestructura no homogénea, comparado con las fibras, las moléculas del polímero sufren una desestructuración debida a la temperatura, hasta alcanzar un carácter de un líquido viscoelástico (Thomas, 2014). Algunos autores han demostrado mediante análisis termogravimétrico que hay una pérdida del agua existente entre las capas de CLL laminares que rodean a las gotas de las emulsiones, por lo que en las cremas que contienen CLL se dan cambios estructurales adicionales con el aumento de la temperatura (Kónya *et al.*, 2003). Un aspecto a destacar, es que la crema/CLLK tiene una $\tan(\delta)$ escalonada, posiblemente debido a existe más de un proceso que destruye las estructuras de la crema, por una parte, la estructura de CLLK que rodea a las gotas de la emulsión, por otro lado, las gotas de la emulsión.

El barrido de frecuencia nos brinda información sobre la estabilidad cinética de un sistema disperso, ya que la frecuencia es el inverso del tiempo, el barrido de frecuencia nos permite conocer que pasa en la estructura de una emulsión con el paso del tiempo, es decir nos informa de la estabilidad preliminar del sistema.

Los valores de los módulos bajo flujo oscilatorio concuerdan con lo reportado por otros autores para las formulaciones de crema en las que se observó la presencia de CLL laminares mediante microscopía de luz polarizada (Isaac *et al.*, 2013). Se sabe que valores de $G' \leq 1$ Pa difícilmente tienen suficientemente estabilidad bajo flujo para cualquier aplicación práctica, mientras que en el presente trabajo para todas las muestras en los tres materiales se obtuvieron valores de G' superiores a 500 Pa, que

se encuentran en el intervalo descrito por Thomas (2014) para los geles viscoelásticos (cremas, ungüentos, pastas, cosméticos, etc.). Las formulaciones de crema en los tres materiales muestran cierta estabilidad, aunque no se puede decir que sean sistemas completamente estables, ya que las curvas tienen cierta pendiente, por lo que hay cierta dependencia de los valores de G' y G'' con la frecuencia. En el caso del análisis de calidad de los sistemas dispersos, los valores de frecuencia a partir de 0.1 o 0.5 (rad/s) sirven para darnos una idea de la estabilidad en reposo, se puede decir ciertamente que hay estabilidad suficiente, porque G' predomina sobre G'' en todo el intervalo de frecuencias (hay un comportamiento pseudosólido).

Debido a un comportamiento muy similar de las cremas/CLLK y la crema/agua durante el barrido de frecuencia, se optó por la determinación de la pendiente de la curva para determinar que formulación es más estable, además si el material de empaque tiene algún efecto sobre la estabilidad. Las pendientes más pequeñas son indicadoras de mayor estabilidad, debido a la menor dependencia con la frecuencia y por lo tanto del tiempo; como se puede observar, en los tres materiales la crema/agua es la que tiene pendientes ligeramente más elevadas, por lo que éstas muestran mayor inestabilidad, lo cual también se demuestra con las pruebas de estabilidad frente a la centrifugación. En cuanto a los materiales de empaque, la muestra de crema/agua en PBDE es la que muestra una pendiente más grande, junto con las muestras de crema en el envase de vidrio; el PBDE siempre se ha considerado un buen material de empaque en relación con su precio, pero es un material muy permeable a la humedad, oxígeno, y otros gases. En el caso del VD existe la creencia de que es un mejor envase, ya que prácticamente no sufre problemas de permeabilidad que sufren los plásticos, pero si se han reportado problemas de alcalinidad, además de su precio elevado y fragilidad. Mientras que el PP tiene menores problemas de permeabilidad en comparación con el PBDE y tiene un costo menos elevado que el vidrio (Vila Jato & Lastres García, 2009).

Con los reogramas obtenidos, la crema/CLLK muestra mayor estabilidad cinética, la crema contenida en el material de PP es la que muestra una mejor estabilidad bajo las condiciones de flujo de estudio.

