Facultad Cs. Médicas
Biblioteca
GMD
TDM 2344

UNR Universidad Nacional de Rosario

# FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

## ANALISIS *in vitro* DE LA DISPONIBILIDAD DE GRISEOFULVINA Y KETOCONAZOL INCLUIDOS EN POLIMEROS SINTETICOS Y SEMI-SINTETICOS. DISEÑO Y DESARROLLO DE SISTEMAS POLIMERICOS ACUOSOS DE APLICACION DERMICA.

**Farm. Daniela María Marinelich**

**Director: Dra Nidia Renée Calafato**

**AREA TECNICA FARMACEUTICA**

**Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional de Rosario**

**2022**

## *Agradecimientos*

*A mi directora, Dra. Renée Calafato, cuya dirección hizo posible la realización de esta tesis.*

*A Claudio, Celina, Darío, Gaby, Agus y Silvi, por sus aportes, consejos y las horas de trabajo compartidas.*

*Al Dr. Guillermo Picó, por su inestimable ayuda y guía en los primeros años de la tesis.*

*A Lucía Bulacio y Silvana Ramadán, quienes hicieron posible la realización de los ensayos microbiológicos.*

*A Mauro Morri, por su invalorable aporte en la realización de los ensayos de liberación.*

*Al Dr Alfredo Rigalli y la Dra Betina Bongiovanni, por su enorme paciencia y comprensión.*

*A Bruno, Luisina, Julieta y Franco; sin ellos, esto no habría sido posible…*

## INDICE GENERAL


| | |
|---|---|
| **RESUMEN** | **i** |
| **HIPOTESIS DE TRABAJO** | **iii** |
| **OBJETIVOS GENERALES** | **iv** |
| **CAPITULO 1** | **1** |
| **CAPITULO 2** | **28** |
| **CAPITULO 3** | **98** |
| **CAPITULO 4** | **149** |
| **CONCLUSIONES FINALES** | **199** |

# RESUMEN

La terapéutica tópica representa una modalidad habitual de tratamiento en el campo de la Dermatología. Dentro del amplio abanico de dermatosis existentes, las micosis constituyen uno de los grupos más frecuentes, cuyo tratamiento requiere la aplicación de Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFAs) en forma localizada, vehiculizados en una forma farmacéutica adecuada. La piel constituye una vía atractiva para la administración de IFAs, tanto en forma local como transdérmica; sin embargo, la presencia de la barrera epidérmica constituye un obstáculo para la penetración de los IFAs aplicados. La liberación de los IFAs a partir de la forma farmacéutica que los vehiculiza es un paso indispensable para conseguir el objetivo terapéutico.

**La hipótesis de trabajo del presente trabajo de tesis es que los polímeros de cadena flexible y anfifílicos hidrosolubles a ensayar permiten aumentar la solubilidad aparente de fármacos poco solubles en agua, proporcionando sistemas estables y mejorando la liberación de los IFAs modelo desde formas farmacéuticas semisólidas que los incluyen.**

Como IFAs modelo se emplearon Ketoconazol y Griseofulvina, agentes antifúngicos de baja solubilidad acuosa. Como polímeros se ensayaron derivados polisacáridos (Carboximetilcelulosa sódica, Metilcelulosa, Hidroxipropilmetilcelulosa, Quitosano, Guar Hydroxypropyl Trimonium Chloride (Cosmedia Guar®)), derivados acrílicos (Copolímero Acrilato/Palmeth-25 Iraconato (Polygel W30®), Glicerilpoliacrilato (Hyspagel 200®)), y Poloxámeros 188, 237, 338, 407.

La determinación de las interacciones IFA-polímero, la capacidad de los sistemas poliméricos para la incorporación de los IFAs, la inclusión de los IFAs en las redes o micelas poliméricas y la estabilidad de los IFAs incluidos en los sistemas poliméricos se analizó por espectrofluorometría. Los resultados obtenidos en esta etapa permitieron la selección de los polímeros con los que se realizaron las etapas siguientes: Quitosano, Poliacrilatos sustituidos y Poloxamer 407.

Se diseñaron sistemas gel y emulgel vehiculizando los IFAs modelo, los cuales se caracterizaron en función de su pH, signo emulsivo, extensibilidad, viscosidad aparente, comportamiento reológico y actividad antifúngica *in vitro*. Todos los sistemas ensayados

presentaron características adecuadas para su uso por vía tópica, resultando los geles de QTO los más fluidos, adecuados para su uso como formas líquidas viscosas.

La liberación *in vitro* de los IFAs a partir de las formas farmacéuticas fue evaluada mediante el uso de celdas de difusión verticales, seleccionando para cada IFA los parámetros de proceso adecuados (medio receptor, tipo de membrana semipermeable, velocidad de agitación). Los geles y emulgeles conteniendo Poloxámero 407, Quitosano y Copolímero Acrilato/Palmeth 25-Itaconato presentaron una mayor capacidad de liberación de Ketoconazol, comparado con una crema comercial empleada como referencia; sus perfiles de liberación se modelizaron según Korsemeyer-Peppas. Los geles y emulgeles con GRI presentaron muy bajas tasas de liberación, al igual que la crema usada como referencia (menor a 0,1%); la cinética de cesión respondió al modelo de Higuchi (difusional). Los sistemas conteniendo QTO presentaron las mayores tasas de liberación.

## HIPOTESIS DE TRABAJO

**Los polímeros de cadena flexible y anfifílicos hidrosolubles a ensayar permiten aumentar la solubilidad aparente de fármacos poco solubles en agua, proporcionando sistemas estables que mejoran la liberación *in vitro* de los IFAs modelo desde formas farmacéuticas que los incluyen.**

## OBJETIVOS GENERALES

- ✓ **Evaluar la capacidad de incorporación y estabilidad de los IFAs modelo en los sistemas poliméricos propuestos.**

- ✓ **Diseñar formas farmacéuticas semisólidas destinadas a aplicación tópica que incluyan los IFAs modelo y polímeros seleccionados.**

- ✓ **Evaluar las características físicoquímicas y actividad antifúngica de las formas farmacéuticas diseñadas.**

- ✓ **Evaluar la liberación *in vitro* de los IFAs modelo a partir de las formas farmacéuticas diseñadas, empleando celdas de difusión vertical.**

# CAPÍTULO 1

# INTRODUCCIÓN GENERAL

# CAPÍTULO 1 - ÍNDICE

**Lista de Abreviaturas y Símbolos** 3

**Índice de Figuras** 4

**Índice de Tablas** 5

**1. 1. Farmacia Galénica** 6

**1.2. Vías de administración de medicamentos** 7

**1.3. Administración de medicamentos a través de la piel** 7

**1.4. Relación forma farmacéutica – efecto terapéutico** 10

**1.5. Liberación de IFAs desde formas farmacéuticas semisólidas de aplicación dérmica** 12

**1.5.1. Recursos tecnológicos para aumentar la tasa de liberación** 14

**1.6. Micosis** 15

1.6.1. Clasificación de las micosis 16

1.6.2. Tratamiento de las micosis superficiales y cutáneas 16

1.6.3. Antifúngicos empleados en este trabajo de tesis 17

1.6.3.1. Griseofulvina 17

1.6.3.1.1. Estructura química 17

1.6.3.1.2. Datos físicoquímicos 17

1.6.3.1.3. Clasificación biofarmacéutica 18

1.6.3.1.4. Espectro de acción 18

1.6.3.1.5. Formas farmacéuticas y farmacocinética 18

1.6.3.2. Ketoconazol 19

1.6.3.2.1. Estructura química 19

1.6.3.2.2. Datos físicoquímicos 19

1.6.3.2.3. Clasificación biofarmacéutica 20

1.6.3.2.4. Espectro de acción 20

1.6.3.2.5. Formas farmacéuticas y farmacocinética 20

**Referencias Bibliográficas** 22

# CAPÍTULO 1 – LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| IFA | Ingrediente Farmacéutico Activo |
| AC | Activo Cosmético |
| RAE | Real Academia Española |
| GRI | Griseofulvina |
| P | Coeficiente de partición |
| EC | Estrato córneo |
| KTO | Ketoconazol |

# CAPÍTULO 1 - ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1. 1. Relación IFA/Excipientes/Forma farmacéutica/Medicamento 10
Fig 1.2. Fases que atraviesa un medicamento 12
Fig 1.3. Línea histórica en el descubrimiento y síntesis de antifúngicos 16
Fig 1.4. Estructura 2D Griseofulvina 17
Fig 1.5. Estructura 2D Ketoconazol 19

# CAPÍTULO 1 - ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. 1. Vías de administración de medicamentos 7
Tabla 1.2. Ventajas y limitaciones de la vía cutánea en la administración de medicamentos 9
Tabla 1.3. Propiedades físicoquímicas de GRI 17
Tabla 1.4. Propiedades físicoquímicas de KTO 19

# CAPÍTULO 1 - DESARROLLO

## 1.1.FARMACIA GALÉNICA

La Farmacia Galénica recibe su nombre de Claudio Galeno Nicón de Pérgamo (más conocido como Galeno)(ca. 130–ca. 210 d. C.), médico de Pérgamo en el Imperio Romano cuyo sistema médico llegó a dominar la medicina occidental durante casi dos milenios. Galeno propuso varias formas de corregir los desequilibrios que según sus teorías causaban las enfermedades, una de las cuales fue el uso de medicamentos o farmacoterapia. La teoría y la práctica de la farmacia constituyeron una importante línea de investigación en sus más de 400 escritos de su autoría[1], sentando las bases técnicas para la preparación de las principales formas farmacéuticas[2].

Según la Farmacopea Argentina, un medicamento es "toda preparación o producto farmacéutico empleado para la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad o estado patológico, o para modificar sistemas fisiológicos". Los medicamentos contienen uno o varios principios activos y excipientes, formulados bajo una determinada forma farmacéutica[3].

La preparación y formulación de medicamentos se consideró durante muchos años como un arte, y su estudio estaba constituido por una gran cantidad de conocimientos empíricos y descriptivos que se han transformado en la actualidad en un conjunto de nociones de alto rigor científico. La indicación, aún mantenida por tradición en prescripciones magistrales, de "Hágase según arte" debería ser sustituida por "Hágase según ciencia", porque el horizonte se ha ampliado considerablemente para el logro de preparados farmacéuticos eficaces, seguros, estables y costo-efectivos[4].

Hoy en día la expresión "Farmacia Galénica" hace referencia al conjunto de conocimientos necesarios para la formulación, control y elaboración de una forma farmacéutica que garantice la seguridad y eficacia terapéutica para la que fue concebida[4-6], y abarca muchas materias diferentes dentro del campo de las ciencias farmacéuticas, todas ellas relacionadas con las fases del desarrollo galénico de un fármaco[5].

Se considera que las dos grandes disciplinas que conforman la Farmacia Galénica son la Tecnología Farmacéutica (o Farmacotecnia) y la Biofarmacia[4]. La Tecnología Farmacéutica hace referencia al conjunto de conocimientos aplicable al arte de elaborar medicamentos,

ocupándose de todos los aspectos relacionados con el diseño, la elaboración y la evaluación de las formas de dosificación[4], mientras que la Biofarmacia se ocupa de estudiar todas las interacciones entre el principio activo vehiculizado en la forma farmacéutica y el sistema biológico al cual ésta se administra, con el objeto de optimizar el resultado terapéutico en términos de seguridad y eficacia[7].

## 1.2.VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE MEDICAMENTOS

Para que los fármacos se pongan en contacto con los tejidos y órganos sobre los que actúan deben atravesar la piel y las mucosas (absorción mediata o indirecta) o bien ha de producirse una efracción de estos revestimientos (administración inmediata o directa)[8].

| Vías inmediatas | Vías mediatas |
|---|---|
| **Intradérmica** | **Oral** |
| **Subcutánea** | **Sublingual** |
| **Intramuscular** | **Bucal** |
| **Intravascular**<br>**Intravenosa, Intraarterial,**<br>**Intralinfática, Intracardíaca** | **Rectal / Vaginal** |
| **Intraperitoneal** | **Pulmonar** |
| **Intrapleural** | **Cutánea**<br>**Tópica (acción local)**<br>**Transdérmica (acción sistémica)** |
| **Intraarticular** | **Oftálmica** |
| **Intraósea** | **Nasal** |
| **Intrarraquídea** | **Otica** |
| **Intraneural** | |

**Tabla 1.1. Vías de administración de medicamentos[8]**

## 1.3.ADMINISTRACIÓN DE MEDICAMENTOS A TRAVÉS DE LA PIEL

# CAPÍTULO 1 - DESARROLLO

La piel es la cubierta externa del cuerpo humano y uno de los órganos más importantes del mismo tanto por su tamaño (2 $m^2$ de superficie, masa alrededor de un 10% del peso corporal) como por sus funciones[9,10].

La aplicación de preparaciones en la piel con fines medicinales y cosméticos es tan antigua como la historia de la medicina. Ya en el siglo XIV a.C. existía la concepción sobre la penetración cutánea[11] y las referencias sobre el uso de linimentos, emplastos, lociones y pomadas pueden encontrarse en los registros de la medicina babilónica y egipcia, si bien su utilización era totalmente empirica. La fórmula del "Cold cream" de Galeno ha persistido a lo largo del tiempo y, con algunas modificaciones, sigue vigente hoy en día[12].

Considerando el volumen de producción de medicamentos, estas preparaciones ocupan sólo un 4% de la estadística industrial mundial, ya que su formulación es uno de los problemas más complejos dentro de la tecnología farmacéutica. El diseño de una forma farmacéutica de aplicación tópica requiere de consideraciones muy especiales, tanto por la diversidad de principios activos y vehículos existentes, como por la complejidad de la piel, considerado como el órgano que mayores variaciones estructurales y funcionales presenta, no sólo en condiciones normales, sino en sus diferentes estados patológicos[13].

Anualmente se venden alrededor de 60.500 millones de unidades de medicamentos tópicos en todo el mundo. Hay un interés creciente por parte de los laboratorios elaboradores en este área de la administración de fármacos y se estima que el mercado mundial de productos dermatológicos crezca a una tasa de crecimiento anual compuesto de 5 años de 3.6% y alcance $ 20.400 millones en 2020 (de $ 17.100 millones en 2015)[14].

Existe una gama muy amplia de opciones de formulación: soluciones simples, emulsiones y suspensiones fluidas, cremas, pomadas y geles, parches, aerosoles y espumas. Al diseñar una forma específica, se debe considerar[15]:

- el vehículo a utilizar (en función del estado de la piel y el objetivo terapéutico).
- las propiedades fisicoquímicas del IFA (Ingrediente Farmacéutico Activo).
- la compatibilidad entre los componentes de la formulación.
- la estabilidad del IFA en particular y de la fórmula en su totalidad.
- las características organolépticas y sensoriales.

# CAPÍTULO 1 - DESARROLLO

Los vehículos dermatológicos están constituidos por sustancias que en principio carecen de acción química o farmacológica primaria, y actúan físicamente como bases para transportar y liberar el IFA. Estos vehículos deben[16]:

- vehiculizar y liberar el IFA, garantizando su biodisponibilidad
- proporcionar el grado adecuado de hidratación o sequedad a la piel, según el objetivo deseado
- ser física y químicamente estables
- no ser irritantes ni alergénicos
- ser cosméticamente aceptables para el paciente

En la actualidad la administración por vía cutánea se emplea para[17]:

1. Lograr un efecto local: la forma farmacéutica debe promover la penetración cutánea del IFA, facilitar su localización en el lugar de acción en la piel y reducir su incorporación a sangre o a linfa.
2. Lograr un efecto sistémico: el vehículo debe facilitar la absorción percutánea o transdérmica, que permite al IFA atravesar la piel e incorporarse a los sistemas sanguíneo o linfático.

Sin embargo, la extraordinaria capacidad barrera que presenta es una limitante para la penetración de la mayoría de los compuestos y representa un desafío en la administración de fármacos por esta vía[18-21].

La administración de IFAs por vía tópica presenta una serie de ventajas y limitaciones[19,21-23] (Tabla 1.2):

| VENTAJAS | LIMITACIONES |
|---|---|
| Extensión y accesibilidad | La capacidad barrera de la piel |
| Minimiza el metabolismo de primer paso hepático | No todos los IFAs son candidatos adecuados |
| Evita degradación de IFAs susceptibles en el tracto gastrointestinal | Variabilidad de la piel intra e inter individuos (variaciones en las tasas de permeación) |

| | |
|---|---|
| Evita acción irritante de IFAs en el tracto gastrointestinal | |
| Evita efectos secundarios y/o adversos del IFA asociados a la administración oral o parenteral | |
| Método de administración no invasivo | |
| Mejor cumplimiento por parte del paciente | |
| Evita los inconvenientes y trauma asociados a la vía parenteral | |
| Puede emplearse para administración controlada | |
| Adecuada para IFAs cuya biodisponibilidad oral es baja o errática | |

**Tabla 1.2. Ventajas y limitaciones de la vía cutánea en la administración de medicamentos**

## 1.4.RELACIÓN FORMA FARMACÉUTICA – EFECTO TERAPÉUTICO

De acuerdo con la Farmacopea Argentina 7º Ed, Forma Farmacéutica es el "producto proveniente de la transformación de un principio activo o de una asociación de los mismos mediante procedimientos fármacotécnicos, a fin de conferirles características físicas y morfológicas particulares para su adecuada dosificación y conservación, y que faciliten su administración y acción farmacológica"[24] (Fig 1.1).

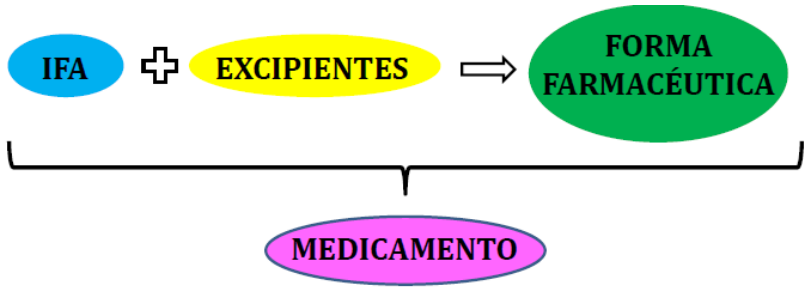



**Figura 1.1. Relación IFA/excipientes/Forma farmacéutica/Medicamento**

La administración de un medicamento a un ser vivo en una forma farmacéutica determinada origina en el organismo una serie de eventos conocidos como procesos LADME (liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción)[25-27].

- **Liberación**: todos los fenómenos que intervienen en la entrega del principio activo desde la forma farmacéutica. También se define como el proceso por el cual el IFA, entregado en un vehículo farmacéutico, accede a la condición de IFA libre imprescindible para su absorción.
- **Absorción**: penetración de las moléculas del principio activo en la circulación.
- **Distribución**: proceso por el cual el principio activo pasa en mayor o menor medida del compartimiento vascular al compartimiento extravascular.
- **Metabolismo o Biotransformación**: todos los procesos químicos a los que es sometido el principio activo en los órganos pertinentes. Puede dar como resultado moléculas menos activas (biodegradación), igualmente activas o más activas (bioactivación) que el compuesto originalmente administrado.
- **Excreción**: la salida del principio activo o su/s metabolito/s fuera del organismo.

Podemos decir entonces que todo medicamento atraviesa por tres fases claramente diferenciadas[26] (Fig 1.2):

⇒ **FASE FARMACÉUTICA**: pasaje del principio activo desde la forma farmacéutica al medio donde será absorbido.

⇒ **FASE FARMACOCINÉTICA**: comprende al "Sistema “ADME", el cual determina la concentración del principio activo en el sitio de acción o biofase.

⇒ **FASE FARMACODINÁMICA**: representada por fenómenos moleculares de relación droga-célula, droga-receptor, acoplamiento receptor, efecto, cooperación entre receptores, etc.

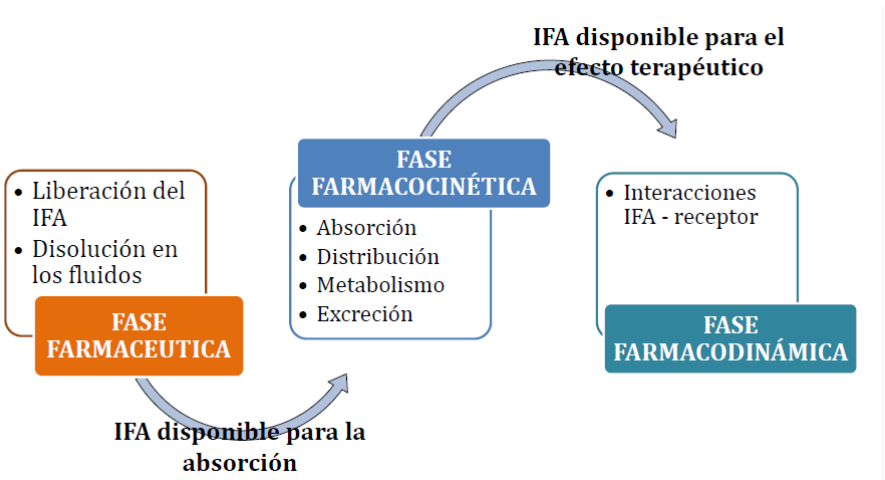



**Figura 1.2. Fases que atraviesa un medicamento**

Se desprende de lo anteriormente expuesto que para que el proceso de absorción pueda producirse el IFA contenido en la forma farmacéutica administrada debe liberarse desde ella y disolverse en los fluidos biológicos correspondientes. La magnitud y velocidad de absorción del IFA está en relación directa con la velocidad y magnitud del proceso de liberación y de su capacidad para atravesar las membranas biológicas[27].

La fase farmacéutica debe ocurrir en todas las formas farmacéuticas, excepto en las soluciones verdaderas, en las cuales la totalidad de la dosis administrada ya se encuentra disuelta[27].

## 1.5.LIBERACIÓN DE IFAs DESDE FORMAS FARMACÉUTICAS SEMISÓLIDAS DE APLICACIÓN DÉRMICA

En primer lugar, el fármaco debe difundir desde la formulación hasta la superficie de la piel. Este proceso, cuantificado a través de la tasa de liberación, requiere la disolución del IFA en el excipiente, y puede ser un proceso limitante de la velocidad de liberación[28].

Pero, por otro lado, los componentes de la base semisólida pueden influir en el comportamiento de las sustancias activas, y, por lo tanto, afectar su liberación desde la formulación y su entrega a la piel (retención)[28]. El vehículo empleado en formas dérmicas impacta en forma directa sobre variables del fármaco determinantes de la liberación, tales como la concentración de fármaco disuelta, su actividad termodinámica, coeficiente de difusión en el vehículo y coeficiente de partición forma farmacéutica – estrato córneo[19,28-30].

Entre los factores que pueden modificar la liberación del IFA desde el vehículo o excipiente semisólido podemos mencionar[28]:

- Naturaleza físicoquímica de la base semisólida
- Hidrofilia / Lipofilia del IFA
- Interacciones entre el IFA y los componentes de la base semisólida
- Estabilidad del sistema semisólido
- Viscosidad de la formulación semisólida (afecta el valor del coeficiente de difusión de la sustancia activa dentro de la formulación)

La mayoría de los modelos teóricos que describen la liberación de un IFA o activo cosmético (AC) a partir de formulaciones semisólidas de aplicación dérmica son modelos basados en procesos de difusión[31]. La difusión en medios líquidos, semisólidos y sólidos es muy importante para estudiar la liberación de IFAs, mientras que la difusión a través de barreras biológicas lo es para estudiar los procesos de penetración y absorción. Sin importar su complejidad, los modelos que describen la liberación de IFAs basados en fenómenos de difusión se derivan de las leyes de Fick, teniendo en cuenta las condiciones específicas de cada caso[31,32].

Los modelos de prueba de liberación *in vitro* se utilizan para caracterizar los perfiles de liberación de los ingredientes activos de la formulación, mientras que los modelos de permeación (o penetración), también *in vitro*, están destinados a predecir la absorción del IFA en la piel y/o su pasaje a través de ella[33].

Los ELIV (Ensayos de Liberación *In vitro*), ó IVRT ("*In Vitro* Release Testing", por sus siglas en inglés) se aplican en varias fases del desarrollo del producto. Como ya mencionamos, se emplean para verificar y caracterizar la liberación del IFA desde la forma farmacéutica, pero también para determinar propiedades de los fármacos incluidos, como coeficiente de difusión dentro de la matriz de formulación, tamaño de partícula de fármacos suspendidos y solubilidad absoluta dentro de una formulación compleja[34,35]. Asimismo, se utilizan en el desarrollo inicial para la evaluación y caracterización de productos tópicos, como una herramienta en los sistemas de Calidad por Diseño y como prueba de control de calidad del proceso de fabricación. Después de la aprobación de un producto (a nivel industrial), los

ELIV se utilizan para demostrar la uniformidad entre lotes y para evaluar bioequivalencia entre productos[33].

### 1.5.1.RECURSOS TECNOLÓGICOS PARA AUMENTAR LA TASA DE LIBERACIÓN DE IFAS A PARTIR DE FORMULACIONES SEMISÓLIDAS DE APLICACIÓN DÉRMICA

Puede recurrirse a la utilización de diversos recursos para maximizar la tasa de liberación de IFAs a partir de una forma farmacéutica semisólida

#### 1.5.1.1. Aumentar la actividad termodinámica del IFA en la formulación

##### 1.5.1.1.1.Aumentando la solubilidad del IFA en el vehículo

Mencionamos anteriormente la necesidad de que el IFA se encuentre disuelto en el vehículo, para poder difundir a través de él y estar disponible en la interfase con el EC. De acuerdo con la ley de Fick, una mayor solubilidad en el vehículo proporciona una mayor concentración de IFA disuelta en la fase donante que mejora la tasa de liberación[36].

##### 1.5.1.1.2.Utilizando soluciones supersaturadas

El uso de soluciones supersaturadas en el suministro tópico de IFAs[30,37,38] fue considerado por primera vez por Higuchi. La supersaturación es un estado en el cual el IFA se encuentra a una concentración o potencial químico mayor que su límite de solubilidad. Como el flujo a través de membranas está gobernado por el gradiente de potencial químico (o concentración), el flujo a partir de sistemas supersaturados se incrementa proporcionalmente.

#### 1.5.1.2.Aumentar la solubilidad acuosa de IFAS poco solubles en agua

El permeante ideal requiere solubilidad en lípidos (alto coeficiente de difusión) pero también una solubilidad acuosa razonable (alta concentración de donante) para maximizar el flujo[18].

La necesidad de administrar IFAs poco solubles en agua en sistemas predominantemente acuosos ha sido respondida por muchos científicos, y distintos métodos han sido descriptos en la literatura. Entre las distintas estrategias investigadas (ajuste de pH, uso de

cosolventes, micelación, hidrotropía, complejación, prodrogas), el uso de polímeros ha generado interés debido a su diversidad y sus múltiples grupos funcionales disponibles para conjugación con diferentes moléculas[39].

#### 1.5.1.3. Modificar la viscosidad del vehículo o excipiente semisólido

La viscosidad de la formulación semisólida puede afectar la tasa de liberación, ya que influye en el valor del coeficiente de difusión del IFA dentro de la formulación[28], variables que se encuentran relacionadas por la ecuación de Stockes-Einstein:

$$D = \frac{K \,.\, T}{6 \,.\, \pi \, r \,.\, n}$$

donde

D = coeficiente de difusión; K = constante de Boltzmann; T = temperatura absoluta; r = radio de la molécula, y $\eta$ = viscosidad del medio.

## 1.6. MICOSIS

Según el diccionario de la Real Academia Española (RAE), las micosis son infecciones producidas por ciertos hongos en alguna parte del organismo[40].

Se estima que casi mil millones de personas sufren infecciones por hongos en la piel, las uñas y el cabello, muchos cientos de millones de candidiasis en mucosas y más de 150 millones de enfermedades fúngicas graves[41].

Existen aproximadamente 250.000 especies de hongos identificadas, de las cuales 300 son patógenos causantes de infecciones superficiales y sistémicas en el hombre y en animales[42]. Más del 75% de los hongos patógenos infectan principalmente la piel y tejidos subcutáneos[43].

En nuestro país, en una encuesta realizada en 130 laboratorios pertenecientes a la Red Nacional de Laboratorios de Micología en el año 2005, se diagnosticaron 23.600 micosis, de las cuales 11.107 (47,06%) fueron micosis superficiales de piel, pelos y uñas; 10.079 (42,70%) candidiasis vaginales; 751 (3,18%) candidiasis orofaríngeas y el resto micosis profundas. Las micosis superficiales localizadas en piel, pelos y uñas fueron debidas a dermatofitos en el 68,78% de los casos; a levaduras en el 16,67%; pitiriasis versicolor en el 12,89% y hongos miceliares oportunistas en el 1,35%[44].

### 1.6.1. CLASIFICACIÓN DE LAS MICOSIS

Existen diversos criterios de clasificación de las micosis. Según la localización de la infección (clasificación clínica) se puede hablar de micosis superficiales (no inflamatorias, afectan estrato córneo), cutáneas (inflamatorias, afectan piel y apéndices), subcutáneas (profundas, afectan tejidos subcutáneos) y sistémicas[45].

Otra nomenclatura utiliza el término dermatomicosis para designar a las infecciones por hongos que afectan la capa córnea de la piel y sus apéndices, y la superficie de las membranas mucosas[46].

### 1.6.2. TRATAMIENTO DE LAS MICOSIS SUPERFICIALES Y CUTÁNEAS

El descubrimiento de fármacos antifúngicos se inicia con este siglo (Fig 1.3), más tardíamente que los antibacterianos, debido fundamentalmente a que los hongos son seres eucariotas y consecuentemente muchos agentes tóxicos también son tóxicos para el huésped[47].

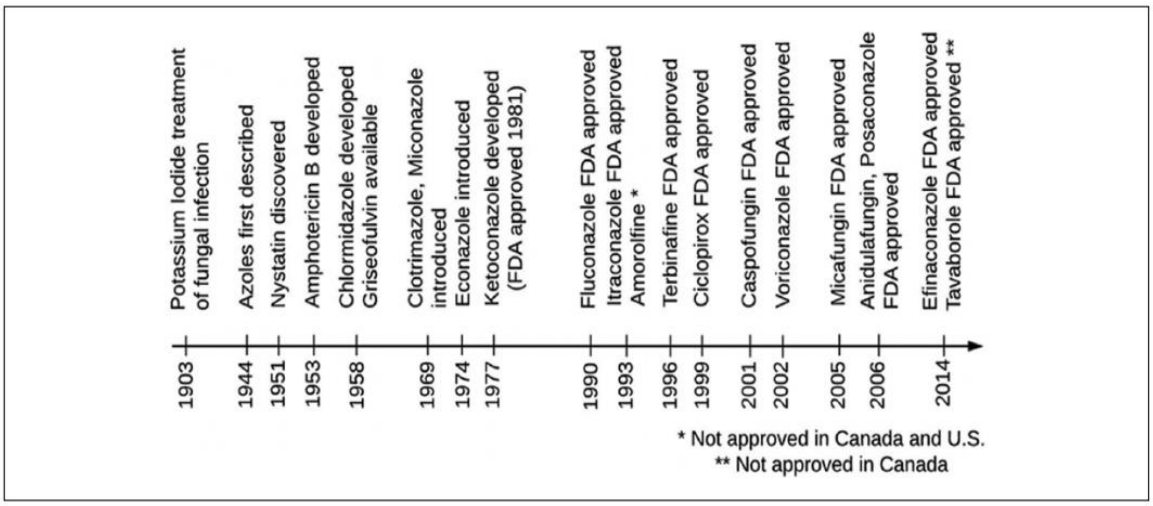



**Fig 1.3. Línea histórica en el descubrimiento y síntesis de antifúngicos[48]**

Un IFA ideal para las infecciones fúngicas superficiales y cutáneas debe tener amplio espectro, ser eficaz en bajas concentraciones, ser fungicida, ser eficaz por aplicación tópica, tener una alta afinidad por el estrato, ser bien tolerado, no ser sensibilizante, evitar el desarrollo de resistencia fúngica, ofrecer un régimen de dosificación que fomente el cumplimiento de la terapia por parte del paciente[49], tener alta especificidad por las células fúngicas y ser de bajo costo[47].

Sin duda, la vía tópica es la de elección; el tratamiento sistémico está indicado en afectaciones extensas, cuando existe foliculitis y en Tinea unguium y Tinea capitis[50], o cuando la respuesta terapéutica a los fármacos tópicos es insuficiente[51].

### 1.6.3. ANTIFÚNGICOS EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO DE TESIS

#### 1.6.3.1. GRISEOFULVINA

Griseofulvina (GRI) es un agente antibiótico antifúngico producido por varias especies de *Penicillium*, en especial *P. griseofulvum*. Se obtuvo por primera vez como un producto metabólico del moho *Penicillium griseofulvum Dierckx* en 1939[52-54].

