



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Proyecto de servicio social:

**Evaluación de la influencia de agentes antioxidantes en la
estabilidad de las dispersiones líquido-cristalinas**

Proyecto genérico: Modificaciones físicas de fármacos y desarrollo de
medicamentos

Lugar de realización: Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada
(N-106)

Periodo: 11 de julio de 2022 al 11 de enero de 2023

Presenta: Gustavo Rocha Ceballos

Matrícula: 2173066523

Asesores:

Dr. Abraham Faustino Vega

Dr. Carlos Tomás Quirino
Barreda

Ciudad de México, Marzo de 2023

ÍNDICE

1	Índice de figuras.....	4
2	Índice de tablas	5
3	Resumen	8
	Abstract	9
4	Introducción.....	10
5	Objetivos	11
5.1	Objetivo general.....	11
5.2	Objetivos específicos	11
6	Marco teórico.....	12
6.1	Sistemas lipídicos para administración de fármacos.....	12
6.2	Cristales líquidos	13
6.2.1	Cristales termotrópicos y liotrópicos	14
6.2.2	Métodos de preparación de CL	15
6.2.3	Síntesis de nanopartículas aplicando ultrasonificación.....	16
6.2.4	Aplicación de CL en sistemas farmacéuticos.....	20
6.3	Ketoconazol.....	23
6.4	Oxidación.....	26
6.4.1	Oxidantes	27
6.4.2	Estrés oxidativo.....	29
6.5	Antioxidantes.....	31
6.5.1	Clasificación de antioxidantes	33
6.5.2	BHT	36
6.5.3	Bisulfito de Sodio	37
6.5.4	Vitamina E	38
6.5.5	Acido ascórbico.....	39

6.5.6	Evaluación de efecto antioxidante.....	40
6.6	Caracterización.....	43
6.6.1	Aspecto físico.....	43
6.6.2	Tamaño de partícula.....	43
7	Materiales y métodos.....	45
7.1	Materiales.....	45
7.2	Preparación de las dispersiones de CL	45
7.2.1	Condiciones de ultrasonificación	46
7.3	Adición de antioxidantes	46
7.4	Caracterización.....	47
7.4.1	Aspecto físico	47
7.4.2	Determinación de tamaño de partícula	47
8	Resultados	48
8.1	Adición de antioxidantes	48
8.2	Evaluación de aspecto visual de las dispersiones con antioxidantes	49
8.3	Análisis de tamaño de partícula	57
8.3.1	Análisis de las condiciones de ultrasonificación	57
8.3.2	Análisis de tamaño de partícula de dispersiones con AO	62
9	Discusión	66
10	Conclusiones.....	72
11	Anexos.....	74
12	Referencias	76

1 Índice de figuras

Figura 1. Proceso de cavitación ultrasónica	19
Figura 2. Estructura química del ketoconazol	25
Figura 3. Estructura química del producto de degradación de ketoconazol ...	25
Figura 4. Ecuación representativa de la reacción típica de oxidación	26
Figura 5. Estructura química del butilhidroxitolueno (BHT).....	36
Figura 6. Estructura química del bisulfito de sodio.....	37
Figura 7. Estructura química del alfa-tocoferol (vitamina E).....	38
Figura 8. Estructura química del ácido ascórbico	39
Figura 9. Comparación de la distribución del tamaño de partícula de dos dispersiones líquido cristalinas sin AO	58
Figura 10. Distribución del tamaño de partícula de la dispersion líquido- cristalina sin AO “CL3”	59
Figura 11. Distribución del tamaño de partícula de la dispersion líquido- cristalina sin AO “CL4”	60
Figura 12. Distribución del tamaño de partícula de la dispersion líquido- cristalina sin AO “CL5”	61
Figura 13. Comparación de la distribución de tamaño de partícula de las tres concentraciones utilizadas de BHT.....	63
Figura 14. Comparación de la distribución de tamaño de partícula de las tres concentraciones utilizadas de bisulfito de sodio.....	64
Figura 15. Comparación de la distribución de tamaño de partícula de las tres concentraciones utilizadas de ácido ascórbico.....	65

2 Índice de tablas

Tabla 1. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCBF)	12
Tabla 2. Parámetros que influyen en la ultrasonicación	17
Tabla 3. Propiedades físicoquímicas de los cristales líquidos liotrópicos de interés para el desarrollo de sistemas farmacéuticos	21
Tabla 4. Propiedades de las dispersiones de cubosomas y hexosomas de CL liotrópicos	22
Tabla 5. Propiedades físicoquímicas del ketoconazol	23
Tabla 6. Ejemplos de especies reactivas oxidantes con y sin radicales libres	28
Tabla 7. Procesos de oxidación observados en distintos tipos de sustratos	30
Tabla 8. Mecanismos de acción antioxidante y ejemplos de especies oxidantes y antioxidantes involucradas	32
Tabla 9. Ejemplos de antioxidantes naturales.....	35
Tabla 10. Ensayos para determinar el efecto antioxidante.....	41
Tabla 11. Fórmula cuali-cuantitativa de las dispersiones CL con Ketoconazol	45
Tabla 13. Comparación entre el día 0 y día 30 de las cualidades físicas de las dispersiones hechas con BHT (grupo A).....	50
Tabla 14. Comparación entre el día 0 y día 30 de las dispersiones hechas con bisulfito de sodio (grupo B).....	52
Tabla 15. Comparación entre el día 0 y día 30 de las dispersiones hechas con Vitamina E (grupo C).....	54
Tabla 16. Comparación entre el día 0 y día 30 de las dispersiones hechas con ácido ascórbico (grupo D)	56

Tabla 17. Comparación de los resultados obtenidos durante el análisis de tamaño de partícula de una dispersión líquido-cristalina sin AO sonicada y otra sin sonicar	58
Tabla 18. Resultados del análisis de tamaño de partícula de la dispersion líquido-cristalina sin AO “CL3”	59
Tabla 19. Resultados del análisis de tamaño de partícula de la dispersion líquido-cristalina sin AO “CL4”	60
Tabla 20. Resultados del análisis de tamaño de la dispersion líquido-cristalina sin AO “CL5”	61
Tabla 21. Resultados del análisis de tamaño de partícula de las tres concentraciones utilizadas para BHT	62
Tabla 22. Resultados del análisis de tamaño de partícula de las tres concentraciones utilizadas para bisulfito de sodio	63
Tabla 23. Resultados del análisis de tamaño de partícula de las tres concentraciones utilizadas ácido ascórbico.....	64

3 Resumen

La búsqueda de técnicas que permitan administrar fármacos de poca solubilidad acuosa ha llevado al desarrollo de nuevas formas farmacéuticas tales como los cristales líquidos o sistemas líquido-cristalinos (CL), los cuales son capaces de almacenar fármacos con distintos tipos de solubilidad, polaridad y tamaño. Un ejemplo de un fármaco que se puede incorporar a un sistema de CL es el ketoconazol (KTZ) el cuál es utilizado para tratar distintos tipos de micosis. No obstante, KTZ es una molécula susceptible a degradación por oxidación, por lo que el objetivo de este proyecto fue incorporar al menos tres antioxidantes (AO) distintos a un sistema líquido-cristalino para reducir o inhibir la reacción de oxidación del KTZ.

Se prepararon distintas dispersiones de CL a las que se les adicionó de manera independiente butilhidroxitolueno (BHT), bisulfito de sodio, ácido ascórbico y alfa-tocoferol (vitamina E). Todos los AO utilizados se probaron en 3 concentraciones distintas. Posteriormente, las muestras se caracterizaron por 30 días, considerando el aspecto físico (cambio de color y apariencia) de las dispersiones como el criterio principal para el análisis del efecto antioxidante. Adicionalmente, la estabilidad del sistema líquido-cristalino se evaluó mediante el análisis del tamaño y distribución de las partículas utilizando un difractómetro de luz láser.

Los resultados obtenidos demuestran que BHT es capaz de proteger al fármaco de la degradación por oxidación pero altera la estabilidad del sistema líquido-cristalino. En contraste, el ácido ascórbico mantuvo el sistema estable, pero no se puede asegurar que se haya inhibido la oxidación de KTZ. Como perspectiva a futuro, se sugiere realizar otros ensayos para evaluar el efecto antioxidante de BHT y ácido ascórbico, así como la combinación de estos.

Abstract

The search for techniques to administer drugs with poor aqueous solubility has led to the development of new dosage forms such as liquid crystals or liquid-crystalline systems (LC), which are capable of storing drugs with different types of solubility, polarity, and size. An example of a drug that can be incorporated into a LC system is Ketoconazole (KTZ) which is used to treat different types of mycoses. However, KTZ is a molecule susceptible to degradation by oxidation, so the objective of this project was to incorporate at least three different antioxidants (AO) into a liquid-crystalline system to reduce or inhibit the oxidation reaction of KTZ.

Different LC dispersions were prepared to which butylhydroxytoluene (BHT), sodium bisulfite, ascorbic acid and alpha-tocopherol (vitamin E) were independently added. All the AOs used were tested at three different concentrations. Subsequently, the samples were characterized for 30 days, considering the physical appearance (change of color and appearance) of the dispersions as the main criterion for the analysis of the antioxidant effect. In addition, the stability of the liquid-crystalline system was evaluated by analyzing the size and distribution of the particles using a laser light diffractometer.

The results show that BHT is able to protect the drug from degradation by oxidation but alters the stability of the liquid-crystalline system. In contrast, ascorbic acid kept the system stable, but it cannot be assured that KTZ oxidation was inhibited. As a future perspective, it is suggested to carry out other trials to evaluate the antioxidant effect of BHT and ascorbic acid, as well as the combination of these.

4 Introducción

El desarrollo de nuevos sistemas lipídicos, específicamente los sistemas nanoestructurados, ha cobrado relevancia en los últimos años ya que son sistemas que tienen propiedades óptimas de biocompatibilidad y biodegradabilidad, así como de capacidad disolvente para moléculas insolubles o poco solubles en agua, así como hidromiscibilidad o cualidades de autoemulsificación y favorecen en otros casos la permeabilidad celular; por lo que resultan ideales para administrar fármacos clase II o IV del SCBF (Ochoa Sánchez, 2018; Tan, et al., 2021). Un ejemplo de sistemas lipídicos que pueden utilizarse como vehículos para administrar fármacos son los sistemas líquido-cristalinos, los cuales se pueden considerar nanoemulsiones cuando se dispersa un líquido en otro líquido, o bien, nanosuspensiones cuando se dispersa un sólido en un líquido (Chountoules et al., 2022; Santiago, 2014).

Los cristales líquidos (CL) son sustancias que presentan al menos una fase intermedia entre la fase líquida isotrópica y la fase sólida cristalina; se caracterizan por tener propiedades de un líquido, como la fluidez, la formación y la coalescencia de las gotas, y también tienen propiedades de un sólido cristalino, como la estabilidad mecánica, la anisotropía de propiedades físicas (ópticas, eléctricas y magnéticas) y la disposición periódica de las moléculas (Andrienko, 2018). Estos sistemas líquido-cristalinos suelen tener propiedades específicas, tales como un tamaño de partícula nanométrico o un aspecto óptico translúcido; dichas propiedades pueden ser modificadas con la aplicación de energía extra mediante técnicas como ultrasonificación, la cual se utiliza en la síntesis de nanopartículas ya que la energía ultrasónica es capaz de romper aglomerados de partículas mediante un proceso denominado cavitación, obteniendo partículas más dispersas y con mayor uniformidad en su tamaño.

Algunos tipos de CL producen cubosomas y hexosomas, los cuales poseen excelentes propiedades de carga y liberación de fármacos, por lo que pueden usarse en la fabricación de diferentes tipos de vehículos para sistemas

farmacéuticos a escala nanométrica que se denominan nanopartículas cristalinas líquidas (NPCL) (Jain et al., 2018). Las NPCL son capaces de encapsular al fármaco en una matriz lipídica, lo cual es muy útil para la administración de fármacos poco solubles en agua.

Uno de los fármacos que se pueden utilizar como principio activo en sistemas líquido-cristalinos es el KTZ el cual es reconocido por su acción antimicótica, estando limitado su uso por problemas de intolerancia y para reducir su toxicidad, a la vía tópica (AEMPS, 2013). Sin embargo, uno de los grandes inconvenientes en las formulaciones con KTZ es que es una molécula susceptible a la degradación por oxidación, lo que conlleva a una reducción o pérdida total del efecto terapéutico. Un signo característico de la oxidación del KTZ es que la dispersión o emulsión se torna de una coloración rosácea. No obstante, es posible la protección del fármaco mediante la adición de un antioxidante adecuado. Con base en lo anterior, el propósito del proyecto es evaluar el efecto de algunos antioxidantes (AO) para proteger al KTZ incluido en dispersiones tipo líquido-cristalinas de la degradación por oxidación. Para determinar que producto tiene mejor rendimiento se requiere evaluar las características morfológicas, como el tamaño de partícula y la distribución de las partículas; para ello es necesario el uso de técnicas como difracción de luz láser estática. Al incrementar las condiciones de tiempo, amplitud y frecuencia de los ciclos de ultrasonificación en la síntesis de dispersiones de CL se pueden producir nanosistemas más estables y con mejor rendimiento.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de algunos antioxidantes en la estabilidad fisicoquímica del ketoconazol incluido en fases líquido-cristalinas.

5.2 Objetivos específicos

1. Replicar un método ya establecido en el laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada (N-106), para obtener dispersiones líquido-cristalinas.

2. Optimizar las formulaciones de las dispersiones líquido-cristalinas para determinar qué condiciones de sonicación son las adecuadas.

3. Incorporar al menos tres antioxidantes de manera independiente en las dispersiones para evaluar cuál de ellos proporciona mayor estabilidad al ketoconazol incluido en dichas dispersiones.

6 Marco teórico

6.1 Sistemas lipídicos para administración de fármacos

En los últimos años, la búsqueda de nuevas técnicas de síntesis y administración de fármacos han aumentado exponencialmente, de manera que han surgido una gran cantidad de nuevas moléculas con potenciales efectos terapéuticos, sin embargo, alrededor del 40% de esas moléculas tienen una muy baja solubilidad acuosa, ocasionando una velocidad de absorción limitada y una baja biodisponibilidad oral; esto es importante a considerar en el desarrollo de nuevos sistemas de administración de fármacos porque, de acuerdo con el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCBF), la solubilidad y permeabilidad son las principales propiedades de un fármaco que afectan su absorción oral (Alvarado López, 2015). La tabla 1 muestra las 4 maneras de clasificar a los fármacos según el SCB.

Tabla 1. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCBF)

Categoría	Solubilidad	Permeabilidad
Clase I	Alta	Alta
Clase II	Baja	Alta
Clase III	Alta	Baja
Clase IV	Baja	Baja

Nota. De Ochoa Sánchez (2018)

Los fármacos de la clase II y IV son los que más se comercializan; más del 92% de fármacos enumerados en la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica presentan una mala solubilidad en agua (Alvarado López, 2015), además, la administración oral de estos fármacos tiene otras limitantes como un rápido metabolismo y la falta de un nivel constante del fármaco en sangre o en plasma, de ahí surge la necesidad de buscar nuevas alternativas, por ejemplo, una técnica reciente es utilizar lípidos como vehículo para administrar fármacos pocos solubles (Akula et al., 2014)

Los sistemas lipídicos, específicamente los sistemas nanoestructurados, tienen propiedades óptimas de biocompatibilidad y biodegradabilidad; pueden subdividirse principalmente en sistemas vesiculares (liposomas), nanoemulsiones o nanopartículas lipídicas (Ochoa Sánchez, 2018). Otro tipo de sistemas lipídicos que pueden utilizarse como vehículos son los sistemas coloidales, entre los que destacan las dispersiones de CL las cuales pueden considerarse como nanoemulsiones (cuando se dispersa un líquido en otro líquido) o como suspensiones (cuando se dispersa un sólido en un líquido) debido a que tanto la fase dispersa como la fase dispersante resultan en un fluido ordenado y nanoestructurado (Santiago, 2014).

6.2 Cristales líquidos

Son considerados un estado de agregación de la materia intermedio denominado mesofase debido a que poseen propiedades de un líquido, como la fluidez, y también poseen propiedades de un sólido cristalino, como la estabilidad mecánica y la disposición periódica de las moléculas; esta última propiedad se utiliza para clasificar a los CL en distintas mesofases, las cuales se dividen en mesofases nemáticas, colestéricas, esmécticas y columnares. Las moléculas con la capacidad de formar mesofases son llamadas mesógenos (Andrienko, 2018; Quirino-Barreda, et al., 2017).

También se pueden clasificar a los CL en función de su origen u obtención como: termotrópicos, donde la mesofase es formada a partir del aumento de temperatura de un estado cristalino, o liotrópicos, donde la mesofase es formada a partir de la mezcla de moléculas anfifílicas (moléculas con una parte de su estructura hidrofílica y otra parte hidrofóbica) y un disolvente (generalmente agua). Los CL liotrópicos son comúnmente utilizados en formulaciones farmacéuticas y cosméticas, así como en la fabricación de productos de limpieza como jabones y detergentes (Vaca Chavez, 2002; Quirino-Barreda, et al., 2017).

6.2.1 Cristales termotrópicos y liotrópicos

Los CL termotrópicos se obtienen fundiendo un sólido cristalino, suelen estar constituidos por sustancias orgánicas que exhiben varias mesofases a diferentes temperaturas o presiones y se clasifican según la forma de sus moléculas constituyentes (Shen & Dierking, 2019).