12.8 Cinética de liberación de ketoconazol desde la crema que contiene a los CLLK

Las Pruebas de Liberación *In Vitro* (PLIV) son usadas para monitorear la liberación y difusión de los fármacos a partir de las formas farmacéuticas semisólidas. La aplicación tiene varios beneficios durante el desarrollo de un producto, como la identificación de variables de manufactura críticos, predecir el rendimiento *in vivo*, medir el rendimiento y uniformidad de un producto lote a lote (Kanfer *et al.*, 2017). Hasta ahora no hay un consenso sobre el método o aparato que hay que usar para medir la liberación del fármaco a partir de los semisólidos o sistemas nanoparticulados (Shen & Burgess, 2013), aunque la FDA recomienda el uso de las celdas de Franz (Center for Drug Evaluation and, 1997), por ejemplo, para determinar la liberación de las pomadas genéricas de Aciclovir (Kanfer *et al.*, 2017).

A pesar del no consenso sobre el aparato o el método para las pruebas de liberación *In vitro* para aplicación tópica, los métodos de diálisis son ampliamente utilizados en este tipo de investigaciones para determinar los perfiles de liberación de los liposomas, emulsiones, nanopartículas poliméricas y también los nanoacarreadores lipídicos.

Para entender los perfiles de liberación del ketoconazol a partir de las cremas, es necesario primero entender el fenómeno detrás de estos, por lo que hay que analizar primero los modelos a los que mejor ajustan, mediante su R^2 ajustado y AIC. El AIC es una medida de la calidad con la que el modelo se ajusta a los datos experimentales (Domínguez-Viveros *et al.*, 2009). En el caso de las tres formulaciones de crema, los modelos que mejor se ajustan a los perfiles de liberación son el de Weibull, Korsmeyer-Peppas y el de Higuchi. El modelo de Weibull es un modelo matemático sin base fisicoquímica que se puede aplicar a los procesos de disolución de los fármacos, por lo que a pesar de ser el modelo que mejor se ajusta a las tres formulaciones de crema, no explica el fenómeno detrás de la liberación de fármaco,

por lo que puede ser descartado (Aguilar Ros, 2014). El siguiente modelo que mejor se ajusta a las formulaciones es el de Korsmeyer-Peppas, este modelo tiene la ventaja de dar una aproximación a los mecanismos de liberación del fármaco a partir de una matriz a partir de un exponente n . Este modelo propone: que si $n=1$, la velocidad de liberación es constante con el tiempo, por lo tanto, la cinética de liberación es de orden cero y el paso limitante sería la relajación de la matriz. Si $n=5$, la velocidad de liberación sigue una cinética de tipo fickiano, donde la liberación estaría controlada por la difusión. Si $n=0.5 < n < 1$, habría un aporte simultáneo de la velocidad de liberación, de los procesos de difusión y relajación, conociéndose como liberación anómala (Andretta, 2003). En el caso de las cremas, todas las formulaciones tienen un exponente n superior a 5, característico de una liberación anómala. Una parte importante que apoya a estos resultados, se deben a que el modelo de Higuchi también se ajusta con los perfiles de liberación de las cremas, lo cual apoya en parte la liberación del ketoconazol por un mecanismo de relajación de la crema, característica de varias formulaciones semisólidas (Brown *et al.*, 2011). Por otro lado, considerando que los CLL en forma laminar se sitúan alrededor de las gotas de la emulsión, una propuesta es que las moléculas del ketoconazol estén atrapadas entre las moléculas de tensoactivo que conforman a los CLL, y que estas laminas sean las que controlen la liberación del ketoconazol gradualmente, además una cierta cantidad del fármaco en las capas exteriores se liberan por difusión.