##### 1.6.3.1.1. Estructura química

Es un benzofurano heterocíclico[55] (Fig 1.4 ):

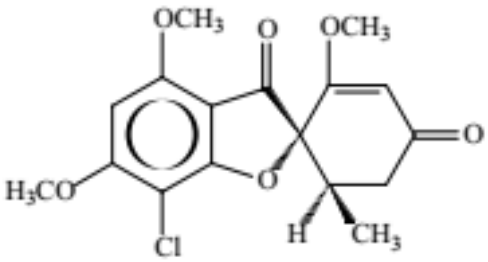



**Fig 1.4 . Estructura 2D GRI**

##### 1.6.3.1.2. Datos físicoquímicos GRI[53,55,56]

| | |
|---|---|
| **Fórmula molecular** | $C_{17}H_{17}Cl0_6$ |
| **Estado de agregación** | Polvo cristalino |
| **Caracteres organolépticos** | Color blanco a blanco pálido, inodoro o casi inodoro, insípido |
| **Peso molecular** | 352,7 g/mol |
| **Punto de fusión** | 220ºC |

| | |
|---|---|
| **Solubilidad** | Muy poco soluble en agua (0,00864 mg/ml a 25ºC). Muy soluble en dimetilformamida (120 mg/ml) y en dimetilsulfóxido (100 mg/ml). Soluble en metanol (1 mg/ml) y en acetona (10-120 mg/ml) |
| **Log P** | 2,17 |

**Tabla 1.3. Propiedades físicoquímicas de GRI**

#### 1.6.3.1.3. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB)

Clase II (alta permeabilidad, baja solubilidad)[54].

#### 1.6.3.1.4. Espectro de acción

Es un agente fungistático eficaz en el tratamiento de diversas micosis superficiales, especialmente las causadas por varias especies de dermatofitos, como *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*[53,54].

#### 1.6.3.1.5. Formas farmacéuticas y farmacocinética

Actualmente sólo está disponible en formas de dosificación oral como comprimidos, cápsulas y suspensión[54].

Luego de la administración oral, se deposita principalmente en células precursoras de queratina y queratinocitos del estrato córneo (EC), cabello y uñas entre las 4 y 8 hs posteriores a la administración[54,57]. Sin embargo, y a pesar de poseer características moleculares favorables, su solubilidad acuosa es demasiado baja para proporcionar una buena biodisponibilidad, la cual es incompleta y altamente variable[54,55]. La duración de los tratamientos es prolongada, y se asocian con efectos secundarios como cefaleas, trastornos gastrointestinales, discrasias sanguíneas, hepatotoxicidad y ginecomastia[55,57].

Dado que el órgano diana es la piel (y en particular las capas superiores) sería útil su administración por vía tópica. Esto permitiría dirigir directamente el fármaco a su sitio de acción, evitaría los efectos sistémicos asociados con la administración oral y aumentaría el cumplimiento del paciente[54]. Se ha informado que las concentraciones obtenidas en la piel

luego de una única administración tópica son más altas que las obtenidas luego de administración oral prolongada y persiste en cantidades significativas durante 4 días o más[57,58]. A pesar de estas observaciones, y de diversos trabajos científicos donde se intenta mejorar la biodisponibilidad cutánea de griseofulvina mediante el uso de diversos disolventes (dimetilsulfóxido, alcohol bencílico, alcohol isopropílico, acetona) y nuevos sistemas transportadores (micelas poliméricas, nanopartículas, microemulsiones, niosomas, etc), el suministro dérmico de GRI permanece dentro del área experimental[54,57,58].

### 1.6.3.2. KETOCONAZOL

Ketoconazol (KTO) es un derivado azólico de amplio espectro que se ha utilizado en el tratamiento de las dermatomicosis desde mediados de la década de 1970[52].

#### 1.6.3.2.1. Estructura química

Químicamente es un imidazol (Fig 1.5):

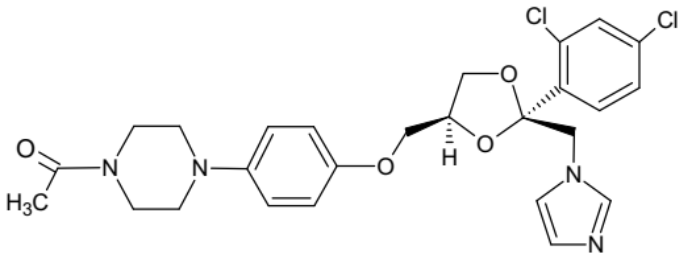



**Fig 1.5. Estructura 2D KTO**

#### 1.6.3.2.2. Datos físicoquímicos KTO[59-62]

| | |
|---|---|
| **Fórmula molecular** | $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$ |
| **Estado de agregación** | Polvo cristalino |
| **Caracteres organolépticos** | Color blanco o casi blanco |
| **Peso molecular** | 531,434 g/mol |
| **Punto de fusión** | 146ºC |

| | |
|---|---|
| **Acidez / Alcalinidad** | Base débil, con pKa 3,96 (grupo amina) y 6,5 (grupo imina) |
| **Solubilidad** | Fácilmente soluble en cloruro de metileno; soluble en metanol y dimetilsulfóxido; moderadamente soluble en etanol; prácticamente insoluble en agua.<br>La solubilidad en agua muestra un perfil dependiente del pH; tiene una excelente solubilidad a pH ácido por debajo de 3, pero su solubilidad disminuye dramáticamente a <1 mg / ml a pH 4 y a sólo 0,002 mg/ml a pH mayor a 6. |
| **Log P** | 4,31 |

**Tabla 1.4. Propiedades físicoquímicas de KTO**

#### 1.6.3.2.3. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB)

Según el SCB, es un medicamento de clase II (alta permeabilidad, baja solubilidad)[63].

#### 1.6.3.2.4. Espectro de acción

Los derivados imidazólicos tópicos poseen un amplio espectro con actividad frente a dermatofitos y levaduras [47,64]. KTO es utilizado tanto para el tratamiento de micosis superficiales como sistémicas; no obstante, su uso sistémico se encuentra restringido o prohibido en algunos países debido a los riesgos hepatotóxicos y la disponibilidad de alternativas menos tóxicas[48].

#### 1.6.3.2.5. Formas farmacéuticas y farmacocinética

Utilizado por vía tópica, KTO no alcanza la circulación sistémica y es una terapia segura y eficaz para las afecciones dermatológicas. Formulaciones en forma de crema, champú y espuma son utilizadas en el tratamiento de micosis superficiales, dermatitis seborreica y foliculitis causadas por *Malassezia spp*., como así también de diversas dermatofitosis y candidiasis superficiales[48].

Sin embargo, dadas sus características moleculares, la penetración percutánea de los agentes azólicos a través de la piel intacta es menor del 1%; luego de una aplicación de 200 mg, la cantidad de KTO presente en estrato córneo es aproximadamente de 0,4 a 1,4 μg/g y

llega a alcanzar los 3 μg/g luego de aplicaciones repetidas. En piel lesionada aumenta al 4%. A nivel de mucosas (donde no existe EC) la penetración varía entre 1 y 10%[64].

# CAPÍTULO 1 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1-De Vos PS. Compound Remedies. University of Pittsburgh Press. December, 2020. ISBN : 9780822946496.

2-Celsi SA. Introducción Histórica. En: Helman J (ed). Farmacotecnia Teórica y Práctica. Méjico DF: Cía Editorial Continental S.A.; 1980. p. 35-50.

3-Ministerio de Salud de la Nación. Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos. ANMAT/INME. Farmacopea Argentina 7º Ed, Tomo I. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación; 2013. Disponible en https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/farmacopea_argentina_2013_ed.7.pdf [acceso 20/03/2022].

4-Vila Jato JL. Introducción. En: Vila Jato JL (ed). Tecnología Farmacéutica Volumen I: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Madrid: Editorial Síntesis S.A.; 2001. p. 15-24.

5-Lozano Estevan MC. Introducción a la Tecnología Farmacéutica. En: En Lozano MC, Córdoba D, Córdoba M (coord.). Manual de Tecnología Farmacéutica. Barcelona: Elsevier; 2012. p. 3-10.

6-Faulí Trillo C. Conceptos generales. En: Faulíi Trillo C (dir, coord.). Tratado de Farmacia Galénica. Madrid: Luzán 5 S.A. Ed; 1993. p. 15-23.

7-Talevi A, Hoya A, Ruiz ME, Quiroga P. Biofarmacia: Los procesos y su relación con la práctica farmacéutica. En: Talevi A, Quiroga P, Ruiz ME (coord). Procesos biofarmacéuticos: Su relación con el diseño de formas farmacéuticas y el éxito de la farmacoterapia. La Plata: Editorial de la Universidad de La Plata; 2016. p. 4-15.

8-de Artiñano AA, Puerro Vicente M. Absorción y distribución de los fármacos. En: Lorenzo Fernández P, Moreno González A, Leza Cerro JC et al (dir). Velázquez: Farmacología Básica y Clínica. 19º ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2018. p. 13-32.

9-Walters KA, Roberts MS. The structure and function of skin. En: Walters KA (ed). Dermatological and Transdermal Formulations. New York: Marcel Dekker Inc.; 2002. p.1-40.

10-Ng KW, Lau WM. Skin Deep: The Basics of Human Skin Structure and Drug Penetration. En: Dragicevic N, Maibach HI (eds). Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Drug Manipulation Strategies and Vehicle Effects. Berlín: Springer; 2015. p. 3–11.

# CAPÍTULO 1 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

11-Carpentieri-Rodrigues NL, Modolo Zanluchi J, Grebogi IH. Percutaneous Absorption Enhancers: Mechanisms and Potential. Braz. Arch. Biol. Technol. 2007; 50(6): 949-961.

12-Hadgraft J, Lane ME. Skin permeation: The years of enlightenment. Int. Jour. Pharm. 2005; 305: 2-12.

13-Pareja B. Aspectos biofarmacéuticos de las preparaciones dermatológicas: Revisión de tema. Folia Dermatol. Peru. 2004; 15(1): 49-52.)

14-Pharmasalmanac [sede Web]. Nueva York: David Alvaro, Ph.D. ed; [acceso 05/07/2018]. Trends in the Topical Delivery of Dermatology Medications [1 pantalla]. Disponible en: https://www.pharmasalmanac.com/articles/trends-in-the-topical-delivery-of-dermatology-medications

15-Williams AC. Topical and Transdermal Drug Delivery. En: Aulton ME, Taylor KMG (eds). Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines. 4º ed. China: Churchill Livingstone Elservier; 2013. p. 675-697.

16-Ricciatti-Sibbald D, Sibbald RG. Dermatologic Vehicles. Clin. Dermatol. 1989; 7(3):11-24.

17-Elorza Barroeta B, Elorza Barroeta MA. Formas de administración cutánea. En Lozano MC, Córdoba D, Córdoba M (coord.). Manual de Tecnología Farmacéutica. Barcelona: Elsevier; 2012. p 411 – 424.

18-Benson HAE. Skin Structure, Function, and Permeation. En: Benson HAE y Watkinson AC (eds). Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2012. p. 1-22.

19-Prausnitz MR, Elias PM, Franz TJ, Schmuth M, Tsai J-C, Menon GK et al. Skin Barrier and Transdermal Drug Delivery. En: Bolognia JL, Schaffer JV, Cerroni L (eds). Dermatology. Vol 2. 4º Ed. China: Elsevier; 2018. p. 2065 – 2073.

20-Rodrigues Leite-Silva V, Mandelli de Almeida M, Fradin A. Delivery of drugs applied topically to the skin. Expert Rev. Dermatol. 2012; 7(4):383–397.

21-Henriques Mota A, Rijo P, Molpeceres J, Pinto Reis C. Broad overview of engineering of functional nanosystems for skin delivery. Int. J. Pharm. 2017; 532: 710–728.

22-Roberts MS, Cross SE, Pellet MA. Skin transport. En: Walters KA (ed). Dermatological and Transdermal Formulations. New York: Marcel Dekker Inc.; 2002. p.91-199.

# CAPÍTULO 1 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

23-Morais Ruela AL, Gravinez Perissinato A, de Sousa Lino ME, Silva Mudrik P, Ribeiro Pereira G. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. Braz. J. Pharm. Sci. 2016; 52(3):527-544.

24-Ministerio de Salud de la Nación. Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos. ANMAT/INME. Farmacopea Argentina 7º Ed, Primer Suplemento. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación; 2013. Disponible en https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/primer suplemento de la fa.pdf [acceso 20/03/2022].

25-Olivera, Maria Eugenia; Guzman, Maria Laura; Luciani Giacobbe, Laura Carolina; Aspectos biofarmacéuticos y tecnológicos que impactan en la absorción y la biodisponibilidad de los medicamentos. En: Manzo RH, Nacucchio MC (coord.). Tópicos de Tecnología Farmacéutica. Buenos Aires: Eudeba; 2019.p. 37-54.

26-
http://www.anmat.gov.ar/webanmat/documentos informativos/anmat y la bioequivalencia.pdf [acceso Marzo 20, 2022].

27-Talevi A, Bellera CL. Liberación de fármacos. En: Talevi A, Quiroga P, Ruiz ME (coord). Procesos biofarmacéuticos: Su relación con el diseño de formas farmacéuticas y el éxito de la farmacoterapia. La Plata: Editorial de la Universidad de La Plata; 2016. p. 16-24.

28-Jankowski A, Dyja R, Sarecka-Hujar B. Dermal and Transdermal Delivery of Active Substances from Semisolid Bases. Indian J Pharm Sci. 2017; 79(4):488-500.

29-Vitorino C, Sousa J, Pais A. Overcoming the Skin Permeation Barrier: Challenges and Opportunities. Cur. Pharm. Des. 2015; 21(20):2698-2712.

30-Surber C, Smith EW. The Mystical Effects of Dermatological Vehicles. Dermatology. 2005; 210:157-168.

31-Xu X, Al-Ghabeish M, Krishnaiah YSR, Rahman Z, Khan MA. Kinetics of drug release from ointments: Role of transient-boundary layer. Int. J. Pharm. 2015; 494:31–39.

32-Couto A, Fernandes R, Cordeiro MNS, Reis SS, Ribeiro RT, Pessoa AM. Dermic diffusion and stratum corneum: A state of the art review of mathematical models. J. Control. Release. 2014; 177: 74–83.

33-Thakker K, Klein R. Drug release: topical products. En Riley CM, Rosanske TW, Reid G (ed). Specification of Drugs Substances and Products: Development and Validation of Analytical Methods. 2º ed. Cambridge: Elsevier Ed; 2020. p. 505-534.

34-Walters KA, Brain KR. Dermatological Formulation and Transdermal Systems. En Walters KA (ed). Dermatological and Transdermal Formulations. New York: Marcel Dekker Inc.; 2002. p. 319-400.

35-Shaha VP, Radulescu FS, Miron DS, Yacobi A. Commonality between BCS and TCS. Int. J. Pharm. 2016; 509:35–40.

36-Barry BW. Modern methods of promoting drug absorption through the skin. Molec. Aspects Med. 1991; 12:195-241.

37-Lane ME, Santos P, Watkinson AC, Hadgraf J. Passive Skin Permeation Enhancement. En: Benson HAE y Watkinson AC (eds). Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice. New Jersey: John Wiley & Sons Inc; 2012. p. 23 – 42.

38-Hadgraft J. Skin, the final frontier. Int. J. Pharm. 2001; 224: 1–18.

39-Francis MS, Piredda M, Winnika FM. Solubilization of poorly water soluble drugs in micelles of hydrophobically modified hydroxypropylcellulose copolymers. J. Control. Release. 2003; 93:59– 68.

40-Word Reference.com/Online Language Dictionaries.
http://www.wordreference.com/es/en/frames.aspx?es=micosis[acceso 09/11/2018].

41-Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. J. Fungi. 2017; 3,57.

42-Pal M. Morbidity and Mortality Due to Fungal Infections (short communication). J. Appl. Microbiol.Biochem. 2017 [acceso 09/11/2018]; 1(1). Disponible en https://www.imedpub.com/articles/morbidity-and-mortality-due-to-fungal-infections.php?aid=18314.

43-Fitzpatrick JE. Superficial fungal skin diseases. En: James WD (ed). Military Dermatology. Washington: Office of the Surgeon General at TMM Publications; 1994. p. 423-452.

44-Davel G, Canteros CE. Situación de las micosis en la República Argentina. Rev. Argent. Microbiol. 2007; 39:28-33.

45-Walsh TJ, Dixon DM. Spectrum of Mycosis. En: Baron S (ed). Medical Microbiology [libro en Internet]. 4º Ed. Galveston: University of Texas Medical Branch; 1996 [acceso 09/11/2018] Disponible en https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7902/.

46-Negroni R. Historical aspects of dermatomycoses. Clin. Dermatol. 2010; 28:125–132.

47-Sánchez Carazo JL, Obón Losada I, Pont Sanjuan V. Tratamiento actual de las micosis superficiales. Rev. Iberoam. Micol. 1999; 16:S26 – S30.

48-Gupta AK, Lyons DCA. The Rise and Fall of Oral Ketoconazole. J. Cutan. Med. Surg. 2015; 19(4):352–357.

49-Brennan B, Leyden JJ. Overview of topical therapy for common superficial fungal infections and the role of new topical agents. J. Am. Acad. Dermatol.1997; 36(2):S3-S8.

50-del Palacio A, Garau M, Cuétara MS. Tratamiento actual de las dermatofitosis. Rev Iberoam Micol. 2002; 19: 68-71.

51-Crespo-Erchiga V, Delgado-Florencio V. Micosis cutáneas. Med Clin. 2005; 125(12):467-74.

52-Sehgal VN, Khandpur S. Antifungal Agents: Unapproved Uses, Dosages, or Indications. Clin. Dermatol. 2002; 20:481–489.

53-De Carli L, Larizza L. Griseofulvin. Mutat. Res. 1988;195:91–126.

54-Aggarwal N, Goindi S. Preparation and evaluation of antifungal efficacy of griseofulvin loaded deformable membrane vesicles in optimized guinea pig model of Microsporum canis—Dermatophytosis. Int. J. Pharm. 2012; 437:277–287.

55-Aggarwal N, Goindi S, Khurana R. Formulation, characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. Colloids Surf. B. 2013; 105: 158–166.

56-National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=441140, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441140 [acceso Diciembre 18, 2018].

57-Vlachou MD, Rekkas DM, Dallas PP, Choulis NH. Development and in vitro evaluation of Griseofulvin gels using Franz diffussion cells. Int. J. Pharm. 1992; 82: 47-52.

58-Sishu, Aggarwal N. Preparation of hydrogels of griseofulvin for dermal application. Int. J. Pharm. 2006; 326: 20-24.

59-Adachi M, Hinatsu Y, Kusamori K, Katsumi H, Sakane T, Nakatami N et al. Improve dissolution and absorption of ketoconazole in the presence of organic acids as pH-modifiiers. Eur. J. Pharm. Sci. 2015; 76:225–230.

60-Kovács K, Stampf G, Klebovich I, Antal I, Ludányi K.Aqueous solvent system for the solubilization of azole compounds. Eur. J. Pharm. Sci. 2009; 36:352-358.

61-Jacobs GA, Gerber M, Malan MM, du Preez JL, Fox LT, du Plessis J. Topical delivery of acyclovir and ketoconazole. Drug Deliv. 2016; 23(2): 631–641.

62-National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=456201, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/456201 [acceso Diciembre 18, 2018].

63-Górniak A, Karolewicz B, Czapor-Irzabek H, Gładysz O. A physicochemical and dissolution study of Ketoconazole - Pluronic F127 solid dispersions. Farmacia. 2016; 64(2):244-251.

64-Schäfer-Korting M. Pharmacokinetics of Topical and Oral Antifungals. Mykosen. 1989; 32 (2):34 – 38.

# CAPÍTULO 2

# SISTEMAS POLIMÉRICOS

# CAPÍTULO 2 - ÍNDICE

**Objetivos específicos** 32

**Lista de Abreviaturas y Símbolos** 33

**Índice de Figuras** 34

**Índice de Tablas** 37

**Índice de Ecuaciones** 38

## Introducción

**2.1. Espectrofluorometría** 39

**2.2. Polímeros** 40

2.2.1. Uso de polímeros en Farmacia 40

2.2.1.1. Polímeros en el aumento de solubilidad de IFAs 41

2.2.1.2. Polímeros como promotores de penetración cutánea 43

**2.2.1. Polímeros empleados en este trabajo de tesis** 43

2.2.2.1. Carboximetilcelulosa sódica 43

2.2.2.2. Metilcelulosa 44

2.2.2.3. Hidroxipropilmetilcelulosa 44

2.2.2.4. Quitosano 45

2.2.2.5. Copolímero Acido Metacrílico/Metilmetacrilato 46

2.2.2.6. Guar Hidroxipropiltrimetilamonio cloruro 46

2.2.2.7. Copolímero Acrilato/Palmeth-25 Itaconato 47

2.2.2.8. Poliacrilato de glicerilo 48

2.2.2.9. Poloxámeros 48

## Materiales y Métodos

**2.3. Materiales** 50

**2.4. Métodos** 50

2.4.1. Preparación de soluciones 50

2.4.2. Obtención de los espectros de emisión de fluorescencia de GRI y KTO en ausencia y presencia de los polímeros en estudio 50

# CAPÍTULO 2 - ÍNDICE

2.4.3. Titulación espectrofluorométrica de GRI y KTO con los polímeros en Estudio 51
2.4.4. Determinación de parámetros asociados al proceso de solubilización de GRI y KTO en los sistemas poliméricos en estudio 52
2.4.5. Estimación de la polaridad del microentorno del fluoróforo en los sistemas poliméricos 53
2.4.6. Extinción de fluorescencia de KTO y GRI en ausencia y en presencia de los polímeros en estudio por acción de Acrilamida 54
2.4.7. Estabilidad de los sistemas IFA/polímero por espectrofluorometría 54

## Resultados y discusión

**2.5. Ketoconazol** 55
2.5.1. Efecto de los polímeros estudiados sobre el espectro de emisión de fluorescencia de KTO 56
2.5.1.1. Derivados polisacáridos 56
2.5.1.2. Derivados acrílicos 59
2.5.1.3. Poloxámeros 61
2.5.2. Titulación espectrofluorométrica y determinación de parámetros de asociación entre KTO - polímeros en estudio 63
2.5.2.1. Derivados polisacáridos 63
2.5.2.2. Derivados acrílicos 65
2.5.2.3. Poloxámeros 67
2.5.3. Extinción de fluorescencia KTO en ausencia y presencia de los polímeros en estudio por agregado de Acrilamida 71
2.5.4. Estimación de la polaridad del microentorno del fluoróforo en los sistemas poliméricos en estudio 74
2.5.5. Estabilidad de KTO solo e incluido en los sistemas poliméricos en estudio 75

**2.6. Griseofulvina** 77
2.6.1. Efecto de los polímeros en ensayo sobre el espectro de emisión de

# CAPÍTULO 2 - ÍNDICE

fluorescencia de GRI 77
2.6.1.1. Derivados polisacáridos 77
2.6.1.2. Derivados acrílicos 79
2.6.1.3. Poloxámeros 80
2.6.2. Titulación espectrofluorométrica y determinación de parámetros de asociación entre GRI - polímeros en estudio 82
2.6.2.1. Derivados polisacáridos 82
2.6.2.2. Derivados acrílicos 83
2.6.2.3. Poloxámeros 85
2.6.3. Extinción de fluorescencia de GRI en ausencia y presencia de los polímeros en estudio por agregado de Acrilamida 85
2.6.4. Estimación de la polaridad del microentorno del fluoróforo incluido en los sistemas poliméricos en estudio 86
2.6.5. Estabilidad de GRI solo e incluido en los sistemas poliméricos en estudio 87

**Conclusiones** 89

**Referencias bibliográficas** 92

# CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**Caracterizar la interacción entre los IFAs y los polímeros en estudio en función de:**

- **Análisis de los espectros de emisión de fluorescencia de los IFAs en ausencia y presencia de de polímeros.**

- **Determinación de parámetros de asociación IFA-polímero a través del análisis de curvas de titulación espectrofluorométricas.**

- **Estimación de la polaridad del entorno donde se localizan los IFAs.**

- **Estimación de la localización de los IFAs dentro de los sistemas poliméricos a través de procesos de extinción de fluorescencia.**

- **Análisis de la estabilidad de los IFAs en los medios poliméricos en función del tiempo y "cycling" de temperatura.**

# CAPÍTULO 2 – ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| IFA / IFAs | Ingrediente Activo Farmacéutico/Ingredientes Activos Farmacéuticos |
| KTO | Ketoconazol |
| GRI | Griseofulvina |
| CMCNa | Carboximetilcelulosa sódica |
| MC | Metilcelulosa |
| HPMC | Hidroxipropilmetilcelulosa |
| USFDA | United States Food and Drug Administration |
| GRAS | Generally recognized as safe |
| Eu L100 | Copolímero Acido metacrílico/Metilmetacrilato (Eudragit® L100) |
| GHPTC | Guar Hidroxipropiltrimetilamonio cloruro (Cosmedia®Guar) |
| Cop A/P-25 I | Copolímero Acrilato/Palmeth-25 Itaconato (Polygel®W30) |
| G/PG | Poliacrilato de glicerilo (Hyspagel®200) |
| QTO | Quitosano |
| P188 | Poloxámero 188 |
| P237 | Poloxámero 237 |
| P338 | Poloxámero 338 |
| P407 | Poloxámero 407 |
| UV | Ultravioleta |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| $\lambda_{exc}$ | Longitud de onda de excitación |
| $\lambda_{em}$ | Longitud de onda de emisión |
| $C_{min}$ | Concentración mínima |
| µl | microlitro |
| mM | milimolar |
| $K_a$ | Constante de asociación |
| $K_d$ | Constante de disociación |
| CMC | Concentración micelar crítica |
| $K_{SV}$ | Constante de Stern Volmer |

# CAPÍTULO 2 – ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Diagrama de Jablonski 39
Figura 2.2. Esquema de la formación de un complejo IFA-polímero 42
Figura 2.3. Formación de una micela polimérica en agua e incorporación de un IFA poco soluble en agua 43
Figura 2.4. Estructura química 2D Carboximetilcelulosa sódica 43
Figura 2.5. Estructura química 2D Metilcelulosa 44
Figura 2.6. Estructura química 2D Hidroxipropilmetilcelulosa 44
Figura 2.7. Estructura química 2D Quitosano 45
Figura 2.8. Estructura química 2D Cop Acido Metacrílico/Metilmetacrilato 46
Figura 2.9. Estructura química 2D Guar Hidroxipropiltrimetilamonio cloruro 47
Figura 2.10. Estructura química 2D Cop Acrilato/Palmeth-25 Itaconato 47
Figura 2.11. Estructura química 2D Poliacrilato de glicerilo 48
Figura 2.12. Estructura química 2D de un poloxámero 48
Figura 2.13. Dependencia de la longitud de onda máxima de emisión banda 2 de KTO en función de la constante dieléctrica de mezclas agua – etanol 55
Figura 2.14. Variación en los valores de R de KTO en función de la constante dieléctrica del medio 56
Figura 2.15. Espectros emisión fluorescencia KTO en presencia de los polímeros polisacáridos en estudio 56
Figura 2.16. Posibles sitios de de interacción entre las moléculas de KTO y MC 58
Figura 2.17. Posibles sitios de interacción en la molécula de QTO 58
Figura 2.18. Espectros emisión fluorescencia KTO en presencia de los polímeros acrílicos en estudio 60
Figura 2.19. Espectros emisión fluorescencia KTO en presencia de poloxámeros en estudio 61
Figura 2.20. -ΔF KTO en presencia de concentraciones crecientes de MC y QTO 64
Figura 2.21. Porcentaje de disminución de intensidad de emisión de fluorescencia de KTO en presencia de cantidades crecientes de MC y de QTO 64
Figura 2.22. -ΔF KTO en presencia de concentraciones crecientes de los polímeros acrílicos en estudio 65

# CAPÍTULO 2 – ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.23. Porcentaje de disminución de intensidad de emisión de fluorescencia de KTO en presencia de cantidades crecientes de los polímeros acrílicos en estudio 66
Figura 2.24. ΔF KTO en presencia de concentraciones crecientes de los poloxámeros en estudio 67
Figura 2.25. Porcentaje de aumento de intensidad de emisión de fluorescencia de KTO en presencia de cantidades crecientes de los poloxámeros en estudio 68
Figura 2.26. Estimación CMC de (a) P188, (b) P237, (c) P338 y (d) P407 por el método de Kabanov 69
Figura 2.27. Representación esquemática de un proceso de extinción de fluorescencia estático 71
Figura 2.28. Gráficos extinción de fluorescencia KTO y KTO incluido en los polímeros en estudio frente a concentraciones crecientes de acrilamida 72
Figura 2.29. Estructura química Acrilamida 73
Figura 2.30. Esquema de la accesibilidad del extintor en función de la ubicación del fluoróforo en la red polimérica (a) y en una micela polimérica (b) 74
Figura 2.31. Cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia de KTO y KTO-polímeros en estudio en función del tiempo y "cycling" de temperatura 76
Figura 2.32. Grupos de la molécula de GRI responsables de la emisión de fluorescencia 77
Figura 2.33. Espectros emisión fluorescencia GRI en presencia de los polímeros polisacáridos en estudio 77
Figura 2.34. Posibles sitios de interacción entre las moléculas de GRI y QTO 79
Figura 2.35. Espectros emisión fluorescencia GRI en presencia de los polímeros acrílicos en estudio 79
Figura 2.36. Posibles sitios de interacción de la molécula de Cop A/P-25 I con GRI 80
Figura 2.37. Espectros de intensidad de emisión de fluorescencia GRI en presencia de los poloxámeros en estudio 81
Figura 2.38. -ΔF GRI en presencia de concentraciones crecientes de QTO 82

# CAPÍTULO 2 – ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.39. Porcentaje de disminución de intensidad de emisión de fluorescencia de GRI en presencia de cantidades crecientes de QTO 83
Figura 2.40. -ΔF GRI en presencia de concentraciones crecientes de Cop A/P-25 I 84
Figura 2.41. Porcentaje de disminución de intensidad de emisión de fluorescencia de GRI en presencia de cantidades crecientes de Cop A/P-25 I 84
Figura 2.42. Gráficos de extinción de fluorescencia GRI en ausencia y presencia de QTO y Cop A/P-25 I por agregado de Acrilamida 86
Figura 2.43. Longitud de onda máxima de emisión de GRI en función de la constante dieléctrica del medio 87
Figura 2.44. Cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia de GRI y GRI-polímeros en función del tiempo y "cycling" de temperatura 88

# CAPÍTULO 2 - ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Características físicoquímicas de los poloxámeros empleados 49
Tabla 2.2. Valores de R para KTO para distintas concentraciones de los polímeros polisacáridos en estudio 59
Tabla 2.3. Valores de R para KTO para distintas concentraciones de los polímeros acrílicos en estudio 61
Tabla 2.4. Valores de R para KTO para distintas concentraciones de los poloxámeros en estudio 63
Tabla 2.5. Parámetros de los procesos de asociación KTO – MC y KTO – QTO 65
Tabla 2.6. Parámetros de los procesos de asociación KTO–polímeros acrílicos 67
Tabla 2.7. Parámetros de los procesos de asociación KTO – poloxámeros 68
Tabla 2.8. CMC de los poloxámeros en estudio estimadas según el método de Kabanov 70
Tabla 2.9. Coeficientes de partición KTO en los sistemas poliméricos micelares en base a poloxámeros 70
Tabla 2.10. Constantes de Stern Volmer KTO en buffer fosfatos pH 7,4 y en las soluciones poliméricas en estudio frente al agregado de Acrilamida 73
Tabla 2.11. Valores de $\lambda_{máx}$ KTO a las $C_{mín}$ obtenidas para cada polímero y las correspondientes D en torno al microentorno del fluoróforo 75
Tabla 2.12. Parámetros del proceso de asociación GRI - QTO calculados según el modelo no lineal de unión de ligandos 83
Tabla 2.13. Parámetros del proceso de asociación GRI – Cop A/P-25 I calculados según el modelo no lineal de unión de ligandos 85
Tabla 2.14. Constantes de Stern Volmer GRI, GRI en presencia de QTO y GRI en presencia de Cop A/P-25 I por agregado de Acrilamida 86
Tabla 2.15. Valores de D del medio en presencia de QTO y de Cop A/P-25 I estimados en función de la longitud máxima de emisión de GRI 87

# CAPÍTULO 2 - ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 2.1. Cambio porcentual de intensidad de emisión de fluorescencia 52
Ecuación 2.2. Ecuación de ajuste no lineal según modelo de unión de ligandos 52
Ecuación 2.3. Coeficiente de partición entre los medios acuoso y micelar según Kabanov 53
Ecuación 2.5. Constante dieléctrica del medio 53
Ecuación 2.5. Ecuación de Stern Volmer 71

# CAPÍTULO 2 - INTRODUCCIÓN

## 2.1. ESPECTROFLUOROMETRÍA

La luminiscencia es la emisión de luz que produce una sustancia luego de la absorción de luz a una determinada longitud de onda (UV o visible) debido a la excitación de electrones y su retorno al estado fundamental. La luminiscencia se divide dos categorías: fluorescencia y fosforescencia, que se pueden diferenciar en la práctica por el tiempo que transcurre entre la absorción y la emisión; los fenómenos de fluorescencia presentan una menor duración[1].

Los procesos que ocurren entre la absorción y la emisión de luz pueden representarse a través del diagrama de Jablonski (Fig 2.1), que muestra las diversas transiciones que pueden ocurrir luego de la excitación de moléculas luminiscentes[1]:

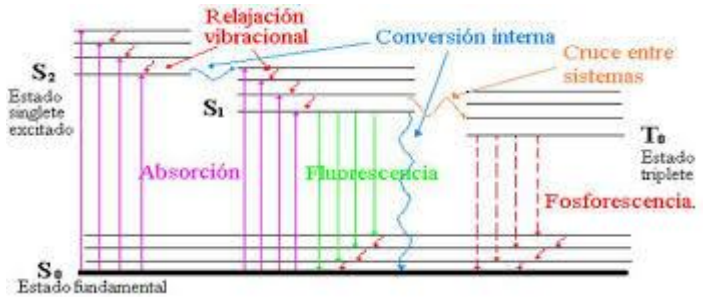



**Fig 2.1. Diagrama de Jablonski**

Un fluoróforo generalmente se excita desde el estado basal $S_0$ a niveles singlete más altos ($S_1$ o $S_2$). Con algunas raras excepciones, las moléculas que alcanzan el estado energético más alto ($S_2$) se relajan rápidamente hasta el nivel vibratorio más bajo $S_1$. Este proceso se llama conversión interna y generalmente ocurre dentro de los $10^{-12}$ seg. La conversión interna generalmente se completa antes de la emisión del fotón y no es significativa a los fines de las mediciones espectrofluorométricas. La emisión de fluorescencia generalmente resulta del retorno de un estado excitado térmicamente equilibrado $S_1$ a estados basales que pueden presentar diversos niveles vibracionales.