Los CL liotrópicos son formados por el autoensamblaje de moléculas anfifílicas en un disolvente (normalmente agua) y este proceso tiende a ser espontáneo. Los autores Wan et al. (2018) clasifican a los CL liotrópicos en 3 mesofases: lamelar ($L\alpha$), cúbica (V_2) y hexagonal (H_2) según sus diferentes estructuras internas, siendo las mesofases cúbica y hexagonal consideradas los transportadores de fármacos más utilizados debido a sus excelentes propiedades de carga y liberación de fármacos. Asimismo, los autores Wang et al. (2019) describen que “la mesofase cúbica consta de bicapas lipídicas curvas bicontinuas que se unen en un espacio tridimensional y se subdividen en dos redes centrales acuosas entrelazadas”, debido a esto, ha generado mucho interés por su encapsulación de moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas y anfifílicas para lograr una liberación de fármaco de tipo sostenida o controlada.

La adición de ciertos lípidos (anfifílicos o polares) a un medio acuoso puede formar CL liotrópicos cúbicos o hexagonales de manera espontánea, sin embargo, las fases tienden a ser muy viscosas y pueden llegar a causar irritación en el epitelio biológico, por lo que su manejo y aplicación se ven limitados. Para solventar este problema, es necesaria la dispersión de la mesofase original en un medio acuoso en forma de partículas pequeñas sin que sea alterada la estructura del sistema mesofásico inicial (Lodha et al., 2014; Dominguez Berraquero, 2016).

Cuando las mesofases cúbicas y hexagonales se dispersan en un medio acuoso en presencia de un coestabilizante polimérico se forman dispersiones coloidales conocidas como cubosomas y hexosomas, respectivamente. Los cubosomas y los hexosomas se clasifican como nanopartículas no laminares y tienen características

que los hacen nanosistemas prometedores de administración de fármacos, ya que cuentan con un grado alto de organización molecular y nanoestructurada, además de tener biodisponibilidad alta y una toxicidad baja; gracias a estas ventajas, se puede utilizar a las dispersiones de CL como sistemas de administración de fármacos (Pasquali et al., 2007; Chountoulesi et al., 2018).

Algunos de los agentes estabilizantes más utilizados en la síntesis de CL liotrópicos son los copolímeros de polioxietileno y polipropileno, tales como copolímeros Pluronic® o Poloxámeros (Guo et al., 2010). Asimismo, existen distintos lípidos utilizados en la síntesis de CL liotrópicos siendo los lípidos a base de glicéridos los más comunes, específicamente el monooleato de glicerilo también llamado monooleína o GMO, el cuál es capaz de formar al menos cuatro mesofases (una lamelar, dos cúbicas y una fase hexagonal); adicionalmente, es un lípido no tóxico, biodegradable y biocompatible, por lo que es una de las moléculas anfifílicas que se utilizan en la síntesis de CL liotrópicos más estudiadas (Wan et al., 2018). Con base en lo anterior, se puede definir que los CL liotrópicos están formados principalmente por lípidos anfifílicos o polares, coestabilizantes poliméricos y agua; no obstante, existen distintos métodos para dispersar a las moléculas anfifílicas en el agua, las cuales difieren principalmente en el tipo y cantidad de energía que se le aplica al sistema y del método de elaboración.

6.2.2 Métodos de preparación de CL

Los métodos de preparación de CL liotrópicos cúbicos y hexagonales son más sencillos que los de sus dispersiones, ya que la formación de la mesofase cúbica y hexagonal tiende a darse de manera espontánea al mezclar fases lípidas anfifílicas con agua mediante agitación (por ejemplo, en un vortex) mientras que los métodos de preparación de sus fases dispersas requieren la adición extra de energía o de otros agentes estabilizadores (Chen et al., 2014).

De acuerdo con los autores Guo et al. (2010) y Chountoulesi et al. (2018) existen dos métodos para la síntesis de CL liotrópicos:

- Técnica “ascendente”, método hidrótopo o Bottom Up (BU), es un método de baja energía en el cual un agente hidrótopo es capaz de disolver lípidos en agua para generar un precursor líquido, al cual se le adiciona agua de manera controlada para reducir la solubilidad del lípido, lo que conlleva a la formación de cubosomas o hexosomas. Este método tiende a producir nanopartículas con mejor estabilidad y con un tamaño de partícula menor, debido a que requiere menos energía que otros métodos.
- Técnica “descendente” o Top Down (TD): La mezcla de las moléculas anfifílicas con los estabilizantes es hidratada para permitir el auto-ensamblado de un material viscoso, el cual es dispersado en un medio acuoso por medio de la aplicación de gran energía que puede ser proporcionada por sonicación, ultrasonificación, corte u homogeneización a presión alta; este suministro de energía produce fragmentación y proporciona nanopartículas de tamaño controlado con polidispersidad baja. Sin embargo, se ha reportado que la ultrasonificación produce una dispersión más uniforme y estable que la agitación convencional (por ejemplo, en un vortex o agitador magnético) y que la homogeneización.

6.2.3 Síntesis de nanopartículas aplicando ultrasonificación

La energía ultrasónica tiene muchas aplicaciones útiles en el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas, tales como: dispersión de materiales sólidos en medios líquidos, la emulsificación de líquidos, la ruptura de aglomerados de partículas, la mejora de la homogeneidad y estabilidad de suspensiones, la síntesis o precipitación de nanopartículas y también se utiliza para inducir una reacción química o mejorar la velocidad de reacción (Hielscher Ultrasonics, s.f.; Kaur et al., 2017)

Se denomina ultrasonido a una vibración de partículas cuya frecuencia se encuentra por encima de la capacidad del oído humano (20000 Hz). La velocidad de propagación en el aire de los ultrasonidos es igual a la de sonidos audibles por el oído humano (343 m/s), mientras que en medios líquidos la velocidad de

propagación de los ultrasonidos aumenta considerablemente (hasta 1500 m/s) (Puech Magaña, 2014). Las ondas de sonido se pueden caracterizar mediante los parámetros descritos en la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros que influyen en la ultrasonicación

Parámetro	Símbolo	Definición	Unidades de medición
Periodo	T	Tiempo de duración de un ciclo	Milisegundos (ms)
Frecuencia	F	Número de ciclos por segundo	Herzios (Hz)
Amplitud	A	Altura máxima de una onda, hace referencia a la intensidad del sonido.	Decibelios (dB).
Longitud de onda	λ	Distancia que recorre un ciclo en un medio.	Milímetros (mm).
Potencia	P	Cantidad de energía trasferida por la vibración.	Watts (W)
Velocidad de desplazamiento	C	Velocidad a la que se mueve una onda en un medio. Se puede calcular a partir de la longitud de onda mediante la ecuación:	Milímetros por segundo (mm/seg)

$$C = f \times \lambda$$

Nota. Adaptado de De la Fuente et al. (2009)

Los ultrasonicadores tienen un componente denominado transductor el cual genera vibraciones mecánicas que se transforman en energía química. Existen varios tipos de transductores; los más comunes son los piezoeléctricos y los magnetostrictivos,

los cuáles generan un campo eléctrico y magnético, respectivamente. Los ultrasonicadores se clasifican según la frecuencia utilizada en: baja frecuencia (10-100 kHz) y alta frecuencia (1-10 MHz), siendo los de baja frecuencia los utilizados en síntesis de nanomateriales y procesos de mezclado, homogeneización, dispersión, emulsión y molienda húmeda (Pineda et al., 2017)

La ultrasonificación se fundamenta en un fenómeno denominado cavitación acústica, en el cual los ultrasonidos se propagan en medios líquidos a través de una serie de ondas acústicas que dan lugar a ciclos alternos de alta y baja presión, los cuales comprimen y expanden respectivamente la estructura molecular del medio. La expansión de las moléculas se conoce como etapa de rarefacción, en la cual se genera una presión negativa capaz de romper las fuerzas intermoleculares del líquido, lo que conlleva a que una pequeña cantidad del volumen del líquido pase a estado gaseoso en forma de pequeñas cavidades denominadas burbujas de cavitación o microburbujas, mientras que en la etapa de compresión, las burbujas generadas se comprimen debido a una presión positiva (aumento de presión) (Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación [CRAI], s.f.).

Estos ciclos sucesivos de compresión y rarefacción provocan que las burbujas aumenten su tamaño hasta alcanzar una medida crítica en la que ya no puede absorber energía ultrasónica eficientemente, por lo que la burbuja se vuelve inestable y el líquido que la rodea entra violentamente ocasionando su implosión. Estas burbujas se comprimen y expanden rápidamente, aproximadamente en 10^{-6} segundos, la rápida implosión de las burbujas libera grandes cantidades de energía en forma de altas temperaturas y presiones que pueden alcanzar los 5000 °C y las 1000 atm, respectivamente (Pineda et al., 2017; Puech Magaña, 2014). La figura 1 muestra como se comprimen y expanden las burbujas en función del aumento y disminución de presión.

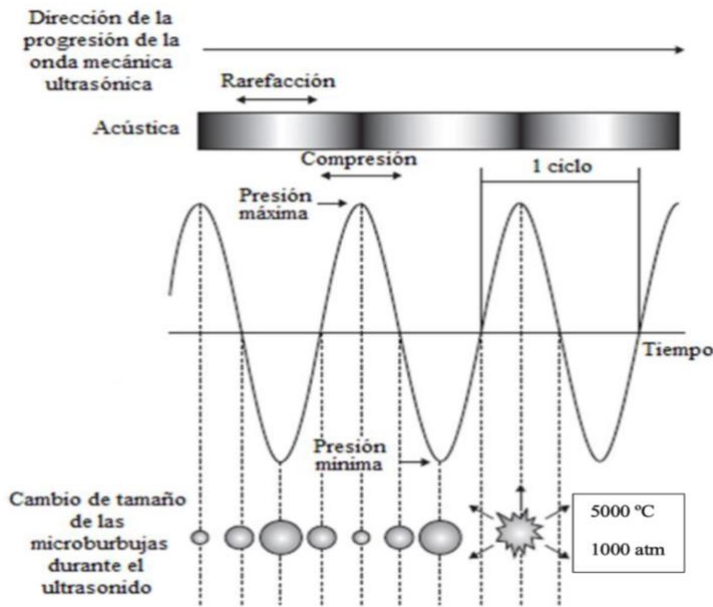


Figura 1. Proceso de cavitación ultrasónica

Nota. Modificado de Pineda et al. (2017)

La implosión de las microburbujas genera ondas de choque que pueden inducir la generación de enormes fuerzas cortantes, si las microburbujas colapsan en una superficie sólida, sufren de una implosión asimétrica en donde el espacio de la microburbuja es ocupado por el medio líquido; esto genera micro corrientes de gran velocidad (de hasta 1000 km/h) que pueden incrementar la penetración del medio líquido hacia el interior de una superficie porosa y aumentar la transferencia de calor y de masa desde y hacia la superficie de las partículas sólidas o de las gotas. Si la superficie sólida se encuentra en forma de polvo, las ondas acústicas pueden causar la ruptura de la partícula, ocasionando que se generen partículas más pequeñas y aumente la dispersión de partículas finas a través del medio. El resultado es una mejor dispersión entre productos inmiscibles o poco solubles, ya que en sistemas líquido-líquido se forman emulsiones más estables; debido a esto, la ultrasonificación es una técnica muy eficaz para la dispersión y la desaglomeración de partículas en un medio líquido, la síntesis de partículas más pequeñas y con mayor uniformidad de tamaño, así como para la molienda y la trituración fina de

partículas de tamaño micrométrico y submicrónico. (CRAI, s.f.; Hielscher Ultrasonics, s.f.; Pineda et al., 2017)

6.2.4 Aplicación de CL en sistemas farmacéuticos

Uno de los principales desafíos en la industria farmacéutica es el desarrollo de sistemas que sean capaces de almacenar fármacos poco o nada solubles en agua, por lo que el uso de CL en la industria farmacéutica se ha ido extendiendo con el paso de los años. Se ha reportado que los CL liotrópicos son eficientes sistemas farmacéuticos de liberación sostenida, debido a que tienen una gran viscosidad y a que son capaces de disolver sustancias tanto hidrosolubles como liposolubles (Pasquali et al., 2007).

En general, los CL liotrópicos en sus mesofases cúbica y hexagonal, así como en sus dispersiones (cubosomas y hexosomas, respectivamente) son considerados como métodos novedosos de liberación de fármacos debido a que cuentan con propiedades físicoquímicas únicas, las cuales son detalladas en la tabla 3.

Tabla 3. Propiedades físicoquímicas de los cristales líquidos liotrópicos de interés para el desarrollo de sistemas farmacéuticos

Solubilización	Efectiva en sustancias hidrosolubles y liposolubles
Composición	Gran flexibilidad en la composición de sus excipientes
Capacidad de carga de fármacos	Alta para fármacos con distintas polaridades y tamaños
Biodisponibilidad (BD)	Aumenta BD oral en comparación con otros sistemas
Moléculas que se pueden incorporar	Fármacos sensibles a degradación enzimática, moléculas con poca solubilidad acuosa, nanopartículas, entre otras
Liberación del fármaco	Facilitan la liberación lenta y sostenida
Toxicidad	No tóxicos, son sistemas biodegradables

Nota. Adaptado de Kim et al. (2015)

Los CL liotrópicos son capaces de almacenar distintos tipos de fármacos según su solubilidad, polaridad, tamaño, entre otras propiedades, de igual manera, son capaces de administrarse por distintas vías, siendo las más comunes: oral, tópica y parenteral, destacando las vías de administración tópica y transdérmica, ya que presentan ventajas frente a la vía oral, como la capacidad de evitar el efecto hepático de primer paso, una alta biodisponibilidad y también evita los efectos de dosis dependientes (Kim et al., 2015)

La vía de administración tópica en formulaciones convencionales presenta una limitante importante: tiene una limitada absorción del fármaco a través de la piel, ya que el estrato córneo es una barrera que limita la absorción del principio activo, sin embargo, se ha reportado que los CL liotrópicos son capaces de atravesar el estrato córneo de la piel, por lo que resultan candidatos ideales para administrar fármacos por vía tópica. Adicionalmente, la tabla 4 muestra algunas ventajas de las

dispersiones (cubosomas y hexosomas) en comparación a las mesofases (cúbica y hexagonal) por las cuales se prefieren a las dispersiones en la síntesis de sistemas de liberación de fármacos por vía tópica.

Tabla 4. Propiedades de las dispersiones de cubosomas y hexosomas de CL liotrópicos

Características	Buena fluidez, mayor área superficial de las partículas dispersas.
Aplicaciones	La dispersion puede ser integrada en otras formulaciones sin alterar la estructura del sistema.
Tamaño de partícula	Partículas pequeñas, por lo general en el rango nanométrico.
Efectos secundarios	No causan irritación después de la aplicación tópica.
Estabilidad	Mayor estabilidad física.

Nota. Adaptado de Guo et al. (2010)

Un ejemplo de un principio activo que se puede incorporar a una dispersión de CL es el KTZ ya que pertenece al grupo II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (solubilidad baja y permeabilidad alta), por lo que su solubilidad en medios acuosos es prácticamente nula, especialmente en condiciones de pH neutro a básico (Romero Ochoa, 2018), además, su administración es comunmente por vía tópica, lo que resulta ideal para administrarse en dispersiones de CL, ya que estos sistemas pueden atravesar el estrato córneo de la piel con facilidad, en comparación con otros sistemas lipídicos (Chen et al., 2014).

6.3 Ketoconazol

Es un fármaco antimicótico y es el único miembro de la familia de los imidazoles que se utiliza en la actualidad para el tratamiento de infecciones sistémicas; es un compuesto lipofílico, propiedad que le permite almacenarse en concentraciones altas en tejidos grasos (Gregori, 2005). La tabla 5 muestra algunas propiedades fisicoquímicas del KTZ.

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas del ketoconazol

Fórmula	$C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$
Apariencia	Sólido, polvo blanco-amarillento
Peso molecular	531.43 g/mol
Punto de fusión	146 - 147 °C
Solubilidad	Fácilmente soluble en metanol y cloruro de metileno, medianamente soluble en etanol a 23 °C, insoluble en agua

El KTZ presenta actividad antimicótica contra distintos hongos que producen micosis superficiales y profundas, es usado principalmente para tratar la candidiasis mucocutánea, candidiasis vaginal, onicomycosis y dermatofitosis; este fármaco tiene buena absorción por el aparato digestivo, una semivida de 6-8 horas, se distribuye por los tejidos y líquidos corporales (aunque en bajas concentraciones no alcanza concentraciones terapéuticas en el SNC), se inactiva en el hígado y se excreta en la bilis y orina; no obstante, el uso de KTZ está restringido por vía oral debido a que puede causar toxicidad hepática, por lo que su principal vía de administración es tópica (Velasco et al., 2003; Trejo et al., 2010).

El mecanismo de acción del KTZ se basa en la inhibición de lanosterol mediante la formación de un complejo entre el azol del KTZ y el citocromo P450, este complejo puede unirse a sitios activos de la enzima C-14- α -dimetilasa mediante fuerzas de Van der Waals, provocando que la enzima no pueda catalizar la desmetilación del lanosterol; dicha reacción enzimática es imprescindible en la síntesis del ergosterol

(componente principal de las membranas celulares de los hongos) y al inhibirse se altera la estructura y fluidez de la membrana fúngica, sin embargo, también puede afectar las membranas celulares del hospedero, lo que puede ocasionar un efecto tóxico (Gregori, 2005; Gazga, 2015).

Se ha demostrado que los derivados de imidazol y triazol inducen estrés oxidativo en diferentes modelos celulares, lo que indica que los radicales libres podrían ser responsables de la toxicidad inducida por azoles; específicamente, se tienen reportes de que existe una relación entre el aumento de peroxidación lipídica, toxicidad mitocondrial y muerte celular con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por distintos azoles como miconazol, KTZ y fluconazol (Petricca et al., 2022).