En cuanto al porcentaje de liberación de la crema/CLLK (12%), la crema/CLLP (13%) y la crema/agua (25%), se puede atribuir a los mecanismos antes mencionados. Aunque estadísticamente se observó que sí hay una diferencia entre las líneas de regresión ajustadas de los perfiles de liberación de la crema/CLLK y la crema/agua, que no es necesariamente debida al modelo de liberación al que se ajusta, en cambio, como se había observado anteriormente, el modelo de los CLL alrededor de las gotas de la emulsión proveen una barrera adicional que deben librar las moléculas del fármaco para su liberación, en cambio la crema/agua al no contar con esta barrera puede permitir el paso de una mayor cantidad de moléculas del fármaco en el mismo tiempo. La necesidad de una liberación sostenida para los fármacos para aplicación tópica puede ser ventajosa, cuando se trata de moléculas que tienen un tiempo de

vida corto (Joshny *et al.*, 2018) o que deben extender su efecto local, como son los analgésicos.

A partir de la información obtenida, se entiende que las cremas que contienen a las dispersiones líquido-cristalinas tienen una liberación sostenida del ketoconazol, la cual es explicada por el mecanismo de liberación anómala.

12.9 Permeación del ketoconazol a partir de la crema/CLLK

Obtener una liberación modificada de un fármaco a partir de una formulación destinada a la aplicación tópica, no garantiza que el fármaco permee en la piel, por lo que es necesario demostrar que éste puede atravesar o ser retenido en la piel.

Un aspecto a destacar, a pesar de haber podido hacer la cuantificación del ketoconazol apropiadamente, es la obtención de una respuesta debida al ketoconazol a partir de su extracción de las membranas de piel. El objetivo de los antibióticos tópicos, son los organismos de la superficie; por lo tanto, una biodisponibilidad superficial eficaz exige que el preparado libere el antibiótico en ese sitio, para que pueda atravesar las fisuras de la piel y alcance al microorganismo, por lo que los ensayos pertinentes deben al menos confirmar que la matriz libera al fármaco (Aulton, 2004). El problema de las concentraciones negativas que se obtuvieron durante la valoración del ketoconazol se debe en principio a que las concentraciones se salen del intervalo de las concentraciones de la curva de calibración utilizada que se utilizó, en este caso las concentraciones probablemente están por debajo del último punto de la curva, que corresponde a la concentración de 25 µg/ml.

A pesar de que con el método analítico utilizado no fue posible cuantificar la concentración del analito, con los resultados anteriores fue posible evidenciar la retención del ketoconazol en la piel de oreja de cerdo.

13. CONCLUSIONES

- El sistema líquido cristalino liotrópico obtenido (CLL) presentó las características de un sistema disperso de tamaño coloidal, con un tamaño de partícula promedio en el intervalo de nanómetros; habiendo mostrado transición de fase con la incorporación del ketoconazol (CLLK).
- El sistema líquido cristalino obtenido cargado con ketoconazol (CLLK), no fue estable químicamente, ya que después de tres meses en condiciones de estudio de estabilidad acelerada e intermedia, las muestras no cumplieron con los criterios de estabilidad de color y de contenido; lo cual se puede atribuir a la oxidación del activo y a que el material polimérico del envase primario no fue impermeable.
- La crema que contiene a los cristales líquidos liotrópicos (crema/CLLK) es estable cinéticamente, de acuerdo a:
 - 1) Las pruebas de estabilidad a la centrifugación, ya que no hubo separación de fases en las condiciones más drásticas de centrifugación probadas.
 - 2) Las pruebas de reología de flujo oscilatorio de pequeña amplitud de deformación, en particular las de barrido de flujo de frecuencia; habiendo mostrado una menor dependencia de los valores de los módulos con la frecuencia.
 - 3) La ausencia de separación de fases en la crema durante las pruebas de estabilidad acelerada e intermedia; manteniendo un tamaño de partícula aceptable, que sólo varió en un rango aceptable de los 50 a 90 μm los 5 meses de estabilidad acelerada.

Dichas propiedades no fueron cumplidas por la crema elaborada con agua como única fase dispersante.

- El perfil de liberación de ketoconazol en la crema con cristales líquidos liotrópicos (crema/CLLK) mostró ser de liberación modificada, del tipo difusión anómala; además el perfil de liberación tuvo diferencias significativas con el perfil de liberación de la crema preparada sólo con agua como fase dispersante.