Las moléculas en el estado $S_1$ también pueden sufrir una conversión de espín a un estado triplete $T_1$ de menor energía (cruce entre sistemas, no radiante). El retorno desde este estado excitado $T_1$ al estado basal se denomina fosforescencia y generalmente se produce a longitudes de onda más largas (menor energía) en relación con la fluorescencia[1].

Los espectros de emisión de fluorescencia representan la intensidad de fluorescencia emitida en función de la longitud de onda o el número de onda, luego de haber sometido a la molécula fluorescente a una energía de excitación definida. Estos espectros pueden variar ampliamente y dependen de la estructura química de la molécula y sus grupos fluoróforos, como así también de la composición del disolvente[1].

La emisión de fluorescencia suele ir acompañada de cambios espectrales debido a un cambio en el entorno de la molécula. Estos cambios pueden obedecer a diversos mecanismos: efecto de filtro interno, extinción de fluorescencia por colisión, formación de complejos en el estado fundamental, cambios estructurales inducidos por la unión del compuesto a la molécula fluorescente, cambios en la polaridad del disolvente, entre otros. Estos cambios generalmente se traducen en dos tipos de efectos: desplazamientos en las longitudes máximas de emisión de los grupos fluoróforos y/o aumento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia [1,2].

Como método analítico, la espectrofluorometría presenta mayor sensibilidad que otras técnicas espectroscópicas; su principal limitación es el bajo número de moléculas que emiten radiación fluorescente. Ha demostrado ser una técnica útil y más sencilla en el seguimiento de los procesos de solubilización y asociaciones moleculares de diversos IFAs capaces de emitir fluorescencia[1].

## 2.2. POLÍMEROS

Son moléculas que tienen secuencias largas de dos o más unidades constitutivas (monómeros) unidas entre sí por enlaces primarios, generalmente covalentes, y que poseen una elevada masa molar (superiores a $10^3$, pudiendo llegar a valores del orden de $10^{10}$)[3,4].

### 2.2.1. USO DE LOS POLÍMEROS EN FARMACIA

Los polímeros han demostrado ser muy versátiles para una amplia gama de aplicaciones en tecnología farmacéutica. Se emplean como agentes viscosizantes de suspensiones y soluciones, coloides protectores para estabilizar emulsiones y suspensiones, formadores de

geles hidrosolubles y bases para ungüentos, aglutinantes en granulación, recubrimiento de comprimidos, modificación de la velocidad de disolución de cubiertas peliculares, adhesivos y matrices en sistemas transdérmicos[5,6].

En los últimos años se les ha encontrado aplicación para modificar y modular la liberación de fármacos (matrices inertes, erosionables, biodegradables, bioadhesivas, flotantes, biomiméticas, sensibles a cambios de temperatura y pH)[6], como así también de modificar la solubilidad de fármacos poco solubles en agua (por formación de complejos, conjugados y micelas)[7,8]. También se emplean para mantener estados de supersaturación y pueden ser usados como promotores de penetración[5].

Varias consideraciones físicoquímicas son críticas en el uso de polímeros en sistemas para solubilización, transporte y liberación de ingredientes activos. Estos deben ser eficientemente incluidos en el sistema y en una cantidad adecuada. La eficiencia de incorporación depende fundamentalmente del polímero empleado, de las propiedades del ingrediente activo y el método de preparación del sistema. El ingrediente activo debe permanecer estable durante el proceso de incorporación y almacenamiento; el mantenimiento de la estabilidad está íntimamente relacionada con las propiedades fisicoquímicas del microambiente creado por el polímero y las interacciones entre el ingrediente activo y el polímero[9].

### 2.2.1.1. POLÍMEROS EN EL AUMENTO DE SOLUBILIDAD DE IFAS

Los polímeros hidrófilos han sido usados en preparaciones farmacéuticas durante muchos años y aunque usualmente son considerados químicamente inertes se sabe que son capaces de formar[8]:

a) complejos con pequeñas moléculas en solución acuosa

b) micelas que pueden incluir en su interior moléculas hidrofóbicas (micelas poliméricas)

#### 2.2.1.1.1. Complejos poliméricos

Los polímeros pueden interaccionar con moléculas de fármacos a través de uniones electrostáticas (ion – ion, ion – dipolo, dipolo – dipolo), pero también otras fuerzas como van der Waals y puentes de hidrógeno participan frecuentemente en la formación de estos complejos. Casi 40 años atrás Higuchi y colaboradores investigaron interacciones de varios fármacos con polietilenglicoles, polipropilenglicoles, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa sódica, etc; en solución acuosa observaron frecuentemente un aumento de la solubilidad del fármaco debido a la formación de complejos soluble[8]. En la Fig 2.2 se muestra un esquema de la formación de estos complejos.

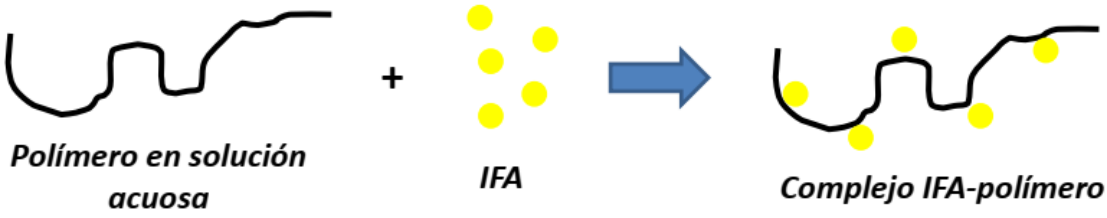



**Fig 2.2. Esquema de la formación de un complejo IFA-polímero (elaboración propia)**

### 2.2.1.1.2. Micelas poliméricas

Las micelas poliméricas están formadas por la autoagregación de polímeros anfifílicos, en particular copolímeros en bloque, con la parte hidrofóbica del polímero hacia el interior (núcleo) y las partes hidrofílicas hacia el exterior (corona), cuando el medio es acuoso[10]. Este proceso está basado en interacciones hidrofóbicas no polares entre las cadenas lipofílicas del polímero, formadoras del núcleo, estéricamente estabilizado por una corona hidrofílica. Esta disposición sirve como reservorio en donde las moléculas del fármaco pueden ser incorporadas por interacciones químicas, físicas o electrostáticas, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas [11,12,13].

La capacidad del núcleo para incorporar activos hidrofóbicos depende de la compatibilidad entre el núcleo hidrofóbico y la molécula insoluble. Generalmente un buen indicador es la similitud estructural entre la molécula y las cadenas que forman el núcleo hidrofóbico; la compatibilidad también puede estimarse a través de la polaridad de la molécula y los segmentos hidrofóbicos[14].

En Fig 2.3. se esquematiza el proceso de micelación en agua a partir de unímeros tribloque en medio acuoso y la incorporación de un IFA insoluble en el núcleo hidrofóbico.

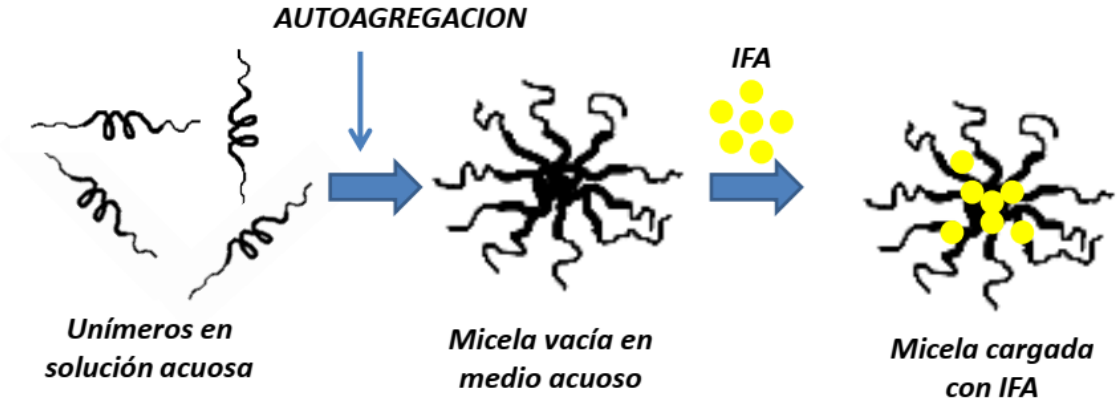



**Fig 2.3.Formación de una micela polimérica en agua a partir de un copolímero tribloque e incorporación de un IFA poco soluble en agua (adaptado de 15)**

### 2.2.1.2. POLÍMEROS COMO PROMOTORES DE PENETRACIÓN CUTÁNEA

Las sales de quitosán y el trimetilquitosán pueden mejorar la permeabilidad paracelular de los epitelios de mucosa como intestinal, nasal y bucal al abrir transitoriamente las uniones estrechas presentes. Estos polímeros también podrían determinar una mejora de penetración cutánea, en función del conocimiento de la presencia de uniones estrechas en las capas de células granulares de la epidermis humana, informado en los últimos años[5].

## 2.2.2. POLÍMEROS EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO DE TESIS

### 2.2.2.1. CARBOXIMETILCELULOSA SÓDICA (CMCNa)

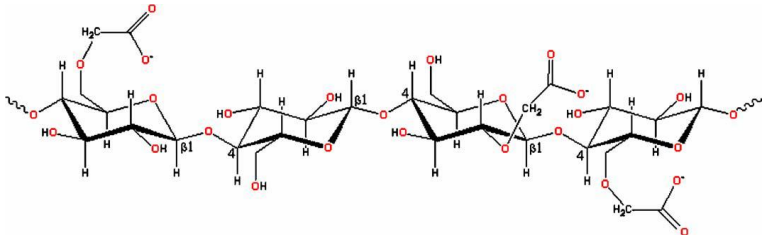


**Fig 2.4. Estructura química 2D Carboximetilcelulosa sódica**

Es la sal sódica del éter policarboximetilado de la celulosa (Fig 2.4). Es un polvo granular de blanco a blanco amarillento, inodoro e insípido, con una masa molar promedio de 90.000 a 700.000 g/mol. Se dispersa fácilmente en agua a cualquier temperatura, dando soluciones coloidales. Uso como viscosizante y coloide protector en formulaciones orales y tópicas; como desintegrante y aglutinante en formas sólidas; como excipiente en formas semisólidas tópicas. Incluido en el listado GRAS ("Generally recognized as safe", por sus siglas en inglés) y en la Base de Datos de Ingredientes Inactivos de la FDA para uso por diferentes vías de administración[16].

### 2.2.2.2. METILCELULOSA (MC)

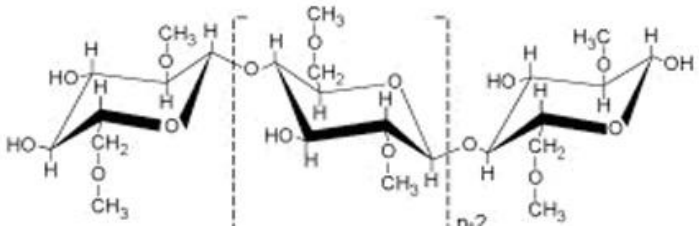


**Fig 2.5. Estructura química 2D Metilcelulosa**

Es una celulosa sustituida de cadena larga, con 27-32% de grupos hidroxilo metilados (Fig 2.5). Polvo o gránulos fibrosos blancos, inodoro e insípido. Masa molar promedio 10.000 a 220.000 Da. En agua fría se hincha y dispersa lentamente para formar dispersiones coloidales transparentes a opalescentes, viscosas. Se emplea como viscosizante en formas orales y tópicas. Está incluido en el listado GRAS y en la Base de Datos de Ingredientes Inactivos de la FDA para su uso por diferentes vías de administración[16].

### 2.2.2.3. HIDROXIPROPILMETILCELULOSA (HPMC)

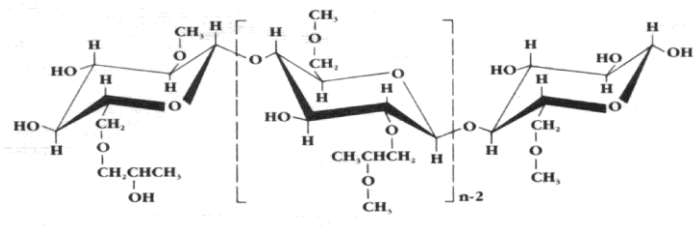


**Fig 2.6. Estructura química 2D Hidroxipropilmetilcelulosa**

Celulosa parcialmente O-metilada y O-(2-hidroxipropilada) (Fig 2.6). Es un polvo granular o fibroso, blanco a blanco cremoso, inodoro e insípido. Masa molar promedio 10.000 a 1.500.000 Da. Soluble en agua fría, formando soluciones coloidales viscosas y transparentes. Uso como viscosizante y coloide protector en formulaciones orales, oftálmicas, nasales y dérmicas. Incluido en el listado GRAS y en la Base de Datos de Ingredientes Inactivos de la FDA para su uso por diferentes vías de administración[16].

### 2.2.2.4. QUITOSANO (QTO)

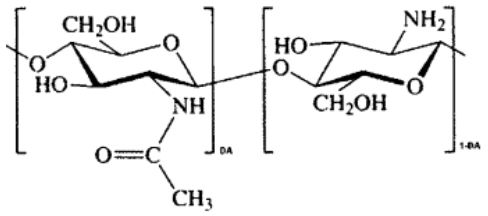



**Fig 2.7. Estructura química 2D Quitosano**

Copolímero semisintético compuesto por unidades de N acetil-d-glucosamina y d-glucosamina disponible en diferentes grados según el grado de restos acetilados (Fig 2.7). Polvo o escamas de color blanco o blanco cremoso, inodoro. Masa molar promedio 20 KDa a 375 KDa, con grado de desacetilación variable (mayor al 80% para dar productos solubles). Poco soluble en agua; prácticamente insoluble en etanol (95%) y soluciones a un pH mayor a 6,5. Fácilmente soluble en soluciones ácidas diluidas por debajo de pH 6,0 debido a la cuaternización de los grupos amina (pKa de 6,3) y formación de sales solubles. La solubilidad se ve afectada por el grado de desacetilación y la presencia de sales. De acuerdo con la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), es un material GRAS[16].

Se obtiene por desacetilación en medio alcalino de su polímero original, la quitina, polisacárido ampliamente distribuido en la naturaleza (por ejemplo, crustáceos, insectos y ciertos hongos)[17,18]. Su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad, seguridad ecológica y baja toxicidad, actividad antimicrobiana y baja inmunogenicidad, unidas a su costo accesible, brindan a este polímero una gran versatilidad en su uso en el ámbito farmacéutico, cosmético y biomédico, además de otras industrias (como alimentaria y textil,

por ejemplo)[19,20]. Para una profundización en las áreas de utilización de quitosano, pueden consultarse las revisiones realizadas por Dash y col[17], Sharatinia[18] y Muxica y col[21], entre otras.

### 2.2.2.5. COPOLÍMERO ÁCIDO METACRÍLICO/METILMETACRILATO (Eudragit© L100) (Eu L100)

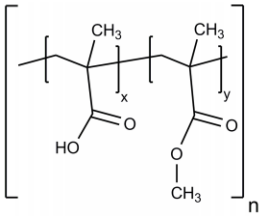



**Fig 2.8. Estructura química 2D Acido Metacrílico/Metilmetacrilato**

Copolímero sintético aniónico de ácido metacrílico y metacrilato de metilo, con una relación grupos carboxílicos libres:grupos éster 1:1 (Fig 2.8). Polvo blanco de olor ligero característico, de flujo libre, con al menos 95% del polímero. Masa molar promedio 135.000 g/mol. Prácticamente insoluble en agua, pero soluble en soluciones de Hidróxido de sodio a pH 6-7. Uso habitual como aglutinante y material de revestimiento pelicular en formas sólidas orales y material matricial en sistemas transdérmicos; por vía tópica se reportó su uso como organogeles para vía rectal. Los copolímeros Eudragit© se consideran materiales no tóxicos y no irritantes, según datos publicados en el "Informe Final sobre Seguridad de Polímeros Acrílicos y 33 Ingredientes Cosméticos Relacionados". La principal preocupación con respecto al uso de estos ingredientes poliméricos sintéticos es la presencia de monómeros residuales, cuyo límite no debe exceder las 500 ppm (según monografías farmacopeicas)[16,22-24].

### 2.2.2.6. GUAR HIDROXIPROPILTRIMETILAMONIO CLORURO (Cosmedia Guar©) (GHPTC)

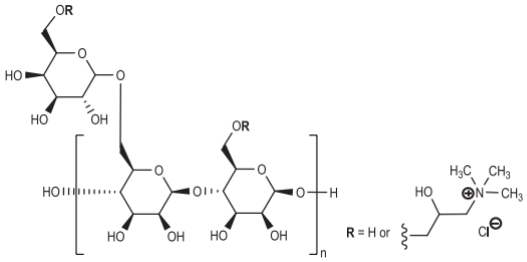



**Fig 2.9. Estructura química 2D Guar Hidroxipropiltrimetilamonio cloruro**

Denominación INCI: Hydroxypropyltrimonium chloride.Polisacárido catiónico semisintético constituido por un esqueleto de goma guar no iónico funcionalizado con grupos de cloruro de 2-hidroxipropiltrimetilamonio unidos a unidades de galactosa, grado de sustitución 0,21 – 0,6 (Fig 2.9). Polvo fino blanco a amarillento, de olor característico. Masa molar promedio $5.10^5$ g/mol a $2.10^6$ g/mol. Ligeramente soluble en agua, formando geles opalescentes. Uso en cosméticos como agentes antiestático y acondicionador del cabello, agente acondicionador de la piel y viscosizante. En un informe presentado por el Cosmetic Ingredient Review Expert Panel acerca de la toxicidad de 16 derivados galactomananos, se concluyó, con respecto al GHPTC, que es un derivado seguro utilizado en las concentraciones habituales, con una DL50 > 12,5 g/kg (en ratas), y cuya molécula es demasiado grande como para ser absorbida y ejercer efectos sistémicos luego de su aplicación sobre la piel[25-28].

### 2.2.2.7. COPOLÍMERO ACRILATO/PALMETH-25 ITACONATO (POLYGEL®W30)(Cop A/P-25 I)

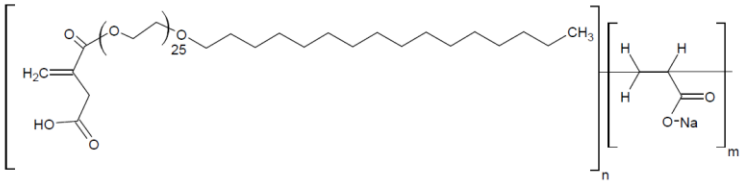



**Fig 2.10. Estructura química 2D Cop Acrilato/Palmeth-25 Itaconato**

Denominación INCI: Acrilates / Palmeth-25 Itaconate Copolymer. Copolímero acrílico aniónico, formado a partir del semiéster del ácido itacónico y del alcohol de palma etoxilado (promedio 25 moles de óxido de etileno), y uno o más monómeros de ácido acrílico, ácido

metacrílico o uno de sus ésteres simples (Fig 2.10). Se presenta como una emulsión fluida de color blanco, con un contenido de polímero entre 30 – 32%. Se emplea en productos cosméticos para la formulación de geles transparentes y estabilización de emulsiones O/A. Los datos de seguridad corresponden a la generalidad de los copolímeros acrílicos según "Informe Final sobre Seguridad de Copolímeros Acrílicos y 33 Ingredientes Cosméticos Relacionados"[24,29].

### 2.2.2.8. POLIACRILATO DE GLICERILO (G/PG)

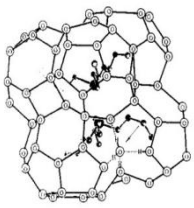


**Fig 2.11. Estructura química 2D Poliacrilato de glicerilo**

Denominación INCI: Glycerin (and) Glyceryl Polyacrylate. Clatrato de poliacrilato de glicerilo, que incluye dentro de su estructura moléculas de glicerina y agua (Fig 2.11). Se presenta como un gel ligeramente amarillento, miscible con agua, pH 4,7 – 5,5. Se emplea en cosmética como base para geles acuosos hidratantes para piel y cabello, y como viscosizante y agente estabilizante para emulsiones. Se ha informado como no irritante por vía dérmica y ocular [30,31].

### 2.2.2.9. POLOXÁMEROS

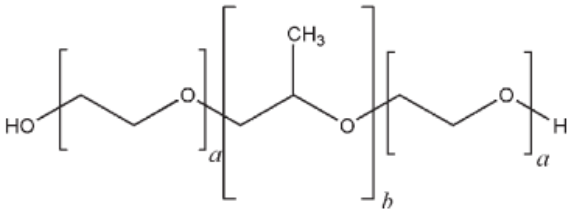



**Fig 2.12. Estructura química 2D de un poloxámero**

Los poloxámeros (Fig 2.12) son una familia de copolímeros no iónicos en bloque anfifílicos, constituidos por bloques de óxido de etileno (OE) y de óxido de propileno (OP), con

estructura general $(OE)_a - (OP)_b - (OE)_a$ Forman estructuras micelares en solución acuosa, con un núcleo hidrófobo formado por las cadenas de OP y una cubierta hidrófila ("corona") formada por las cadenas de OE[32].

En la Tabla 2.1. se muestran algunas características físicoquímicas de los poloxámeros empleados en este trabajo de tesis.

| | Estado de agregación | Masa Molar Promedio (g/mol) | Número promedio (OE) | Número promedio (OP) | H.L.B. | C.M.C. (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Poloxamero 188 (P188) | Sólido | 7680 a 9510 | 152,73 | 28,97 | 29 | $4{,}8.10^{-4}$ |
| Poloxamero 237 (P237) | Sólido | 6840 a 8830 | 122,5 | 39,83 | 24 | $9{,}1.10^{-5}$ |
| Poloxamero 338 (P338) | Sólido | 12700 a 17400 | 265,45 | 50,34 | 27 | $2{,}2.10^{-5}$ |
| Poloxamero 407 (P407) | Sólido | 9840 a 14600 | 200,45 | 65,17 | 22 | $2{,}8.10^{-6}$ |

**Tabla 2.1. Características físicoquímicas de los poloxámeros empleados[32,33]**

Los poloxámeros se emplean en una variedad de formulaciones, tanto por vía parenteral, como oral y tópica. Son considerados no tóxicos y no irritantes. En estudios realizados en animales no han producido efectos adversos, administrados por diferentes vías. Están incluidos en la base de datos de la USFDA sobre Ingredientes Inactivos, para uso parenteral, inhalaciones, oftálmicos, oral y preparaciones tópicas[16].

# CAPÍTULO 2 – MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.3. MATERIALES

Ketoconazol, Griseofulvina, Eudragit® L100 y Poloxámeros 188, 237 y 338 fueron adquiridos en Sigma Aldrich (Argentina); Metilcelulosa Parafarm (4000 cP, 1 % p/p, 20 °C), Hidroxipropilmetilcelulosa Parafarm (4680 cP, 2 % p/p, 20 °C), Carboximetilcelulosa sódica Parafarm (4000 cP, 1 % p/p, 20 °C), Quitosano Parafarm (PM promedio 240 kDa, GD > 75%) y Poloxámero 407 Parafarm fueron adquiridos en Droguería Saporiti (CABA, Argentina); Dimetilsulfóxido Anedra, Fosfato monosódico Cicarelli, Fosfato disódico Cicarelli, Acido acético Cicarelli y Acrilamida Merck fueron adquiridos en Norces (Rosario, Argentina); Cosmedia Guar® BASF, Hyspagel 200® BASF y Polygel W30® 3VSigma fueron donados por Cognis Argentina.

## 2.4. MÉTODOS

### 2.4.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Soluciones stock de KTO y GRI se prepararon en Dimetilsulfóxido (DMSO), en concentraciones 37,6 mM y 56,6 mM respectivamente.

Soluciones de CMC Na, GHPTC, HPMC, MC, EUL100, PG/G y Cop A/P-25 I se prepararon al 0,5% p/v en solución tampón de fosfato monosódico-fosfato disódico pH 7,4. Soluciones de QTO 0,5% se prepararon en solución de ácido acético 1% p/v.

Soluciones de poloxámeros P188, P237, P338 y P407 se prepararon en solución tampón de fosfato monosódico-fosfato disódico pH 7,4 en concentraciones de 0 a 20%.

### 2.4.2. OBTENCIÓN DE LOS ESPECTROS DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA DE GRI Y KTO EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE LOS POLÍMEROS EN ESTUDIO

#### 2.4.2.1.Polímeros polisacáridos y acrílicos

Se mezclaron de 10 µl de solución stock de IFA con solución tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 7,4, obteniéndose concentraciones finales de 0,23 mM en el caso de GRI y 0,09 mM en el caso de KTO.

Se registraron los espectros de emisión de fluorescencia de las soluciones preparadas de ambos IFA (blanco), tras lo cual se añadieron alícuotas de solución polimérica (2.4.1.), registrando los espectros luego de cada agregado.

#### 2.4.2.2. Poloxámeros

Se mezclaron de 10 µl de solución stock de IFA con solución tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 7,4, obteniéndose concentraciones finales de 0,23 mM en el caso de GRI y 0,09 mM en el caso de KTO (blanco).

Se prepararon soluciones del poloxámero en ensayo al 1, 5 y 10% según 2.4.1., a las que se agregaron 10 µl de solución stock del IFA, se dejaron en reposo con agitación ocasional durante 24 hs, registrándose luego los espectros de las tres soluciones preparadas.

Los espectros se registraron por triplicado a 25ªC en un espectrofluorómetro Aminco Bowman S2 empleando una cubeta de polimetacrilato de 1 cm de paso óptico. Se empleó una longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc}$) de 293 nm para KTO y 303 nm para GRI, y la emisión se midió en el rango de 320 a 520 nm (GRI) y de 320 a 460 para KTO.

El análisis estadístico de las diferencias observadas en la posición e intensidad de los máximos de emisión de fluorescencia se realizó por la prueba T para muestras independientes (en el caso de los poloxámeros) y pareadas (para los polímeros polisacáridos y acrílicos), a 1 cola, p = 0,05.

### 2.4.3. TITULACIÓN ESPECTROFLUOROMÉTRICA DE GRI Y KTO CON LOS POLÍMEROS EN ESTUDIO

#### 2.4.3.1. Polímeros polisacáridos y acrílicos

Se mezclaron de 10 µl de solución stock de IFA con solución tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 7,4, obteniéndose concentraciones finales de 0,23 mM en el caso de GRI y 0,09 mM en el caso de KTO. Las mismas fueron tituladas con alícuotas de soluciones poliméricas 0,5% preparadas según 2.4.1., midiendo la intensidad de emisión de fluorescencia luego del agregado de cada alícuota.

#### 2.4.3.2. Poloxámeros

A cada una de las soluciones de poloxámeros preparadas según 2.4.1. se agregó exceso de IFA, se sometieron a agitación durante 48 hs (agitador Boeco PSU-10i, 180 rpm) y se filtraron. Se midió la intensidad de fluorescencia de cada una de la soluciones así obtenidas.

En ambos casos las mediciones se realizaron por triplicado en un espectrofluorómetro Jasco FP 770, a temperatura ambiente y empleando una cubeta de polimetacrilato de 1 cm de paso óptico. La longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc}$) empleada fue de 293 nm para KTO y 303 nm para GRI, fijándose la longitud de emisión ($\lambda_{em}$) a 382 nm para KTO y 443 nm para GRI. Los datos se expresaron como el porcentaje de cambio (aumento o disminución) de la intensidad de fluorescencia de KTO y GRI, según la ecuación 2.1.

$$\Delta F\% = [(F_i - F_0)/F_0].100 \qquad \text{Ecuación 2.1.}$$

donde

$F_i$ = intensidad de fluorescencia en presencia de "i" concentración de polímero

$F_0$ = intensidad de fluorescencia en ausencia de polímero

Se graficaron los valores de $\Delta F\%$ obtenidos en función de la concentración de polímero.

### 2.4.4. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ASOCIADOS AL PROCESO DE SOLUBILIZACIÓN DE GRI Y KTO EN LOS SISTEMAS POLIMÉRICOS EN ESTUDIO

Procedimiento por ajuste no lineal, basado en la ecuación 2.2.[34]:

$$y = (\Delta F_{máx} . [P])/(K_d + [P]) \qquad \text{Ecuación 2.2.}$$

donde

[P] = concentración de polímero

y = cambio en la intensidad de emisión de fluorescencia

$\Delta F_{máx}$ = cambio máximo en la intensidad de emisión de fluorescencia

$K_d$ = constante de disociación de equilibrio

A partir del ajuste de las curvas obtenidas en el punto 2.4.3. se calculó la concentración mínima ($C_{mín}$) de polímero necesaria a partir de la intersección entre la tangente a los primeros puntos de la curva y la asíntota a la misma, y las relaciones de peso polímero/IFA. La constante de asociación ($K_a$) se calculó en todos los casos como la inversa de la constante de disociación ($1/K_d$) informada por el programa estadístico.

En el caso de los poloxámeros, se calculó además la concentración micelar crítica (CMC) como la concentración a la cual se produjo un cambio en la intensidad de emisión de

fluorescencia del 50% ($\Delta F_{50\%}$)[35] y según el método por solubilización de sonda óptica reportado por Kabanov y col[36]. También se calculó el coeficiente de partición de KTO entre los medios acuoso y micelar, según el modelo propuesto asimismo por Kabanov y col[36]:

$$\alpha = (I - I_0)/(I_{máx} - I_0) = \theta \cdot P \cdot [1 + (P - \theta) \cdot \theta] \qquad \text{Ecuación 2.3.}$$

Donde

$\alpha$ = fracción de KTO incorporada en las micelas

$I_m$ = intensidad máxima de emisión (situación en que todas las moléculas de KTO se han incorporado a las micelas)

$I_0$ = intensidad de emisión de KTO en ausencia del poloxámero

I = intensidad de emisión de KTO a una dada concentración de poloxámero

$\theta$ = fracción de volumen de la fase micelar = 0,01.v.([poloxámero] – CMC)

P = coeficiente de partición

El gráfico de $1/\alpha$ vs $1/\theta$ proporciona una línea recta, cuya pendiente es 1/P.

### 2.4.5. ESTIMACIÓN DE LA POLARIDAD DEL MICROENTORNO DEL FLUORÓFORO EN LOS SISTEMAS POLIMÉRICOS

Se prepararon mezclas tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 7,4/etanol con concentraciones de 0 a 60% de etanol y se calculó su constante dieléctrica según la ecuación 2.4.

$$D_m = [(\%_A \cdot D_A) + (\%_E \cdot D_E)] / 100 \qquad \text{Ecuación 2.4.}$$

donde

$D_m$ = constante dieléctica del medio

$D_A$ = constante dieléctrica del agua = 80,1

$\%_A$ = porcentaje p/v de agua

$D_E$ = constante dieléctrica del etanol = 24,3

$\%_E$ = porcentaje p/v de etanol

A cada una de las mezclas hidroalcohólicas preparadas se agregó 10 µl de solución madre de IFA preparada según 2.3.1. y se registraron los espectros de emisión ($\lambda_{exc}$ 293 nm y $\lambda_{exc}$ 303 nm para KTO y GRI respectivamente).

Se graficó la longitud de emisión máxima ($\lambda_{máx}$) en función de $D_m$. Interpolando en estos gráficos el valor de $\lambda_{máx}$ correspondiente a la $C_{mín}$ se estimó la polaridad del microambiente en cada sistema IFA/polímero.

### 2.4.6. EXTINCIÓN DE FLUORESCENCIA DE KTO Y GRI EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE LOS POLÍMEROS EN ESTUDIO POR ACCIÓN DE ACRILAMIDA

Se prepararon soluciones de polímero con la $C_{mín}$ determinada según lo descripto en 2.4.4., a las que se agregaron 10 µl de solución madre de KTO ó GRI preparadas según 2.4.1. Estas soluciones fueron tituladas con alícuotas de 3 µl de Acrilamida 3M y se midió la intensidad de emisión de fluorescencia de los IFA tras el agregado de cada alícuota.

La longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc}$) empleada fue de 293 nm para KTO y 303 nm para GRI, fijándose la longitud de emisión ($\lambda_{em}$) a 382 nm para KTO y 443 nm para GRI.

A partir de los gráficos de $F_o/F$ en función de la concentración de Acrilamida[34,37], se determinó la constante de Stern Volmer ($K_{sv}$), que corresponde a la pendiente de dichos gráficos.