El KTZ es un fármaco susceptible a degradación por oxidación provocada por radicales libres, específicamente por aquellas especies químicas que contienen oxígeno (ROS), lo que conlleva a una reducción o pérdida total del efecto terapéutico (Silva et al., 2021). Se ha reportado que KTZ puede sufrir oxidación en medios acuosos así como en medios no acuosos (Shaligram & Padmaja, 2012). El producto de degradación oxidativa del fármaco se debe a la formación de un N-óxido en el anillo de piperazina del KTZ, el cuál contiene dos átomos de nitrógeno (figura 2) de los que el nitrógeno unido al grupo carbonilo tiene dos pares de electrones libres que participan en deslocalización por resonancia con el grupo carbonilo, por lo que la formación del N-óxido tiene lugar en el nitrógeno unido al grupo fenólico (Mhaske & Sahasrabudhe, 2011).

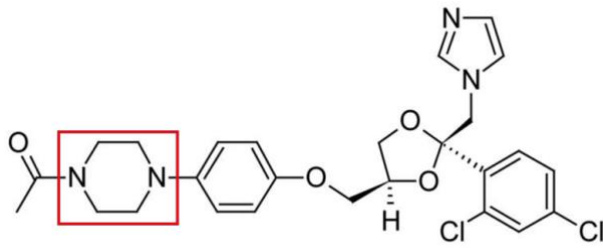


Figura 2. Estructura química del ketoconazol

Nota. La sección marcada con el cuadro rojo es el anillo de piperazina que contiene los nitrógenos más susceptibles a sufrir oxidación. Modificado de *Mhaske & Sahasrabudhe (2011)*

Los autores Farhadi & Maliki (2001) y Shaligram & Padmaja (2012) proponen un mecanismo de oxidación en el cuál KTZ se oxida inicialmente con la pérdida de un electrón en el nitrógeno unido al grupo fenólico, formando un radical catiónico (KTZ⁺) que se puede estabilizar por resonancia, posteriormente, se une a un oxígeno para formar un N-óxido; la aparición de esta forma oxidada es responsable de la coloración rosada en el producto en que se adiciona. KTZ⁺ puede oxidarse aún más con la pérdida de un segundo electrón; no obstante, este producto es más estable, aunque la estabilidad del radical catiónico también depende de las condiciones de disolución por lo que disminuye gradualmente en un disolvente polar y en medios acuosos ácidos débiles.

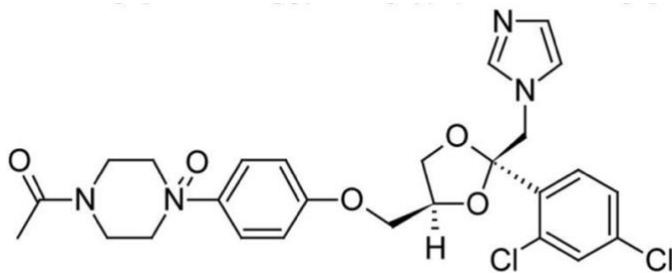


Figura 3. Estructura química del producto de degradación de ketoconazol

Nota. Obtenido de *Mhaske & Sahasrabudhe (2011)*

Para elegir un antioxidante adecuado es necesario conocer las bases teóricas de la oxidación, como las distintas especies oxidantes, sustratos susceptibles y los mecanismos de acción antioxidante.

6.4 Oxidación

En una reacción de oxidación, un agente oxidante actúa sobre alguna molécula (denominada sustrato) para producir productos oxidados, como se muestra en la figura 4; este proceso ocurre simultáneamente con la reacción de reducción y a estas reacciones químicas se les conoce como reacciones redox e implican transferencia de electrones: la oxidación es la pérdida de electrones y la reducción la ganancia de electrones y ninguno de los dos procesos puede ocurrir de manera aislada (Prenzler et al., 2021).

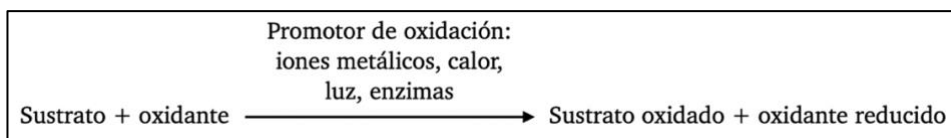


Figura 4. Ecuación representativa de la reacción típica de oxidación

Nota. Modificado de *Prenzler et al.* (2021)

La oxidación ocurre en distintos procesos como: la combustión, corrosión de metales, en procesos fisiológicos de distintas plantas o animales (los cuales normalmente están mediados por reacciones enzimáticas) y en productos destinados al consumo como alimentos, bebidas, cosméticos, entre otros; adicionalmente, muchos fármacos pueden sufrir degradación por oxidación, la cual está asociada principalmente a la disminución del efecto terapéutico (Galano, 2022; González Limón, 2016). Los distintos mecanismos de oxidación dependerán de la especie oxidante que participe en la reacción.

6.4.2 Oxidantes

Un agente oxidante es cualquier molécula que provoca la oxidación de otra (sustrato) al aceptar electrones, por lo tanto, su estado de oxidación (el cuál indica el grado de oxidación de un átomo) disminuye; el agente oxidante más distintivo es el oxígeno, ya que es un elemento muy electronegativo que tiende a reaccionar con casi todos los elementos y con muchos compuestos químicos, por lo que está presente en procesos de oxidación muy comunes, como la combustión y la corrosión (Prenzler et al., 2021).

Se pueden catalogar a las especies oxidantes dependiendo de su composición en: especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) y especies reactivas de azufre (RSS), a su vez, todas estas especies reactivas pueden ser oxidantes de radicales libres (cuando contienen un electrón desapareado) y oxidantes sin radicales (cuando todos sus electrones están apareados), siendo las ROS las más estudiadas (Galano, 2022; Prenzler et al., 2021). La tabla 6 muestra algunos ejemplos de especies reactivas oxidantes.

Tabla 6. Ejemplos de especies reactivas oxidantes con y sin radicales libres

Especie oxidante	Ejemplos
Especies reactivas de oxígeno (ROS) radicales libres	Radical: hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), alcoxilo ($\text{RO}\cdot$), peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), hidroperoxilo ($\text{HOO}\cdot$) y superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$). ²
Especies reactivas de oxígeno (ROS) sin radicales	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroperoxidos lipídicos (ROOH), ozono (O_3) y oxígeno singlete (O_2). ¹
Especies reactivas de nitrógeno (RON) radicales libres	Dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot^-$), óxido nítrico ($\text{NO}\cdot^-$), catión nitroxilo (NO^+). ³
Especies reactivas de nitrógeno (RON) sin radicales	Peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot^-$), dinitrógeno trióxido (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), anión nitroxilo ($\text{NO}\cdot^-$), óxido nitroso (N_2O). ³
Especies reactivas de azufre (RSS) radicales libres	Radical tilio ($\text{RS}\cdot^-$). ³
Especies reactivas de azufre (RSS) sin radicales	Ácido sulfúrico (H_2S), ácido sulfénico (RSOH). ²

Nota. ¹Prenzler et al. (2021). ²Galano (2022). ³González Limón (2016)

Los oxidantes también tienen una función reguladora en distintos procesos biológicos, se tiene registro de que los radicales libres tienen un papel importante en la eliminación de células defectuosas conocida como apoptosis, así como en señalización celular (Galano, 2022). De acuerdo con el autor Prenzler et al. (2021) las distintas especies reactivas oxidantes (ROS, RNS y RSS) se forman continuamente durante distintos procesos fisiológicos del metabolismo aeróbico provocando que los organismos aeróbicos estén constantemente expuestos a especies oxidantes que generan un daño constante a moléculas biológicas (ADN, proteínas y lípidos), sin embargo, la formación y eliminación de oxidantes se mantiene en equilibrio gracias a distintos mecanismos de defensa (principalmente enzimáticos). No obstante, también es posible que ocurra un desequilibrio entre la

producción y eliminación de oxidantes causada por una sobreproducción de oxidantes o por el agotamiento de los mecanismos de defensa, a este desequilibrio se le conoce como estrés oxidativo.

6.4.3 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como “el desequilibrio entre la producción y manifestación de las ROS y la capacidad de un sistema biológico para reparar el daño ocasionado, donde las especies reactivas u oxidantes se forman como producto normal del metabolismo aeróbico” (González Limón, 2016). En un sistema biológico, el estrés oxidativo depende de distintos factores como: tipo de oxidante, sitio de producción, intensidad de producción, naturaleza del sustrato y sus distintos mecanismos de defensa; asimismo, tiene un gran impacto en los sistemas biológicos ya que puede provocar alteraciones en la estructura y función de distintos órganos, sistemas o grupos celulares especializados, ocasionando daño celular asociado a distintas patologías, debido a esto, el equilibrio redox es muy importante para la homeostasis celular, ya que regula la producción de especies oxidantes reactivas (Prenzler et al., 2021).

Algunos factores externos que pueden provocar degradación oxidativa a distintas moléculas biológicas, ya sea causando un daño directo o actuando como catalizadores en la reacción de oxidación, son: exposición a la luz (foto-oxidación), contacto con especies reactivas oxidantes (ROS, RNS o RSS), alteración en el pH, aumento de temperatura, entre otros (Prenzler et al., 2021). La tabla 7 muestra algunos ejemplos de los procesos de oxidación en distintas biomoléculas.

Tabla 7. Procesos de oxidación observados en distintos tipos de sustratos

Sustrato	Tipo de muestra	Tipo de oxidación	Efectos adversos que provocan
Lípidos	Alimentos y biológicas	Enzimático (lipooxigenasa), foto-oxidación y auto-oxidación.	Sabor rancio en alimentos, infecciones en animales y humanos.
Proteínas	Alimentos y biológicas	Codificación del DNA, acción directa de oxidante y foto-oxidación inducida por productos de oxidación de lípidos	Pérdida del valor nutritivo, agregación de proteínas.
ADN	Biológicas	Provocada por ROS/RNS	Carcinogénesis.
Carbohidratos	Polisacáridos en alimentos y en muestras biológicas	Provocada por ROS/RNS	Productos finales de glicación avanzada.

Nota. Adaptado de Prenzler et al. (2021)

Todas las moléculas biológicas son susceptibles a la oxidación, no obstante, los lípidos son más susceptibles debido a que la energía de activación para llevar a cabo la reacción de oxidación es menor en comparación a la energía necesaria para la oxidación de proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos, es por eso que los lípidos son el componente más sensible a la oxidación de muchos alimentos como carnes, productos lácteos, aceites y grasas, provocando un sabor rancio; el deterioro por oxidación de lípidos se produce mediante 3 vías principales: 1)

reacciones enzimáticas, 2) foto-oxidación no enzimática y no radical y 3) reacciones en cadena no enzimáticas mediadas por radicales libres, conocidas como auto-oxidación (Prenzler et al., 2021).

6.5 Antioxidantes

Cualquier sustancia con acción antioxidante debe ser capaz reducir la velocidad de reacción de oxidación, o bien, de prevenir o inhibir completamente la reacción; las moléculas con acción antioxidante tienden a actuar directamente sobre la especie oxidante mediante distintos mecanismos, no obstante, también son capaces de ejercer su acción antioxidante sobre el sustrato (González Limón, 2016). Se puede clasificar a los AO dependiendo su mecanismo de acción, como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Mecanismos de acción antioxidante y ejemplos de especies oxidantes y antioxidantes involucradas

Mecanismo de acción antioxidante	Ejemplos de oxidantes	Ejemplos de antioxidantes
Captación de radicales libres, mediante: a) transferencia de átomos de hidrógeno (HAT). b) transferencia de electrones (SET). c) transferencia protón-electrón o reacción mixta	- ROS: alcoxilos, hidroxilos, peroxilos, suoperóxidos. - RNS: dióxido de nitrógeno, óxido nítrico, catión nitroxilo - RSS: radical tilio	Vitaminas A, C, E y distintos tipos de: antocianinas, ácidos fenólicos y flavonoides. ^c
Quelación de iones metálicos de transición pro-oxidantes	Hierro (III), cobre (II)	Agentes quelantes como: ácido cítrico, EDTA, deferoxamina, compuestos fenólicos y aminoácidos como carnosina e histidina. ^b
Captación de oxidantes sin radicales.	Oxígeno singlete y agentes fotosensibilizadores (por ejemplo: clorofila y riboflavina)	Para oxígeno singlete: carotenoides, coferoles, compuestos fenólicos, curcumina y ascorbato. ^a Para fotosensibilizadores: tocoferoles y compuestos fenólicos. ^a

Nota. ^aPrenzler et al. (2021). ^bGalano (2022). ^cGonzález Limón (2016).

Estas vías de acción antioxidante son vitales para distintas bio-moléculas como proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos, así como para productos hechos a partir de estos, no obstante, también existen vías específicas para ciertas bio-moléculas (Galano, 2022). La variedad de vías de acción antioxidante, sustratos y especies oxidantes permiten clasificar a los AO de distintas maneras, como se describe a continuación.

6.5.1 Clasificación de los antioxidantes

Existen distintas clasificaciones de los AO, por ejemplo, dependiendo cómo actúen químicamente pueden dividirse en dos grupos:

1) Primarios: también conocidos captadores de radicales libres porque actúan donando un átomo de H o un electrón una especie con radicales, produciendo especies mucho menos reactivas o terminando la reacción de oxidación (Galano, 2022). Los AO primarios pueden ser moléculas hidrófilas como el butilhidroxianisol (BHA), ácido ascórbico y algunos polifenoles, o también pueden ser hidrófobos como butilhidroxitolueno (BHT) caroteno, ácido lipoico, tocoferoles y coenzima Q10; cuando la mayoría de estos AO están presentes en pequeñas cantidades, son capaces de retrasar o inhibir el paso de iniciación de la oxidación por radicales libres al reaccionar con un sustrato radical, aunque también se ha reportado que cuando se mezclan algunos AO primarios pueden tener una eficacia mayor a la de sus efectos individuales (Prenzler et al., 2021).

2) Secundarios: se les conoce como AO preventivos porque reaccionan directamente con un promotor de oxidación, como los iones metálicos, para reducir la velocidad de formación de nuevas cadenas de radicales libres, capaces de retardar la reacción de oxidación mediante distintos mecanismos indirectos, principalmente: quelación de iones metálicos, reparación de AO primarios mediante la donación de átomos de H o electrones, absorción de luz UV, descomposición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y captación de oxidantes sin radicales (Galano, 2022; Prenzler et al., 2021). Algunos de los AO secundarios más comunes son agentes quelantes de iones metálicos como ácido cítrico, EDTA, deferoxamina y aminoácidos como histidina o carnosina, los captadores de oxígeno como

carotenoides, coferoles y curcumina, y también se incluyen tocoferoles y varios compuestos fenólicos.

De acuerdo con el autor González Limón (2016) otra manera clasificar a los AO es según su origen, como sintéticos o naturales; los AO sintéticos son comunmente utilizados en productos farmacéuticos y cosméticos, así como en alimentos y bebidas ya que son capaces de prolongar la vida útil de un producto sin afectar sus propiedades organolépticas, especialmente en productos que contienen aceites y grasas debido a su solubilidad lipofílica. Los AO sintéticos más utilizados en la industria cuentan con un anillo aromático insaturado en su estructura química, el cual contiene al menos un hidroxilo capaz de donar electrones o átomos de hidrógeno a una especie radical e inhibir el proceso de oxidación.

En los últimos años se ha cuestionado la seguridad de los AO sintéticos mediante estudios toxicológicos que demuestran que cuando se agregan en cantidades excesivas o cuando tienen uso prolongado, pueden causar efectos tóxicos, lo que conlleva a que distintos países impongan cada vez más restricciones para el uso de AO sintéticos, especialmente en alimentos y bebidas (González Limón, 2016).

Por otro lado, los AO naturales son comunmente metabolitos secundarios de las plantas, por lo que se encuentran en muchos alimentos de origen vegetal principalmente frutas y verduras, suelen estar presentes en pequeñas cantidades y son capaces de retardar o prevenir la reacción de oxidación en distintas moléculas biológicas como lípidos, proteínas, carbohidratos y DNA; debido a estas características, el uso de AO de origen natural se ha incrementado en los últimos años gracias a las tendencias actuales de la sociedad que hacen énfasis en los productos naturales y a la restricción de AO sintéticos debido a la preocupación por su posible toxicidad, también se han relacionado a las dietas ricas en frutas y verduras con la protección contra diversas enfermedades, por ejemplo, el consumo de alimentos ricos en AO reduce reacciones adversas y toxicidad producida por

distintos tipos de cáncer, hiperglucemia, aterosclerosis, trombosis, entre muchas otras (González Limón, 2016; Prenzler et al., 2021)

Los AO naturales se dividen en enzimáticos, que son principalmente enzimas primarias y secundarias, y en no enzimáticos, que son compuestos orgánicos como flavonoides, vitaminas, compuestos fenólicos, carotenoides, entre otros (González Limón, 2016). Los AO naturales no enzimáticos más representativos se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Ejemplos de antioxidantes naturales

Antioxidantes	Ejemplos
Vitaminas	Vitamina A (compuesta por retinol y ácido retinoico), vitamina C (compuesta principalmente por ácido ascórbico), vitamina E (compuesta por tocoferoles y tocotrienoles). ^a
Glucosinolatos	Sinigrina, glucorafanina , gluconapina. ^c
Flavonoides	Flavonas (por ejemplo, diosmetina), flavonoles (por ejemplo, 3-hidroxi-flavona, fisetina, quercetina), antocianidinas (por ejemplo, cianidina, delphinidina). ^b
Ácidos fenólicos	Acidos: clorogénico, salicílico, gálico, ferúlico. ^a
Carotenoides	Astaxantina, luteína, licopeno, β -caroteno. ^d

Nota. ^aGonzález Limón (2016). ^bMartínez-Flórez et al. (2002). ^cBayer (2021). ^dQuintana López et al. (2018).