- A partir de las pruebas de permeabilidad, hay una primera evidencia sobre la permeación y retención del ketoconazol en la piel de cerdo.
- La inclusión de un sistema líquido cristalino cargado con ketoconazol en una crema para uso tópico, otorga estabilidad cinética al producto y le confiere propiedades de liberación modificada del activo, lo que lo hace un sistema potencialmente útil para la administración tópica de ketoconazol, sin embargo, habrá que incorporar un agente antioxidante a la fórmula para determinar si ello le proporciona la estabilidad química al activo, requerida para uso medicinal. o

14. PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ Evaluar el efecto de la incorporación de un antioxidante en la formulación de la crema/CLLK; con lo cual se espera proporcionar estabilidad química al principio activo.
- ✓ Mejorar el método analítico para la crema, para poder valorar la cantidad de ketoconazol permeado en la piel de cerdo; procurando obtener las condiciones en que no se requiera tanta inversión de tiempo en la preparación de las muestras.
- ✓ Analizar si la potencia expresada como Concentración Mínima Inhibitoria de la crema/CLLK (con cristales líquidos liotrópicos) es equiparable o superior al valor de Concentración Mínima Inhibitoria del sistema (CLLK) líquido cristalino cargado con Ketoconazol (Santiago Téllez, A. 2014.Tesis MCF. UAMX. México)

15. REFERENCIAS

- Abdel-Moety, E. M., Khattab, F. I., Kelani, K. M., & AbouAl-Alamein, A. M. (2003). Chromatographic determination of clotrimazole, ketoconazole and fluconazole in pharmaceutical formulations. // *Farmaco*, 57(11), 931-938.
- Aguilar Ros, A. (2014). *Biofarmacia y farmacocinética: ejercicios y problemas resueltos*. Barcelona: Elsevier.
- Als-Nielsen, J., & McMorrow, D. (2017). *Elements of modern X-ray physics* (2a ed.). United Kingdom: John Wiley & Sons.
- Amar-Yuli, I., Wachtel, E., Shoshan, E. B., Danino, D., Aserin, A., & Garti, N. (2007). Hexosome and Hexagonal Phases Mediated by Hydration and Polymeric Stabilizer. *Langmuir*, 23(7), 3637-3645.
- Andreetta, H. A. (2003). *Farmacos de Accion Prolongada: Mecanismos de Liberacion. Usos de Distintos Modelos*. Acta farmacéutica bonaerense: publicación del Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires (Argentina). 22, 355-364.
- Apiwongngam, J., Limwikrant, W., Jintapatanakit, A., & Jaturanpinyo, M. (2018). Enhanced supersaturation of chlortetracycline hydrochloride by amorphous solid dispersion. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 47, 417-426
- Arenas Guzmán, R. (2000). *Micología médica ilustrada* (4a. ed.). México: Mc Graw Hill
- Atkins, P. W., & Jones, L. (2013). *Principios de química: los caminos del descubrimiento*. Buenos Aires; Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Aulton, M. E. (2004). *Farmacia: la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. Madrid: Elsevier.
- Banker, G. S. (2002). *Modern pharmaceuticals*. New York: Marcel Dekker.
- Beaucage, G. (1996). Small-Angle Scattering from Polymeric Mass Fractals of Arbitrary Mass-Fractal Dimension. *JOURNAL OF APPLIED CRYSTALLOGRAPHY*, 29(2), 134-146.
- Bitan-Cherbakovsky, L., Aserin, A., & Garti, N. (2013). Structural characterization of lyotropic liquid crystals containing a dendrimer for

solubilization and release of gallic acid. *Colloids Surf. B Biointerfaces Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112, 87-95.