### 2.4.7. ESTABILIDAD DE LOS SISTEMAS IFA/POLÍMERO

Se prepararon soluciones de polímero con la $C_{mín}$ determinada según lo descripto en 2.4.4., a las que se agregaron 10 µl de solución madre de KTO ó GRI preparadas según 2.4.1. y se midió la intensidad de fluorescencia a las 24 h ($F_o$). Los sistemas se sometieron en forma cíclica (cada 3 días) a 40ºC y 8ºC. Se midió la intensidad de emisión de fluorescencia a los 7 ($F_7$), 14 ($F_{14}$), 21 ($F_{21}$), 28 ($F_{28}$), 60 ($F_{60}$) y 90 ($F_{90}$) días. Como blanco se empleó una solución de 10 µl de solución madre de KTO ó GRI en buffer fosfatos pH 7,4.

La longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc}$) empleada fue de 293 nm para KTO y 303 nm para GRI, fijándose la longitud de emisión ($\lambda_{em}$) a 382 nm para KTO y 443 nm para GRI.

## 2.5. KETOCONAZOL

En solución tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 7,4 y a una $\lambda_{exc}$ = 293 nm KTO muestra un espectro de emisión de fluorescencia donde se distinguen dos bandas de emisión aproximadamente a 364 y 382 nm, (denominadas de aquí en adelante banda 1 y banda 2, respectivamente). Estas bandas corresponden a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$, ubicadas en el anillo aromático -O-Ph-N con una participación significativa del grupo 1,3-dioxolan-4- ilo y los sustituyentes del grupo piperazina[38], como así también a nivel del grupo imidazol[39].

Al igual que KTO, otras moléculas fluorescentes muestran espectros de emisión con multiplicidad de bandas, como por ejemplo el pireno, para el cual la relación de intensidad de emisión de las dos bandas principales ($I_1/I_3$) es ampliamente utilizada como un parámetro para determinar la polaridad del disolvente en medios microheterogéneos[40-42]. De una forma similar la relación de intensidad de emisión entre las dos bandas de emisión de KTO ($I_1/I_2$) podría utilizarse como una indicación del cambio de polaridad local en torno a los grupos fluoróforos[40,43]. Se registraron los espectros de emisión de KTO en mezclas hidroalcohólicas de constante dieléctrica (D) calculada según la ecuación 2.4. Se observó un desplazamiento hacia el rojo ("redshift") en los máximos de emisión de la banda 2 con el aumento de la polaridad del medio, expresada en función de la constante dieléctrica del medio, en coincidencia con lo descripto por Starosta et al[38], no así en la banda 1, que no mostró variaciones significativas. En la fig 2.13. se muestra la variación en la longitud máxima de emisión de KTO en la banda 2 en función de la D del medio.

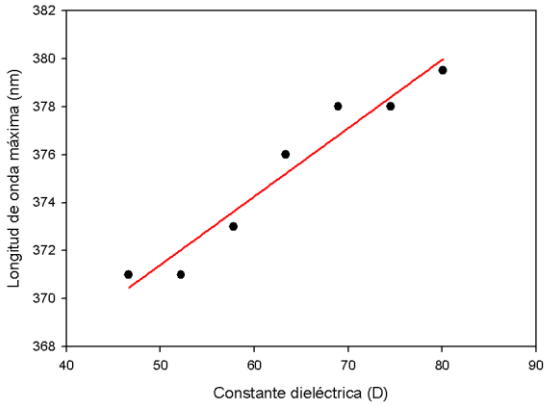



**Fig 2.13. Dependencia de la longitud de onda máxima de emisión banda 2 de KTO en función de la constante dieléctrica de mezclas agua – etanol**

Asimismo, se calcularon los valores de R (relación $I_1/I_2$) y se graficaron en función de D. Se observó que R disminuyó notablemente en función del aumento de la polaridad del medio (Fig 2.14), sugiriendo que la intensidad de emisión de KTO también se ve afectada por los cambios en la polaridad del medio.

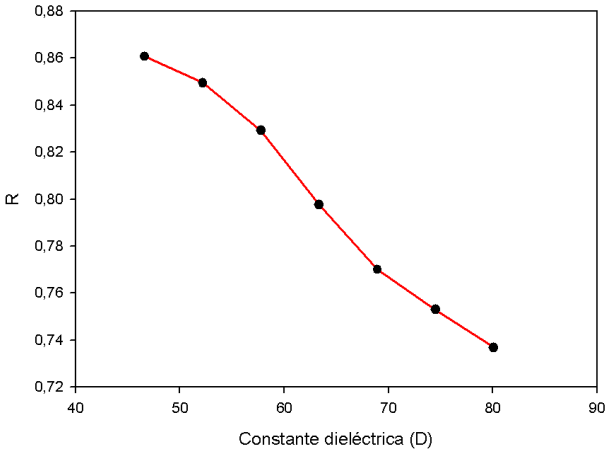
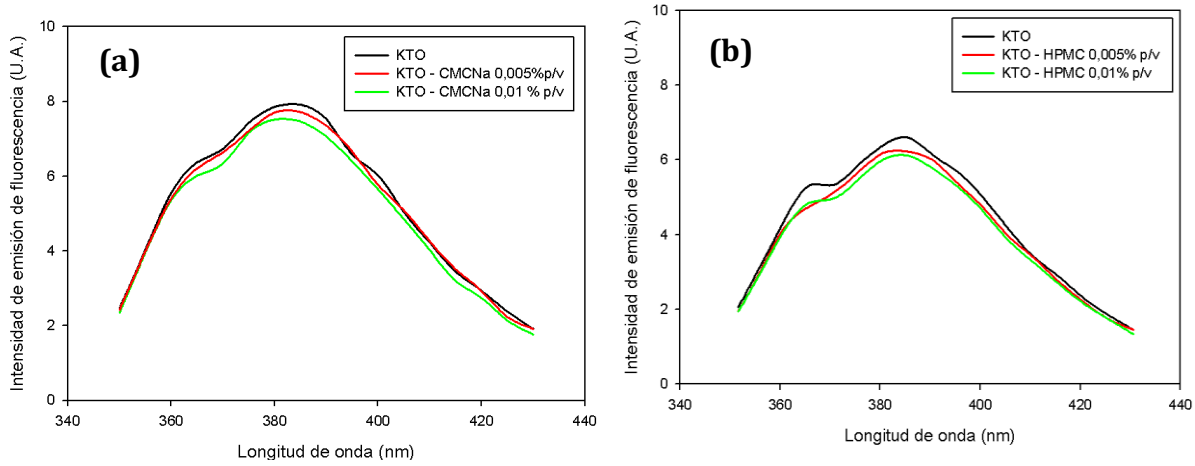



**Fig 2.14. Variación en los valores de R de KTO en función de la constante dieléctrica del medio**

Estos resultados muestran que los valores de R pueden ser usados para estimar la polaridad del microentorno en que se halla la molécula de KTO.

## 2.5.1. EFECTO DE LOS POLÍMEROS ESTUDIADOS SOBRE EL ESPECTRO DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA DE KTO

### 2.5.1.1. DERIVADOS POLISACÁRIDOS



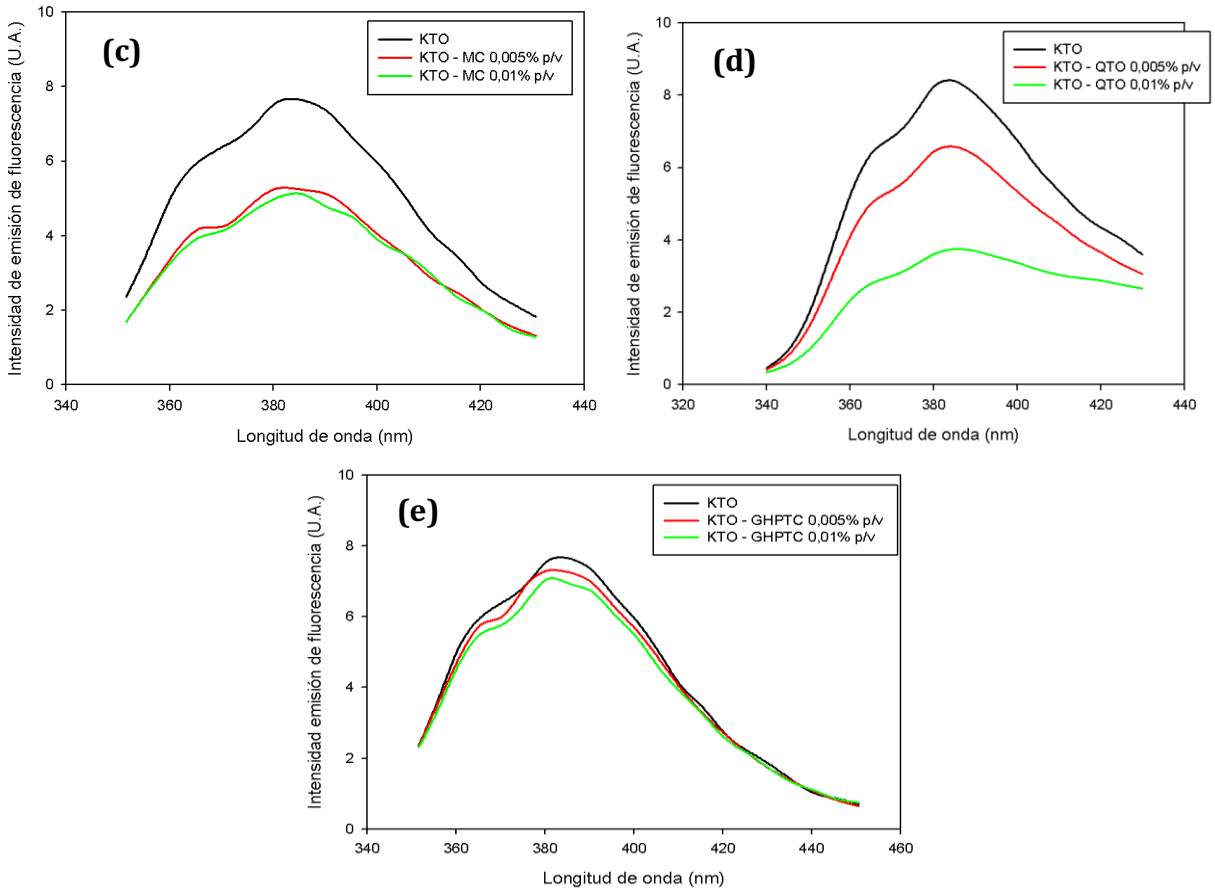



**Fig 2.15. Espectros emisión fluorescencia KTO en presencia de (a) CMCNa; (b) HPMC; (c) MC: (d) QTO; (e) GHPTC**

Las figuras 2.15. (a), (b) y (c) muestran el efecto de los tres derivados celulósicos sobre el espectro de emisión de fluorescencia de KTO. En presencia de CMCNa y HPMC el espectro de emisión no mostró cambios significativos en la posición de las bandas ni en la intensidad de las mismas. MC indujo una disminución notable en la intensidad de las bandas, con un ligero desplazamiento hacia menores longitudes de onda en banda 2; sin embargo, esta disminución no fue proporcional a la cantidad de polímero presente. La disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia podría deberse a la formación de complejos no fluorescentes, mediados por uniones puente hidrógeno entre los grupos aceptores de KTO (nitrógenos del grupo imidazol, grupo carbonilo adyacente al anillo de piperazina) y los grupos dadores de MC (hidroxilos) (Fig 2.16)[44-47].

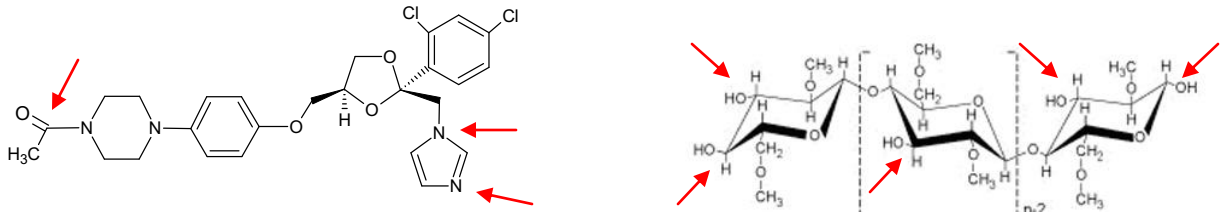


**Fig 2.16. Posibles sitios de interacción entre las moléculas de KTO y MC**

En la figura 2.15(d) se muestra el espectro de emisión de KTO en presencia de QTO. El agregado de concentraciones crecientes de polímero indujo un leve desplazamiento en la posición de banda 2 hacia mayores longitudes de onda (388 nm, $p < 0,05$), evidenciando un ambiente más polar entorno al fluoróforo debido a interacciones dipolo-dipolo que favorecen la pérdida de energía en forma no radiante, y una disminución significativa en las intensidades de emisión en ambas bandas. La disminución de la intensidad de fluorescencia puede explicarse por el efecto de las cargas eléctricas de QTO localizadas en los grupos amino (que se encuentran protonados) que interaccionan con el grupo imidazólico induciendo un aumento de la disipación de energía de KTO por mecanismos no radiactivos (pérdida de fluorescencia)[1]. Al igual que con MC, también podría plantearse interacciones mediadas por puente hidrógeno, en este caso entre las aminas terciarias del QTO y el grupo carbonilo terminal de KTO y/o los oxígenos del grupo 1,3-dioxolan-4- ilo.

Los posibles sitios de interacción de QTO[48] se indican en Fig. 2.17.

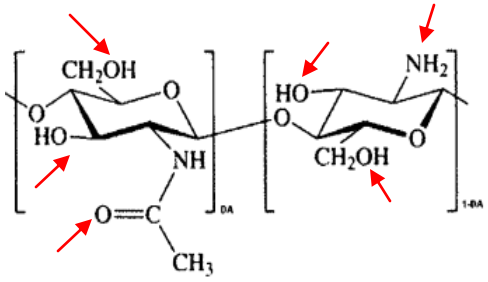


**Fig 2.17. Posibles sitios de interacción en la molécula de QTO**

Con respecto a GHPTC (Fig 2.15(e)) no se observaron modificaciones significativas en el espectro de KTO, ni en posición de bandas ni en intensidad de emisión.

Los valores de R (relación de intensidades de fluorescencia, $I_1/I_2$) que se muestran en Tabla 2.2. no sufrieron cambios significativos ($p > 0,05$) en función de concentraciones crecientes de polímeros, lo que sugiere que los polímeros ensayados no inducen cambios significativos en la polaridad del ambiente en torno a KTO.

| Polímero | Concentración | R |
|---|---|---|
| **CMCNa** | 0% | 0,7906 |
| | 0,005% | 0,7923 |
| | 0,01% | 0,7830 |
| **GHPTC** | 0% | 0,7728 |
| | 0,005% | 0,7789 |
| | 0,01% | 0,7723 |
| **HPMC** | 0% | 0,8026 |
| | 0,005% | 0,7863 |
| | 0,01% | 0,7803 |
| **MC** | 0% | 0,7724 |
| | 0,005% | 0,7645 |
| | 0,01% | 0,7660 |
| **QTO** | 0% | 0,7583 |
| | 0,005% | 0,7555 |
| | 0,01% | 0,7428 |

**Tabla 2.2.Valores de R para KTO para distintas concentraciones de los polímeros polisacáridos en estudio**

### 2.5.1.2. DERIVADOS ACRÍLICOS

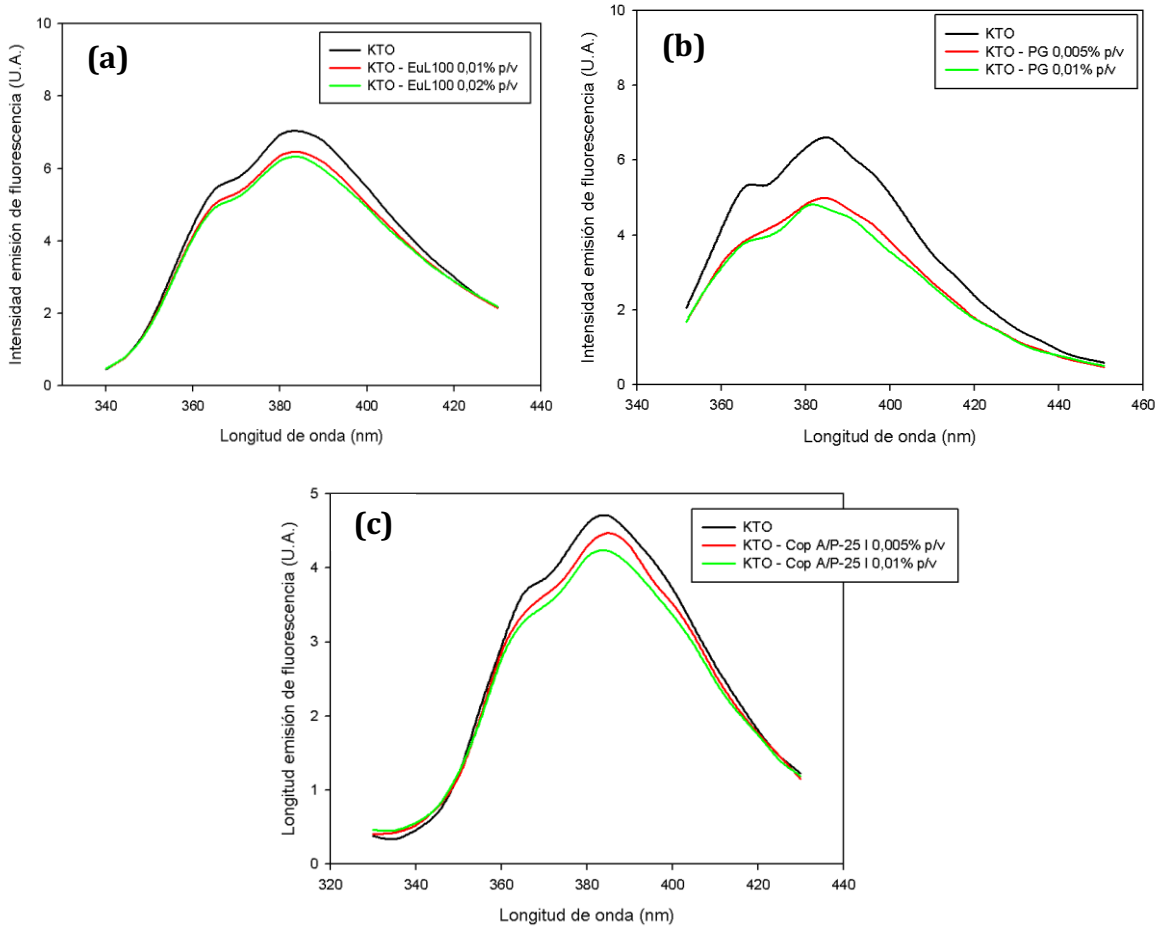



**Fig 2.18. Espectros emisión fluorescencia KTO en presencia de (a) EuL100; (b) PG/G; (c) Cop A/P-25 I**

En las figuras 2.18. (a), (b) y (c) se muestran los espectros de emisión de KTO en presencia de los polímeros acrílicos en estudio. Ninguno de los derivados produjo modificaciones significativas en las posiciones de las bandas de emisión ($p > 0,05$), pero sí disminuciones significativas de la intensidad de emisión en ambas bandas en función del aumento de concentración ($p < 0,05$).

La formación de complejos no fluorescentes entre KTO y los polímeros ensayados podría ser la causa de la disminución en la intensidad de emisión de la molécula. Diversos tipos de interacciones pueden presentarse, según lo informado por Mistry y col; con polímeros acídicos (como Eu L100, PG/G y Cop A/P-25 I), se ha sugerido y comprobado por FTIR y NMR una interacción entre el N3 del grupo imidazólico del KTO y el grupo carboxílico libre del polímero acrílico, de tipo iónico, mediante la cesión de un protón[49].

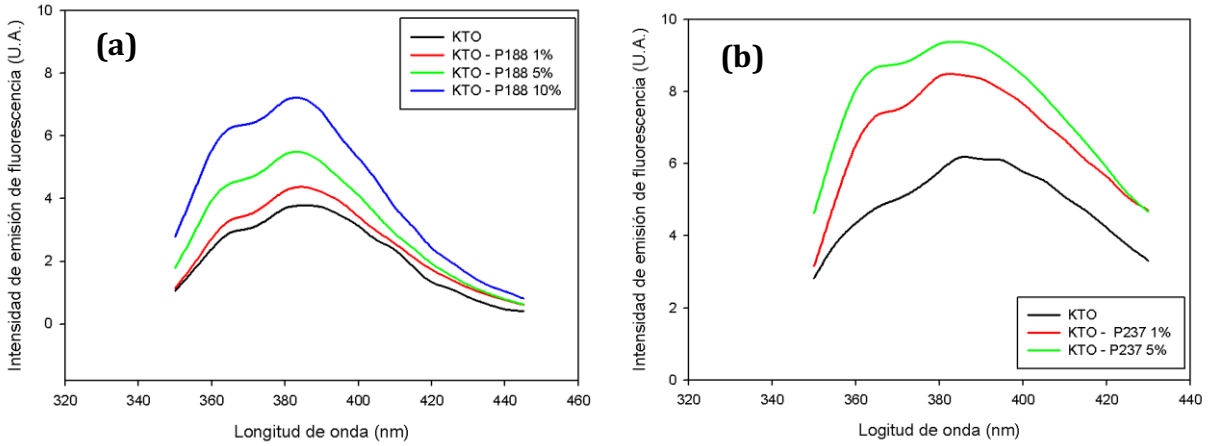
Los valores de R (Tabla 2.3.) no mostraron cambios significativos en presencia de concentraciones crecientes del polímero ($p > 0,05$), lo que indica que no se produjeron cambios en la polaridad del medio, en coincidencia con el análisis espectral.

| Polímero | Concentración | R |
|---|---|---|
| EuL100 | 0% | 0,7662 |
| | 0,01% | 0,7728 |
| | 0,02% | 0,7760 |
| PG/G | 0% | 0,8110 |
| | 0,005% | 0,8122 |
| | 0,01% | 0,8137 |
| Cop A/P-25 I | 0% | 0,7695 |
| | 0,005% | 0,7528 |
| | 0,01% | 0,7626 |

**Tabla 2.3. Valores de R para distintas concentraciones de los polímeros acrílicos en estudio**

### 2.5.1.3. POLOXÁMEROS

En las figuras 2.19. (a), (b), (c) y (d) se muestran los espectros de emisión de KTO en presencia de concentraciones crecientes de los poloxámeros en ensayo. Se observó que todos los poloxámeros aumentaron significativamente la intensidad de emisión de fluorescencia en ambas bandas, con desplazamientos significativos hacia menores longitudes de onda, en particular en presencia de P407 ($p < 0,05$).



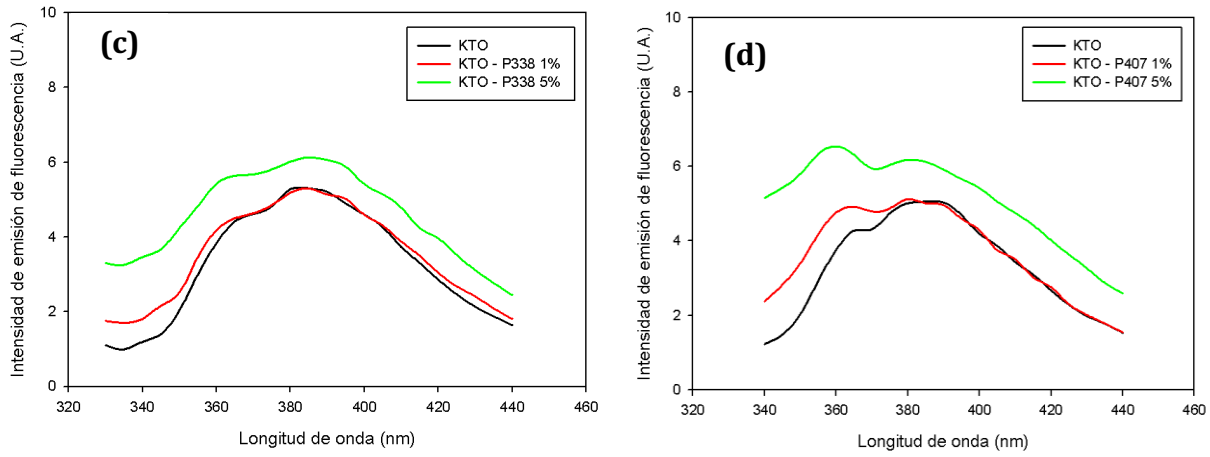



**Fig 2.19. Espectros emisión fluorescencia KTO en presencia de (a) P188; (b) P237; (c) P338: (d) P407**

Las micelas poliméricas, como ya se mencionó en la introducción de este capítulo, son capaces de albergar en sus dominios las moléculas de IFA, alterando el microambiente que rodea a los grupos fluoróforos. Los cambios observados en la posición de los máximos de emisión de KTO y la variación de los valores de R (Tabla 2.4.) en presencia de los poloxámeros ensayados evidencian la creación de un microambiente menos polar en torno a la molécula de KTO, debido al movimiento de la molécula desde un ambiente altamente polar (acuoso) al ambiente menos polar proporcionado por las micelas[40,50]. Este cambio en la polaridad puede explicarse por la pérdida de agua en torno a los bloques de polipropileno a medida que progresa el proceso de formación de las micelas[51]. Jalali et al obtuvieron resultados similares (aumento de intensidad y desplazamiento hacia el azul) trabajando con KTO y agentes tensoactivos (Bromuro de Cetiltrimetilamonio), y explicaron el aumento de intensidad por la restricción en el desplazamiento de las moléculas de KTO incluidas en las micelas[52].También se ha planteado que como resultado de la inclusión de KTO en un entorno más hidrófobo, la molécula se encuentra protegida de desactivaciones no radiativas y de extintores solubles en agua, como el oxígeno, lo cual también explica el aumento en la emisión de fluorescencia[53,54].

| Polímero | Concentración | R |
|---|---|---|
| P 188 | 0% | 0,7623 |
| | 1% | 0,7877 |
| | 5% | 0,8056 |
| P 237 | 0% | 0,7690 |
| | 1% | 0,8567 |
| | 5% | 0,9210 |
| P 338 | 0% | 0,8317 |
| | 1% | 0,8368 |
| | 5% | 0,9137 |
| P 407 | 0% | 0,8344 |
| | 1% | 0,9430 |
| | 5% | 1,0587 |

**Tabla 2.4. Valores de R para distintas concentraciones de los poloxámeros en estudio**

### 2.5.2. TITULACIÓN ESPECTROFLUOROMÉTRICA Y DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE ASOCIACIÓN KTO – POLÍMEROS EN ESTUDIO

En función de los resultados obtenidos en el apartado 2.5.1. se realizó la titulación espectrofluorométrica de KTO con los polímeros que evidenciaron interacciones significativas.

#### 2.5.2.1. DERIVADOS POLISACÁRIDOS

La titulación de KTO con concentraciones crecientes de MC y QTO produjo una disminución progresiva en la intensidad de emisión de fluorescencia de KTO, en concordancia con lo observado en el análisis espectral. En la figura 2.20 se observa el gráfico de $-\Delta F$ vs la concentración de los polímeros:

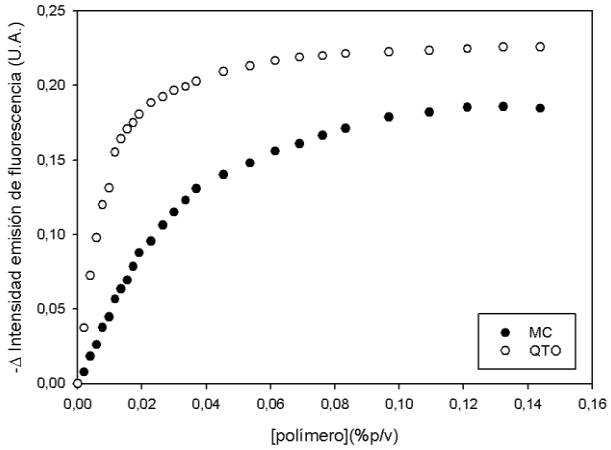



**Fig 2.20. -ΔF KTO en presencia de concentraciones crecientes de MC y QTO**

En las figuras 2.21. (a) y (b) se muestran las gráficas del porcentaje de disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia de KTO, calculado según la ecuación 2.1. , en función de concentraciones crecientes de MC y QTO, ajustadas según la ecuación 2.2. En ambos casos se obtuvieron curvas con un perfil hiperbólico. Las flechas señalan los valores de $C_{mín}$ estimados, que se obtuvieron a partir de la intersección entre la pendiente a la curva y el máximo % de cambio de fluorescencia calculado según el programa estadístico.

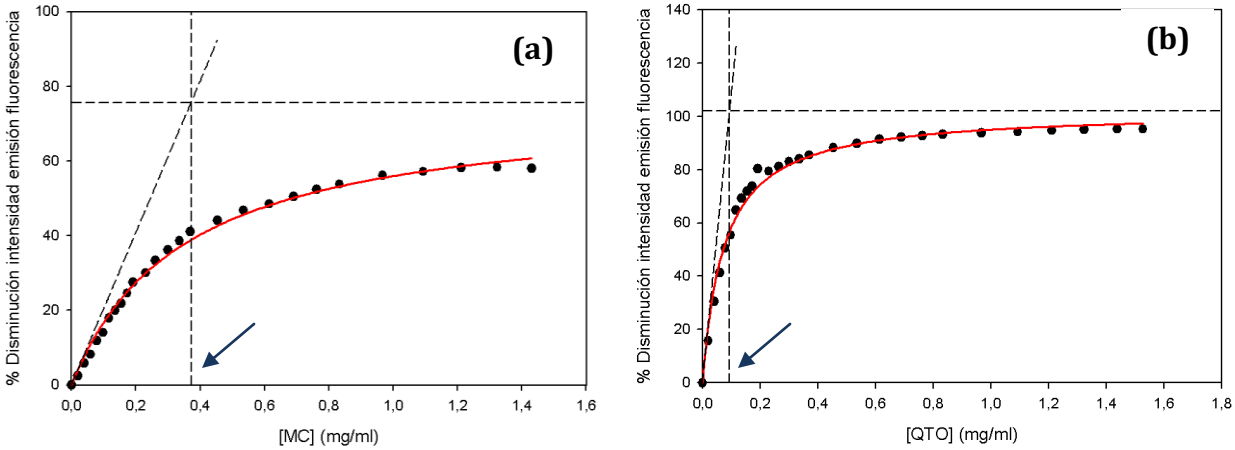



**Fig 2.21. Porcentaje de disminución de intensidad de emisión de fluorescencia de KTO en presencia de cantidades crecientes de (a) MC; (b) QTO.**

En tabla 2.5 se muestran los valores de concentración de polímero mínima ($C_{mín}$), relación mínima de peso polímero-KTO (P/F), porcentaje máximo de disminución de fluorescencia

($\Delta F_{máx}$) y $K_a$ (constante de asociación) para los procesos de asociación KTO – polímeros polisacáridos, calculados según este modelo.

| | $C_{mín}$ (%p/v) | P/F (p/p) | $\Delta F_{máx}$ (%) | $K_a$ $(mg/mL)^{-1}$ |
|---|---|---|---|---|
| **KTO-MC** | 0,04 ± 0,0006 | 12,50 | 75,63 ± 1,41 | 2,84 ± 0,02 |
| **KTO-QTO** | 0,01 ± 0,0002 | 3,22 | 102,11 ± 1,06 | 13,96 ± 0,04 |

**Tabla 2.5. Parámetros de los procesos de asociación KTO – MC y KTO – QTO calculados según el modelo no lineal de unión de ligandos**

### 2.5.2.2. DERIVADOS ACRÍLICOS

La titulación de KTO con concentraciones crecientes de los tres polímeros acrílicos en estudio produjo una disminución progresiva en la intensidad de emisión de fluorescencia de KTO (en concordancia con lo observado en el análisis espectral) hasta alcanzar una meseta donde la intensidad de fluorescencia se mantuvo más o menos constante. En la figura 2.22 se observa el gráfico de $-\Delta F$ vs la concentración de los polímeros:

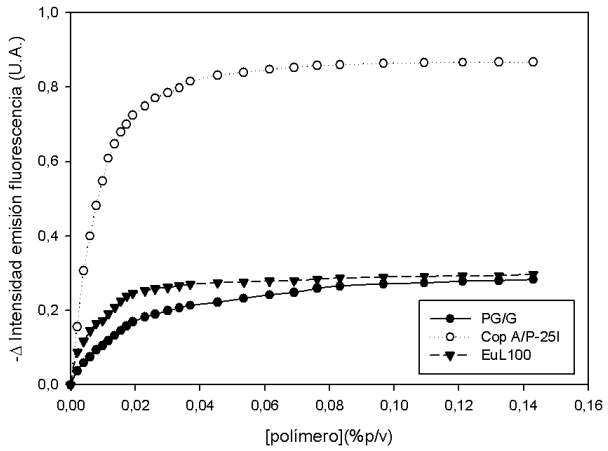



**Fig 2.22. -ΔF KTO en presencia de concentraciones crecientes de los polímeros acrílicos en estudio**

En las figuras 2.23 (a), (b) y (c) se muestran las gráficas del porcentaje de disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia de KTO, calculado según la ecuación 2.1. , en función de concentraciones crecientes de los tres polímeros acrílicos en estudio, ajustadas según la ecuación 2.2. En los tres casos se obtuvieron curvas con un perfil hiperbólico. Las flechas señalan los valores de $C_{mín}$ estimados, que se obtuvieron a partir de la intersección entre la

pendiente a la curva y el máximo % de cambio de fluorescencia (línea punteada horizontal superior) calculado según el programa estadístico.