Otra manera de distinguir a los AO es por su solubilidad, esta clasificación es importante para el desarrollo de sistemas farmacéuticos, ya que distintos AO presentan reacciones con compuestos oxidantes específicos; de acuerdo con Prenzler et al. (2021) muchos AO con solubilidad acuosa reaccionan con

compuestos oxidantes presentes en el citoplasma celular y en el plasma sanguíneo, mientras que los AO hidrofóbicos protegen a las membranas celulares de la oxidación lipídica. Algunos de los AO más usados en la industria farmacéutica y cosmética son: butilhidroxitolueno (BHT), bisulfito de sodio, ácido ascórbico, y α -tocoferol (vitamina E), así como la combinación de estos; adicionalmente, todos estos AO han sido utilizados en formulaciones que incluyen KTZ (Burnett & Kurtz, 2019); a continuación se describen las propiedades fisicoquímicas de estos AO.

6.5.2 BHT

El butilhidroxitolueno o BHT es un antioxidante sintético muy usado en la industria alimentaria y farmacéutica, específicamente en productos que contienen grasas y aceites ya que es capaz de retardar la oxidación lipídica mediante la eliminación de radicales libres. Tiene el aspecto de un polvo blanco cristalino, es muy soluble en aceites y en disolventes como metanol, etanol, benceno y tolueno, pero casi insoluble en agua, químicamente es un compuesto fenólico con un grupo hidroxilo (figura 5) que tiene un tamaño de partícula grande (511 μm) comparado con el de otros AO, lo que a menudo complica su actividad como antioxidante (Vaquero & Vicentini, s.f.).

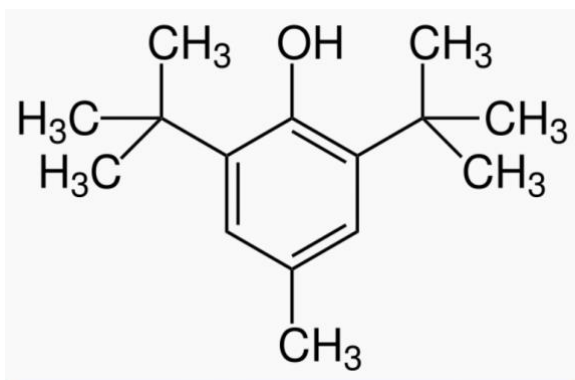


Figura 5. Estructura química del butilhidroxitolueno (BHT)

El BHT tiene un mecanismo análogo al de la vitamina E, ya que actúa como captador de radicales en reacciones de autooxidación de lípidos, específicamente, puede convertir peróxidos a hidroperóxidos mediante la donación de un átomo de

hidrógeno (Rubio Cortés et al., 2016). Suele utilizarse en concentraciones de 0.01% hasta 0.03%, aunque en el caso de aceites esenciales y fragancias se ha reportado concentraciones de hasta 0.5%, no obstante, se ha reportado que su efecto antioxidante aumenta al combinarse con otros AO, como butilhidroxianisol (BHA), derivados del ácido gálico o con otros ácidos como el cítrico o fosfórico (Acofarma, 2021). También se ha reportado que tiene buena eficacia para reducir la oxidación del KTZ en concentraciones desde el 0.01% hasta el 0.03% p/p (Fernández-Montes, 2004).

6.5.3 Bisulfito de sodio

El bisulfito de sodio es un conservante sintético, sus principales aplicaciones son principalmente como antioxidante y conservante en alimentos, aunque también se utiliza en la fabricación de perfumes, jarabes de glucosa y azúcar, productos de fermentación como cerveza, entre otros (Chinguel Heredia, 2021).

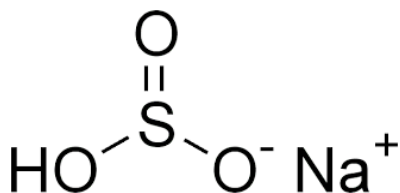


Figura 6. Estructura química del bisulfito de sodio

Es un sólido blanco cristalino con olor desagradable, presenta una alta solubilidad acuosa pero es poco soluble en alcoholes, químicamente es considerado una sal ácida que al reaccionar con el oxígeno se convierte en sulfato de sodio (Chinguel Heredia, 2021).

El bisulfito de puede considerarse un antioxidante secundario ya que actúa como agente reductor del oxígeno, principalmente en oxígeno singlete y peróxidos, evitando la oxidación del principio activo o excipiente susceptible (Dominguez Berraquero, 2016). Se tiene registro de que el bisulfito de sodio es efectivo como antioxidante en distintas emulsiones cuando se utiliza en concentraciones inferiores al 0.1% m/v; también se tiene registro de su uso efectivo en formulaciones con KTZ en concentraciones de entre 0.01% y 0.1% m/v (Ruipérez, 2020; Francois &

Snoeckx, 2015), no obstante, se ha reportado su uso como antioxidante en formulaciones que contienen aceites y grasas, sin embargo, puede presentar reacciones adversas como irritación cutánea (Acofarma, 2021).

6.5.4 Vitamina E

Su aspecto físico es de un líquido oleoso de una coloración verdosa, aunque también se puede encontrar en forma de un polvo cristalino. Es una molécula altamente lipofílica y casi insoluble en agua, está compuesta por 4 distintos isómeros de tocoferoles y 4 isómeros de tocotrienoles, siendo el alfa-tocoferol (figura 7) su forma más representativa (Michels, 2012).

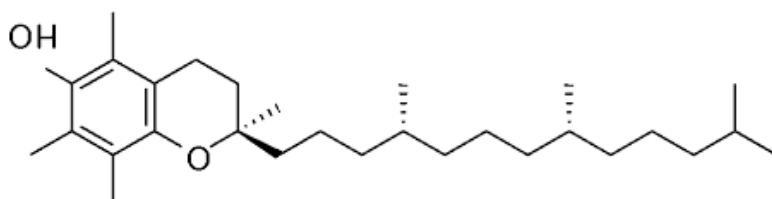


Figura 7. Estructura química del alfa-tocoferol (vitamina E)

La acción antioxidante de la vitamina E se debe a las propiedades redox del anillo cromano, las cuales le permiten reaccionar con radicales peroxilos promotores de oxidación, por lo que la función principal de la vitamina E es la protección contra la peroxidación lipídica; actúa *in vivo* (específicamente en plasma y en eritrocitos) protegiendo a los lípidos tisulares del ataque por radicales libres (Febes Fernández, 2022). En la industria se utiliza como aditivo en muchos productos hechos a base de aceites; se tiene reportes de que la vitamina E tiene un efecto antioxidante efectivo sobre emulsiones cuando se utiliza en concentraciones que van desde el 0.5% hasta el 1% en peso (Ruipérez, 2020).

A pesar de ser efectiva contra la peroxidación lipídica, la vitamina E presenta algunas desventajas importantes, tales como: es una vitamina fotosensible que puede oxidarse por la radiación UV, por lo que su incorporación a veces tiene un

efecto pro-oxidante, no debe someterse a calentamiento prolongado debido a que la temperatura elevada puede ocasionar degradación molecular (Michels, 2012).

6.5.5 Ácido ascórbico

El ácido ascórbico también conocido como vitamina C es un AO que está presente en muchas frutas, verduras y plantas, es esencial para el ser humano ya que actúa como cofactor en distintas reacciones de hidroxilación y amidación y en reacciones enzimáticas como la síntesis de colágeno (Rodríguez Carranza, 2021).

Es uno de los AO más importantes debido a su presencia en muchos alimentos de origen vegetal, ha mostrado alta solubilidad acuosa y baja toxicidad, así como beneficios en el ser humano, como: brinda protección a distintas moléculas orgánicas, actúa como cofactor en reacciones enzimáticas, ayuda a la prevención de enfermedades, entre otros (Prenzler et al., 2021). Además de estas ventajas que presenta *in vivo*, el ácido ascórbico es una molécula hidrosoluble con propiedades ácidas y fuertemente reductoras debido a su estructura con grupos hidroxilo (figura 8) los cuales son capaces de donar electrones a moléculas receptoras (Higdon et al., 2018).

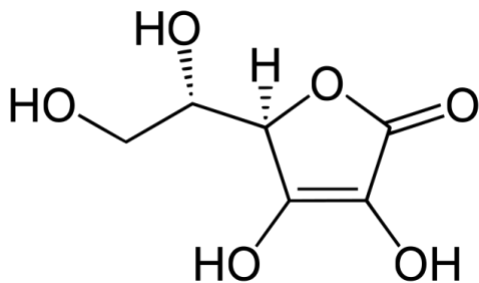


Figura 8. Estructura química del ácido ascórbico

El ácido ascórbico es un antioxidante primario que actúa como eliminador de radicales libres cuyo principal mecanismo de acción es la transferencia de electrones (González Limón, 2016), incluso en pequeñas cantidades, puede proteger a bio-moléculas como carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos del daño causado por radicales libres y por especies reactivas de oxígeno (ROS)

generadas durante el metabolismo normal de células inmunitarias activas o por la exposición a toxinas y contaminantes (Higdon et al., 2018).

El ácido ascórbico uno de los AO más utilizados en la industria alimentaría, cosmética y farmacéutica; de estas últimas, se ha reportado que en formulaciones tópicas la concentración necesaria de ácido ascórbico para inhibir la oxidación varía desde el 0.5% hasta el 1% en relación al peso total de la formulación (Ruipérez, 2020). Se ha utilizado como antioxidante en formulaciones que incluyen KTZ en concentraciones desde el 0.1% hasta el 0.5% en m/v (Francois & Snoeckx, 2015)

La elección de un antioxidante ideal es muy importante para garantizar la calidad final de un producto, no obstante, se debe evaluar su efecto antioxidante para asegurar que se retrasa o inhibe la reacción de oxidación y para comprobar que el antioxidante utilizado no está alterando las propiedades fisicoquímicas del sistema al que se adiciona.

6.5.6 Evaluación de efecto antioxidante

Los métodos de evaluación de efecto antioxidante tienen como objetivo comprobar que el daño oxidativo que provoca un agente oxidante a un sustrato es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante, en estos métodos la inhibición es directamente proporcional al efecto antioxidante del compuesto; sin embargo, también existen ensayos basados en la cuantificación de productos formados tras el proceso oxidativo, en los cuales la cantidad de producto formado es inversamente proporcional al efecto antioxidante del compuesto (Fernández-Pachón et al., 2006).

Es importante considerar que el método de evaluación a elegir dependerá de las características fisicoquímicas del antioxidante, sustrato, agente oxidante y de las interacciones que puedan ocurrir entre ellos o de las reacciones que puedan tener con los reactivos utilizados en algunos ensayos (González Limón, 2016). La elección del método de evaluación también dependerá del mecanismo de acción antioxidante del compuesto, la tabla 10 muestra algunos ensayos basándose en los

mecanismos de antioxidación: transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) o transferencia de electrones (SET).

Tabla 10. Ensayos para determinar el efecto antioxidante

Ensayo	Mecanismo específico	Especie iniciadora	Técnica para cuantificar	Antioxidantes compatibles
Ensayos de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)				
ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	Captación de radicales oxígeno; se puede medir mediante la pérdida de fluorescencia	Azoderivado (AAPH) para generar radicales peroxilo	Fluorimetría	Vitaminas, ácido úrico, albúmina, flavonoides
TRAP (Total radical trapping power)	Captación de radicales totales; cuantificable mediante medición del oxígeno consumido	Azoderivado (AAPH o ABAP) para generar radicales peroxilo	Electrodo de oxígeno disuelto	Ascorbato, alfa-tocoferol. Ácido úrico, antioxidantes con grupos tiol.
Ensayos de transferencia de electrones (SET)				
DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)	Captación de radicales libres; cuantificable mediante la disminución de la intensidad de absorción y cambio de color del reactivo DPPH	Radical DPPH	Espectrofotometría UV-Visible	Vitaminas, flavonoides, compuestos fenólicos, compuestos proteicos,

TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)	Disminución de la absorbancia del cation radical de ABTS	Cación radical de ABTS	Espectrofotom etría UV- Visible	Antioxidantes liposobles e hidrosolubles, flavonoides y vitaminas.
FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power)	Reducción de un complejo formado por un cromógeno (TPTZ) y hierro férrico (Fe ³⁺) incoloro a un azul intenso. Complejo TPTZ-Fe ³⁺ se reduce a TPTZ-Fe ²⁺	Complejo TPTZ-Fe ³⁺	Espectofotome tría UV-Visible	Ácido ascórbico, ácido úrico,

Nota. Adaptado de Fernández-Pachón et al. (2006) y Huet Breña (2017)

La mayoría de los ensayos de medición de efecto antioxidante suelen medir compuestos hidrosolubles, no obstante, algunos ensayos como ORAC, TEAC y TRAP se pueden adaptar para medir el efecto de AO lipofílicos. Estos métodos *in vitro* son útiles para comparar la actividad antioxidante de diferentes muestras de alimentos, bebidas, jarabes, productos farmacéuticos y cosméticos, sin embargo, la actividad antioxidante de una sustancia *in vitro* difiere del efecto que puede tener *in vivo*, ya que los compuestos AO sufren transformaciones metabólicas que afectan su actividad; para alcanzar una mayor aproximación, algunos ensayos incluyen radicales que participan en procesos de oxidación en sistemas biológicos como O₂, H₂O₂, ROO y OH (Fernández-Pachón et al., 2006).

Además de la evaluación de efecto antioxidante, es importante considerar otras técnicas de caracterización para asegurar que la adición del antioxidante (y de otros aditivos que se puedan incorporar como conservantes o saborizantes) no afecten

las propiedades farmacológicas, fisicoquímicas y estructurales del sistema al que se está incorporando.

6.6 Caracterización de las dispersiones líquido-cristalinas

6.6.1 Aspecto físico

Una de las características más importantes para el análisis cualitativo de las dispersiones de CL es su aspecto físico, donde se evalúan características como: formación de 2 fases, formación de sedimentos, presencia de partículas no disueltas, y más importante, el color de la muestra; una dispersión de CL estable debería tener un color blanco, ligeramente azulado, y debe ser ligeramente translúcida cuando es vista a contra luz, mientras que cuando se incorpora KTZ a las dispersiones, su color se vuelve ligeramente más opaco. Otro aspecto muy importante a tomar en cuenta es la decoloración de la muestra, específicamente cuando se vuelven rosadas, ya que dicha coloración está asociada a la degradación del KTZ. Se tiene registro de que formulaciones tópicas hechas con KTZ tienen una vida media de 30 días, después de ese periodo, la oxidación degrada al principio activo y disminuye la estabilidad de las dispersiones (Burnett & Kurtz, 2019).

6.6.2 Tamaño de partícula

Existen distintas técnicas que permiten evaluar las características morfológicas de los CL, tales como el tamaño de partícula. Una de estas técnicas es difracción de luz láser estática o static light scattering (SLS) y ha sido muy utilizada en la caracterización de dispersiones liposomales (Chountoulesi et al., 2018). En dicha técnica, las partículas se iluminan con un rayo láser y se observa dispersión de la luz, por lo que se puede determinar el tamaño de las partículas a partir de la distribución de intensidad angular, para ello es necesario considerar las propiedades ópticas de las partículas como el índice de refracción descrita por la teoría de Mie, el cuál también incluye la difracción (Jacob et al., 2022).

Para que sean consideradas nanopartículas, deben tener un tamaño de partícula medio de 100 nm o menos. Con los datos estadísticos de tamaño de partícula medio

y desviación estándar, se puede calcular el índice de polidispersidad (PDI) el cuál representa la amplitud de la distribución de tamaños de partícula con una escala que va del 0 al 1; un PDI más cercano al cero se atribuye a una muestra monodispersa mientras que valores cercanos al 1 corresponden a una muestra altamente polidispersa (Kaur et al., 2017).

7 Materiales y métodos

7.1 Materiales

El desarrollo experimental se realizó en el laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, mismo que proporcionó las materias primas necesarias para la investigación. Los excipientes utilizados en la preparación de las dispersiones de CL son: monooleato de glicerol (Peceol®, de Gattefosé®), propilenglicol monolaurato (Lauroglycol®, de Gattefosé®) FCC, poloxámero P407 (Kolliphor® 407 micro Geismar, de BASF Pharma®), agua grado HPLC (AGUAM®), KTZ (Química LUFRA, S.A. de C.V.), BHT (J.T. Baker®), ácido ascórbico grado principio activo (Meyer®), vitamina E libre (Droguería Cosmopolita S.A. de C.V.) y bisulfito de sodio (J.T. Baker®). Los excipientes lipídicos de la marca Gattefosé® fueron gentilmente donados por la empresa Químicos Lyontec, S. de R. L. de C.V., México.

7.2 Preparación de las dispersiones de CL

Las dispersiones se realizaron de acuerdo con la formulación patentada por el Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada de la UAM-X (Quirino Barreda et al., 2020). Los componentes y proporción en la formulación se detallan en la tabla 11.