- Boldon, L., Laliberte, F., & Liu, L. (2015). Review of the fundamental theories behind small angle X-ray scattering, molecular dynamics simulations, and relevant integrated application. *Nano reviews*, 6.
- Botch, P. G., & Corona, V. H. L. (2017). *Difracción y fluorescencia de rayos X* (1 ed.). México: Terracota
- Bragg, W. L. (1968). *X-Ray crystallography*. San Francisco: W.H. Freeman.
- Brown, C. K., Friedel, H. D., Barker, A. R., Buhse, L. F., Keitel, S., Cecil, T. L., *et al.* (2011). FIP/AAPS Joint Workshop Report: Dissolution/In Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms. *Indian journal of pharmaceutical sciences.*, 73(3), 338-353.
- Center for Drug Evaluation and, R. (1997). *Guidance for industry: nonsterile semisolid dosage forms: scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls: in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation*.
- Chávez, G., Parra, I., Luzardo, M., Bravo, B., & Márquez, N. (2013). Characterization of liquid crystals by optical microscopy in polyethoxylated surfactant-alkane-water systems. *Quím. Nova*, 36(9), 1343-1347.
- Chen, Y., Ma, P., & Gui, S. (2014). Cubic and Hexagonal Liquid Crystals as Drug Delivery Systems. *BioMed Research International*, 2014, 1-12.
- Domínguez-Viveros, J., Rodríguez-Almeida, F. A., Ortega-Gutiérrez, J. A., & Flores-Mariñelarena, A. (2009). Selección de modelos, parámetros genéticos y tendencias genéticas en las evaluaciones genéticas nacionales de bovinos Brangus y Salers. *Agrociencia*, 43(2), 107-117.
- Gazga, U. C. (2015). *Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y de la cinética de difusión percutánea in vitro de cristales líquidos liotrópicos cargados con ketoconazol* (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad: Xochimilco
- Goodwin, J. W., & Hughes, R. W. (2008). *Rheology for chemists an introduction*. Cambridge, UK: RSC.

- Guo, C., Wang, J., Cao, F., Lee, R. J., & Zhai, G. (2010). Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. *Drug discovery today.*, 15(23), 1032.
- Heimo, S., & Singh, Y. (2013). *The SAXS Guide: Anton Paar GmbH.*
- HORIBA. (2017). A guidebook to particle size analysis Available from https://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/PSA/PSA_Guidebook.pdf
- Isaac, V. L. B., Moraes, J. D. D., Chiari, B. G., Guglielmi, D. A. S., Cefali, L. C., Rissi, N. C., *et al.* (2013). Determination of the Real Influence of the Addition of Four Thickening Agents in Creams Using Rheological Measurements. *JOURNAL OF DISPERSION SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 34(4), 532-538.
- Jacques, D. A., & Trehwella, J. (2010). Small-angle scattering for structural biology Expanding the frontier while avoiding the pitfalls. *PRO Protein Science*, 19(4), 642-657.
- Jilavenkatesa, A., Dapkunas, S. J., & National Institute of Standards and, T. (2001). NIST recommended practice guide: particle size characterization.
- Joshny, J., Hari, V., & Devi, R. (2018). Experimental optimization of Lornoxicam liposomes for sustained topical delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112(3), 38-51.
- Kanfer, I., Rath, S., Purazi, P., & Mudyahoto, N. A. (2017). In Vitro Release Testing of Semi-Solid Dosage Forms. *Dissolution Technologies*, 24(3), 52-60.
- Kikhney, A. G., & Svergun, D. I. (2015). A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. *FEBS letters*, 589(19), 2570-2577.
- Kim, I. Y., Nakagawa, S., Ri, K., Hashimoto, S., & Masaki, H. (2009). Liquid Crystal O/W Emulsions to Mimic Lipids and Strengthen Skin Barrier Function. *COSMETICS AND TOILETRIES*, 124(7), 64-73.
- Kónya, M., Sorrenti, M., Ferrari, F., Rossi, S., Csóka, I., Caramella, C., *et al.* (2003). Study of the microstructure of o/w creams with thermal and rheological methods. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 73(2), 623-632.