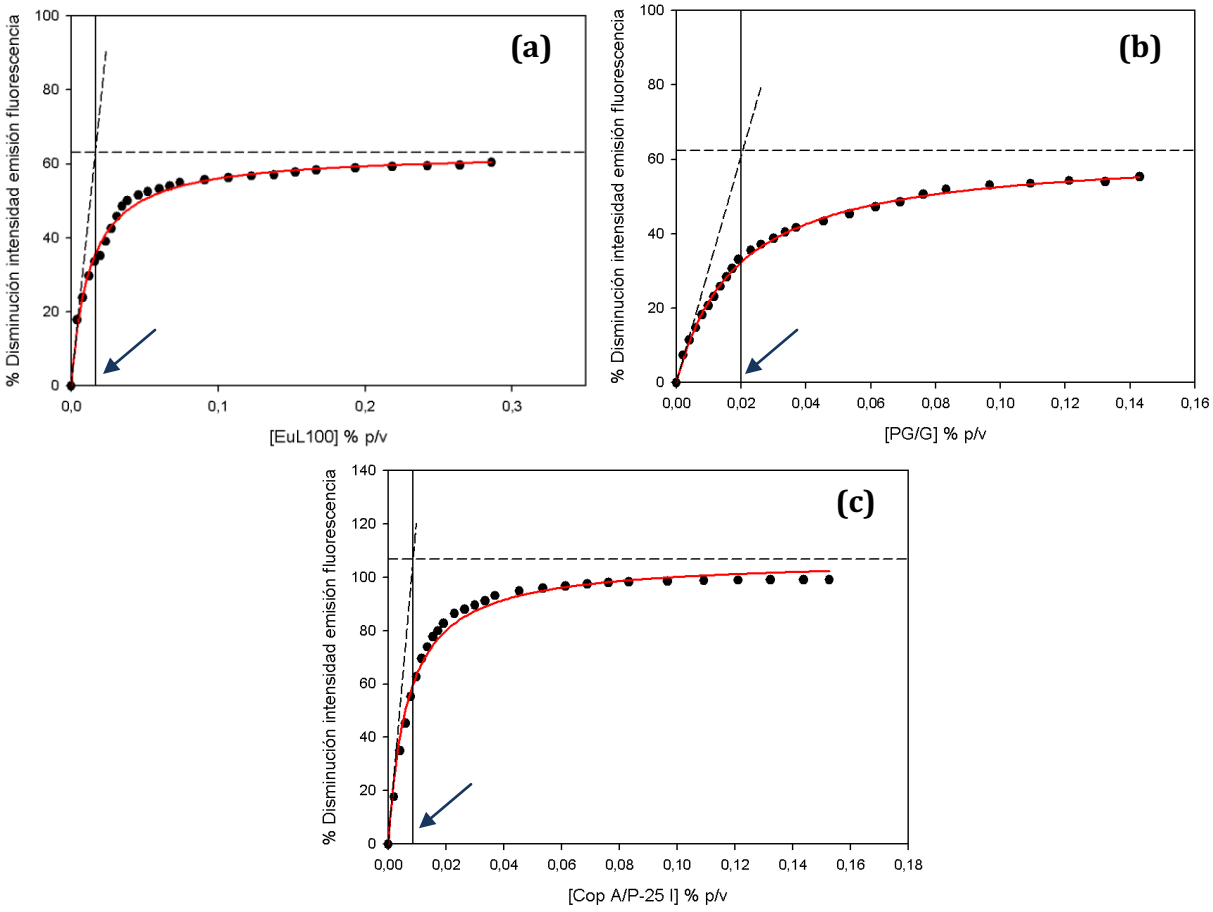



**Fig 2.23. Porcentaje de disminución de intensidad de emisión de fluorescencia de KTO en presencia de cantidades crecientes de (a) EuL100; (b) PG/G; (c) Cop A/P-25 I.**

En tabla 2.6 se muestran los valores de concentración de polímero mínima ($C_{mín}$), relación mínima de masa polímero-KTO (P/F), porcentaje máximo de disminución de fluorescencia ($\Delta F_{máx}$) y $K_a$ (constante aparente de asociación) para los procesos de asociación KTO – polímeros acrílicos según este modelo.

| | $C_{mín}$ (%p/v) | P/F (p/p) | $\Delta F_{máx}$ (%) | $K_a$ $(mg/ml)^{-1}$ |
|---|---|---|---|---|
| **KTO-EuL100** | 0,02 ± 0,0003 | 3,57 | 63,17 ± 0,552 | 7,92 ± 0,005 |
| **KTO-PG/G** | 0,02 ± 0,0001 | 4,10 | 62,36 ± 0,441 | 5,39 ± 0,004 |
| **KTO- A/P-25 I** | 0,01 ± 0,0003 | 1,50 | 106,88 ± 1,117 | 14,88 ± 0,003 |

**Tabla 2.6. Parámetros asociados a los procesos de asociación KTO – polímeros acrílicos calculados según el modelo no lineal de unión de ligandos**

### 2.5.2.3. POLOXÁMEROS

En la Fig 2.24. se observan los cambios en la intensidad de emisión de KTO en presencia de concentraciones crecientes de P188, P237, P338 y P407. En todos los casos se observó un aumento en la intensidad de emisión de fluorescencia de KTO, en concordancia con lo observado en el análisis espectral.

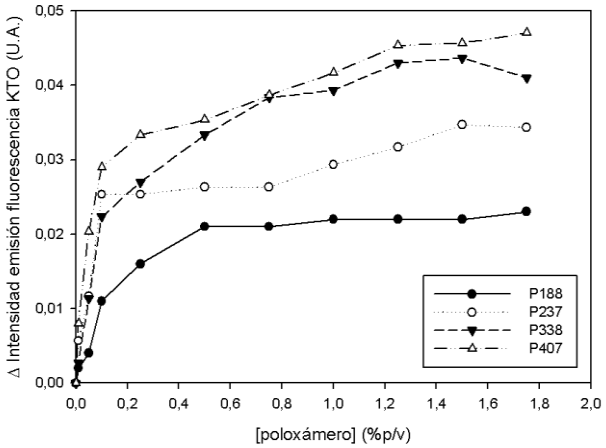



**Fig 2.24. ΔF KTO en presencia de concentraciones crecientes de los poloxámeros en estudio**

En la figura 2.25. se muestran las gráficas de porcentaje de aumento en la intensidad de emisión de fluorescencia de KTO en función de concentraciones crecientes de los poloxámeros ensayados. En todos los casos se obtuvieron curvas con un perfil hiperbólico, que se ajustaron a un modelo no lineal de unión de ligando a un sitio de unión. Las flechas señalan los valores de $C_{mín}$ estimados.

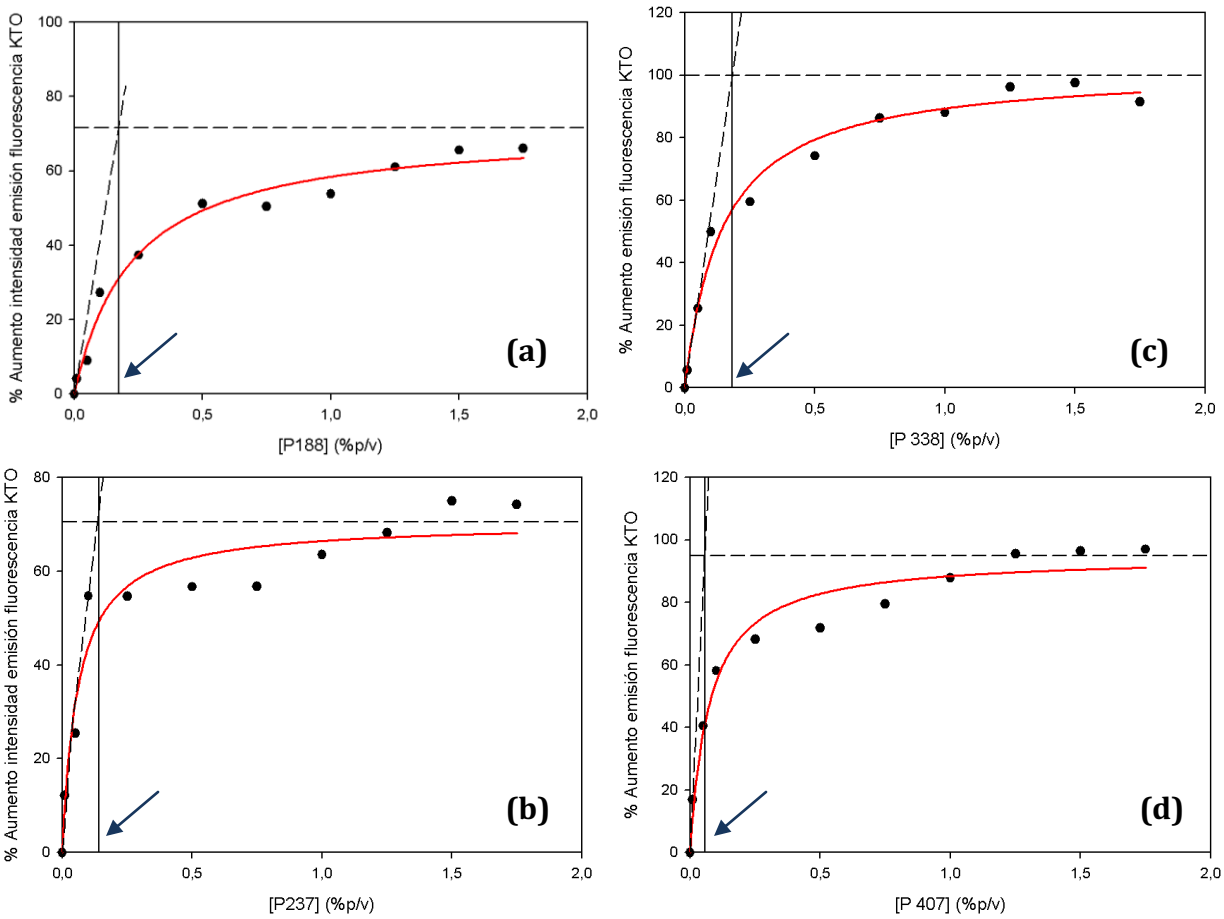



**Fig 2.25. Porcentaje de aumento de intensidad de emisión de fluorescencia de KTO en presencia de cantidades crecientes de (a) P188; (b) P237; (c) P338; (d) P407.**

En tabla 2.7. se muestran los valores de concentración de polímero mínima ($C_{mín}$), CMC (concentración micelar crítica), porcentaje máximo de disminución de fluorescencia ($\Delta F_{máx}$) y $K_a$ (constante aparente de asociación) para los procesos de asociación KTO – poloxámeros según este modelo.

| | $C_{mín}$ (M) | CMC (M) | $\Delta F_{máx}$ (%) | $K_a$ ($M^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| **KTO-P188** | $2{,}00.10^{-4}$ | $6{,}2.10^{-4}$ | 71,6 ± 3,14 | $3{,}33.10^{3}$ ± 0,04 |
| **KTO-P237** | $2{,}00.10^{-4}$ | $2{,}04.10^{-4}$ | 70,46 ± 3,36 | $1{,}27.10^{4}$ ± 0,02 |
| **KTO-P338** | $1{,}24.10^{-4}$ | $9{,}83.10^{-5}$ | 102,26 ± 3,09 | $1{,}01.10^{4}$ ± 0,02 |
| **KTO-P407** | $4{,}00.10^{-5}$ | $6{,}51.10^{-5}$ | 94,91 ± 3,38 | $1{,}714.10^{4}$ ± 0,01 |

**Tabla 2.7. Parámetros de los procesos de asociación KTO – poloxámeros calculados según el modelo no lineal de unión de ligandos**

La determinación de la CMC se puede realizar utilizando cualquier propiedad que presente un cambio significativo frente a la concentración de agentes formadores de micelas. Algunas de las propiedades más utilizadas son: la tensión superficial, la conductividad y las propiedades ópticas y espectroscópicas tales como medidas de dispersión de la luz e índice de refracción o absorción[55]. Si en el sistema micelar se incluye alguna molécula fluorescente, su intensidad de emisión frente a concentraciones crecientes del agente formador de micelas puede ser utilizada para estimar su CMC. Esta propiedad fue utilizada en los trabajos de Kabanov y col, que determinaron las CMC de distintos poloxámeros utilizando pireno como sonda óptica fluorescente. En forma análoga, y como ya se viera en apartados anteriores, KTO es sensible a los cambios en la polaridad del ambiente, y su intensidad de emisión de fluorescencia puede usarse para monitorear su incorporación en micelas y estimar la CMC de estos polímeros a partir de los puntos de inflexión de la curva de intensidad de emisión de fluorescencia vs el log de la concentración de los poloxámeros (Fig 2.26).

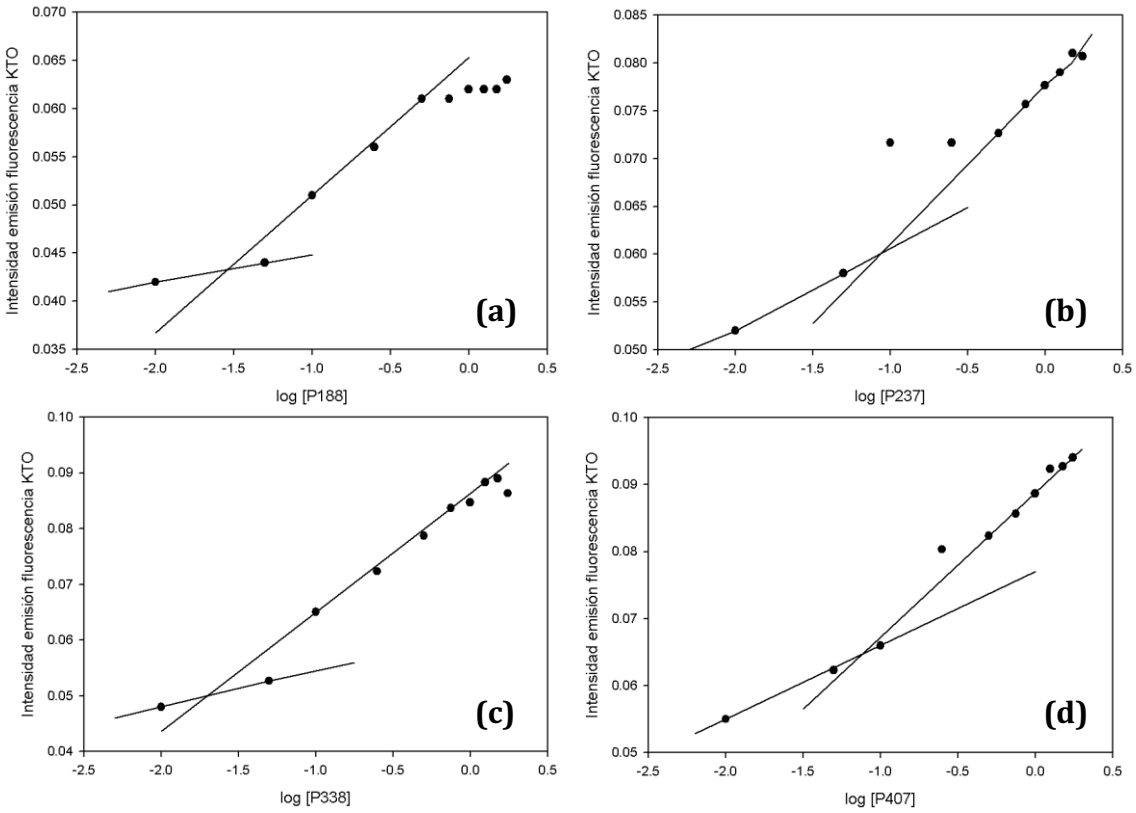



**Fig 2.26. Estimación CMC de (a) P188, (b) P237, (c) P338 y (d) P407 por el método de Kabanov**

Los valores de intensidad de fluorescencia de KTO permanecen bajos y sin cambios significativos por debajo de la CMC, pero a concentraciones mayores aumenta significativamente, reflejando la incorporación de KTO en el entorno hidrofóbico de las micelas formadas. En Tabla 2.8 se muestran los valores de CMC obtenidos por el método de Kabanov:

| | CMC (M) |
|---|---|
| **P 188** | $1{,}47.10^{-4}$ |
| **P 237** | $1{,}10.10^{-4}$ |
| **P 338** | $1{,}37.10^{-5}$ |
| **P 407** | $6{,}10.10^{-5}$ |

**Tabla 2.8. CMC de los poloxámeros en estudio estimadas según el método de Kabanov**

Los resultados obtenidos son coincidentes en cuanto a que la CMC de estos polímeros se encuentra relacionada a la longitud de la porción hidrofóbica de la molécula polimérica; a mayor longitud, menor CMC. Un menor valor de CMC indica una mayor facilidad para la formación de micelas[50].

Para describir las interacciones entre micelas de los poloxámeros en ensayo y KTO, se calcularon los coeficientes de partición de KTO en los cuatro sistemas poliméricos a partir de los datos obtenidos por espectrofluorometría, que se detallan en tabla 2.9.

| | P | log P |
|---|---|---|
| **KTO – P188** | 80,65 ± 0,001 | 1,90 |
| **KTO – P237** | 99,87 ± 0,007 | 1,99 |
| **KTO – P338** | 152,22 ± 0,07 | 2,18 |
| **KTO – P407** | 166,66 ± 0,99 | 2,22 |

**Tabla 2.9. Coeficientes de partición KTO en los sistemas poliméricos micelares en base a poloxámeros**

Se observa que el coeficiente de partición de KTO aumenta en función del la hidrofobicidad del poloxámero (relación PEO/PPO). Esto sugiere que el aumento de solubilidad de KTO

por poloxámeros se debe principalmente a interacciones de tipo hidrofóbico entre la molécula de KTO y las micelas, en concordancia con trabajos previos[36,56].

### 2.5.3. EXTINCIÓN DE FLUORESCENCIA KTO EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE LOS SISTEMAS POLIMÉRICOS POR AGREGADO DE ACRILAMIDA

Los procesos de extinción de fluorescencia pueden representarse según los esquemas (Fig 2.27.)

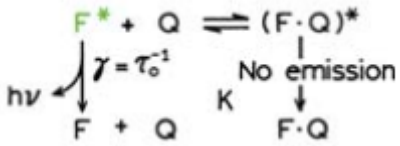



**Fig 2.27. Representación esquemática de un proceso de extinción de fluorescencia estático[1]**

Los procesos de extinción estática obedecen a la ecuación de Stern Volmer:

$$F_0/F = 1 + K_{SV} . [E]$$ Ecuación 2.5.

Donde

F0 = Intensidad emisión de fluorescencia en ausencia del polímero

F = Intensidad emisión de fluorescencia a una dada concentración del extintor

[E] = concentración del extintor

$K_{SV}$ = constante de Stern Volmer

Los datos de extinción se presentan como gráficos $F_0/F$ versus [E], esperándose que $F_0/F$ sea linealmente dependiente de la concentración del extintor. Las gráficas lineales presentan intersección en el eje y igual a 1 y una pendiente igual a K; son generalmente indicativas de una sola clase de fluoróforos, todos igualmente accesibles para el extintor. Si dos poblaciones de fluoróforos están presentes, y una clase no es accesible al apagador, entonces los gráficos se desvían de la linealidad hacia el eje x. En muchos casos, el fluoróforo se puede apagar tanto por colisiones como por formación de complejos con el mismo extintor; en estos casos los gráficos presentan una curvatura hacia arriba, cóncava hacia el eje y[1].

Los procesos de extinción de fluorescencia son ampliamente utilizados para el estudio de la unión de fármacos a macromoléculas (en especial, proteínas), como así también para inferir la localización y sitios de unión de IFAs en sistemas micelares[57,58] y membranas biológicas[1].

A fin de estimar la posición de la molécula del IFA en el entramado polimérico o en las micelas, se realizaron pruebas de extinción de fluorescencia empleando Acrilamida como extintor. Se obtuvieron las gráficas de Stern Volmer (Fig 2.28) y las constantes de extinción correspondientes, que se indican en Tabla 2.10.

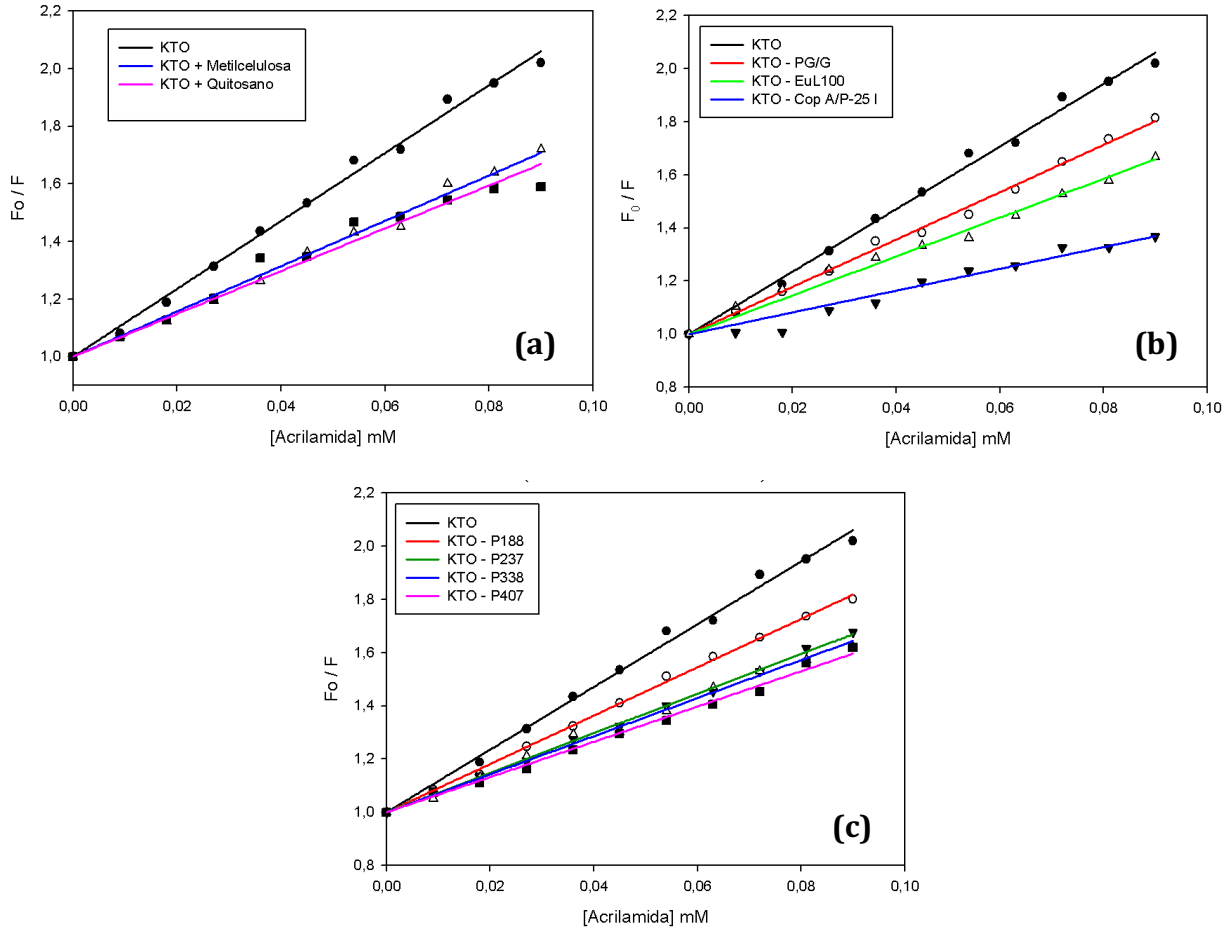



**Fig. 2.28. Gráficos Stern Volmer KTO y KTO con (a) polímeros polisacáridos; (b) polímeros acrílicos; (c) poloxámeros frente a concentraciones crecientes de acrilamida**

| | $K_{SV}$ ($mM^{-1}$) |
|---|---|
| **KTO** | 11,78 ± 0,3 |
| **KTO – P188** | 9,10 ± 0,13 |
| **KTO – PG/G** | 8,91 ± 0,2 |
| **KTO - MC** | 7,86 ± 0,24 |
| **KTO – P237** | 7,43 ± 0,1 |
| **KTO – EuL100** | 7,32 ± 0,3 |
| **KTO – P338** | 7,15 ± 0,2 |
| **KTO – P407** | 6,62 ± 0,18 |
| **KTO - QTO** | 6,42 ± 0,40 |
| **KTO – Cop A/P-25 I** | 4,10 ± 0,3 |

**Tabla 2.10. Constantes de Stern Volmer para KTO en solución buffer fosfatos pH 7,4 e incluido en las soluciones poliméricas en estudio frente al agregado de acrilamida**

Acrilamida (Fig 2.29.) es una molécula no iónica, hidrofílica, de carácter anfifílico. Si bien su molécula es demasiado pequeña para agregarse en forma micelar, puede incorporarse fácilmente en estructuras poliméricas donde existan grupos polares y no polares, especialmente a través del límite entre ambos. Si este proceso se produce en un sistema donde un fluoróforo esté incluido, puede conducir al contacto con el fluoróforo y, por lo tanto, inducir la extinción de fluorescencia. La presencia de agua favorece el proceso, dada su solubilidad en ella[59].

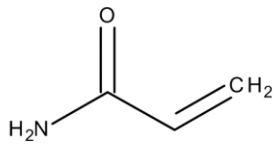



**Fig 2.29. Estructura química Acrilamida**

En todos los casos, se obtuvieron gráficas de Stern Volmer lineales, sugiriendo la existencia de una sola población de fluoróforos accesible a Acrilamida.

El mayor valor de $K_{SV}$ se obtuvo para KTO en ausencia de polímeros, lo cual indica un fácil acceso del extintor al fluoróforo (mayor eficiencia de extinción). Las diferencias observadas

en los valores de $K_{SV}$ en los sistemas KTO-polímero pueden proporcionar una aproximación de la localización dentro de la red o la micela; un fluoróforo localizado en la superficie estará más expuesto al extintor (con valores de $K_{SV}$ similares a KTO solo) que aquél que se sitúa en el interior y se encuentra protegido frente a la colisión con el extintor (Fig 2.30.).

**(a)** **(b)**

**Fig 2.30. Esquema de la accesibilidad del extintor en función de la ubicación del fluoróforo en la red polimérica (a) y en una micela polimérica (b)**

Si bien todos los polímeros, debido a sus menores valores de $K_{SV}$, evidenciaron un grado de inclusión dentro de sus estructuras, para QTO, Cop A/P-25 I y P407 se obtuvieron los menores valores de $K_{SV}$, lo cual sugiere una mayor inclusión dentro de los dominios más hidrófobos de las redes o de las micelas poliméricas.

### 2.5.4. ESTIMACIÓN DE LA POLARIDAD DEL MICROENTORNO DEL FLUORÓFORO EN LOS SISTEMAS POLIMÉRICOS EN ESTUDIO

Para estimar la polaridad del microambiente en torno al fluoróforo ante la presencia de los polímeros ensayados, se obtuvieron los valores de $\lambda_{máx}$ de KTO a la $C_{mín}$ de cada uno de los polímeros, y por interpolación y extrapolación en la Fig 2.13. se obtuvieron los valores de D en cada caso, que se muestran en Tabla 2.11.

| Polímero | $C_{min}$ (%p/v) | $\lambda_{máx}$ (nm) | D |
|---|---|---|---|
| **MC** | 0,04 | 380,5 | 81,4 |
| **QTO** | 0,01 | 382,0 | 87,2 |
| **Eu L100** | 0,02 | 385,0 | 97,0 |
| **PG/G** | 0,02 | 380,6 | 82,3 |
| **Cop A/P25I** | 0,01 | 380,0 | 80,2 |
| **P 188** | 8,85 | 379,5 | 78,5 |
| **P 237** | 3,75 | 378,8 | 76,2 |
| **P 338** | 6,43 | 379,5 | 78,4 |
| **P 407** | 3,25 | 379,0 | 76,3 |

**Tabla 2.11. Valores de $\lambda_{máx}$ KTO a las $C_{mín}$ obtenidas para cada polímero y las correspondientes D en torno al microentorno del fluoróforo**

Tomando como referencia el valor de D del agua (80,1) se observa que los cuatro poloxámeros en estudio disminuyeron dicho valor, evidenciando un microentorno menos polar. El resto de los polímeros no mostraron diferencias significativas, e incluso Eu L100 y QTO mostraron un aumento respecto al valor de referencia. Estas observaciones coinciden con lo ya analizado en cuanto a los valores de R de KTO.

### 2.5.5. ESTABILIDAD DE KTO SOLO E INCLUÍDO EN LOS MEDIOS POLIMÉRICOS EN ESTUDIO

En la Fig 2.31 se muestran las variaciones en la intensidad de emisión de fluorescencia de KTO incluidos en las soluciones poliméricas preparadas a las $C_{min}$ de cada uno de los polímeros.

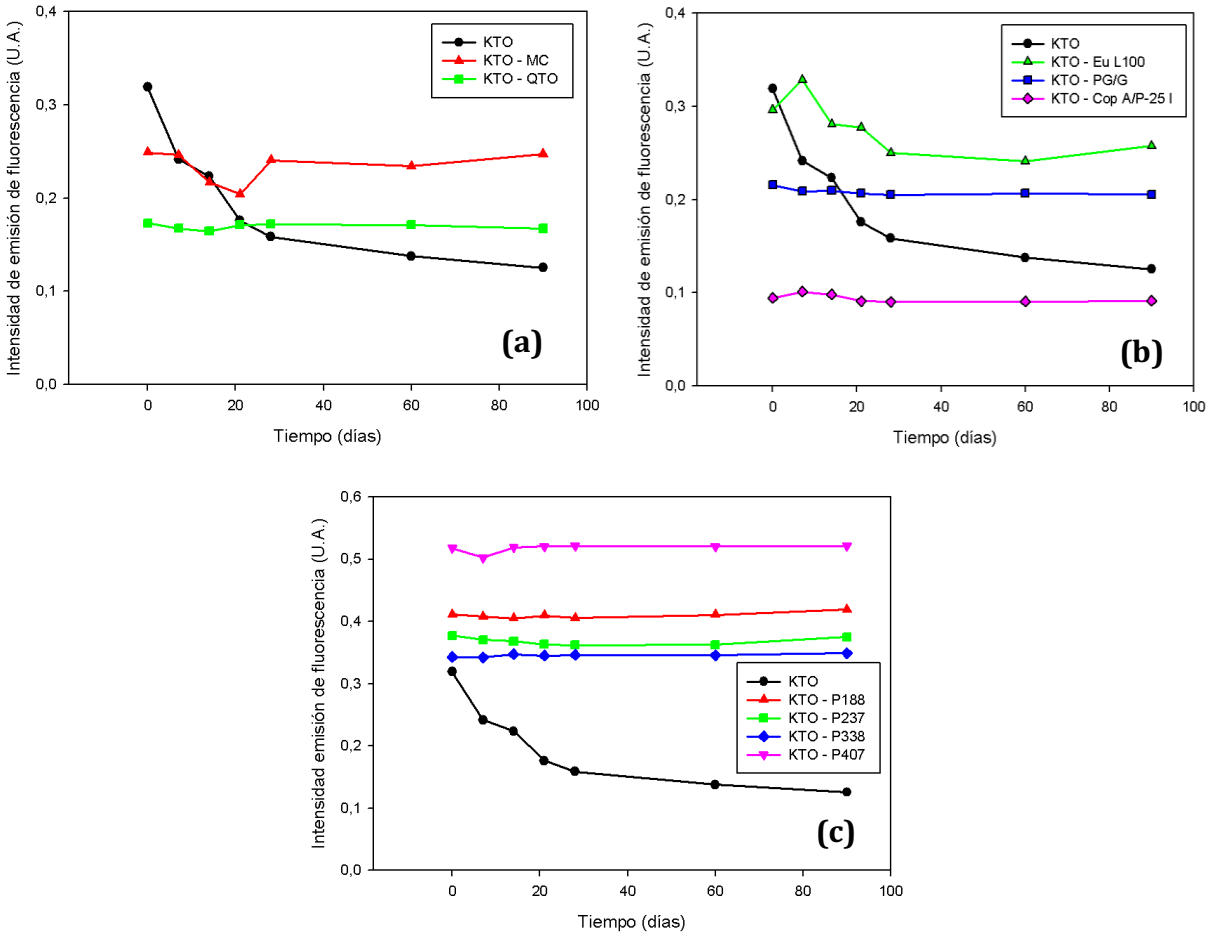



**Fig 2.31. Cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia de KTO y KTO en (a) polímeros polisacáridos, (b) polímeros acrílicos y (c) poloxámeros en función del tiempo y "cycling" de temperatura**

Estableciendo como criterio un % de cambio en la intensidad de emisión de fluorescencia de KTO del ±5%, se puede observar que QTO, PG/G, Cop A/P-25 I y todos los poloxámeros cumplieron con el mismo. Incluso en el caso de los poloxámeros, KTO fue más estable que en solución buffer fosfatos pH 7,4 durante todo el período de ensayo. Dado que la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración del IFA, se concluye que KTO incluido en los sistemas poliméricos mencionados permanece estable durante las condiciones y el período en estudio, según el criterio establecido.

# CAPÍTULO 2 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 2.6. GRISEOFULVINA

En solución acuosa tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 7,4 y a una $\lambda_{exc}$ = 303 nm GRI mostró un espectro de emisión de fluorescencia donde se distingue una banda de emisión a aproximadamente 443 nm. La emisión de fluorescencia de GRI se atribuye a la presencia de dobles enlaces conjugados del anillo bencénico que junto con el puente lactona y el doble enlace del anillo hexagonal hacen que la molécula presente una estructura altamente rígida, situación que favorece la desexcitación de la molécula por emisión de un fotón[60] (Fig 2.32.)