Tabla 11. Fórmula cuali-cuantitativa de las dispersiones CL con Ketoconazol

Materia Prima	Nombre comercial	Composición (% p/p)
Glicerol monooleato	Peceol®	1.66
Propilenglicol monolaurato FCC	Lauroglycol® FCC	1.66
Poloxámero P407	Kolliphor® 407 micro Geismar	1.66
Ketoconazol	Ketoconazol	0.30
Agua desionizada	Agua desionizada	94.70

Procedimiento

- 1) Preparación de fase lipídica: se mezcló glicerol monooleato, propilenglicol monolaurato y poloxámero en un mismo vaso de precipitado; se calentó la mezcla hasta 60 °C y agitando a 500 rpm con un agitador magnético.
- 2) Se adicionó lentamente el KTZ a la fase lipídica, manteniendo la temperatura y la agitación hasta que se haya incorporado completamente a la mezcla.
- 3) En otro vaso de precipitado, se agregó agua desionizada y se calentó por encima de los 55 °C (fase acuosa).
- 4) Se agregó lentamente la fase lipídica a la fase acuosa, manteniendo la agitación y temperaturas constantes hasta la completa incorporación de las fases.
- 5) La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente, después se aplicó ultrasonicación.
- 6) Nuevamente se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se filtró la mezcla a través de un papel filtro Whatman no. 2.

El diagrama que ejemplifica el proceso anteriormente descrito se encuentra en el anexo 3.

7.2.1 Condiciones de ultrasonicación

Se prepararon varias dispersiones de CL cargadas con KTZ y se sonicaron a distintas condiciones (tiempo, amplitud y ciclos, respectivamente). Las muestras se sonicaron utilizando un equipo ultra-sonicador marca: Hielscher®, modelo: UP200Ht (anexo 1).

7.3 Adición de antioxidantes

Se prepararon nuevas dispersiones de CL y se les adicionó de manera independiente 4 AO distintos: dos de ellos se agregaron en la fase acuosa debido a su solubilidad hidrofílica (ácido ascórbico y bisulfito de sodio) y los otros dos se agregaron en la fase oleosa debido a su solubilidad hidrofóbica (BHT y vitamina E), respectivamente. Todos los AO se adicionaron a temperatura y agitación constantes, tal como lo indica el procedimiento descrito anteriormente. Los AO utilizados se agregaron en 3 distintas concentraciones, las cuales se eligieron

considerando lo descrito en distintas fuentes bibliográficas (Burnett & Kurtz, 2019; Fernández-Montes, 2004; Ruipérez, 2020).

7.4 Caracterización de las dispersiones líquido-cristalinas

Las dispersiones realizadas se caracterizaron en función de su aspecto físico (color y apariencia monofásica) y de su tamaño de partícula, como se describe a continuación.

7.4.1 Aspecto físico

Las dispersiones de CL cargadas con KTZ deben ser ópticamente translúcidas, con una tonalidad ligeramente blanca-azulada, deben ser monofásicas, no deben tener sedimentos ni partículas sin disolver. Las dispersiones fueron evaluadas durante 30 días y las muestras que no cumplieron con las características descritas previamente, no se tomaron en cuenta para su análisis de tamaño de partícula.

7.4.2 Determinación de la distribución de tamaño de partícula

La determinación y distribución del tamaño promedio de partícula de las dispersiones de CL se realizó mediante la técnica de difracción de luz láser utilizando un equipo marca: Horiba®, modelo: Partica LA-950V2 (anexo 2) ubicado en el Área Común de Instrumentos Analíticos del Departamento de Sistemas Biológicos, edificio N de la UAM-Xochimilco. El programa del equipo proporciona datos estadísticos como media y desviación estándar, con los cuales se puede calcular el índice de polidispersión (PDI) con la siguiente ecuación:

$$PDI = \left(\frac{\sigma}{D}\right)^2$$

Donde:

σ = Desviación estándar (μm)

D = diámetro medio de las partículas (μm)

8 Resultados

Todas las dispersiones realizadas bajo el procedimiento establecido, se mantuvieron en frascos de vidrio almacenadas a temperatura ambiente (22 °C aprox) y protegidas de la luz. Las dispersiones de CL con KTZ deben de ser visualmente translúcidas, con una tonalidad blanca-azulada, no debe contener precipitados, partículas no disueltas, ni la aparición de 2 fases. La muestra control (imagen 1a) es considerada visualmente ideal, por lo que el resto de dispersiones deberán ser lo más similares posibles. Otro aspecto importante durante la evaluación visual es la aparición de una coloración rosada (imagen 1b), la cuál está asociada con la degradación del KTZ por oxidación.

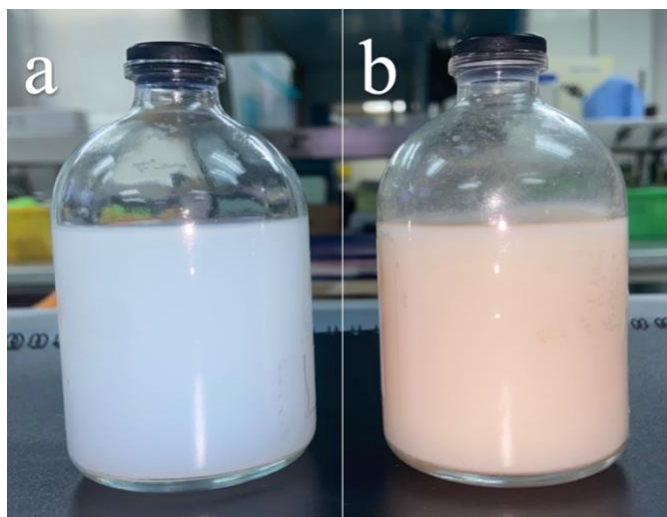


Imagen 1. Comparacion entre dos dispersiones de CL con ketoconazol.

a) muestra control sin oxidación **b)** muestra con oxidación del principio activo

8.1 Adición de antioxidantes

Se incorporaron de manera independiente 4 AO a las dispersiones líquido-cristalinas cargadas con KTZ, cada uno a 3 concentraciones distintas. Cada AO fue clasificado con una letra (A, B, C y D) y cada concentración con un número (1, 2 y 3, siendo 1 la menor concentración y 3 la mayor) para poder distinguir las dispersiones. Las concentraciones y la fase en que se adicionó cada antioxidante se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Relación de 4 antioxidantes de uso común en preparados farmacéuticos y las distintas concentraciones recomendadas.

Grupo	Concentración 1 (% p/p)	Concentración 2 (% p/p)	Concentración 3 (% p/p)	Adición en fase
A (BHT)	0.03	0.05	0.1	Oleosa ^a
B (Bisulfito de sodio)	0.03	0.05	0.1	Acuosa ^{b,c}
C (Vitamina E)	0.1	0.5	1	Oleosa ^c
D (Ácido ascorbico)	0.1	0.5	1	Acuosa ^{b,c}

Nota. ^aFernández-Montes (2004). ^bFrancois & Snoeckx (2015). ^cRuipérez (2020).

8.2 Evaluación de aspecto visual de las dispersiones con antioxidantes

Se evaluó el aspecto físico de todas las dispersiones durante 30 días, debido a que es el tiempo de vida medio de muchos productos que incluyen KTZ. Las tablas 13, 14, 15 y 16 describen las características consideradas durante la evaluación para cada antioxidante, así como las imágenes 3, 4, 5 y 6 muestran la comparación entre las dispersiones al día 0 y al día 30.

Tabla 13. Comparación entre el día 0 y día 30 de las cualidades físicas de las dispersiones hechas con BHT (grupo A)

Muestra	Color	Tonalidad	Formación de 2 fases	Formación de sedimentos
DÍA 0				
A1	Blanco	Muy opaca	No	Si
A2	Blanco-azulado	Translúcida	No	No
A3	Blanco	Ligeramente opaca	No	Si
DÍA 30				
A1	Blanco, ligeramente amarillento	Aumentó la opacidad	No	Si
A2	Blanco-azulado	Conservó translucidez	No	Si
A3	Blanco, ligeramente amarillento	Se mantiene ligeramente opaca	No	Si



Imagen 3. Comparación visual entre el grupo control y las 3 concentraciones utilizadas de BHT (grupo A); las muestras de la parte superior de la imagen corresponden al día 0 y las de la inferior al día 30.

Tabla 14. Comparación entre el día 0 y día 30 de las dispersiones hechas con bisulfito de sodio (grupo B)

Muestra	Color	Tonalidad	Formación de 2 fases	Formación de precipitados
DÍA 0				
B1	Blanco	Ligeramente opaca	No	Si
B2	Blanco-azulado	Ligeramente opaca	No	Si
B3	Blanco	Ligeramente opaca	no	no
DÍA 30				
B1	Rosa	Aumentó la opacidad	No	Si
B2	Rosa	Aumentó la opacidad	No	Si
B3	Blanco-amarillento	Se mantiene ligeramente opaca	No	Si

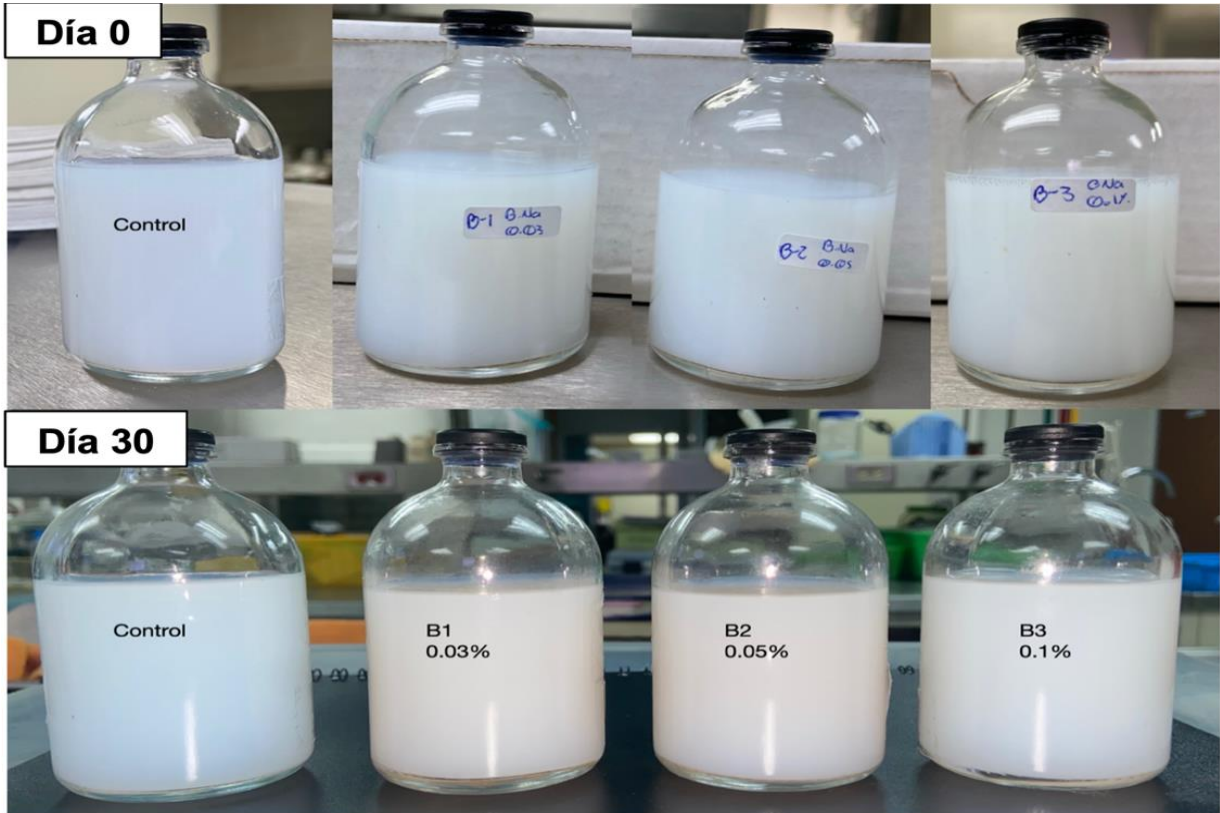


Imagen 4. Comparación visual entre el grupo control y las 3 concentraciones utilizadas de bisulfito de sodio (grupo B); las muestras de la parte superior de la imagen corresponden al día día 0 y las de la inferior al día 30.

Tabla 15. Comparación entre el día 0 y día 30 de las dispersiones hechas con Vitamina E (grupo C)

Muestra	Color	Tonalidad	Formación de 2 fases	Formación de precipitados
DÍA 0				
C1	Blanco-amarillento	Muy opaca	No	Si
C2	Blanco-amarillento	Muy opaca	No	Si
C3	Blanco-amarillento	Muy opaca	No	si
DÍA 30				
C1	Rosa	Aumentó la opacidad	Si	Si
C2	Rosa y amarillo	Una fase se puso mas turbia, la otra más translúcida	Si	Si
C3	Rosa intenso	Aumentó opacidad	Si	si



Imagen 5. Comparación visual entre el grupo control y las 3 concentraciones utilizadas de vitamina E (grupo C); las muestras de la parte superior de la imagen corresponden al día día 0 y las de la inferior al día 30.

Tabla 16. Comparación entre el día 0 y día 30 de las dispersiones hechas con ácido ascórbico (grupo D)

Muestra	Color	Tonalidad	Formación de 2 fases	Formación de precipitados
DÍA 0				
D1	Blanco-azulado	Ligeramente translúcida	No	No
D2	Blanco-azulado	Translúcida	No	no
D3	Blanco-azulado; más azul que las otras.	Translúcida	No	No
DÍA 30				
D1	Rosa-amarillo	Aumentó opacidad	No	No
D2	amarillo	Conservó translucidez	No	No
D3	amarillo	Aumentó opacidad	No	No

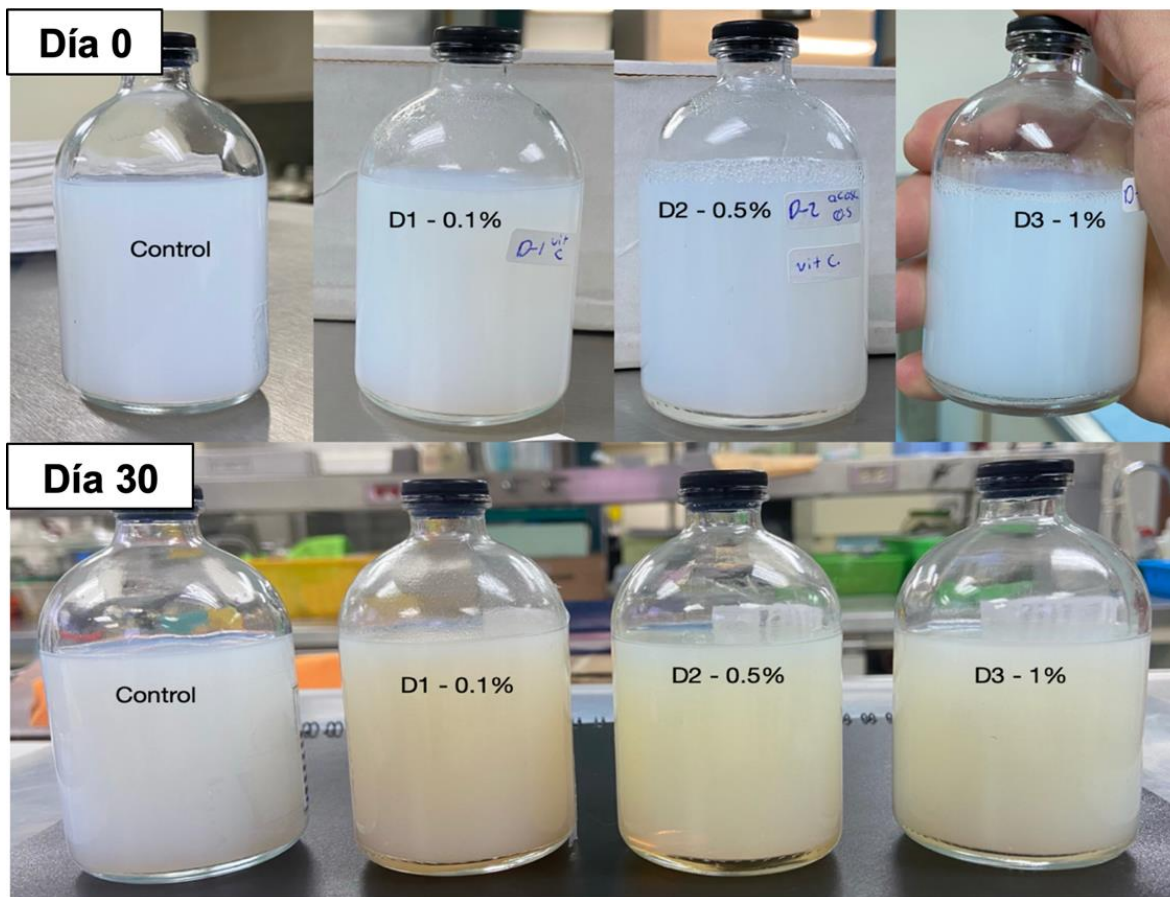


Imagen 6. Comparación visual entre el grupo control y las 3 concentraciones utilizadas de ácido ascórbico (grupo D). Las muestras de de la parte superior de la imagen corresponden al día día 0 y las de la inferior al día 30.

8.3 Análisis de tamaño de partícula

8.3.1 Análisis de las condiciones de ultrasonicación

Uno de los objetivos de esta investigación fue establecer las condiciones de ultrasonicación óptimas, por lo que se prepararon varias dispersiones de CL cargadas con KTZ a las que se les aplicó ultrasonicación con variaciones de tiempo, amplitud y frecuencia de ciclos. Se aplicó ultrasonicación para reducir el tamaño de partícula de las dispersiones hasta aproximadamente $0.1 \mu\text{m}$ (100 nm). La tabla 17 y la figura 9 muestran la comparación de los resultados del análisis de tamaño de partícula entre una dispersión sin sonicar y otra dispersión sonicada por 3 periodos de 1 minuto cada uno, a una amplitud del 50% y ciclos del 50%.