- Lachman, L., & Liebermann, H. A. (2013). The Theory and practice of industrial pharmacy. New Delhi: CBS Publishers & Distributors Pvt. Ltd.
- Lai-Cheong, J. E., & McGrath, J. A. (2009). Structure and function of skin, hair and nails. *MEDICINE -ABINGDON-*, 37(5), 223-226.
- Lavaselli, S. A., Pedemonete, C. I., Mazon, J. I., Lillini, G. J., Pasquali, R. C., & Riquelme, B. (2012). Rheological behavior of liquid-crystalline emulsion of topic application with econazole nitrate. *Series on Biomechanics*, 27(3-4), 34-38.
- Lazzari, S., Nicoud, L., Jaquet, B., Lattuada, M., & Morbidelli, M. (2016). Fractal-like structures in colloid science. *Advances in colloid and interface science*, 235, 1-13.
- Lieberman, H. A. (1996). *Pharmaceutical dosage forms: disperse systems: in 2 volumes. 2 2.* New York u.a.: Dekker.
- Márquez, A. L., Palazolo, G. G., & Wagner, J. R. (2005). Emulsiones tipo crema preparadas a base de leche de soja 1: Estudios de estabilidad y determinación de las formulaciones. *Grasas y Aceites*, 56(1), 59-66.
- Martin, A. N., Sinko, P. J., & Singh, Y. (2011). *Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences physical chemical and biopharmaceutical principles in the pharmaceutical sciences.* Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins.
- Martínez, L. M., Videa, M., López Silva, T., Castro, S., Caballero, A., Lara-Díaz, V. J., *et al.* (2017). Two-phase amorphous-amorphous solid drug dispersion with enhanced stability, solubility and bioavailability resulting from ultrasonic dispersion of an immiscible system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 119, 243-252.
- McClements, D. J. (2007). Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. *crit rev food sci nutr Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(7), 611-649.
- McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *SM Soft Matter*, 7(6), 2297-2316.
- Mhaske, R. A., & Sahasrabudhe, S. (2011). Identification of Major Degradation products of Ketoconazole. *SCIENTIA PHARMACEUTICA*, 79(4), 817-836.

- Moser, K., Kriwet, K., Naik, A., Kalia, Y. N., & Guy, R. H. (2001). Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 52(2), 103-112.
- Mota, A. H., Rijo, P., Molpeceres, J., & Reis, C. P. (2017). Broad overview of engineering of functional nanosystems for skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 532(2), 710-728.
- Mota, A. H., Rijo, P., Reis, C. P., & Molpeceres, J. (2017). Broad overview of engineering of functional nanosystems for skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 532(2), 710-728.
- Mulet, X., Boyd, B. J., & Drummond, C. J. (2013). Advances in drug delivery and medical imaging using colloidal lyotropic liquid crystalline dispersions. *Journal of Colloid And Interface Science*, 393, 1-20.
- Muller, F., Degrouard, J., & Salonen, A. (2013). Stabilization of Lipid-Based Lyotropic Liquid Crystalline Phases by Nanoparticles: Perspectives for Colloid-Isosomes. *BS: ADPLAN*, 18, 209-236.
- Nakano, M., Teshigawara, T., Sugita, A., Leesajakul, W., Taniguchi, A., Kamo, T., *et al.* (2002). Dispersions of Liquid Crystalline Phases of the Monoolein/Oleic Acid/Pluronic F127 System. *LANGMUIR*, 18, 9283-9288
- Nature. (2018). Particle physics - Latest research and news | Nature. from <https://www.nature.com/subjects/particle-physics>
- OECD. (2004). Test No. 427: Skin Absorption: In Vivo Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris: OECD Publishing.
- Pascuali, C. R. (2006). Estructura líquido cristalina y sus aplicaciones farmacéuticas y cosméticas (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires.
- Pasquali, C. R., Bregni, C., & Serrao, R. (2018). Características e identificación de los cristales líquidos liotrópicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(2), 38-53.
- PERC. (2018). What is a particle?, de <http://perc.ufl.edu/particle.asp>
- Polymerdatabase. (2018). FLORY-HUGGINS PARAMETER AND EXCLUDED VOLUME OF POLYMERS. de <http://polymerdatabase.com/polymer%20physics/Excluded%20Volume2.html>