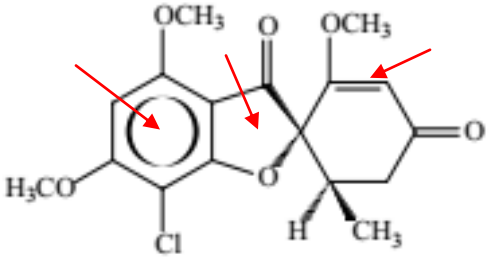
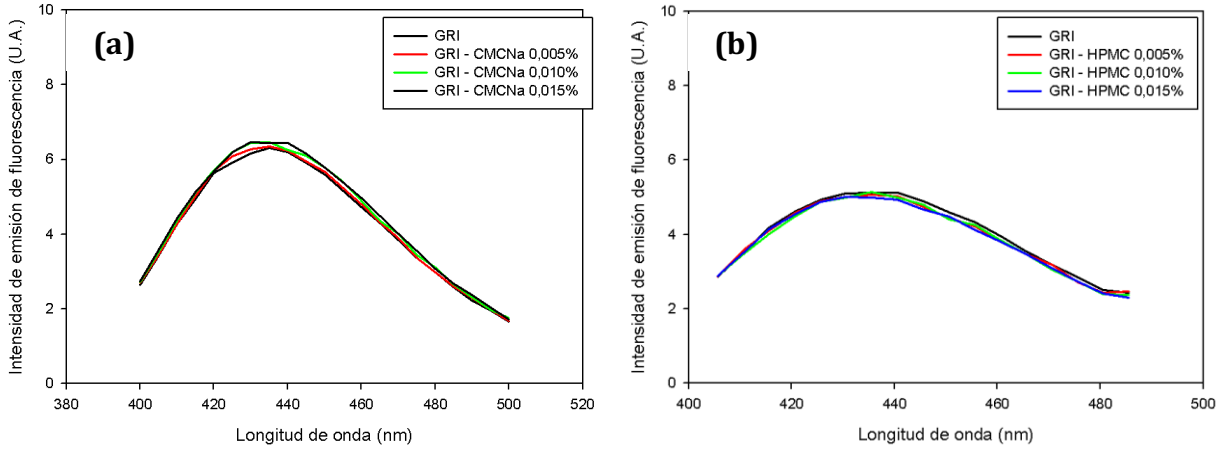



**Fig 2.32. Grupos de la molécula de GRI responsables de la emisión de fluorescencia**

### 2.6.1. EFECTO DE LOS POLÍMEROS EN ENSAYO SOBRE EL ESPECTRO DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA DE GRI

#### 2.6.1.1. DERIVADOS POLISACÁRIDOS



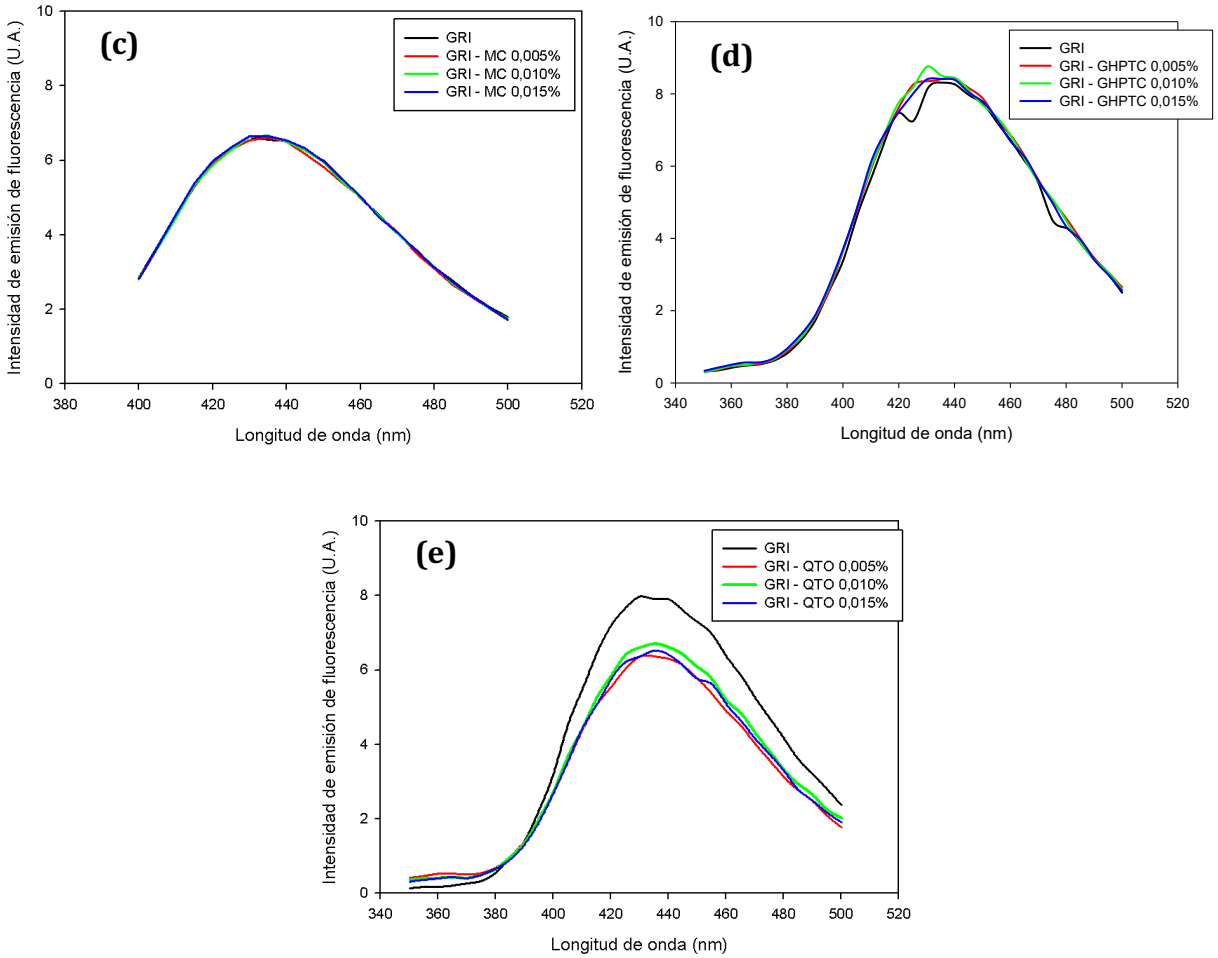



**Fig 2.33. Espectros emisión fluorescencia GRI en presencia de (a) CMC Na; (b) HPMC; (c) MC; (d) GHPTC; (e) QTO**

Las figuras 2.33. (a), (b), (c) y (d) muestran el efecto de los tres derivados celulósicos y GHPTC sobre el espectro de emisión de fluorescencia de GRI. En ninguno de los casos se observaron cambios significativos en la posición del máximo ni en las intensidades de emisión frente al agregado de cantidades crecientes de los polímeros ($p > 0,05$). Los resultados sugieren que no existe una interacción significativa entre estos polímeros y GRI.

En presencia de QTO (Fig 2.33.(e)) se produjo un desplazamiento significativo hacia mayores longitudes de onda (430 a 435 y 433nm) ($p < 0,05$) ante 0,005% y 0,01% del polímero, evidenciando un microambiente más polar en torno a la molécula de GRI. Mayores concentraciones no produjeron cambios significativos. Con respecto a la

intensidad de emisión se produjo una disminución significativa en presencia de 0,005% de QTO ($p < 0,005$); mayores concentraciones no produjeron cambios significativos.

GRI contiene dos grupos cetona, cuatro átomos de oxígeno unidos por enlaces éter y un anillo aromático, cada uno de los cuales puede aceptar protones para formar enlaces de hidrógeno. Estas transiciones son del tipo π - π * y sugieren que moléculas dadoras de protones pueden formar complejos con el par de electrones de los átomos de oxígeno unidos por enlace éter y / o el átomo de oxígeno del carbonilo, provocando cambios ligeros hacia el rojo en el espectro de GRI y disminución de la intensidad de emisión, lo cual es coincidente con lo observado en el análisis del espectro de emisión en presencia de QTO, que presenta numerosos sitios dadores de protones, como los grupos hidroxilo y amino no acetilados[61-63].

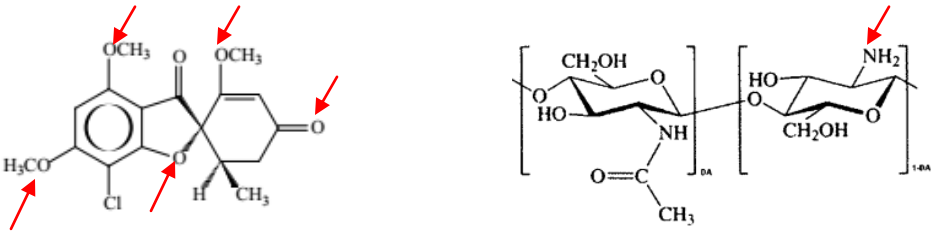
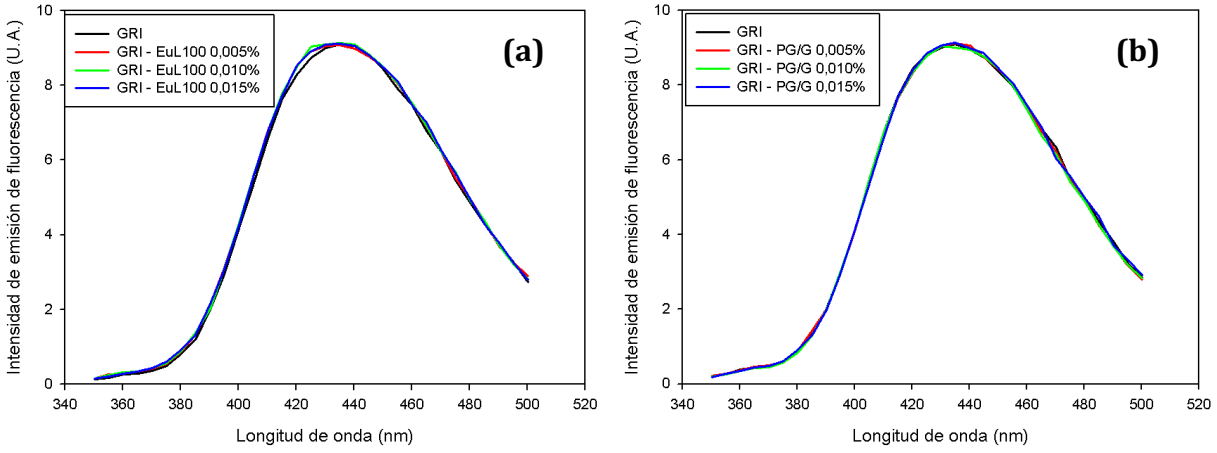



**Fig 2.34. Posibles sitios de interacción entre las moléculas de GRI y QTO**

### 2.6.1.2. DERIVADOS ACRÍLICOS



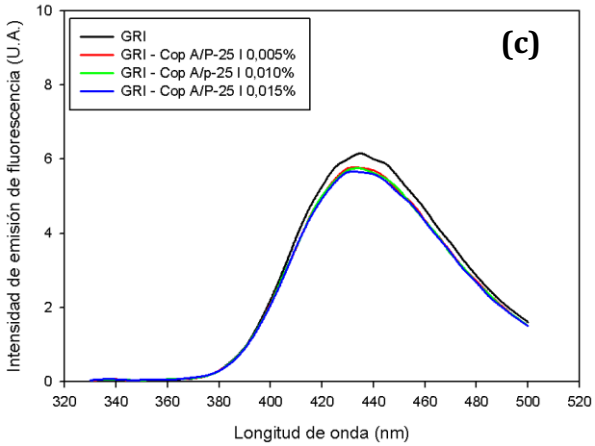



**Fig 2.35. Espectros emisión fluorescencia GRI en presencia de (a) EuL100; (b) PG/G; (c) Cop A/P-25 I**

En la Fig 2.35 se muestran los espectros de emisión de GRI en presencia de los polímeros acrílicos en estudio. Ninguno de los derivados produjo modificaciones significativas ($p > 0,05$) en las posiciones de las bandas de emisión, lo que sugiere no se produjeron cambios en la polaridad del medio en torno a la molécula de GRI debido a la presencia de estos polímeros.

Con respecto a las intensidades de emisión, Eu L100 y PG/G indujeron ligeros aumentos no significativos; Cop A/P-25 I produjo una disminución significativa a concentración igual a 0,005%, sin cambios significativos frente a mayores concentraciones.

La disminución de intensidad de emisión de fluorescencia puede explicarse, al igual que lo planteando con QTO, por la formación de complejos no fluorescentes. La interacción podría darse a nivel de alguno de los grupos aceptores de protones de GRI y el grupo hidroxilo libre de Cop A/P-25 I (Fig 2.36).

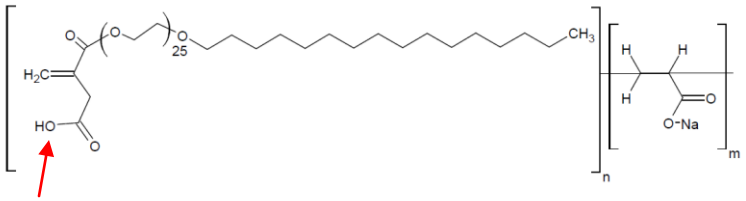



**Fig 2.36. Posibles sitios de interacción de la molécula de Cop A/P-25 I con GRI**

### 2.6.1.3. POLOXÁMEROS

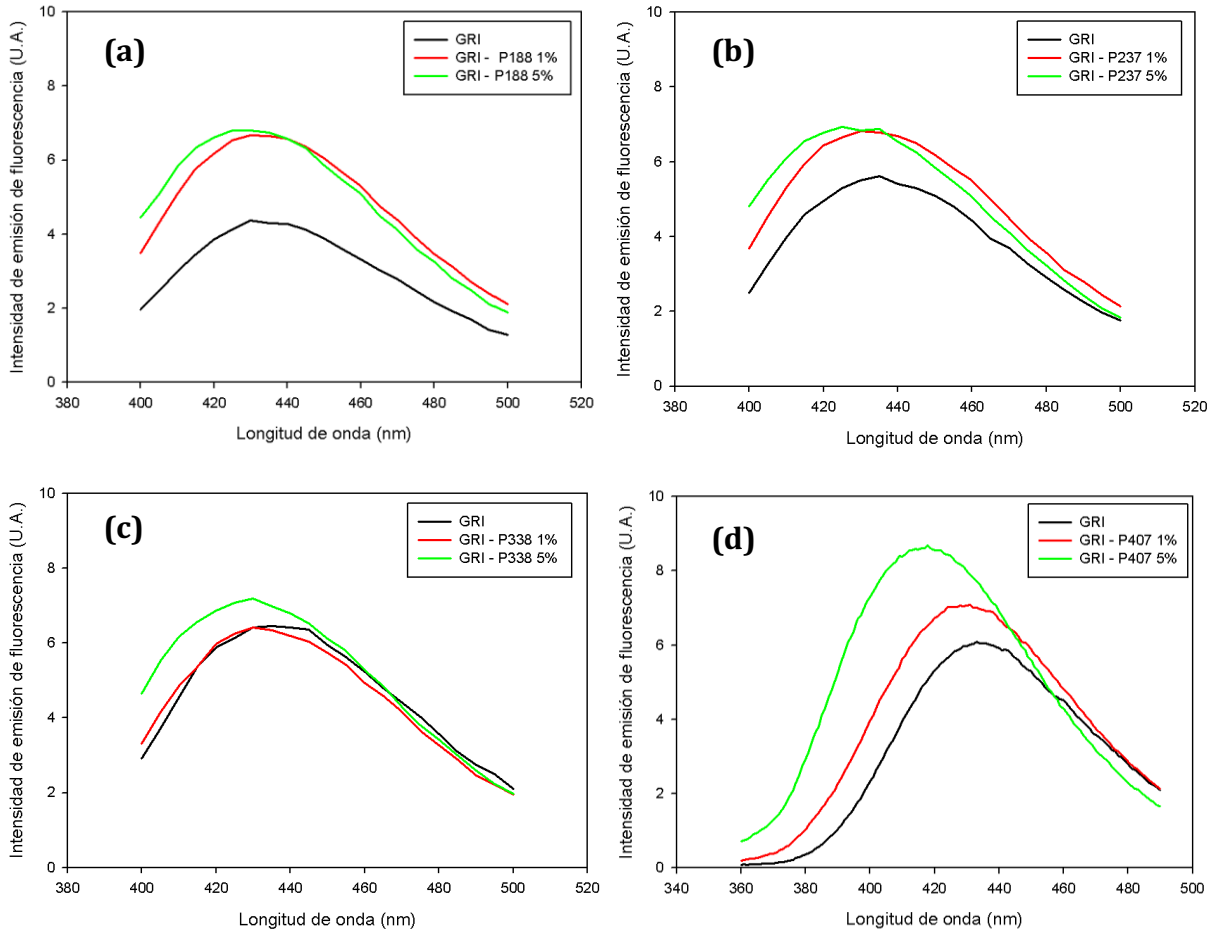



**Fig 2.37. Espectros de intensidad de emisión de fluorescencia GRI en presencia de (a) Poloxámero 188; (b) Poloxámero 237; (c) Poloxámero 338; (d) Poloxámero 407**

GRI mostró cambios significativos en la posición del máximo de emisión en presencia de P188, P237 y P407, con desplazamiento hacia longitudes de onda más bajas (menor polaridad en el microambiente del fluoróforo), no así en presencia de P338.

Todos los poloxámeros indujeron aumentos en la intensidad de emisión de fluorescencia de GRI, dependientes de la concentración. P188, P237 y P407 produjeron aumentos significativos frente a ambas concentraciones empleadas, mientras que P338 sólo produjo un aumento significativo con un 5% de concentración.

Similarmente a lo expuesto en el apartado de KTO, el desplazamiento en el máximo de emisión hacia menores longitudes de onda se explica por el microambiente menos polar en torno al fluoróforo proporcionado por el medio micelar; el aumento en la intensidad de

emisión de fluorescencia se atribuye a la mayor inmovilidad de las moléculas del IFA incluido en la fase micelar y la mayor protección proporcionada por la misma a los procesos de desactivación no radiante y la presencia de oxígeno en el medio acuoso, que puede actuar como extintor.

El menor grado de interacción entre GRI y P338 respecto a los demás poloxámeros en estudio podría explicarse en función de la mayor longitud de los bloques hidrofílicos de P338 (mayor espesor de corona micelar), que podría dificultar la interacción de la molécula de GRI con el bloque hidrofóbico del polímero.

### 2.6.2. TITULACIÓN ESPECTROFLUOROMÉTRICA Y DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE ASOCIACIÓN GRI – POLÍMEROS EN ESTUDIO

#### 2.6.2.1. DERIVADOS POLISACÁRIDOS

La titulación espectrofluorométrica de GRI con concentraciones crecientes de QTO (único polímero polisacárido que evidenció cambios significativos en el espectro de emisión de GRI) produjo una disminución progresiva en su intensidad de emisión de fluorescencia, en concordancia con el análisis espectral. En la figura 2.38. se representa el –ΔF de GRI vs concentraciones crecientes de QTO:

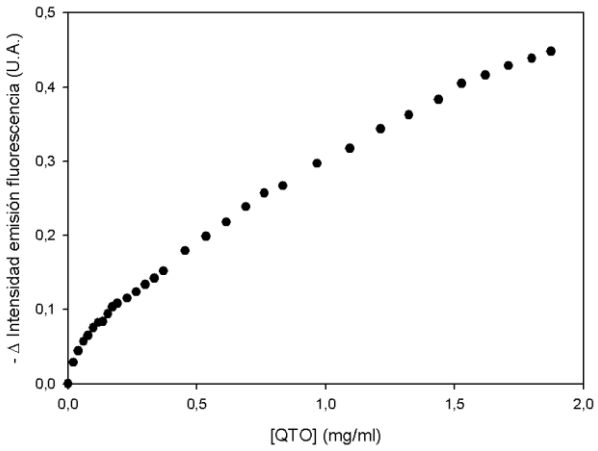



**Fig 2.38. –ΔF GRI en presencia de concentraciones crecientes de QTO**

En la Fig 2.39. se muestra la gráfica del porcentaje de disminución de intensidad de emisión de fluorescencia de GRI calculado según la ecuación 2.1. en función de concentraciones crecientes de QTO, que fue ajustada según la ecuación 2.2. Se obtuvo una curva con perfil

hiperbólico. La flecha señala el valor de $C_{mín}$ estimado, que se obtuvo a partir de la intersección entre la pendiente a la curva y el máximo % de cambio de fluorescencia (indicado por la línea punteada horizontal superior) calculado según el programa estadístico.

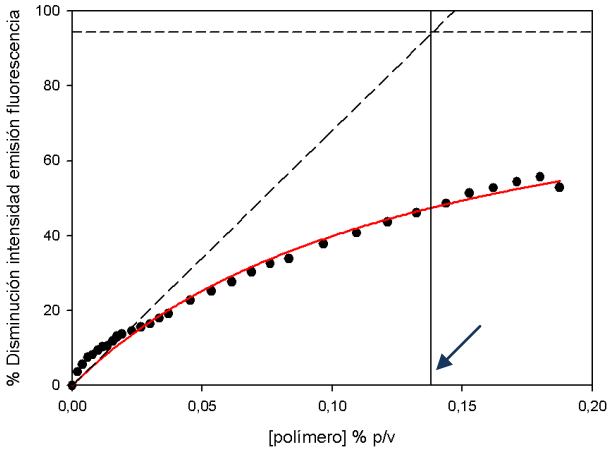



**Fig 2.39. Porcentaje de disminución de intensidad de emisión de fluorescencia de GRI en presencia de cantidades crecientes de QTO.**

En tabla 2.12. se muestran los valores de concentración de polímero mínima ($C_{mín}$), relación mínima de peso polímero-KTO (P/F), porcentaje máximo de disminución de fluorescencia ($\Delta F_{máx}$) y Ka (constante aparente de asociación) para los procesos de asociación GRI-QTO.

| | $C_{mín}$ (%p/v) | P/F (p/p) | $\Delta F_{máx}$(%) | $K_a$ $(mg/ml)^{-1}$ |
|---|---|---|---|---|
| **GRI-QTO** | 0,14 ± 0,002 | 5,15 | 94,33 | 0,73 ± 0,12 |

**Tabla 2.12. Parámetros del proceso de asociación GRI - QTO calculados según el modelo no lineal de unión de ligandos**

### 2.6.2.2. DERIVADOS ACRÍLICOS

La titulación espectrofluorométrica de GRI con concentraciones crecientes de Cop A/P-25 I (único polímero acrílico que evidenció cambios significativos en el espectro de emisión de GRI) produjo una disminución progresiva en su intensidad de emisión de fluorescencia, en

concordancia con el análisis espectral. En la figura 2.40 se representa el –ΔF vs concentración del polímero:

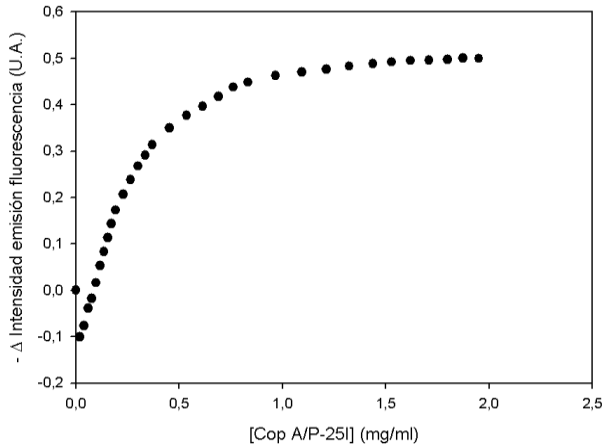



**Fig 2.40. -ΔF GRI en presencia de concentraciones crecientes de Cop A/P-25 I**

En la Fig 2.41. se muestra la gráfica del porcentaje de disminución de intensidad de emisión de fluorescencia de GRI, calculada según la ecuación 2.1., en función de concentraciones crecientes de Cop A/P-25 I. El ajuste según la ecuación 2.2. mostró una curva con perfil hiperbólico. La flecha señala el valor de $C_{mín}$ estimado, calculado según lo explicado en otros apartados.

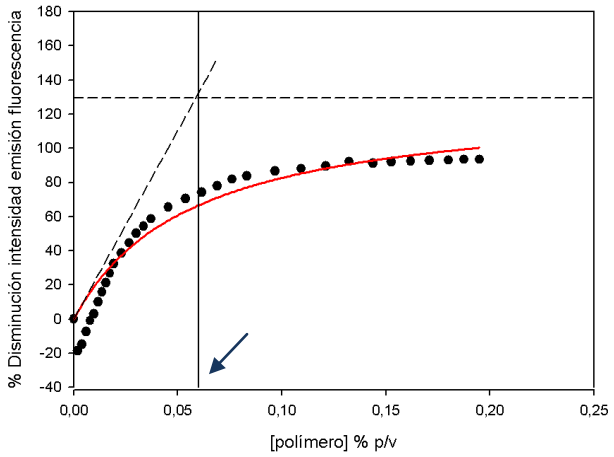



**Fig 2.41. Porcentaje de disminución de intensidad de emisión de fluorescencia de GRI en presencia de cantidades crecientes de Cop A/P-25 I.**

En la Tabla 2.13. se muestran los valores de concentración de polímero mínima ($C_{mín}$), relación mínima de peso polímero-KTO (P/F), porcentaje máximo de disminución de

fluorescencia ($\Delta F_{máx}$%) y Ka (constante aparente de asociación) para los procesos de asociación GRI-Cop A/P-25 I.

| | $C_{mín}$ (%p/v) | P/F (p/p) | $\Delta F_{máx}$ (%) | $K_a$ $(mg/ml)^{-1}$ |
|---|---|---|---|---|
| **GRI-CopA/P-25 I** | 0,06 | 6,25 | 129,37 ± 8,9 | 1,77 ± 0,1 |

**Tabla 2.13. Parámetros del proceso de asociación GRI – Cop A/P-25 I calculados según el modelo no lineal de unión de ligandos**

### 2.6.2.3. POLOXÁMEROS

Si bien el análisis de los espectros de emisión de GRI frente a diferentes concentraciones de poloxámeros indica la presencia de interacciones entre estos polímeros y el IFA, en esta etapa no fue posible obtener datos a fin de modelar la variación de emisión de fluorescencia según los métodos establecidos en este trabajo de tesis.

La capacidad del núcleo micelar para encapsular un IFA depende en gran medida de la compatibilidad entre el núcleo hidrófobo y la molécula del IFA. Generalmente, una buena indicación de compatibilidad es la similitud estructural entre la molécula del fármaco y la parte hidrofóbica o la cadena lateral hidrofóbica del polímero anfifílico que forma el núcleo[64]. Siendo GRI un compuesto poco polar, pero de naturaleza aromática, puede suponerse una baja compatibilidad con el núcleo de las micelas de poloxámeros, formado por cadenas lineales de polioxipropileno. Estudios previos demostraron una pobre capacidad de solubilización de GRI en los poloxámeros ensayados[65,66]. Por otro lado, también se ha sugerido que la longitud de las cadenas hidrofílicas de poli(oxietileno) presentes en los poloxámeros ejercen una mayor protección sobre el núcleo de la micela polimérica, dificultando el acceso de GRI al núcleo hidrofóbico[67].

## 2.6.3. EXTINCIÓN DE FLUORESCENCIA GRI EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE LOS POLÍMEROS POR AGREGADO DE ACRILAMIDA

Frente al agregado de concentraciones crecientes del extintor (Acrilamida), los gráficos de Stern Volmer para GRI en solución buffer fosfatos pH 7,4 y en soluciones de QTO y Cop A/P-

25 I a la $C_{mín}$ mostraron una gráfica lineal, indicando la existencia de una sola población de fluoróforos, todos igualmente accesibles al extintor (Fig 2.42)

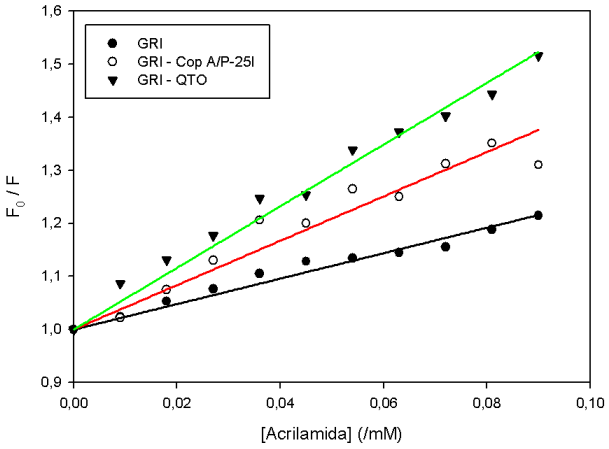



**Fig 2.42. Gráficos de extinción de fluorescencia GRI en ausencia y en presencia de QTO y Cop A/P-25 I por agregado de Acrilamida**

En la Tabla 2.14. se muestran los valores de $K_{SV}$ obtenidas:

| | $K_{SV}$ (mM)-1 |
|---|---|
| **GRI** | 2,53 ± 0,12 |
| **GRI - QTO** | 5,81 ± 0,26 |
| **GRI – Cop A/P-25 I** | 4,00 ± 0,15 |

**Tabla 2.14. Constantes de Stern Volmer GRI, GRI en presencia de QTO y GRI en presencia de Cop A/P-25 I.**

En ambos casos, la pendiente ($K_{SV}$) de las rectas obtenidas en la presencia de QTO y Cop A/P-25 I fue mayor, evidenciando que en presencia de los polímeros, la molécula de GRI está más expuesta al ataque del agente extintor que en su ausencia. Se ha informado que en el caso de algunas moléculas, pueden producirse cambios conformacionales del grupo fluoróforo al unirse con algunos sustratos, que cambian las condiciones de accesibilidad, obteniéndose gráficos similares a los obtenidos en este caso, lo que no implicaría la no inclusión de la molécula de GRI en el entramado polimérico[1].

### 2.6.4. ESTIMACIÓN DE LA POLARIDAD DEL MICROENTORNO DEL FLUORÓFORO EN LOS SISTEMAS POLIMÉRICOS EN ESTUDIO

A partir de los espectros de emisión de GRI incluido en mezclas hidroalcohólicas de distinta D, se obtuvieron los valores de $\lambda_{máx}$ para cada uno de los sistemas. Como se observa en la figura 2.43. existe una fuerte dependencia lineal entre $\lambda_{máx}$ y la D del medio.

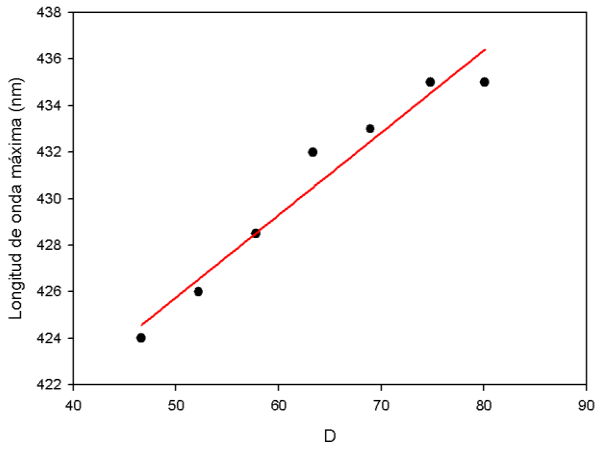



**Fig 2.43. Longitud de onda máxima de emisión de GRI en función de la constante dieléctrica del medio**

Para estimar la polaridad del microambiente en torno al fluoróforo ante la presencia de los polímeros ensayados, se obtuvieron los valores *de* $\lambda_{máx}$ de GRI a la $C_{mín}$ de cada uno de los polímeros, y por interpolación y extrapolación en la figura anterior se obtuvieron los valores de D en cada caso, que se muestran en Tabla 2.15. Estos resultados son coincidentes con las observaciones realizadas en los análisis espectrales.

| Polímero | Cmín (%p/v) | $\lambda_{máx}$ (nm) | D |
|---|---|---|---|
| **QTO** | 0,14 | 438 | 84,60 |
| **Cop A/P-25 I** | 0,06 | 436 | 78,94 |

**Tabla 2.15. Valores de constante dieléctrica del medio en presencia de QTO y de Cop A/P-25 I estimados en función de la longitud máxima de emisión de GRI en dichos medios**

### 2.6.5. ESTABILIDAD DE GRI SOLO E INCLUÍDO EN LOS MEDIOS POLIMÉRICOS EN ESTUDIO

En las figuras 2.44 (a) y (b) se muestran las variaciones en la intensidad de emisión de fluorescencia de GRI en buffer fosfatos pH 7,4 y en presencia de las $C_{min}$ de QTO y Cop A/P-25 I.