Tabla 17. Comparación de los resultados obtenidos durante el análisis de tamaño de partícula de una dispersión líquido-cristalina sin AO sonicada y otra sin sonicar

Muestra	CL1	CL2
Condiciones de ultrasonificación	Sin sonicar	3 minutos A= 50% C= 50%
Tamaño de partícula promedio (μm)	2.769	4.716
Desviación estándar (μm)	3.232	7.693

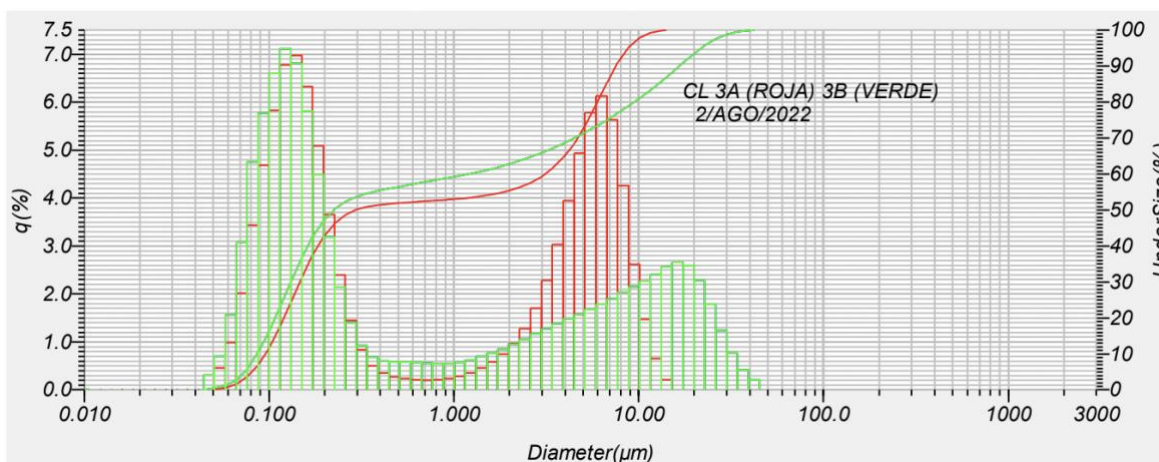


Figura 9. Comparación de la distribución del tamaño de partícula de dos dispersiones líquido cristalinas sin AO

Nota. La gráfica roja es una muestra sin sonicar (CL1) y la gráfica verde es una muestra sonicada por 3 periodos de 1 minuto cada uno, amplitud del 50% y ciclos del 50% (CL2).

La muestra “CL2” se sonicó por otros 3 minutos ininterrumpidos, manteniendo las condiciones de amplitud y ciclos; en total, la muestra recibió 6 minutos totales de sonicación, se renombró como “CL3” para poder diferenciarla. Los resultados del análisis de tamaño de partícula de la muestra CL3 se muestran en la tabla 18 y en la figura 10.

Tabla 18. Resultados del análisis de tamaño de partícula de la dispersión líquido-cristalina sin AO “CL3”

Condiciones de ultrasonicación	6 minutos (3 periodos de 2 minutos) A= 50% C= 50%
Tamaño de partícula promedio (μm)	2.209
Desviación estándar (μm)	5.808

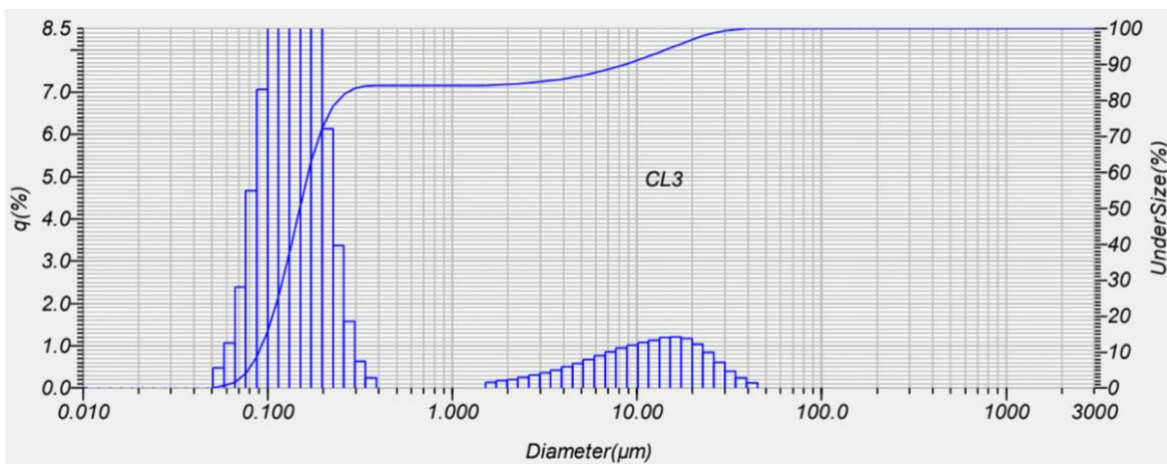


Figura 10. Distribución del tamaño de partícula de la dispersión líquido-cristalina sin AO “CL3”

Nota. Ultrasonicación por 6 minutos totales, a una amplitud=50% y ciclos=50% .

La disminución del tamaño de partícula en la muestra CL3 fue mucho menor, por lo que se realizó otra dispersión (nombrada como CL4) y se le aplicó ultrasonidos por el mismo tiempo que a la muestra CL3, pero aumentando los parámetros con el fin de que la cavitación ultrasónica sea mayor. La muestra CL4 se sonicó por 3 periodos de 2 minutos cada uno (6 minutos totales) a una amplitud del 80% y ciclos del 100%. Los resultados del análisis de tamaño de partícula se muestran en la tabla 19 y en la figura 11.

Tabla 19. Resultados del análisis de tamaño de partícula de la dispersión líquido-cristalina sin AO “CL4”

Condiciones de ultrasonificación	6 minutos (3 periodos de 2 minutos) A= 80% C= 100%
Tamaño de partícula promedio (μm)	1.190
Desviación estándar (μm)	8.478

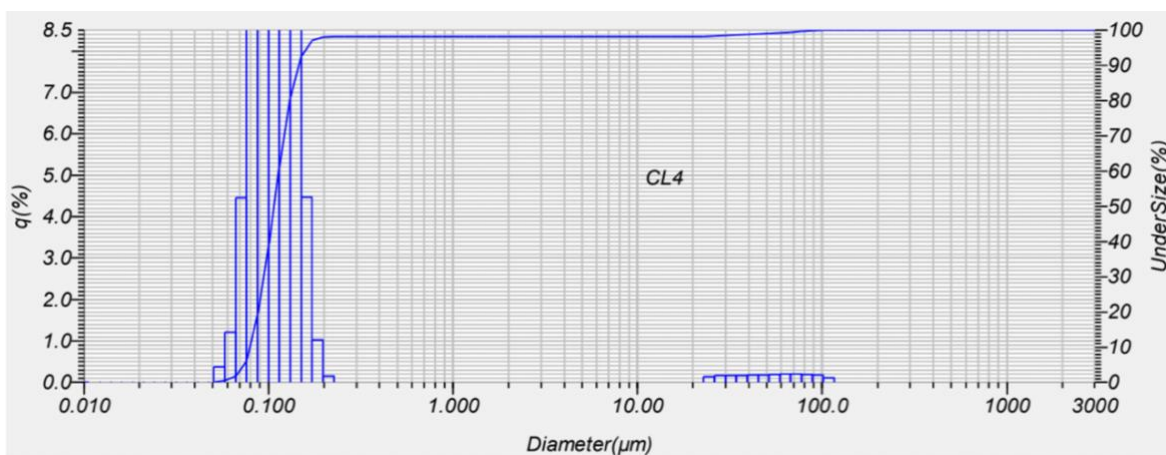


Figura 11. Distribución del tamaño de partícula de la dispersión líquido-cristalina sin AO “CL4”

Nota. Se aplicó ultrasonificación por 3 periodos de 2 minutos cada uno (6 minutos totales) a una amplitud del 80% y ciclos del 100%.

La misma dispersión “CL4” se sonicó por otros dos minutos, conservando las mismas condiciones de amplitud (80%) y ciclos (100%) dando un total de 8 minutos de ultrasonificación; estas condiciones resultaron ser las más eficientes, debido a que el tamaño de partícula se encuentra en la escala nanométrica y a que la dispersión muestra una población de partículas monodispersa, como se muestra en la figura 12. La muestra se renombró como “CL5” para distinguir los resultados del análisis de tamaño de partícula, los cuales se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Resultados del análisis de tamaño de la dispersión líquido-cristalina sin AO “CL5”

Condiciones de ultrasonificación	8 minutos (4 periodos de 2 minutos)
	A= 80% C= 100%
Tamaño de partícula promedio (μm)	0.122
Desviación estándar (μm)	0.026

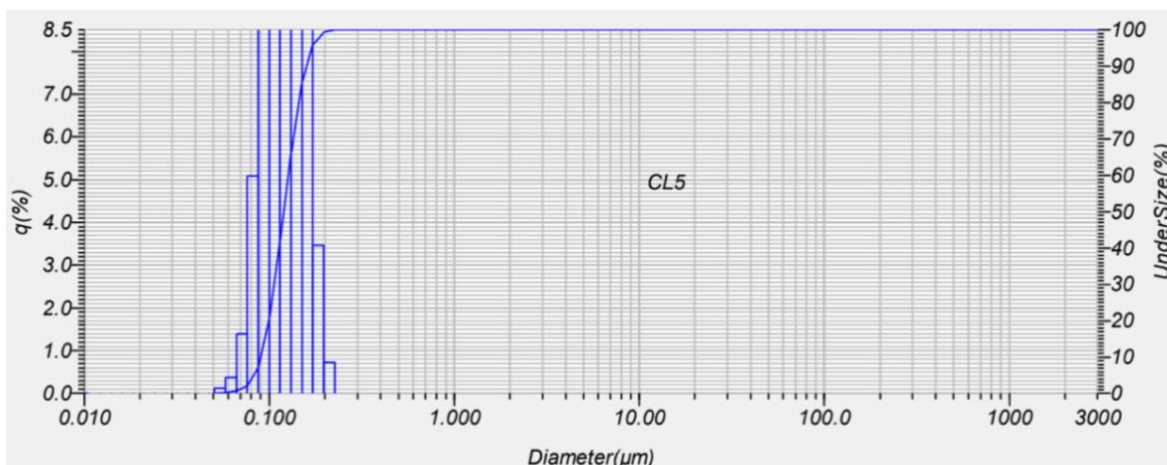


Figura 12. Distribución del tamaño de partícula de la dispersión líquido-cristalina sin AO “CL5”

Nota. Se aplicó ultrasonificación por 4 periodos de 2 minutos cada uno (8 minutos totales) a una amplitud del 80% y ciclos del 100%. Estas condiciones fueron las que se aplicaron a las dispersiones con AO.

Con base en los resultados obtenidos del análisis de tamaño de partícula, se eligieron los parámetros de ultrasonificación establecidos en la muestra CL5 (4 periodos de 2 minutos cada uno, amplitud del 80% y ciclos del 100%) para replicarlos en el resto de las dispersiones a las que se les añadió algún AO, ya que a esas condiciones el tamaño de partícula medio fue de 0.122 μm y el histograma muestra una única población homogénea (sistema monodisperso), los cuales son considerados criterios de estabilidad aceptables.

8.3.2 Análisis de tamaño de partícula de dispersiones con AO

Las siguientes muestras: A2 (BHT 0.05%), B3 (Bisulfito de sodio 0.1%), y todas las del grupo D (ácido ascórbico) cumplieron con los criterios de aceptación del aspecto físico al día 0, mientras que las muestras del grupo C (vitamina E) no cumplieron con casi ningún criterio establecido, ya que fueron las dispersiones más opacas y con mayor formación de sedimento, por lo que no fueron consideradas para el análisis de tamaño de partícula. El resto de muestras del grupo A (A1 y A3) y del grupo B (B1 y B2) si cumplieron con algunos criterios de aceptación al día 0, por lo que si se determinó su tamaño de partícula.

Los resultados estadísticos del análisis de tamaño de partícula de los grupos A, B y D se muestran en las tablas 21, 22 y 23, así como su distribución de tamaño de partícula se muestra en las figuras 13, 14 y 15, respectivamente.

Tabla 21. Resultados del análisis de tamaño de partícula de las tres concentraciones utilizadas para BHT

Muestra	Tamaño de partícula promedio (μm)	Desviación Estándar (μm)	PDI
A1	6.960	26.887	14.923
A2	10.749	32.112	8.924
A3	14.376	34.793	5.857

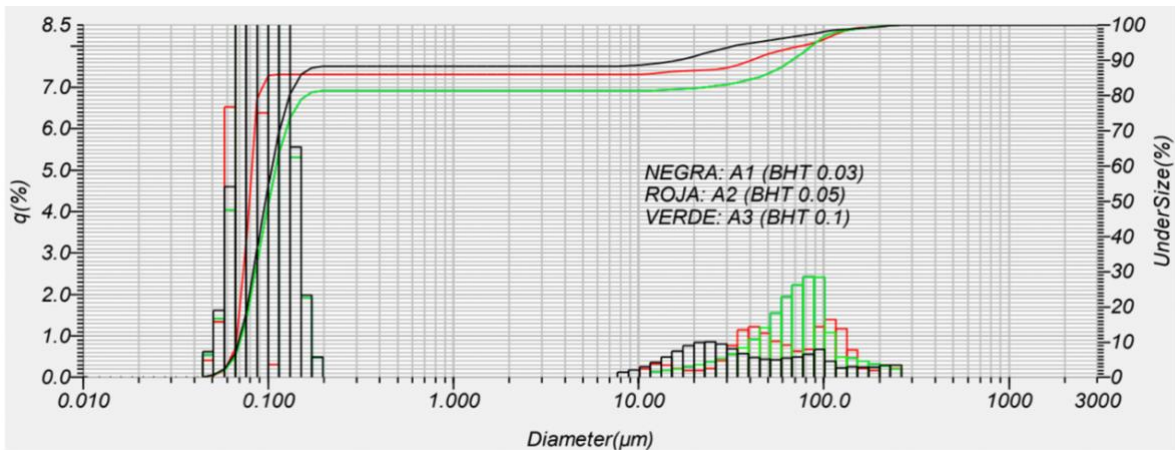


Figura 13. Comparación de la distribución de tamaño de partícula de las tres concentraciones utilizadas de BHT.

Nota. El gráfico negro corresponde a la muestra A1, gráfico rojo es A2 y gráfico verde es A3.

Tabla 22. Resultados del análisis de tamaño de partícula de las tres concentraciones utilizadas para bisulfito de sodio

Muestra	Tamaño de partícula promedio (μm)	Desviación Estándar (μm)	PDI
B1	0.108	0.023	0.045
B2	0.121	0.025	0.042
B3	0.122	0.026	0.046

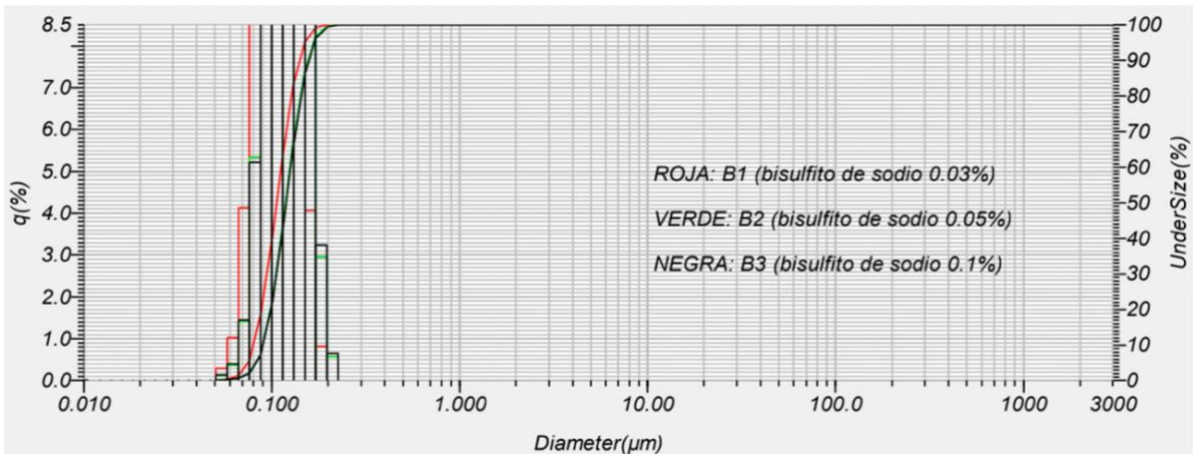


Figura 14. Comparación de la distribución de tamaño de partícula de las tres concentraciones utilizadas de bisulfito de sodio.

Nota. El gráfico rojo corresponde a la muestra B1, gráfico verde es B2 y gráfico negro es B3.