- Research, C. f. D. E. a. (2018). Drug Safety and Availability - FDA Drug Safety Communication: FDA limits usage of Nizoral (ketoconazole) oral tablets due to potentially fatal liver injury and risk of drug interactions and adrenal gland problems. [WebContent].
- Rober, P. (2018). pair-distance distribution function. de <http://www.bioisis.net/tutorial/5>
- Santiago Téllez, A. (2014). Determinación del efecto antimicótico de ketoconazol incorporado en cristales líquidos en *C. albicans*. Tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Schramm, G. (2004). A practical approach to rheology and rheometry. Karlsruhe: Thermo Electron.
- Shen, J., & Burgess, D. J. (2013). In Vitro Dissolution Testing Strategies for Nanoparticulate Drug Delivery Systems: Recent Developments and Challenges. *Drug delivery and translational research*, 3(5), 409-415.
- Shin, J. (2002). Steric stabilization. 45. Retrieved from http://muri.lci.kent.edu/References/NIM_Papers/stabilization_of_NP_suspensions.htm.
- Sjöblom, J. (2001). Encyclopedic handbook of emulsion technology. New York: Marcel Dekker.
- Skiba, M., Skiba-Lahiani, M., Marchais, H., Duclos, R., & Arnaud, P. (2000). Stability assessment of ketoconazole in aqueous formulations. *International journal of pharmaceutics*, 198(1), 1-6.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2010). Principios de análisis instrumental. México, D.F.: Cengage Learning.
- Staub, I., Flores, L., Gosmann, G., Pohlmann, A., Froehlich, P. E., Schapoval, E. E. S., *et al.* (2010). Photostability studies of ketoconazole: Isolation and structural elucidation of the main photodegradation products. *Lat. Am. J. Pharm. Latin American Journal of Pharmacy*, 29(7), 1100-1106.
- Tadros, T. F. (2014). Formulation of disperse systems: science and technology. Weinheim: Wiley-VCH

- Tadros, T. F. (2016). *Emulsions: formation, stability, industrial applications*. Weinheim: Wiley-VCH
- Thomas, M. (2014). *The Rheology Handbook*. Hannover: Vincentz Network.
- Toshifumi, I., Yukitaka, T., & Kenji, A. (2012). Two-step Emulsification Process for Water-in-Oil-in-Water Multiple Emulsions Stabilized by Lamellar Liquid Crystals. *Journal of Oleo Science.*, 61(8), 413-420.
- Tsume, Y., Mudie, D. M., Langguth, P., Amidon, G. E., & Amidon, G. L. (2014). The Biopharmaceutics Classification System: Subclasses for in vivo predictive dissolution (IPD) methodology and IVIVC. *Eur J Pharm Sci*, 57, 152-163.
- Vardanyan, R. S., & Hruby, V. J. (2006). 35 - Antifungal Drugs. In R. S. Vardanyan & V. J. Hruby (Eds.), *Synthesis of Essential Drugs* (pp. 535-547). Amsterdam: Elsevier.
- Vila Jato, J. L., & Lastres García, J. L. (1997). *Tecnología farmacéutica. Vol I. Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*. Madrid: Síntesis.
- Vila Jato, J. L., & Lastres García, J. L. (2009). *Tecnología farmacéutica. Vol. II*. Madrid: Síntesis.
- Viseras, C., Salem, I. I., Galan, I. C. R., Galan, A. C., & Galindo, A. L. (1995). The effect of recrystallization on the crystal growth, melting point and solubility of ketoconazole. *THERMOCHIMICA ACTA*, 268(COM), 143-151.
- Yaghmur, A., & Glatter, O. (2009). Characterization and potential applications of nanostructured aqueous dispersions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 147-148, 333-342.
- Zhang, W., & Liu, L. (2013). Study on the Formation and Properties of Liquid Crystal Emulsion in Cosmetic. *JCDSA Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 03(02), 139-144.