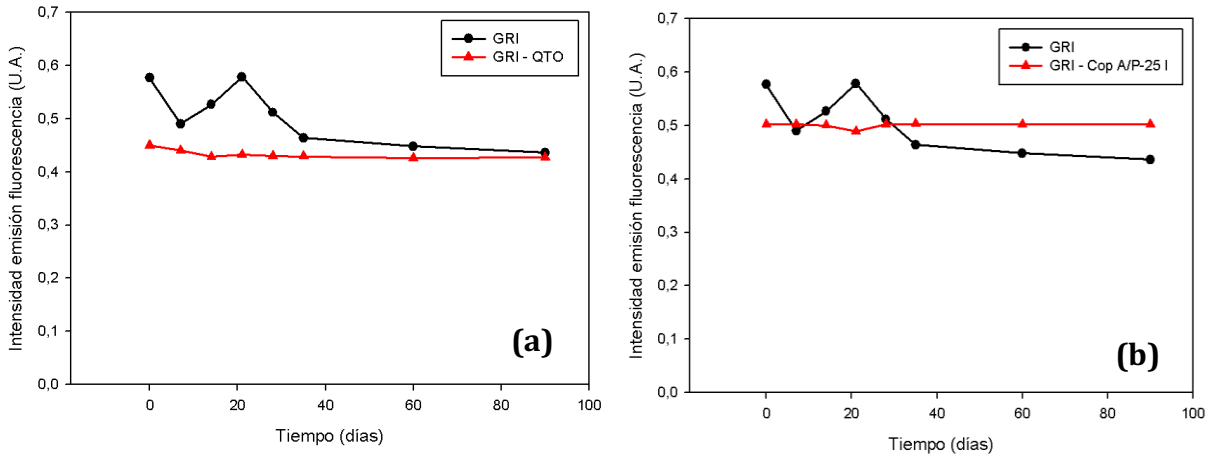



**Fig 2.44. Cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia de GRI en ausencia y presencia de QTO (a) y Cop A/P-25 I (b) en función del tiempo y "cycling" de temperatura**

Estableciendo como criterio un % de cambio en la intensidad de emisión de fluorescencia del ±5%, podemos observar que en ambos sistemas poliméricos los valores de intensidad de fluorescencia de GRI permanecieron dentro del rango establecido, proporcionando mejor estabilidad que GRI en solución buffer fosfatos pH 7,4. Dado que la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración del IFA, se concluye que GRI incluida en los sistemas poliméricos mencionados permanece estable durante las condiciones y el período en estudio.

# CAPÍTULO 2 - CONCLUSIONES

En este capítulo se analizaron las posibles interacciones entre los IFAs modelo y los polímeros en estudio, empleando espectrofluorometría como metodología instrumental.

⇒ KTO en solución acuosa mostró dos bandas de emisión, a aproximadamente 364 (I1) y 382 nm (I2). La banda I2 mostró cambios significativos en posición y/o en intensidad de emisión en función de la polaridad del medio, no así la banda I1. La relación R=I1/I2 se empleó como criterio para estimar el cambio de polaridad en torno al fluoróforo ante el agregado de los polímeros en ensayo.

⇒ CMCNa, GHTPC y HPMC no indujeron cambios significativos en el espectro de fluorescencia de KTO. MC indujo cambios tanto en la intensidad de emisión como en la posición de banda 2, que no resultaron proporcionales a las concentraciones de polímeros presentes. QTO produjo un ligero desplazamiento en la posición de la banda 2 y disminución significativa en la intensidad de fluorescencia de ambas bandas en función de la concentración de QTO, cambios podrían deberse a la formación de complejos no fluorescentes entre KTO y QTO. Los valores de R no evidenciaron cambios significativos en la polaridad del microentorno del fluoróforo en presencia de ninguno de los polímeros polisacáridos.

⇒ Los polímeros acrílicos en estudio no produjeron cambios significativos en la posición de las bandas I1 e I2, pero sí en la intensidad de emisión, la cual disminuyó en todos los casos, posiblemente por la formación de complejos no fluorescentes entre KTO y estos polímeros. Los valores de R no presentaron modificaciones significativas en presencia de concentraciones crecientes de los polímeros, sugiriendo que no existen cambios en la polaridad del medio.

⇒ Todos los poloxámeros ensayados produjeron cambios significativos en el espectro de emisión de KTO, tanto en la posición de las bandas como en la intensidad de emisión. El desplazamiento de las bandas hacia la región del azul evidencia una disminución en la polaridad del medio, en coincidencia con los valores de R obtenidos. El aumento en las intensidades de emisión puede explicarse por la inclusión de KTO en las micelas poliméricas formadas.

# CAPÍTULO 2 - CONCLUSIONES

⇒ La titulación espectrofluorométrica en KTO en presencia de concentraciones crecientes de los polímeros que evidenciaron interacciones arrojó curvas con un perfil hiperbólico, que se analizaron según un modelo de regresión no lineal de unión de ligandos. Se determinaron los valores de Cmin, CMC, ΔF% y $K_a$. QTO, Cop A/P-25I y P407 mostraron la mejor capacidad de incorporación del IFA en función de esas tres variables.

⇒ El análisis de los procesos de extinción de fluorescencia de KTO incluido en los polímeros en ensayo evidenció una mayor inclusión del IFA en los dominios hidrofóbicos de las soluciones poliméricas en el caso de QTO, Cop A/P-25I y P407.

⇒ Según el análisis de estabilidad de KTO en los sistemas poliméricos, seguida por espectrofluorometría, KTO permaneció estable en los sistemas en estudio durante el tiempo establecido.

⇒ En solución acuosa tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 7,4 y a una $\lambda_{exc}$ 303 nm GRI mostró un espectro de emisión de fluorescencia donde se distingue una banda de emisión a aproximadamente 443 nm.

⇒ De los polímeros polisacáridos, sólo QTO indujo cambios significativos en el espectro de emisión de GRI, modificando el máximo de emisión hacia mayores longitudes de onda y disminuyendo la intensidad de emisión, probablemente por la formación de complejos no fluorescentes.

⇒ Los polímeros acrílicos no produjeron cambios en la posición del máximo de emisión. Sólo Cop A/P-25 I produjo un cambio significativo en la intensidad de emisión, cuya disminución se atribuye a la formación de complejos no fluorescentes con GRI.

⇒ P188, P237 y P407 produjeron cambios significativos en la posición del máximo de emisión, desplazándolo hacia el azul, lo cual se relaciona con una disminución de la polaridad del entorno del fluoróforo. Todos los poloxámeros aumentaron significativamente la intensidad de emisión, siendo este efecto más marcado en el caso de P407.

⇒ La titulación espectrofluorométrica de GRI con QTO y con Cop A/P-25 I proporcionaron gráficas con un perfil hiperbólico, que se analizaron según un

modelo de regresión no lineal de unión de ligandos, calculándose Cmin, AF% y Ka. En el caso de los poloxámeros no fue posible obtener datos que permitieran realizar su análisis.

⇒ Los valores de KSV obtenidos por extinción de fluorescencia con acrilamida en presencia de QTO y Cop A/P-25 I fueron mayores que en ausencia de los polímeros, lo que no se asocia a la no inclusión de GRI en el entramado polimérico.

⇒ En el análisis de estabilidad de GRI en los sistemas poliméricos, seguida por espectrofluorometría, el IFA permaneció estable en los sistemas ensayados durante el tiempo establecido.

Por lo anteriormente expuesto, se continuó el desarrollo de la presente tesis para KTO utilizando los polímeros QTO, Cop A/P-25 I y P407, mientras que para GRI se utilizaron QTO y Cop A/P-25 I.

# CAPÍTULO 2 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1-Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3º Ed. Singapur: Springer Science+Business Media, LLC. 2006.

2-van de Weert M, Stella L. Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology. J. Mol. Struct. 2011; 998:144–150.

3-Young RJ, Lovell PA. Concepts and Nomenclature. En Young RJ, Lovel PA (autores). Introduction to Polymers. 3º ed. Boca Ratón (EEUU): CRC Press, Taylor & Francis Group; 2011. p. 3-14.

4-Martin A. Pharmaceutical Polymers. En Sinko PJ, Singh Y (eds). Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 6º ed. China; Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 492-515.

5-Valenta C, Auner BG. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. Eur J Pharm. Biopharm. 2004; 58: 279-289.

6-Villanova JCO, Oréfice RL, Cunha AS. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. Polímeros: Ciência e Tecnologia. 2010; 20(1): 51-64.

7-Francis MF, Piredda M, Winnik FM. Solubilization of poorly water soluble drugs in micelles of hydrophobically modified hydroxypropylcellulose copolymers. J. Control. Release. 2003. 93: 59– 68.

8-Loftsson T, Fridriksdóttir H, Gudmundsdóttir T. The effect of water soluble polymers on aqueous solubility of drugs. Int J. Pharm. 1996; 127:293-296.

9-Lin Y, Paschalis A. Physicochemical aspects of drug delivery and release from polymer-based colloids. Curr. Opin.Colloid Interface Sci. 2000; 5:132-143.

10-Kulkarni Vishakha S, Butte Kishor D, Rathod Sudha S. Natural Polymers – A Comprehensive Review. Int. J. Pharm. Biomed. Res. 2012; 3(4):1597 – 1613.

11-Gaucher G, Dufresne MH, Sant VP, Kang N, Maysinger D, Leroux JC. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. J. Control. Release. 2005; 109:169-188.

12-Chiappetta DA, Degrossi J, Teves S, D'Aquino M, Bregni C, Sosnik A.. Triclosan-loaded poloxamine micelles for enhanced topical antibacterial activity against biofilm. Eur J. Pharm. Biopharm. 2008; 69: 535–545.

13-Oh KT, Bronich TK, Kabanov AV. Micellar formulations for drug delivery based on mixtures of hydrophobic and hydrophilic Pluronic® block copolymers. J. Control. Release. 2004; 94: 411– 422.

14-Alvarez Lorenzo C, González López J, Fernández Tarrió M, Sandez Macho I, Concheiro A. Tetronic micellization, gelation and drug solubilization: Influence of pH and ionic strength. Eur J. Pharm. Biopharm. 2007; 66: 244-252.

15-Pasquali RC, Chiappetta DA, Bregni C. Los Copolímeros en Bloques Anfifílicos y sus Aplicaciones Farmacéuticas. Acta Farm. Bonaerense. 2005;24 (4):610-618.

16-Rowe RC, Sheskey PJ, Queen ME (eds). Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6º ed. Londres-Chicago: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association; 2009.

17-Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. Prog. Polym. Sci. 2011; 36: 981–1014.

18-Shariatinia Z. Pharmaceutical applications of chitosan. Adv. Colloid Interface Sci. 2019; 263: 131–194.

19-Özcan I, Abacı O, Haliki Uztan A, Aksu B, Boyacıoğlu H, Güneri T et al. Enhanced Topical Delivery of Terbinafine Hydrochloride with Chitosan Hydrogels. AAPS PharmSciTech. 2009; 10(3):1024-1031.

20-Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. Int. J. Food Microbiol. 2010; 144: 51–63.

21-Muxika A, Etxabide A, Uranga J, Guerrero P, de la Caba K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. Int. J. Biol. Macromol. 2017; 105: 1358–1368.

22-Evonik Industries AG. Pharma Polymers & Services. Technical Information. Eudragit L100® and Eudragit S100®. Germany; 2012.

23-Goto S, Kawata M, Suzuki T, Kim N-S, Ito C.. Preparation and Evaluation of Eudragit Gels. I: Eudragit Organogels Containing Drugs as Rectal Sustained-Release Preparations. J. Pharm. Sci. 1991; 80(10): 958-961.

24-Cosmetic Ingredient Review (CIR) Expert Panel. Final Report on the Safety Assessment of Acrylates Copolymer and 33 Related Cosmetic Ingredients. Washington DC; 2002.

25-Chudzikowski RJ. Guar gum and its applications. J. Soc. Cosmet. Chem. 1971; 22:43-60.

26-Fevola MJ. Guar Hydroxypropyltrimonium Chloride. En Cosmetics & Toiletries [sede web]. Carol Stream (USA). 2013 [acceso 18/12/2018]. Formulating; Sensory [1 pantalla]. Disponible en:
www.cosmeticsandtoiletries.com/formulating/function/feelenhancer/premium-Guar-Hydroxypropyltrimonium-Chloride-199604791.html

27-Wilbur J, Heldreth B, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD et al. Safety Assessment of Galactomannans as Used in Cosmetics. Int. J. Toxicol. 2015; 34(Supplement 1): 35S-65S.

28-Cosmetic Ingredient Review (CIR)Expert Panel. Final Report: On the Safety Assessment of Galactomannans As Used in Cosmetics. Washington DC; 2012.

29-3V Sigma S.P.A. División Cosmética. Informe técnico. Polygel W30®. Bérgamo (Italia); Edición 1/1.

30-Roig Farma S.A.U. Grupo Fagron. Ficha técnica. Hyspagel® 200. Barcelona (España); 2006. Versión 2.

31-Guinama. Ficha técnica. Hyspagel® 200. Ficha técnica. Valencia (España); 2014. Versión 1.

32-Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. J. Control. Release. 2002; 82:189–212.

33-BASF The Chemical Company. Technical Bulletin. Pluronic Block Copolymer NF Grades (Poloxamer NF Grades). New Jersey (EEUU); 2004.

34-Barbero N, Barni E, Barolo C, Quagliotto P, Viscardi G, Napione L, Pavan S et al. A study of the interaction between fluorescein sodium salt and bovine serum albumin by steady-state fluorescence. Dyes Pigm. 2009; 80:307–313.

35-Priotti J, Leonardi D, Pico G, LamasMC. Application of Fluorescence Emission for Characterization of Albendazole and Ricobendazole Micellar Systems: Elucidation of the Molecular Mechanism of Drug Solubilization Process. AAPS PharmSciTech. 2017; 19(3):1152-1159.

36-Kabanov AV, Nazarova IR, Astafieva IV, Batrakova EV, Alakhov VY, Yaroslavov AA et al. Micelle Formation and Solubilization of Fluorescent Probes in Poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) Solutions. Macromolecules. 1995;28: 2303-2314.

# CAPÍTULO 2 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

37-Naveenraj S, Anandan S. Binding of serum albumins with bioactive substances – Nanoparticles to drugs. J. Photochem. Photobiol. C. Photochem. Rev. 2013; 14: 53–71.

38-Starosta R, de Almeida RFM. Luminescence properties of the antifungal agent ketoconazole and its diphenylphosphane derivatives. J. Lumin. 2020; 220: 116956.

39-Tian M, Wang C, Wang L, Luo K, Zhao A, Guo C. Study on the synthesis and structure–effect relationship of multi-aryl imidazoles with their fluorescence properties. Luminescence. 2014; 29: 540–548.

40-Selvam S. A fluorescence parameter based analysis on the solubilization of carvedilol by bile salt media. J. Photochem. Photobiol. B. Biol. 2012; 116: 105–113.

41-Uchiyama H, Tozuka Y, Asamoto F, Takeuchi H. Fluorescence investigation of a specific structure formed by aggregation of transglycosylated stevias: Solubilizing effect of poorly water-soluble drugs. Eur. J. Pharm. Sci. 2011; 43:71–77.

43-Calafato NR, Picó G. Griseofulvin and ketoconazole solubilization by bile salts studied using fluorescence spectroscopy. Colloids Surf. B. 2006; 47:198–204.

44-Edwards F, Tsakmaka C, Mohr S, Fielden PR, Goddard NJ, Booth J et al.Using droplet-based microfluidic technology to study the precipitation of a poorly water-soluble weakly basic drug upon a pH-shift. Analyst. 2013; 138:339-345.

45-Turhan KN, Sahbaz F, Güner A. A Spectrophotometric Study of Hydrogen Bonding in Methylcellulose-based Edible Films Plasticized by Polyethylene Glycol. Journal of Food Science. 2001; 66(1):59-62.

46-Ullrich A, Schiffter HA. The influence of polymer excipients on the dissolution and recrystallization behavior of ketoconazole: Application, variation and practical aspects of a pH shift method. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2018; 133:20–30.

47-Ghazal HS, Dyas AM, Ford JL, Hutcheon GA. The impact of food components on the intrinsic dissolution rate of ketoconazole. Drug Dev. Ind. Pharm. 2015; 41(10):1647-1654.

48-Pillai CKS, Paul W, Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. Prog. Polym. Sci. 2009; 34: 641–678.

49-Mistry P, Mohapatra S, Gopinath T, Vogt FG, Suryanarayanan R. Role of the Strength of Drug-Polymer Interactions on the Molecular Mobility and Crystallization Inhibition in Ketoconazole Solid Dispersions. Mol. Pharm. 201; 12: 3339-3350.

50-Sotoudegana F, Aminib M , Faizic M, Aboofazeli R. Nimodipine-Loaded Pluronic® Block Copolymer Micelles: Preparation, Characterization, In-vitro and In-vivo Studies. Iran. J. Pharm. Res. 2016; 15 (4): 641-661.

51-Lee K, Shin S-C,Oh I. Fluorescence Spectroscopy Studies on Micellization of Poloxamer 407 Solution. Arch. Pharm. Res. 2003; 26(8): 653-658.

52-Jalali F, Afshoon A, Shamsipur M. Micellar-Enhanced Spectrofluorimetric Determination of Ketoconazole in Cetyltrimethylammonium Bromide Medium. Chem. Anal. 2007. 52, 115-123.

53-Mahajan S, Mahajan RK. Interactions of phenothiazine drugs with bile salts: Micellization and binding studies. J. Colloid Interface Sci. 2012; 387:194–204.

54-Jalali F, Afshoon A. Spectrofluorimetric Study and Detection of Ketoconazole in the Presence of β-cyclodextrin. J. Fluoresc. 2008; 18(1):210-225.

55-Schott H. Dispersiones coloidales. En Gennaro AR (director/editor). Remington "Farmacia". 20º ed. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana; 2003. p. 334-364.

56-Kozlov MY, Melik-Nubarov NS, Batrakova EV, Kabanov AV. Relationship between Pluronic Block Copolymer Structure, Critical Micellization Concentration and Partitioning Coefficients of Low Molecular Mass Solutes. Macromolecules. 2000; 33: 3305-3313.

57-Mohanty ME, Rao VJ, Mishra AK. A fluorescence study on the interaction of telmisartan in triblock polymers pluronic P123 and F127. Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectroscop. 2014; 121:330–338.

58-Olea AF, Silva P, Fuentes I, Martínez F, Worrall DR. Probing solubilization sites in block copolymer micelles using fluorescence quenching. J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 2011; 217: 49–54.

59-Loran CP, von Wandruszka R. Acrylamide quenching of fluorescence in micellar environments. Anal. Chim. Acta. 1992; 258: 335-339.

60-Calafato NR. Estudio de la solubilización de fármacos insolubles en medio acuoso empleando agentes surfactantes [tesis doctoral]. Rosario (Argentina): UNR; 2012.

61-Mehdizadeh M, Grant DJW. Solubility and Complexation Behavior of Griseofulvin in Fatty Acid-Isooctane Mixtures. J. Pharm. Sci. 1984; 73(9):1995-1203.

62-PubChem [base de datos en Internet]. Bethesda: National Library of Medicin; [1966 – acceso 10 de noviembre 2020]. Disponible en: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chitosan

63-Ji C, Barrett A, Poole-Warren LA, Foster NR, Dehghani F. The development of a dense gas solvent exchange process for the impregnation of pharmaceuticals into porous chitosan. Int. J. Pharm. 2010; 391:187-196.

64-Lu Y, Park K. Polimeric micelles and alternative nanosized delivery vehicles for poorly soluble drug. Int. J. Pharm. 2013; 453(1): 198– 214.

65-Rekatas CJ, Mai S-M, Crothers M, Quinn M, Collet JH, Attwood D et al. The efect of hydrophobe chemical structure and chain length on the solubilization of griseofulvin in aqueous micellar solutions of block copoly(oxyalkylene)s. Phys. Chem. Chem. Phys. 2001; 3: 4769-4773.

66-Oliveira CP, Ribeiro MENP, Ricardo NMPS, de Souza TV, Lima Moura C, Chaibundit C et al. The effect of water-soluble polymers, PEG and PVP, on the solubilisation of griseofulvin in aqueous micellar solutions of Pluronic F127. Int. J. Pharm. 2011; 421(2):252-257.

67-Ribeiro MENP, de Moura CL, Vieira MGS, Gramosa NV, Chaibundit C, de Mattos MC et al. Solubilisation capacity of Brij surfactants. Int. J. Pharm. 2012; 436:631-635.

# CAPÍTULO 3

# FORMAS FARMACÉUTICAS DÉRMICAS

# CAPÍTULO 3 - ÍNDICE

**Objetivos específicos** 101

**Lista de abreviaturas y símbolos** 102

**Índice de figuras** 104

**Índice de tablas** 106

**Índice de ecuaciones** 107

**Introducción**

3. Formas farmacéuticas de aplicación dérmica 108

3.1. Clasificación de las formas farmacéuticas de aplicación dérmica 108

3.1.1. Formulaciones líquidas 108

3.1.2. Formulaciones semisólidas 109

3.1.2.1. Hidrogeles 109

3.1.2.2. Bases emulsionadas 110

3.1.2.2.1. Emulgeles 112

**Materiales y Métodos**

3.2. Materiales 113

3.3. Métodos 113

3.3.1. Elaboración de Geles 113

3.3.1.1. Composición cuali-cuantitativa 113

3.3.1.2. Técnicas de elaboración 114

3.3.2. Elaboración de Emulgeles 115

3.3.2.1. Composición cuali-cuantitativa 115

3.3.2.1. Técnica de elaboración 115

3.3.3. Elaboración de cremas O/A 116

3.3.3.1. Composición cuali-cuantitativa 116

3.3.3.2. Técnica de elaboración C-GRI 116

3.3.4. Ensayos 117

3.3.4.1. pH 117

3.3.4.2. Signo de las emulsiones 117

# CAPÍTULO 3 - ÍNDICE

3.3.4.3. Extensibilidad 117
3.3.4.4. Viscosidad aparente 118
3.3.4.5. Comportamiento reológico 119
3.3.4.5. Actividad antifúngica *in vitro* 120
3.3.5. Análisis estadístico 122

**Resultados y Discusión**

3.4. Ensayos 123
3.4.1. pH 123
3.4.2. Signo de los sistemas emulsionados 124
3.4.3. Extensibilidad 124
3.4.4. Viscosidad aparente 125
3.4.5. Comportamiento reológico 127
3.4.6. Actividad antifúngica *in vitro* de los sistemas conteniendo KTO y GRI en estudio 138

**Conclusiones** 142
**Referencias bibliográficas** 144

# CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Elaboración de formas farmacéuticas semisólidas que incluyan los polímeros seleccionados a partir de los datos obtenidos en el Capítulo 2.**

- **Caracterización de las formas farmacéuticas elaboradas con los polímeros seleccionados según las siguientes variables:**
  - ✓ **pH**
  - ✓ **Signo de los sistemas emulsivos**
  - ✓ **Extensibilidad**
  - ✓ **Viscosidad y Comportamiento reológico**
  - ✓ **Actividad antifúngica in vitro**

- **Comparación de los resultados obtenidos con los de una crema comercial con KTO y una crema convencional de elaboración propia conteniendo GRI**

# CAPÍTULO 3 – LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| $\gamma$ | Velocidad de corte |
| A | área |
| a.C. | antes de Cristo |
| A/O | Agua en Aceite |
| A/O/A | (Agua en Aceite) en Agua |
| ADS | Agar Dextrosa Saboureaud |
| AMH | Agar Mueller Hinton |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| C-GRI | Crema conteniendo Griseofulvina |
| C-KTO | Crema conteniendo Ketoconazol |
| CMC Na | Carboximetilcelulosa sódica |
| d | diámetro |
| E-GRI-COP | Emulgel conteniendo Cop A/P-25 I y Griseofulvina |
| E-GRI-QTO | Emulgel conteniendo Quitosano y Griseofulvina |
| E-KTO-COP | Emulgel conteniendo Cop A/P-25 I y Ketoconazol |
| E-KTO-P407 | Emulgel conteniendo Poloxámero 407 y Ketoconazol |
| E-KTO-QTO | Emulgel conteniendo Quitosano y Ketoconazol |
| $\tau$ | Esfuerzo de corte |
| $F_e$ | Factor de extensibilidad |
| GD | Grado de desacetilación |
| G-GRI-COP | Gel Cop A/P-25 I con Griseofulvina |
| G-GRI-QTO | Gel Quitosano con Griseofulvina |
| G-KTO-COP | Gel Cop A/P-25 I con Ketoconazol |
| G-KTO-P407 | Gel Poloxámero 407 con Ketoconazol |
| G-KTO-QTO | Gel Quitosano con Ketoconazol |
| k | Índice de consistencia |
| LSNa | Laurilsulfato de sodio |
| MEG AE | Monoestearato de glicerilo autoemulsionable |
| MIP | Miristato de isopropilo |
| n | Índice de fluidez |

# CAPÍTULO 3 – LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| O/A | Aceite en Agua |
| O/A/O | (Aceite en Agua) en Aceite |
| P | peso |
| P407 | Poloxámero 407 |
| PM | Peso molecular |
| PPG | Propilenglicol |
| SR | Shear rate |
| SS | Shear stress |
| TEA | Trietanolamina |
| $\alpha$ | Indice de tixotropía |
| $\tau_0$ | Umbral de fluencia, tensión de fluencia, “yield stress” |

# CAPÍTULO 3 – ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Clasificación de formas farmacéuticas dérmicas 108
Figura 3.2. Clasificación de formas farmacéuticas semisólidas dérmicas según la composición de la base 109
Figura 3.3. Diámetros medidos para el cálculo del Factor de extensibilidad 118
Figura 3.4. pH de los geles, emulgeles y cremas empleados en este trabajo 123
Figura 3.5. Factor de extensibilidad de los geles, emulgeles y cremas empleados 125
Figura 3.6. Viscosidad aparente a 2,5 rpm de los geles, emulgeles y cremas Empleados 126
Figura 3.7. Curvas de fluidez y de viscosidad de G-KTO-COP 127
Figura 3.8. Curvas de fluidez y de viscosidad de G-KTO-QTO 127
Figura 3.9. Curvas de fluidez y de viscosidad de G-KTO-P407 128
Figura 3.10. Curvas de fluidez y de viscosidad de G-GRI-COP 128
Figura 3.11. Curvas de fluidez y de viscosidad de G-GRI-QTO 128
Figura 3.12. Visualización de las cadenas poliméricas en reposo y alineadas en función de la dirección del flujo en geles poliméricos físicos 129
Figura 3.13. Curvas de fluidez y de viscosidad de C-KTO 129
Figura 3.14. Curvas de fluidez y de viscosidad de E-KTO-COP 130
Figura 3.15. Curvas de fluidez y de viscosidad de E-KTO-QTO 130
Figura 3.16. Curvas de fluidez y de viscosidad de E-KTO-P407 130
Figura 3.17. Curvas de fluidez y de viscosidad de C-GRI 131
Figura 3.18. Curvas de fluidez y de viscosidad de E-GRI-COP 131
Figura 3.19. Curvas de fluidez y de viscosidad de E-GRI-QTO 131
Figura 3.20. Esquematización de la deformación de los glóbulos de fase interna de una emulsión debida a esfuerzos de cizalla 132
Figura 3.21. Curvas de fluidez de los sistemas en función de SR crecientes y decrecientes 134
Figura 3.22. Halos inhibición KTO, crema control, QTO y sistemas en estudio frente a *Candida parapsillosis* 138
Figura 3.23. Comparación de los halos de inhibición obtenidos con los sistemas en estudio conteniendo KTO 139
Figura 3.24. Halos inhibición GRI, crema control, QTO y sistemas en estudio

# CAPÍTULO 3 – ÍNDICE DE FIGURAS

frente a *Dermatophyton mentagrophytes* 140

Figura 3.25. Comparación de los halos de inhibición obtenidos con los sistemas en estudio conteniendo GRI 141

# CAPÍTULO 3 – ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Composición cuali-cuantitativa de los geles elaborados 113
Tabla 3.2. Composición cuali-cuantitativa de los emulgeles elaborados 115
Tabla 3.3. Composición cuali-cuantitativa cremas O/A 116
Tabla 3.4. Valores de $r^2$ para los diferentes modelos reológicos considerados 133
Tabla 3.5. Índice de tixotropía de los sistemas en estudio 137

# CAPÍTULO 3 – ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 3.1. Diámetro extensibilidad formulaciones semisólidas 117
Ecuación 3.2. Factor de extensibilidad formulaciones semisólidas 118
Ecuación 3.3. Ecuación de Newton 119
Ecuación 3.4. Ecuación de Ostwald – de Waele 119
Ecuación 3.5. Ecuación de Casson 119
Ecuación 3.6. Ecuación de Herscheld – Bulkley 119
Ecuación 3.7. Ecuación de Bingham 119
Ecuación 3.8. Ecuación para cálculo del área de tixotropía 120

## 3. FORMAS FARMACÉUTICAS DE APLICACIÓN DÉRMICA

Las enfermedades de la piel son uno de los problemas de salud más comunes, que afectan aproximadamente a un tercio de la población mundial, y la vía tópica es la de elección para la administración de IFAs dirigidos a su tratamiento[1].

### 3.1.CLASIFICACIÓN DE LAS FORMAS FARMACÉUTICAS DE APLICACIÓN DÉRMICA

Las formas de dosificación para vía tópica se pueden clasificar desde diversos puntos de vista. Una de las clasificaciones más generales se basa en el sistema físico de la formulación: líquidas, semisólidas y sólidas[2,3].

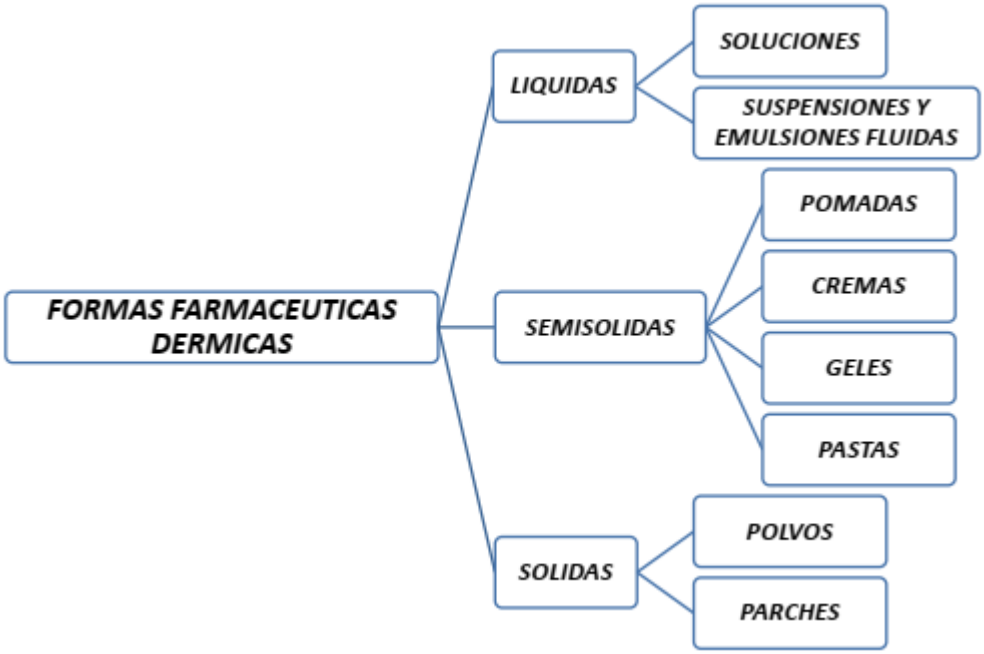



**Fig 3.1. Clasificación de formas farmacéuticas dérmicas**

#### 3.1.1. FORMULACIONES LÍQUIDAS

Las formulaciones líquidas para aplicación tópica (lociones) pueden presentarse como simples soluciones (acuosas, alcohólicas, hidroalcohólicas, oleosas), suspensiones y emulsiones fluidas. En general, tienen un tiempo de permanencia en la piel corto (soluciones < suspensiones < emulsiones), lo que da como resultado bajos flujos de los IFAs

hacia el tejido; por lo tanto, se usan habitualmente cuando se quieren obtener efectos superficiales. En el caso de las soluciones, los tiempos de permanencia pueden aumentarse ligeramente empleando glicerina, polietilenglicoles líquidos y/o polímeros afines al disolvente[2].

### 3.1.2. FORMULACIONES SEMISÓLIDAS

La mayoría de las formulaciones aplicadas sobre la piel son semisólidas. Tienen aspecto homogéneo, consistencia más o menos blanda y pueden emplearse para la administración local y sistémica de medicamentos, como así también para protección e hidratación del sitio de aplicación. Presentan gran versatilidad en cuanto a composición cuali-cuantitativa (adaptación a muy diferentes objetivos terapéuticos), pueden vehiculizar una gran diversidad de activos y su preparación es relativamente rápida y sencilla. Son atractivas para el paciente y de fácil aplicación, en especial las que contienen agua en su composición. Debido a su comportamiento reológico plástico, disminuyen su consistencia al aplicar una fuerza mecánica externa mínima, facilitando su aplicación. Presentan sustantividad, siendo posible su permanencia en el área de aplicación durante períodos de tiempo más extensos que las formas líquidas[2,4-6].