Tabla 23. Resultados del análisis de tamaño de partícula de las tres concentraciones utilizadas ácido ascórbico

Muestra	Tamaño de partícula promedio (μm)	Desviación Estándar (μm)	PDI
D1	0.100	0.024	0.057
D2	0.087	0.022	0.063
D3	0.116	0.027	0.054

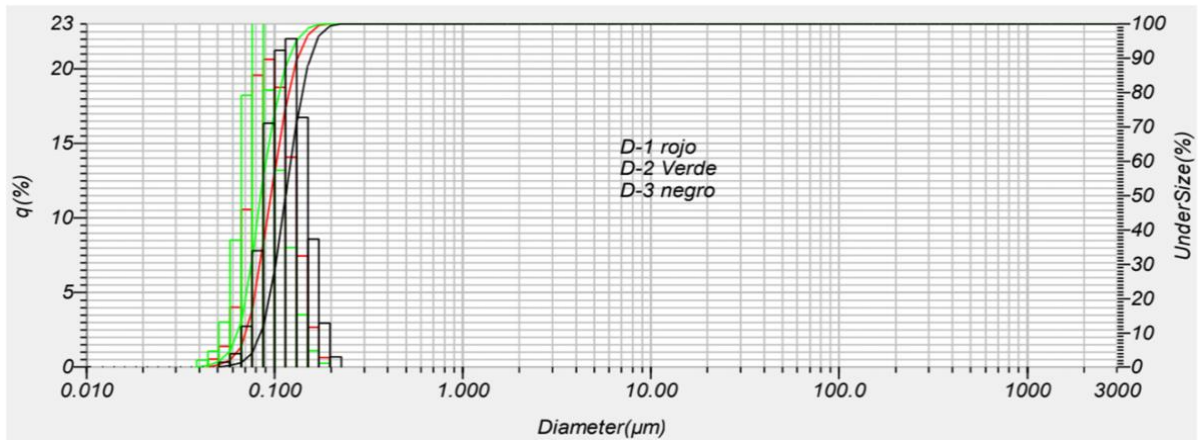


Figura 15. Comparación de la distribución de tamaño de partícula de las tres concentraciones utilizadas de ácido ascórbico.

Nota. Gráfico rojo representa a la muestra D1, gráfico verde a D2 y gráfico negro a D3.

9 Análisis y discusión de resultados

Las dispersiones de CL se prepararon de acuerdo con el método patentado por el Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada de la UAM-Xochimilco; se tuvo especial cuidado en el control de la temperatura, ya que aquellas dispersiones que excedían la temperatura establecida (60 °C) tenían una tonalidad más opaca, lo cual complicaba su análisis de tamaño de partícula, no obstante, no hubo complicaciones adicionales para lograr la reproducibilidad del método.

Varios estudios (Pineda et al., 2017; Puech Magaña, 2014) describen que los ultrasonidos producen ondas acústicas que se dispersan en un medio líquido y generan etapas de alta y baja presión mediante un proceso conocido como cavitación ultrasónica, las cuales son capaces de causar la ruptura de los aglomerados de partículas, generando partículas de menor tamaño y más dispersas. Debido a esto, se eligió a la ultrasonicación como técnica para la síntesis de las dispersiones y la disminución del tamaño de partícula.

Los resultados obtenidos confirman que, como era de esperarse, entre más tiempo se sometían las dispersiones de CL a energía ultrasónica, se obtendrán partículas más dispersas y con mayor uniformidad en su tamaño. Esto se debe a que la cavitación ultrasónica genera fuerzas de choque que rompen los aglomerados de partículas, obteniendo partículas más pequeñas. Lo anterior se ejemplifica con las muestras CL1 (sin sonicar), CL2 (sonicada por 3 minutos) y CL3 (sonicada por 6 minutos), ambas muestras sonicadas con una amplitud y ciclos del 50%. A medida que aumenta el tiempo de ultrasonicación, los ultrasonidos causan la ruptura de los aglomerados de partículas, lo cual aumenta el grado de dispersión y se obtienen partículas más pequeñas y con mayor uniformidad en su tamaño.

No obstante, llega un punto en que las fuerzas de choque se mantienen constantes y ya no tienen la intensidad necesaria para causar una ruptura en las partículas aunque se sometían a ultrasonicación por más tiempo, tal como se ejemplifica en las muestras CL2 y CL3, ya que esta última se sonicó por el doble de tiempo y la

diferencia en el tamaño y uniformidad de las partículas no es tan grande. Lo anterior indica que aplicar ultrasonificación por periodos más largos no es suficiente para disminuir el tamaño de partícula hasta 100 nm, por lo que es necesario un aumento en la intensidad y frecuencia del ultrasonido. Esto se comprueba con la muestra CL4, ya que se mantuvieron las condiciones de tiempo de CL3 (3 periodos de 2 minutos cada uno) pero se aumentó la amplitud a 80% y la frecuencia de los ciclos hasta el 100%, logrando un aumento en la uniformidad del tamaño de partícula.

Sin embargo, el histograma de CL4 muestra que aún persiste una pequeña población de partículas de tamaño micrométrico, por lo que fue necesario aplicar un último periodo de 2 minutos de ultrasonificación con las mismas condiciones de amplitud y frecuencia de ciclos, obteniendo una dispersión de nanopartículas con un tamaño promedio de 0.122 μm y con uniformidad en su tamaño (CL5). Con base en lo anterior, se concluye que las condiciones de ultrasonificación óptimas para obtener sistemas dispersos de nanopartículas de CL son: 4 periodos de 2 minutos cada uno, con una amplitud del 80% y una frecuencia de ciclos del 100%; estos parámetros de ultrasonificación se replicaron en el resto de las dispersiones a las que se les añadió algún AO.

Se analizó el aspecto físico y el tamaño de partícula de todas las dispersiones que incluyen KTZ y AO durante 30 días. La evaluación del efecto antioxidante se basó en el aspecto físico de las dispersiones, considerando el cambio de coloración como el signo más importante, debido a que la oxidación de KTZ produce una coloración rosada en las dispersiones. De acuerdo con los autores Farhadi & Maliki (2001) y Shaligram & Padmaja (2012), el KTZ se oxida con la pérdida de un electrón en el nitrógeno unido al grupo fenólico, formando un radical catiónico (KTZ⁺) que se puede estabilizar por resonancia; posteriormente, el radical catiónico se une a un oxígeno para formar un N-óxido; la aparición de esta forma oxidada es responsable de la coloración rosa.

Por otra parte, Silva et al. (2021) describen que el KTZ es un fármaco susceptible a degradación por oxidación provocada por radicales libres, específicamente por aquellas especies químicas que contienen oxígeno (ROS), lo cual reduce o inhibe el efecto terapéutico del fármaco; por lo que la aparición de una coloración rosa indica que la concentración de AO utilizada no tuvo efecto y, por consecuencia, el principio activo sufrió una degradación por oxidación. Adicionalmente, cualidades físicas como la formación de dos fases, formación de sedimentos o partículas no disueltas, son características atribuidas a la falta de estabilidad en la dispersión.

La muestra control (sin AO) comenzó a teñirse de rosa después de 15 días, por lo que las muestras con AO deberían prolongar por más tiempo la vida media del fármaco. Las muestras del grupo A (BHT), B (bisulfito de sodio) y D (ácido ascórbico) sí cumplieron con las características del aspecto físico al día 0 ya que todas tuvieron una coloración blanca-azulada, ligeramente translúcida y no contenían sedimentos, lo cual indica que la adición de dichos AO no influye en el proceso de síntesis ni en la estabilidad de las dispersiones a corto plazo. En contraste, las muestras del grupo C (vitamina E) tuvieron una tonalidad muy opaca, así como la presencia de sedimentos desde el día 0. Debido a esto último, no se consideró a las muestras del grupo C para su análisis de tamaño de partícula. Es probable que el aspecto físico de las muestras del grupo C se deba a que la vitamina E es una sustancia susceptible a degradación por calentamiento prolongado (Michels, 2012), por lo que el aumento de temperatura generado durante el proceso de ultrasonificación pudo degradar a la molécula, lo cual afectó la estabilidad de las dispersiones.

La muestra control (sin AO) comenzó a teñirse de rosa después de 15 días, por lo que las muestras con AO deberían prolongar por más tiempo la vida media del fármaco. Luego de 30 días, las muestras del grupo A (BHT) fueron las que mejor conservaron sus cualidades físicas ya que su coloración se mantuvo casi idéntica en comparación al día 0, específicamente en las muestras A2 (BHT 0.05%) y A3 (BHT 0.1%), lo cual indica que existe efecto antioxidante, pero habrá que evaluar mediante otro estudio, el efecto de su concentración. Esto era de esperarse, ya que

el mecanismo de acción del BHT se basa en la captación de radicales libres mediante la transferencia de electrones y átomos de hidrógeno, mientras que el KTZ se oxida principalmente por la pérdida de electrones provocada por radicales libres de ROS, por lo que el BHT cede un electrón a la especie oxidante, lo cual evita la formación del N-óxido en el fármaco. No obstante, en todas las dispersiones (A) conteniendo BHT hubo la formación de precipitados después de 25 días. Adicionalmente, los resultados del análisis de tamaño de partícula mostraron que las muestras del grupo A fueron las que tuvieron mayor variación en el promedio del tamaño de partícula, el histograma muestra que las tres muestras fueron sistemas polidispersos ya que hubo la aparición de grupos de partículas de tamaño micrométrico y el PDI de las 3 muestras del grupo A fue mayor a 1; de acuerdo con los autores Kaur et al. (2017), valores de PDI iguales o cercanos a 1 son atribuidos a un nivel alto de polidispersidad en las partículas, es decir, baja uniformidad en el tamaño de partícula de las dispersiones. Los resultados del análisis de tamaño de partícula demuestran que la adición de BHT afectó la estabilidad del sistema líquido-cristalino, probablemente porque ocurrió alguna interacción química con el poloxámero, el cuál es el agente estabilizador que se utilizó en la síntesis de las dispersiones.

Las dispersiones a las que se les adicionó bisulfito de sodio (grupo B) sufrieron un cambio de coloración de blanco-azulado a rosa después de 20 días, aunque en la muestra B3 (0.1% p/p) la coloración rosa fue más tenue; esto puede interpretarse en que es necesario una concentración de bisulfito de sodio mínima del 0.1% p/p para lograr un efecto antioxidante, no obstante, el cambio de coloración se presentó con sólo 5 días de diferencia en comparación con la muestra control, lo cual podría atribuirse a que el bisulfito de sodio puede retardar la reacción de oxidación, pero no la inhibe completamente. Adicionalmente, el bisulfito de sodio actúa principalmente como un agente reductor del oxígeno, principalmente en oxígeno singlete y peróxidos (Dominguez Berraquero, 2016), el cual no es el mecanismo de oxidación principal del KTZ, lo cual podría explicar por qué la coloración rosa fue más intensa en las dispersiones con bisulfito de sodio que en las dispersiones donde

se utilizó BHT o ácido ascórbico. No obstante, las muestras del grupo B fueron las que mayor similitud tuvieron en el tamaño de partícula, ya que las 3 muestras tienen un tamaño de partícula medio de aproximadamente $0.1 \mu\text{m}$ y un PDI muy cercano al 0, lo que representa homogeneidad en el tamaño de partícula de las dispersiones. Por otra parte, con este grupo B ocurrió la formación de sedimentos en todas las dispersiones, el cual es un signo de inestabilidad física. La formación de sedimentos y la coloración rosa en las muestras del grupo B demuestran que el bisulfito de sodio no es un antioxidante ideal para incorporarse en sistemas líquido cristalinos cargados con KTZ.

Por su parte, después de 30 días, las muestras del grupo D no presentaron una coloración rosa sino amarillenta; tonalidad que fue más intensa en D1 (0.1%), mientras que las muestras D2 y D3 (0.5% y 1%, respectivamente) conservaron su tono translúcido, lo cual podría indicar que se necesita una concentración mínima del 0.5% p/p de ácido ascórbico para lograr retardar la reacción de oxidación del KTZ. La coloración amarillenta podría atribuirse a que el ácido ascórbico logra reducir la velocidad de reacción de oxidación, pero no la inhibe completamente, es por eso que si hay un cambio de coloración pero no llega a ser completamente rosa. De acuerdo con lo reportado por Rubio Cortés et al. (2016), el mecanismo antioxidante del ácido ascórbico es análogo al de BHT, el cual se basa en la donación de electrones y átomos de H a especies oxidantes de radicales libres. Sin embargo, el ácido ascórbico se adicionó en la fase acuosa debido a su solubilidad hidrofílica mientras que el BHT se adicionó en la fase lipídica (misma fase en la que se encuentra el fármaco), por lo que es probable que para lograr inhibir la reacción de oxidación, el AO debe añadirse en la misma fase donde se encuentra el fármaco; esto podría explicar por qué las dispersiones con BHT conservaron su coloración casi idéntica a la del día 0. Otra explicación podría ser que el producto de la reacción de oxidación es distinto al N-óxido de KTZ, lo cual explicaría por qué sufrió un cambio de color distinto al rosa mostrado normalmente. Así mismo, los resultados muestran que la adición de ácido ascórbico no parece interferir con la estabilidad del sistema líquido-cristalino, ya que no hubo la formación de dos fases ni de

sedimentos en ninguna de las muestras del grupo D. Adicionalmente, hubo gran similitud en los resultados del análisis de tamaño de partícula; todas las dispersiones tuvieron una desviación estándar de $0.02 \mu\text{m}$ y un PDI de aproximadamente 0.06, un valor muy cercano al 0 el cual está asociado con dispersiones estables y con homogeneidad en su distribución de tamaño.

Finalmente, las dispersiones a las que se les adicionó vitamina E (grupo C) fueron las que mostraron menor efecto antioxidante, ya que tuvieron una coloración rosa intensa desde el día 15; también fueron las únicas dispersiones en presentar separación de fases. La vitamina E tiene un mecanismo antioxidante análogo al de BHT y ácido ascórbico, el cual se basa en la captación de radicales libres mediante transferencia de átomos de H y electrones (Rubio Cortés et al., 2016). No obstante, es una vitamina susceptible a la degradación por calentamiento prolongado y exposición a la luz UV, generando productos de degradación que pueden ocasionar un efecto pro-oxidante (Michels, 2012) por lo que es posible que se haya degradado durante el proceso de ultrasonificación, ya que en ese paso se libera una gran cantidad de energía lo cual conlleva a un aumento en la temperatura.

En resumen, ningún AO fue 100% efectivo; no obstante, los relativamente más efectivos como antioxidantes fueron el BHT y el ácido ascórbico; el primero demostró que puede inhibir la reacción de oxidación de KTZ por 30 días, pero altera la estabilidad física del sistema, ya que las dispersiones con BHT tienen aglomerados de partículas; por otra parte, se destaca al ácido ascórbico, del cual no se puede asegurar que haya inhibido o retardado la reacción oxidación, sin embargo, no afectó la estabilidad física del sistema líquido cristalino. Por lo anterior, la combinación de BHT y ácido ascórbico puede ser una opción prometedora para inhibir completamente la reacción de oxidación de KTZ sin afectar la estabilidad del nanosistema líquido-cristalino. Por otra parte, el bisulfito de sodio sólo logró retardar la reacción de oxidación del KTZ por poco tiempo; mientras que la vitamina E no mostró ningún efecto beneficioso, por lo que se descarta completamente la adición de estos dos AO para el sistema líquido-cristalino conteniendo KTZ.

10 Conclusiones

- El método de síntesis de dispersiones de CL cargadas con KTZ propuesto por el Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada de la UAM-X es reproducible.
- La ultrasonificación como mecanismo de reducción de tamaño de glóbulo en el proceso de síntesis del sistema nanoestructurado líquido-cristalino requiere de un estricto control de sus parámetros de proceso. Para el presente sistema conteniendo KTZ, las condiciones óptimas de ultrasonificación en las que el promedio del tamaño de partícula de las dispersiones de CL se redujeron hasta $0.1\ \mu\text{m}$ (100 nm) son: 4 periodos de 2 minutos cada uno, amplitud del 80% y ciclos del 100%.
- El uso de AO y su proporción, es un parámetro crítico de formulación para la estabilidad química del KTZ y la física del sistema LC; habiéndose identificado que de los AO estudiados, la vitamina E no es un aAO efectivo.
- De los AO incorporados al sistema LC cargado con KTZ, el bisulfito de sodio puede retardar por muy poco tiempo, la reacción de oxidación en concentraciones peso/peso superiores al 0.1%; por lo que no se considera viable su utilización.
- Con relación al uso del BHT como AO, no obstante que logra inhibir la reacción de oxidación en concentraciones superiores a 0.05% (al menos durante 30 días), los resultados del análisis de tamaño de partícula demuestran que no hay homogeneidad en el tamaño de partícula obtenido en la dispersión, por lo que no se puede considerar un AO útil para obtener un sistema estable LC cargado con KTZ.
- El ácido ascórbico mostró tener efecto AO para el sistema LC cargado con KTZ, sin embargo, es necesario evaluar su potencial efecto antioxidante con algún ensayo (como el método DPPH) para comprobar su potencia como AO.
- Del conjunto de resultados obtenidos, se propone continuar el estudio experimentando la combinación AO de BHT y ácido ascórbico, ya que cada uno mostró una eficacia relativa como AO con estabilidad física del sistema.

- Se recomienda dar continuidad a este proyecto con otras técnicas de caracterización, tales como: espectrometría UV-visible, cromatografía líquida de alta resolución o ensayos específicos para evaluar el efecto antioxidante, como el método DPPH.

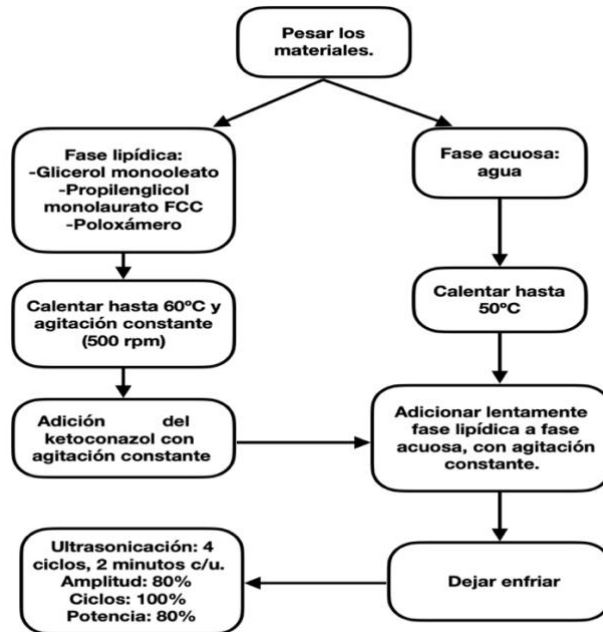
11 Anexos



Anexo 1. Equipo ultrasonicador, marca: Hielscher, modelo: UP200Ht.



Anexo 2. Analizador de tamaño de partícula, marca: Horiba, modelo: Partica LA-050V2.



Anexo 3. Diagrama del proceso de preparación de dispersiones líquido-cristalinas propuesto por el LFMLC.

12 Referencias

Acofarma. (2021). Ficha de información técnica: butilhidroxitolueno (BHT). <https://formulasmagistrales.acofarma.com/idb/descarga/3/f804bd7fb3ad27dd.pdf>

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, AEMPS (2013). Ketoconazol de administración sistémica (comprimidos): suspensión de comercialización. Nota Informativa: NI-MUH (FV), 2112013-ketoconazol. 2013, 1-A; 4 pag. https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosUsoHumano/seguridad/2013/docs/NI-MUH_FV_21-2013-ketoconazol.pdf

Akula, S., Gurram, A. K. & Devireddy, S. R. (2014). Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems: An Attractive Strategy for Enhanced Therapeutic Profile. *International Scholarly Research Notices*, 2014, Article ID 964051. <https://doi.org/10.1155/2014/964051>

Alvarado López, K. (2015). Uso de cocrystalos para mejorar la solubilidad y velocidad de disolución de los fármacos. *Pensamiento Actual*, 15(25), 207-215. https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjbsd_07oj9AhXQKkQIHW4GCHYQFnoECA4QAQ&url=https%3A%2F%2Fdiagonalnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F5821471.pdf&usg=AOvVaw1OSj0rbK_-U8WCgxOgefhd

Andrienko, D. (2018). Introduction to liquid crystals. *Elsevier, Journal of molecular liquids*. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.01.175>

Barrio Saralegui, R. (2020). *Nanopartículas lipídicas como sistemas de administración de sustancias activas: aspectos tecnológicos y aplicaciones terapéuticas*. [Trabajo de fin de grado, Universidad del País Vasco]. https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/51089/TFG_Barrio.pdf?sequence=1

Bayer. (2021). Beneficios de los glucosinolatos en el brócoli. <https://www.vegetables.bayer.com/cl/es-cl/recursos/growing-tips/beneficios-de-los-glucosinolatos-en-el-brocoli.html>

Burnett, M. K. & Kurtz, S. E. (2019). *Water-Free ketoconazole containing preparations for topical application to the skin*. (Patente de Alemania. No. DE69930004T2). Johnson and

Johnson Consumer Inc.
<https://patents.google.com/patent/DE69930004T2/en?inventor=M.+Katharine+Basking+Ridge+BURNETT>

Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación. (s.f.). *Fundamento de la técnica de ultrasonificación*. Universidad de Barcelona. <https://www.ub.edu/talq/es/node/252>

Chen, Y., Ma, P., & Gui, S. (2014). Cubic and hexagonal liquid crystals as drug delivery systems. *BioMed research international*, 815981. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/815981/>

Chountoulesi, M., Pippa, N., Pispas, S., Chrysina, E. D., Forys, A., Trzebicka, B. & Demetzos, C. (2018). Cubic lyotropic liquid crystals as drug delivery carriers: Physicochemical and morphological studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 550 (1-2), 57-70. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.08.003>.

Chountoulesi, M., Pispas, S., Tseti, I. K., & Demetzos, C. (2022). Lyotropic Liquid Crystalline Nanostructures as Drug Delivery Systems and Vaccine Platforms. *Pharmaceuticals*, 15(4), 429. <http://dx.doi.org/10.3390/ph15040429>

De la Fuente, R., Altermatt, F., Corvetto, M., Sierra, R., Petersen, K., Fierro, C. & De la Cuadra, J. C. (2009). Conceptos básicos de ultrasonografía aplicada a la anestesia regional. *Rev Chil Anest*, 38, 39-45. https://www.sachile.cl/upfiles/revistas/4ac678bc0ebdf_revisión_fuente_altermatt.pdf

Farhadi, K & Maleki, R. (2001). A New Spectrophotometric Method for the Determination of Ketoconazole Based on the Oxidation Reactions. *Analytical Sciences*, 17, 867-870. https://www.jstage.jst.go.jp/article/analscisp/17icas/0/17icas_0_i867/_pdf

Febles Fernández, C., Soto Febles, C., Saldaña Bernabeu, A. & García Triana, B. E. (2002). Funciones de la vitamina E: Actualización. *Revista Cubana de Estomatología*, 39(1), 28-32. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072002000100005

Fernández-Montes, E. (2004). Formulario visual. *Elsevier*, 18 (10), 57-61. <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-formulario-visual-13068987>

Fernández-Pachón, M. S., Villaño, D., Troncoso, A. M. & García-Parrilla, M. C. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del vino y valoración de sus efectos *in vivo*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56(2), 110-122. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222006000200002

Francois, M. K. & Snoeckx, E. C. (2015). *Ketoconazole topical emulsions*. (Patente de España, No. ES2240977T3). Janssen Pharmaceutica NV. <https://patents.google.com/patent/ES2240977T3/es?inventor=Marc+Karel+Jozef+Francois>

Galano, A. (2022). Estrés oxidativo, radicales libres, antioxidantes y química computacional. http://bsqm.org.mx/pdf-boletines/V11/V11N3/BSMQ_11_3_kEstresOxidativo.pdf

Gazga, C. (2015). *Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y de la cinética de difusión percutánea in vitro de cristales líquidos liotrópicos cargados con ketoconazol* [Idonea Comunicación de Resultados para obtener el grado de Maestro en Ciencias Farmacéuticas, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco]. <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/bitstream/123456789/2314/1/181401.pdf>

Gregori, B. (2005). Structure and activity of the antifungal agents. *Rev Cubana Farm*, 39(2), 1-16. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75152005000200012&script=sci_abstract&lng=en

González Limón, M. (2016). *Aplicación de ultrasonido de potencia, luz visible y ultravioleta en hojas de brócoli (Brassica oleracea var. Itálica) y su efecto sobre actividad y concentración de compuestos antioxidantes* [Tesis de maestría, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/2233?locale-attribute=es>

Guo, C., Wang, J., Cao, F., Lee, R. J., & Zhai, G. (2010). Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. *Drug discovery today*, 15(23-24), 1032–1040. http://csmres.co.uk/cs.public.upd/article-downloads/Guo_2010_Drug-Discovery-Today.pdf

Hielscher Ultrasonics. (s.f.). *Ultrasonic Dispersing and Deagglomeration*. <https://www.hielscher.com/disperse.htm>

Higdon, J., Drake, V. J., Angelo, G. & Delage, B., (julio de 2018). *Vitamin C*. Linus Pauline Institute. <https://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/vitamin-C>

Huet Breña, C. (2017). *Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en muestras biológicas*. [Trabajo de fin de grado, Universidad Complutense de Madrid]. <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/CRISTINA%20HUET%20BREÑA.pdf>

Jacob, S., Nair, A. B., Shah, J., Gupta, S., Boddu, S. H. S., Sreeharsha, N., Joseph, A., Shinu, P. & Morsy, M. A. (2022). Lipid Nanoparticles as a Promising Drug Delivery Carrier for Topical Ocular Therapy—An Overview on Recent Advances. *Pharmaceutics*, 14(3), 533. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030533>

Jain, S., Yadav, P., Swami, R., Swarnakar, N. K., Kushwah, V. & Katiyar, S. (2018). Lyotropic Liquid Crystalline Nanoparticles of Amphotericin B: Implication of Phytantriol and Glyceryl Monooleate on Bioavailability Enhancement. *AAPS PharmSciTech* 19, 1699–1711. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-0986-3>

Kaur, I., Ellis, L. J., Romer, I., Tantra, R., Carriere, M., Allard, S., Mayne-L'Hermite, M., Minelli, C., Unger, W., Potthoff, A., Rades, S. & Valsami-Jones, E. (2017). Dispersion of Nanomaterials in Aqueous Media: Towards Protocol Optimization. *Journal of Visualized Experiments*, (130), e56074, doi:10.3791/56074. <https://www.jove.com/es/t/56074/dispersion-nanomaterials-aqueous-media-towards-protocol>

Kim, D. H., Jahn, A., Cho, S. J., Kim, J. S., Ki, M-H. & Kim, D-D. (2015). Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery: a review. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 45, 1–11. <https://link.springer.com/article/10.1007/s40005-014-0165-9>

Lodha, A. P., Jadhav, G. P. & Pande, V. V. (2014). Liquid crystals as a cubo-hexagonal topical controlled drug delivery system. *Pharmacophore*, 5(3), 430-441. <https://pharmacophorejournal.com/storage/models/article/DmRbc35MQj74pr7IVJjLaK2r61pHA YKI4Ib44yRGJVERixhPhSt1ZBQQmVEG/liquid-crystals-as-a-cubo-hexagonal-topical-controlled-drug-delivery-system.pdf>

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M. & Tuñón, M.J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, XVII(6), 271-278. <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>

Mhaske, R. A., & Sahasrabudhe, S. (2011). Identification of major degradation products of ketoconazole. *Scientia pharmaceutica*, 79(4), 817–836. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1107-18>

Michels, A. J. (febrero de 2012). *Vitamin E and skin health*. Linus Pauline Institute. <https://lpi.oregonstate.edu/mic/health-disease/skin-health/vitamin-E>

Quintana López, A., Hurtado Oliva, M. A., Hernández, C. & Palacios Mechetnov, E. (2018). Carotenoides: ¿Qué son y para qué se usan?. *Academia Mexicana de Ciencias*, 69(4), 50-55. https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/69_4/PDF/10_69_4_1106_Carotenoide_s_L.pdf

Quirino-Barreda, C.T; Gazga-Urioste, C; Juárez-Sandoval, J.J; Faustino-Vega, A; Macín-Cabrera, S.A. y Melo-Ruíz, V. E. (2017). Cristales líquidos liotrópicos. Nanoestructuras biomiméticas para uso tópico medicinal. *MundoNano. Revista Interdisciplinaria de Nanociencia y Nanotecnología*, 10 (19):7-25. DOI: 10.22201/ceiich.24485691e.2017.19.57559

Quirino-Barreda, C.T., Noguez-Méndez, N.A., Rivera-Becerril, E., Gazga-Urioste, C., Pérez-Hernández, G., Maldonado-Campos, J.F.J., Palma-Ramos, A., Castrillón-Rivera, L.E., Juárez-Sandoval, J.J., Santiago-Téllez, A., Faustino-Vega, A., Gutiérrez-Zamora, A.C., Macín-Cabrera, S.A., Rubio-Martínez, A., Ramírez-Palma, J.A. y Campos-Terán, J. Composición tópica con base en cristales líquidos liotrópicos. Patente MX 372244. No. Expediente IMPI: MX/a/2015/009845.

Rodríguez Carranza, R. (2021). Ácido ascórbico: vitaminas. *Vademécum Académico de Medicamentos*. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1552§ionid=90366713>

Ruipérez, V. (2020). Cremas de hidroquinolina blanqueantes de la piel [Trabajo de fin de grado]. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense. <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/VICTOR%20PABLO%20RUIPEREZ%20FERREIRO.pdf>

Santiago, A. (2014). Determinación del efecto antimicótico de ketoconazol incorporado en cristales líquidos liotrópicos en *C. albicans* [Idónea Comunicación de Resultados para obtener

el grado de Maestro en Ciencias Farmacéuticas, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco]. <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/bitstream/123456789/2317/1/181407.pdf>

Shaligram S. & Padmaja, P. (2012). Spectrophotometric method for the determination of ketoconazole based on amplification reactions. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2(1), 43-47. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2011.10.004>

Shen, Y. & Dierking, I. (2019). Perspectives in Liquid-Crystal-Aided Nanotechnology and Nanoscience. *MDPI*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/app9122512>

Silva A.M. & Silva L.M. (2021). Influence of the capuchin hydroethanolic extract *Tropaeolum majus* L. on the stability of ketoconazole. *Rev Ciênc Farm Básica, Apl.* 41. <https://doi.org/10.4322/2179-443X.0679>

Suárez, M. & Brito, C. (2020). Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de antocianinas de *Vaccinium floribundum* Kunt en nanopartículas de zeína. *infoANALÍTICA*, 8 (1). <https://doi.org/10.26807/ia.v8i1.98>

Ochoa Sánchez, S. (2018). *Sistema de clasificación biofarmacéutica en la solicitud de una bioexención*. [Trabajo de fin de grado, Universidad Complutense de Madrid]. <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/SOFIA%20OCHOA%20SANCHEZ.pdf>

Pasquali, R. Chiappetta, D., García Gamboa, M. F. & Bregni, C. (2007). Liberación sostenida de cafeína de dos sistemas líquido-cristalinos. *Lat. Am. J. Pharm.* 26(3). http://www.latamjpharm.org/trabajos/26/3/LAJOP_26_3_1_10_65L4DY5V74.pdf

Petricca, S., Celenza, G., Luzi, C., Cinque, B., Lizzi, A. R., Franceschini, N., Festuccia, C., & Iorio, R. (2022). Synergistic Activity of Ketoconazole and Miconazole with Prochloraz in Inducing Oxidative Stress, GSH Depletion, Mitochondrial Dysfunction, and Apoptosis in Mouse Sertoli TM4 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5429. <https://doi.org/10.3390/ijms23105429>

Pineda, C., Medina, S., Tellez, A., Ramirez, M., Villanueva, M., Lucho, C., Trejo, G. & Jimenez, A. (2017). Ultrasonificación de baja frecuencia aplicada a la producción biológica de hidrógeno. *Ecorfan*. https://www.ecorfan.org/proceedings/PCBS_TI/PCBS_1.pdf

Prenzler, P. D., Ryan, D., & Robards, K. (2021). Chapter 1: Introduction to basic principles of antioxidant activity en Prenzler, P. D., Ryan, D., & Robards, K. (Ed.), *Handbook of antioxidant methodology: Approaches to activity determination* (No. 28, pp. 1- 62). Royal Society of Chemistry. <https://books.rsc.org/books/edited-volume/903/chapter/693594/Introduction-to-Basic-Principles-of-Antioxidant>

Puech Magaña, J. (2014). *Efecto de ultrasonificación de alta potencia en las propiedades de un nanocomposite de matriz epoxi reforzado con sílice* [Proyecto de fin de carrera, Universidad Carlos III de Madrid]. https://e-archivo.uc3m.es/bitstream/handle/10016/24963/PFC_Jaime_Puech_Magana.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Romero Ochoa, G. A. (2018). *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, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco]. <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/bitstream/123456789/2362/1/183463.pdf>

Rubio Cortés, J. E., López Martínez, J. C., Vázquez Guevara, M. A. & Alcaraz Contreras, Y. (2016). Evaluación de la actividad antioxidante de análogos del BHT. *Jóvenes en la ciencia*, 2(1), 351-354. Universidad de Guanajuato. <http://repositorio.ugto.mx/bitstream/20.500.12059/2527/1/Evaluación%20de%20la%20Actividad%20Antioxidante%20de%20Análogos%20del%20Bht.pdf>

Tan, O.J., Loo, H. L., Thiagarajah, G., Palanisamy, U. D., & Sundralingam, U. (2021). Improving oral bioavailability of medicinal herbal compounds through lipid-based formulations – A Scoping Review. *Phytomedicine*, 90, 153651.

Trejo, S., Dueñas, A., Hernández, G., Nuñez, L., Plascencia, N., Santiago, D., Reynoso, M., Vergara, A. & Villalpando, J. (2010). *Fundamentos de Farmacología*. Editorial Trillas (1a ed., pp. 436-453).

Vaca Chavez, F. (2002). *Estudio mediante resonancia magnética de efectos pretransicionales en cristales líquidos* [Tesis de doctorado, Universidad Nacional de Córdoba]. <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/85>

Vaquero, G. & Vicentini, N. (s.f.). Propiedades, estudios y dosis recomendada del PARAdigmOX® White Dry: Diferenciación química y de eficiencia respecto al BHT. Kemin. <https://info.kemin.com/hubfs/KASA/LT/LT-Propiedades,%20estudios%20y%20dosis%20recomenda%20del%20PARAdigmOX%20White%20Dry.pdf>

Velasco, A., San Román, L., Serrano, J., Martínez-Sierra, R. & Cadavid, I. (2003). *Farmacología Fundamental*. McGraw-Hill, (1a ed., pp. 821-834).

Wan, J., Wang, S., Gui, Z., Yang, Z., Shan, Q., Chu, X., Gui, S. & Yang, Y. (2018). Phytantriol-based lyotropic liquid crystal as a transdermal delivery system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 125, 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.09.018>.

Wang, X., Zhang, Y., Huang, J. et al. (2019). A Novel Phytantriol-Based Lyotropic Liquid Crystalline Gel for Efficient Ophthalmic Delivery of Pilocarpine Nitrate. *AAPS PharmSciTech* 20, 32. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1248-0>