Las formas semisólidas suelen clasificarse según la composición de la base:

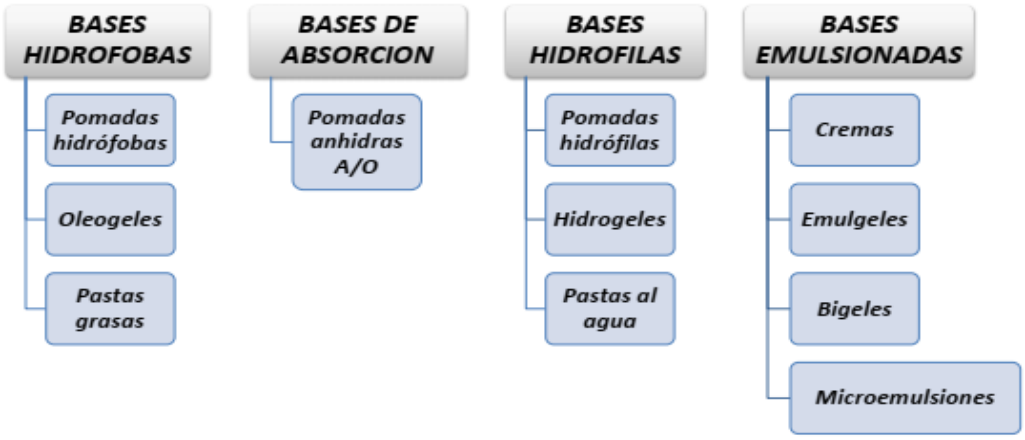



**Fig 3.2. Clasificación de formas semisólidas dérmicas según la composición de la base**

#### 3.1.2.1. HIDROGELES

Los hidrogeles[4,7-9]son sistemas monofásicos hidratados, cuya base está compuesta de una fase líquida (agua sola o en mezclas con etanol, isopropanol, propilenglicol, glicerol) y agentes gelificantes hidrófilos que forman una red tridimensional coherente. Como gelificantes pueden emplearse gomas naturales, derivados semisintéticos de celulosa, derivados sintéticos acrílicos (Carbopol®, Pemulen®, Jaguar® y otros).

El agua, componente principal de los hidrogeles, puede aumentar la hidratación del estrato córneo, actuando como un potenciador natural de la penetración. Sin embargo, la tendencia de los hidrogeles al secado rápido después de la aplicación limita sus propiedades hidratantes.

Ventajas

- Capacidad filmógena, no son oclusivos
- Gran facilidad de aplicación y eliminación
- Cosméticamente muy aceptables
- Proporcionan una liberación más rápida del fármaco, independientemente de la solubilidad en agua del fármaco, en comparación con las cremas y los ungüentos.

Desventajas

- Incompatibilidades con principios activos cuando éstos modifican el pH del medio o influyen en la carga iónica, lo que generalmente afecta la estabilidad física de los geles
- Tendencia a la desecación (pérdida de la textura original)
- Escaso poder de penetración (sólo tratamientos superficiales)
- Elevado efecto “tacking” (pegajosidad) de algunos gelificantes
- No son oclusivos ni emolientes
- La transpiración puede provocar su eliminación

### 3.1.2.2. BASES EMULSIONADAS[2,4,7,8,10,11]

Consisten en una fase oleosa y una fase acuosa, con presencia de emulsionantes que estabilizan la dispersión de una fase (interna) en la otra (externa). Son sistemas de dos fases (A/O u O/A) o sistemas de fases múltiples (A/O/A u O/A/O).

Entre las bases emulsionadas se pueden distinguir cremas, emulgeles, bigeles y microemulsiones gelificadas.

Estas bases contienen tanto componentes hidrófobos como hidrófilos, por lo que combinan las propiedades de ambos tipos de componentes, observándose predominio de las propiedades de la fase externa (la emulsión es hidrófila, si su fase externa es acuosa e hidrófoba, si su fase externa es oleosa).

Permiten vehiculizar activos tanto hidrosolubles como liposolubles; los activos pueden estar localizados en la fase externa o en la fase dispersa (dependiendo de su solubilidad y del tipo de emulsión). La velocidad de liberación in vitro de las sustancias activas suele ser mayor cuando se encuentran solubilizadas en la fase externa.

Algunos emulsionantes contenidos en las bases emulsionadas pueden penetrar en los lípidos intercelulares del estrato córneo y actuar como potenciadores de la penetración.

Los procesos involucrados en la liberación y permeación de fármacos desde un sistema emulsionado son complejos y difíciles de definir. La emulsión cambia a medida que se aplica: la fase continua acuosa se evapora (o si es oleosa puede penetrar en la piel) y la emulsión se rompe. Además, el ingrediente activo, si bien puede estar solubilizado en una de las fases, se dividirá entre las fases continua y dispersa o puede incorporarse en las micelas del emulsionante a medida que la formulación colapsa. También debe tenerse en cuenta el coeficiente de difusión real del activo en un sistema bifásico. Si el activo está suspendido, deberá disolverse previamente para quedar disponible para la liberación, haciendo aún más complejo el proceso.

Dentro de las bases emulsionadas, las cremas O/A (hidrófilas, lavables) son las formas más frecuentemente elegidas para la administración tópica de activos dermatológicos. Son emulsiones con una fase dispersa oleosa y una fase continua acuosa; los emulsionantes más utilizados son los no iónicos, ya que son menos tóxicos e irritantes para la piel.

- No son oclusivas.
- Pueden usarse en lesiones húmedas; presentan una cierta capacidad de absorción de exudados.
- Promueven hidratación del estrato córneo mediante el contacto directo de la fase acuosa externa con la piel.
- Son lavables (se retiran fácilmente de la piel y la ropa).
- Son fáciles de dosificar y aplicar.
- Son fácilmente aceptados por los pacientes debido al menor contenido de aceite.

- Crean un efecto de enfriamiento a través de la evaporación de la fase acuosa, dejando una capa mínima de aceite en la piel como un emoliente.

#### 3.1.2.2.1. EMULGELES

Los emulgeles[11,12] son emulsiones del tipo O/A, cuya fase externa se encuentra gelificada. Poseen las ventajas de emulsiones y geles, y actúan como un sistema de liberación de control dual.

Los emulgeles para uso dermatológico tienen varias propiedades favorables:

- Son bien aceptados por los pacientes, debido a su tacto no graso y refrescante, y su apariencia agradable
- Son emolientes
- Son fácilmente removibles
- No manchan

Los geles emulsionados han demostrado ser vehículos adecuados para fármacos hidrofóbicos o poco solubles en agua. Los sistemas aceite en agua atrapan los fármacos lipofílicos en la fase oleosa y se libera lentamente a la piel a través de la fase externa gelificada. Los emulgeles se han utilizado como vehículos para administrar diversos fármacos hidrófobos (ketoconazol, aciclovir, diclofenac y calcipotriol) a la piel. Algunos de los agentes gelificantes utilizados son P407, HPMC, carbómeros (Carbopol©), Pemulen© y CMC Na.

# CAPÍTULO 3 - MATERIALES Y MÉTODOS

## 3.2. MATERIALES

Ketoconazol Parafarm, Griseofulvina Parafarm, Quitosano Parafarm (PM promedio 240 kDa, GD > 75%), Poloxámero 407 Parafarm, Alcohol cetílico Parafarm, Miristato de isopropilo (MIP) Parafarm, Monoestearato de glicerilo autoemulsionable (MEG AE) Parafarm, Laurilsulfato de Sodio (LSNa) Parafarm, Alcohol estearílico Parafarm y Metilparabeno Parafarm fueron adquiridos en Droguería Saporiti (CABA, Argentina); Acido Láctico, Propilenglicol (PPG), Vaselina blanca y Vaselina líquida fueron adquiridos en Droguería Novalquim (Rosario, Argentina); Trietanolamina (TEA) Cicarelli fue adquirida en Norces (Rosario, Argentina); Polygel W30® 3VSigma (30% p/p en polímero) fue donado por Cognis Argentina.

## 3.3. MÉTODOS

### 3.3.1. ELABORACIÓN DE FORMAS FARMACÉUTICAS SEMISÓLIDAS - GELES

#### 3.3.1.1. COMPOSICIÓN CUALI-CUANTITATIVA

| | G-KTO-COP | G-KTO-QTO | G-KTO-P407 | G-GRI- COP | G-GRI-QTO |
|---|---|---|---|---|---|
| **KTO** | 2 g | 2 g | 2 g | ----- | ----- |
| **GRI** | ------ | ----- | ----- | 0,2 g | 0,2 g |
| **Polygel W30®** | 3 g | ----- | ----- | 3 g | ----- |
| **TEA** | c.s. pH 7 | ----- | ----- | c.s. pH 7 | ----- |
| **QTO** | ----- | 5 g | ----- | ----- | 5 g |
| **Acido Láctico** | ----- | 2 g | ----- | ----- | 2 g |
| **P 407** | ----- | ----- | 25 g | ----- | ----- |
| **Metilparabeno** | 0,1 g | 0,1 g | 0,1 g | 0,1 g | 0,1 g |
| **Propilparabeno** | 0,05 g | 0,05 g | 0,05 g | 0,05 g | 0,05 g |
| **Agua destilada c.s.p.** | 100 g | 100 g | 100 g | 100 g | 100 g |

**Tabla 3.1. Composición cuali-cuantitativa de los geles elaborados**

### 3.3.1.2. TÉCNICAS DE ELABORACIÓN

#### 3.3.1.2.1. SOLUCIÓN CONCENTRADA DE PARABENOS

Se prepararon 100 ml de solución concentrada de Parabenos, disolviendo 10 g de Metilparabeno y 5 g de Propilparabeno en cantidad suficiente de Propilenglicol, con ayuda de calor (40ºC) y agitación (agitador magnético Arcano 78-HW-1).

#### 3.3.1.2.2. AGUA CONSERVADA

Se preparó por mezcla de Agua destilada y 1% de Solución concentrada de Parabenos, de manera que la concentración final de conservadores antimicrobianos fue 0,1 % p/v de Metilparabeno y 0,05% p/v de Propilparabeno.

#### 3.3.1.2.3. GELES DE COP ACRILATO/PALMETH-25 ITACONATO

En 80 ml de Agua conservada se incorporó la cantidad prescripta de emulsión de Polygel W30® con agitación manual. Se agregó TEA hasta pH 7, continuando la agitación hasta obtención del gel[13]. Se pesó la cantidad correspondiente de IFA y se agregó el gel obtenido sobre el IFA por dilución geométrica, con agitación manual hasta homogeneidad. Se completó a peso final de 100 g con Agua conservada.

#### 3.3.1.2.4. GELES DE QUITOSANO

Se preparó 100 mL de solución acuosa de Acido Láctico 2% p/v. En 80 ml de esa solución se mezcló 1 ml de solución concentrada de Parabenos y se dispersó la cantidad prescripta de QTO en forma manual[14]. El sistema se dejó en reposo con agitación ocasional durante 48 h hasta disolución completa del polímero. Se pesó la cantidad prescripta de IFA y se incorporó el gel obtenido sobre el IFA por dilución geométrica, con agitación manual hasta homogeneidad. Se completó a peso final de 100 g con solución de Acido Láctico 2%.

#### 3.3.1.2.5. GELES DE POLOXÁMERO 407

Utilizando 80 ml de Agua conservada se preparó el gel conteniendo el IFA según el método en frío reportado por Schmolka[15], agitando en forma manual hasta homogeneidad. Se completó a peso final de 100 g con Agua conservada.

### 3.3.2. ELABORACIÓN DE FORMAS FARMACÉUTICAS SEMISÓLIDAS - EMULGELES O/A

#### 3.3.2.1. Composición cuali-cuantitativa

| | E-KTO-COP | E-KTO-QTO | E-KTO-P407 | E-GRI-COP | E-GRI-QTO |
|---|---|---|---|---|---|
| **KTO** | 2 g | 2 g | 2 g | ----- | ----- |
| **GRI** | ------ | ----- | ----- | 0,2 g | 0,2 g |
| **MEG AE** | 2 g | 3 g | 2 g | 2 g | 3 g |
| **MIP** | 5 g | 5 g | 5 g | 5 g | 5 g |
| **Alcohol cetílico** | 2 g | 3 g | 2 g | 2 g | 3 g |
| **PPG** | 5 g | 5 g | 5 g | 5 g | 5 g |
| **Vaselina líquida** | 5 g | 5 g | 5 g | 5 g | 5 g |
| **Polygel W30®3%** | 50 g | ----- | ----- | 50 g | ----- |
| **QTO 5%** | ----- | 50 g | ----- | ----- | 50 g |
| **P 407 25%** | ----- | ----- | 60 g | ----- | ----- |
| **Polisorbato 80** | 1 g | 1 g | 1 g | 1 g | 1 g |
| **Metilparabeno** | 0,1 g | 0,1 g | 0,1 g | 0,1 g | 0,1 g |
| **Propilparabeno** | 0,05 g | 0,05 g | 0,05 g | 0,05 g | 0,05 g |
| **Agua destilada c.s.p.** | 100 g | 100 g | 100 g | 100 g | 100 g |

**Tabla 3.2. Composición cuali-cuantitativa de los emulgeles elaborados**

#### 3.3.2.2. TÉCNICA DE ELABORACIÓN

Los geles de Cop A/P-25 I, QTO y P 407 (sin IFA) se prepararon según técnicas descriptas en 3.3.1. Se pesaron los componentes de la fase oleosa y se fundieron a baño maría en orden decreciente de sus puntos de fusión. Se calentó la cantidad prescripta de gel a igual temperatura que la fase oleosa (60ºC ± 1ºC) y se mezclaron ambas fases por método directo, con agitación manual constante manteniendo la temperatura hasta formación de la emulsión, retirándose del calentamiento y prosiguiendo la agitación hasta alcanzar

temperatura ambiente. Se pesó la cantidad prescripta de IFA, y se incorporó el emulgel obtenido sobre el IFA por dilución geométrica, con agitación manual hasta homogeneidad. Se completó a peso final de 100 g con Agua conservada.

### 3.3.3. ELABORACIÓN DE FORMAS FARMACÉUTICAS SEMISÓLIDAS - CREMAS O/A

Como referencia de una formulación de KTO existente, se empleó una especialidad medicinal bajo la forma de crema O/A conteniendo KTO 2% (C-KTO).

Dado que no existen especialidades medicinales semisólidas para vía dérmica conteniendo GRI, se preparó una crema O/A con excipientes convencionales (C-GRI).

#### 3.3.3.1. COMPOSICIÓN CUALI-CUANTITATIVA

| | C-KTO | C-GRI |
|---|---|---|
| **KTO** | 2 g | ----- |
| **GRI** | ----- | 0,2 g |
| **Alcohol cetílico** | n.d.* | 9,0 g |
| **MEG AE** | n.d.* | ----- |
| **Vaselina líquida** | n.d.* | 5,0 g |
| **Vaselina blanca** | ----- | 7,5 g |
| **PPG** | n.d.* | 5,0 g |
| **Alcohol cetoestearílico** | n.d.* | ----- |
| **Laurilsulfato de sodio** | ----- | 1,0 g |
| **Conservadores*** | n.d.* | 0,15 g |
| **Agua purificada c.s.p.** | 100 g | 100 g |

**Tabla 3.3. Composición cuali-cuantitativa de las cremas O/A (*no declarado por el fabricante)**

#### 3.3.3.2. TÉCNICA DE ELABORACIÓN C-GRI

Se preparó la fase acuosa, mezclando 1 ml de Solución concentrada de Parabenos con 70ml de agua destilada y posterior disolución de Laurilsulfato de Sodio. Se preparó la fase oleosa, fundiendo sus componentes en orden decreciente de puntos de fusión. Se mezclaron ambas fases por método inverso (fase acuosa sobre fase oleosa), a igual temperatura (65 ± 1ºC)

con agitación manual constante manteniendo la temperatura hasta formación de la emulsión, retirándose del calentamiento y prosiguiendo la agitación hasta alcanzar temperatura ambiente. Se pesó la cantidad prescripta de GRI y se dispersó en PPG. Sobre la dispersión del IFA se incorporó la crema obtenida, por dilución geométrica, con agitación manual. Se completó a peso final con agua destilada.

### 3.3.4. ENSAYOS

#### 3.3.4.1. pH

Una porción de 1 g de cada una de las formas elaboradas se dispersó en 30-40 ml de agua destilada (pH 7) a temperatura ambiente. La dispersión se filtró utilizando papel de filtro y se midió el pH del filtrado (phmetro Arcano PHS-3E). Las mediciones se realizaron por triplicado[16].

#### 3.3.4.2. SIGNO DE LA EMULSIÓN (EN EMULGELES Y CREMAS)

Sendas porciones de 1 g de formulación se esparció sobre cada uno de dos portaobjetos, colocándose a continuación Azul de Metileno 1% (hidrosoluble) sobre uno de los portas y Rojo Sudán 1% (liposoluble) sobre el otro. Se observó visualmente la distribución de cada uno de los colorantes[17].

#### 3.3.4.3. EXTENSIBILIDAD

Se colocó una muestra de 1 g de la formulación sobre una placa de vidrio 20 x 20 cm, y se colocó sobre ella otra placa igual, de peso conocido (380 g). Al cabo de 5 minutos se midió el diámetro del círculo formado en 4 direcciones (Fig 3.3.) y se calculó la superficie según la ecuación[18]:

$$A = d^2 . \frac{\pi}{4} .$$ Ecuación 3.1.

donde

A = superficie ($mm^2$) frente al peso aplicado

d = diámetro principal (mm) frente al peso aplicado

Se calculó el factor de extensibilidad según la ecuación[19]:

$$F_e = \frac{A}{P}$$ Ecuación 3.2.

donde

Fe = factor de extensibilidad ($mm^2/g$)

A = área total ($mm^2$) al final del ensayo

P = peso total aplicado (g)

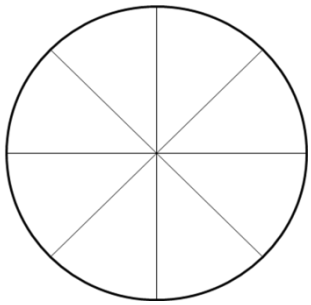


**Fig 3.3. Diámetros medidos para el cálculo del Factor de extensibilidad**

### 3.3.4.4. VISCOSIDAD APARENTE

Se utilizó un viscosímetro rotacional de cilindros coaxiales (Brookfield RVDV II+ PRO, Versión 6.1, Brookfield Engineering Lab. Inc., Middleboro, U.S.A.), con adaptador para muestras pequeñas.

Las muestras fueron analizadas a temperatura ambiente (25ºC), luego de 20 días de su preparación, empleando un husillo 29 y una velocidad de rotación de 2,5 rpm. Las muestras fueron colocadas en el adaptador para muestras pequeñas y luego de 10 minutos para su estabilización[20] se aumentó gradualmente la velocidad de rotación hasta alcanzar el valor de 2,5 rpm. Luego de 3 minutos se leyó el valor de viscosidad (η) informado en el display del equipo.

### 3.3.4.5. COMPORTAMIENTO REOLÓGICO

Se utilizó un viscosímetro rotacional de cilindros coaxiales (Brookfield RVDV II+ PRO, Versión 6.1, Brookfield Engineering Lab. Inc., Middleboro, U.S.A.), con adaptador para muestras pequeñas.

# CAPÍTULO 3 - MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras fueron analizadas a temperatura ambiente (25ºC), luego de 20 días de su preparación[20]. Los husillos empleados fueron aquéllos para los cuales el porcentaje de torque del equipo se mantuviera entre el 10 y el 100%[21]. Las muestras fueron colocadas en el adaptador y luego de 10 minutos para su estabilización[20], fueron sometidas a diferentes velocidades de rotación, primero en orden ascendente y luego en orden descendente. Las velocidades de rotación empleadas fueron 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 4,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0 y 100,0 rpm.

Para cada una de las velocidades de rotación aplicadas, se midieron la viscosidad, esfuerzo de corte y velocidad de corte. Con los datos obtenidos, se obtuvieron:

a- Curvas de fluidez ($\tau$ vs $\gamma$), utilizando el coeficiente $r^2$ para la asignación del modelo reológico[20,21]:

- Newton $\tau = \eta.\gamma$ Ecuación 3.3.
- Ostwald-De Waele $\tau = k.\eta^n$ Ecuación 3.4.
- Casson $\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_0} + \sqrt{\eta.\gamma}$ Ecuación 3.5.
- Herscheld Bulkley $\tau = \tau_0 + k.\eta^n$ Ecuación 3.6.
- Bingham $\tau = \tau_0 + \eta.\gamma$ Ecuación 3.7.

donde

$\tau$ = shear stress (SS), esfuerzo de corte

$\gamma$ = shear rate (SR), tasa o velocidad de deformación

$\eta$ = viscosidad

$\tau_0$ = yield stress (YS), tensión de fluencia

k = índice de consistencia

n = índice de fluidez

b- Curvas de viscosidad ($\eta$ vs $\gamma$)

c- Valor de tensión de fluencia ($\tau_0$) (si corresponde)

La representación gráfica de la raíz cuadrada del esfuerzo de corte vs la raíz cuadrada de la velocidad de corte proporciona una línea recta, cuya extrapolación a velocidad de corte igual a 0 proporciona el valor de tensión de fluencia[21].

d- Valor del índice de tixotropía (α) ( si corresponde)

Se calcularon las áreas bajo las curvas ascendente (U) y descendente (D) obtenidas en los gráficos de $\tau$ vs $\gamma$. El índice de tixotropía se calculó según la fórmula[22]:

$$\alpha = \left[\frac{(U-D)}{U}\right].100 \qquad \text{Ecuación 3.8}$$

### 3.3.3.6. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *in vitro*

a- **ENSAYO PARA KTO**

La actividad antifúngica de las formas semisólidas conteniendo KTO se estudió en cultivos de *Candida parapsillosis* (ATCC 22019), empleando el método de difusión en disco.

**a.1.Preparación de los discos de referencia**

Se cortaron discos de papel Whitman Nº 1, de 6 mm de diámetro, que se esterilizaron por vapor húmedo saturado a 134ºC durante 15 min. Los mismos se cargaron con 10 µl de solución de KTO en DMSO, previamente filtrada por filtros de Nylon®66 0,22 µ, de forma que la carga final de cada disco fue 0,2 mg KTO. Se secaron en estufa a 35ºC y se conservaron en recipiente hermético estéril[23].

**a.2.Procedimiento**

La cepa de *C. parapsilosis* se repicó en Agar Dextrosa Saboureaud (ADS) y se incubó a 28ºC durante 24 hs. A partir del repique se preparó una suspensión en Cloruro de Sodio 0,9% estéril de turbidez equivalente al estándar McFarland 0,5 ($1.10^6$ a $5.10^6$ UFC / ml).

Se prepararon y esterilizaron 10 placas de Petri (dm 10 cm) conteniendo Agar Mueller Hinton (AMH) enriquecido con Glucosa 2% y Azul de Metileno 0,5 mg/l.

En cabina de seguridad biológica clase II, la superficie de cada placa se hisopó en tres direcciones con la suspensión y se dejó secar 3 – 5 min. Se reservó una placa para control de viabilidad del inóculo; en una segunda placa se colocó un disco de KTO de referencia, y en cada una de las siete placas restantes se realizó un pocillo de 6 mm con sacabocado

estéril, en donde se colocaron 10 mg de cada muestra en estudio, incluyendo una muestra de gel de QTO solo, sin IFA.

Todas las placas así obtenidas se incubaron en estufa a 35ºC durante 24 hs. Se evaluó desarrollo, y se reincubaron hasta 48 hs en caso de no haber crecimiento. Luego de la incubación se midieron los diámetros de halos de inhibición. Los resultados se expresaron como la media de tres medidas ± SD[23-25].

b- **ENSAYO PARA GRI**

La actividad antifúngica de las formas semisólidas conteniendo GRI se estudió en cultivos de *Tricophyton mentagrophytes* (CCC 141-2002), empleando el método de difusión en disco.

**b.1. Preparación de los discos de referencia**

Se cortaron discos de papel Whitman Nº 1, de 6 mm de diámetro, que se esterilizaron por vapor húmedo saturado a 134ºC durante 15 min. Los mismos se cargaron con 10 µl de solución de GRI en DMSO, previamente filtrada por filtros de Nylon©66 0,22 µ, de forma que la carga final de cada disco fue 0,02 mg GRI. Se secaron en estufa a 35ºC y se conservaron en recipiente hermético estéril[23,26].

**b.2. Procedimiento**

La cepa de *T. mentagrophytes* se repicó en Agar Dextrosa Saboureaud (ADS) y se incubó a 28ºC durante 7 días para favorecer la conidiación. A partir del repique se preparó una suspensión en Cloruro de Sodio 0,9% estéril ajustando la concentración de conidios a $1.10^6$ UFC/ml, según recuento en cámara de Neubauer.

Se prepararon y esterilizaron ocho placas de Petri (dm 10 cm) conteniendo Agar Mueller Hinton (AMH) enriquecido con Glucosa 2% y Azul de Metileno 0,5 mg/l.

En cabina de seguridad biológica clase II, la superficie de cada placa se hisopó en tres direcciones con la suspensión y se dejó secar 3 – 5 min. Se reservó una placa para control de viabilidad del inóculo; en una segunda placa se colocó un disco de GRI de referencia, y en cada una de las seis placas restantes se realizó un pocillo de 6 mm con sacabocado estéril, en donde se colocaron 10 mg de cada muestra en estudio, incluyendo una muestra de gel de QTO sin IFA.

Todas las placas así obtenidas se incubaron en estufa a 28ºC durante 4 – 5 días. Luego de la incubación se midieron los diámetros de halos de inhibición. Los resultados se expresaron como la media de tres medidas ± SD[26,27].

### 3.3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se informan como la media de tres mediciones. Se empleó el análisis de varianza (ANOVA) para la comparación entre grupos, y prueba de rangos múltiples de Tuckey cuando fuera necesario. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

# CAPÍTULO 3 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## ENSAYOS

### 3.4.1. pH

Los pH medidos se muestran en la Fig 3.4.

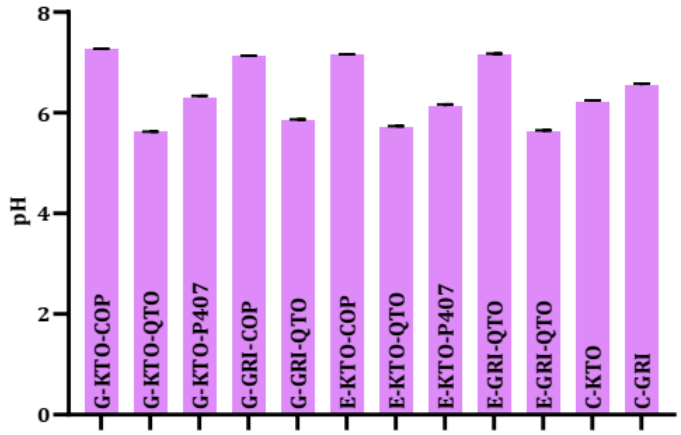



**Fig 3.4. pH de los geles, emulgeles y cremas empleadas en este trabajo de tesis**

El pH de la superficie de la piel no ocluida presenta valores ácidos, comprendidos entre 4,5 y 5,9, y depende en gran medida de la presencia del manto ácido. El manto ácido es importante en la función barrera de la piel, y si bien la piel presenta capacidad tampón ante la presencia de sustancias más ácidas o más alcalinas, la misma puede encontrarse disminuida en algunas patologías. Es importante que las formas dermatológicas presenten un pH similar al pH de la piel, a fin de no alterar significativamente la acidez de la misma; por ello existe un consenso generalizado que las formulaciones a administrar por esta vía presenten un pH entre 4,5 y 6,5-7[28,29].

Las formulaciones que incluyen Cop A/P-25 I presentaron un pH ligeramente mayor a 7. Esto se debe a las características del polímero, que requiere el agregado de un agente alcalino (Trietanolamina, en este caso) hasta pH aproximadamente 7 para neutralizar los grupos carboxílicos, situación en que se produce la gelificación. No obstante, estos valores no representan un desvío significativo a los valores recomendados, por lo que se consideran aceptables.

El resto de las formulaciones presentó valores de pH dentro del rango establecido por la bibliografía, siendo adecuadas para su administración por vía dérmica.

### 3.4.2. SIGNO DE LOS SISTEMAS EMULSIONADOS (EMULGELES Y CREMAS)

La diferente solubilidad de los colorantes empleados en este método de verificación del signo de los sistemas emulsivos permite corroborar que el signo de la emulsión sea el propuesto. Azul de Metileno es un colorante soluble en agua[30], por lo que presentará afinidad por la fase acuosa de las emulsiones, mientras que Rojo Sudán III es insoluble en agua y soluble en lípidos[31]. En función de estas características es de esperar que en un sistema emulsionado O/A, tal como se plantea en los sistemas propuestos, se observe una coloración dispersa y puntual correspondiente a los glóbulos de fase interna ante el agregado de Rojo Sudán III , y una coloración uniforme debida a la coloración de la fase externa ante el agregado de Azul de Metileno.

En todos los sistemas emulsionados se observó, en forma visual, una coloración uniforme ante el agregado de Azul de Metileno, y la presencia de puntos dispersos ante el agregado de Rojo Sudán III, confirmando el signo O/A de estos sistemas.

Estos resultados demuestran que el signo de los emulgeles y cremas coinciden con el signo propuesto en el diseño de los sistemas emulsionados en esta tesis.

### 3.4.3. EXTENSIBILIDAD

La aceptación del consumidor de una preparación para aplicación tópica, aparte de los efectos terapéuticos y cosméticos, se rige por varias propiedades de la preparación, como la apariencia, el olor, la capacidad de extrusión, las sensaciones iniciales al contacto con la piel, extensibilidad, pegajosidad (o untuosidad) y sensación grasa residual, todas ellas conocidas en forma general como “perfil de textura”[18].

La extensibilidad (capacidad de extensión, capacidad de esparcimiento, capacidad de propagación) es la capacidad que tiene una formulación semisólida de extenderse uniformemente al ser aplicada sobre la piel[19,32]. Es una propiedad muy importante de las formas de dosificación tópicas, ya que puede afectar la aceptación del paciente (en términos de facilidad de aplicación) y la eficacia clínica, ya que ésta depende de que pueda extenderse la formulación en una capa uniforme que suministre la dosis necesaria del IFA[18,33].

La extensibilidad depende de la composición de la formulación, como así también de la naturaleza y proporción de los componentes en el caso de bases compuestas[34]. Las formulaciones semisólidas con valores de extensibilidad más altos permiten una aplicación más fácil y una mayor área de superficie disponible para la permeación de IFAs[29,33].

No existe un método estandardizado para la determinación de extensibilidad en formas farmacéuticas semisólidas; de hecho, la bibliografía reporta diferentes formas de realizarlo y diferentes formas de interpretar los resultados, lo que dificulta el análisis de esta variable. La extensibilidad se mide comúnmente por el diámetro extendido de la muestra o el área que forma el producto al aplicar un/unos pesos conocidos sobre la muestra durante un período de tiempo predeterminado[18,19,33]. El método de placas paralelas es el método más utilizado para determinar y cuantificar la extensibilidad de una preparación semisólida. Las ventajas de este método son su simplicidad y economía; pero, por otro lado, no es un método muy sensible. Intituivamente, las formulaciones más fluidas presentarán un factor de extensibilidad mayor que aquéllas menos fluidas, pero como ya mencionamos, no existen parámetros oficiales en cuanto a los valores que las fórmulas deben cumplir.

En la Fig 3.5. se muestran los $F_e$ obtenidos para los diferentes sistemas ensayados, según el método utilizado:

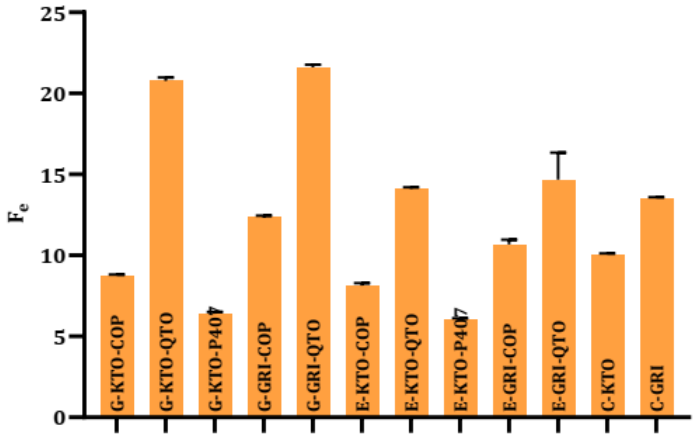



**Fig 3.5. Factores de extensibilidad de los geles, emulgeles y cremas empleados en este trabajo de tesis**

### 3.4.4. VISCOSIDAD APARENTE

El estudio sobre las propiedades de flujo de la materia y su deformación se denomina Reología. En el campo farmacéutico, y específicamente con respecto a las formulaciones

tópicas, las propiedades de flujo de un producto influyen en diversos pasos del proceso de desarrollo (como el mezclado y el envasado), en su uso (extracción del contenedor antes de la aplicación, sensación táctil), en su comportamiento in vivo (extensibilidad, liberación y permeación del IFA) y en su estabilidad[35-37].

Una forma de cuantificar y describir las propiedades de flujo de un sistema líquido o semisólido es a través de medidas de viscosidad. La viscosidad es una expresión de la resistencia de un fluido a fluir; cuanto mayor es la viscosidad, mayor es la resistencia. Los líquidos simples se pueden describir en términos de viscosidad absoluta (sistemas newtonianos), en los cuales la viscosidad no varía en función de un esfuerzo externo aplicado (esfuerzo de cizalla); sin embargo, en las dispersiones heterogéneas el comportamiento es más complejo y la viscosidad del sistema varía en función del esfuerzo externo aplicado (sistemas no newtonianos)[36].

Todos los sistemas elaborados (geles, emulgeles, cremas) son dispersiones heterogéneas, por lo que no pueden caracterizarse con un solo valor de viscosidad; la viscosidad del sistema varía en función de los esfuerzos aplicados, y por ello se habla de "viscosidad aparente". A fines comparativos de la viscosidad de los sistemas elaborados, se tomó un valor de esfuerzo de cizalla aplicado dentro del rango utilizado para la caracterización reológica, midiendo la viscosidad en ese punto. En la figura 3.6. se muestran los valores de viscosidad de los sistemas medidos a 2,5 rpm, utilizando un husillo 29.

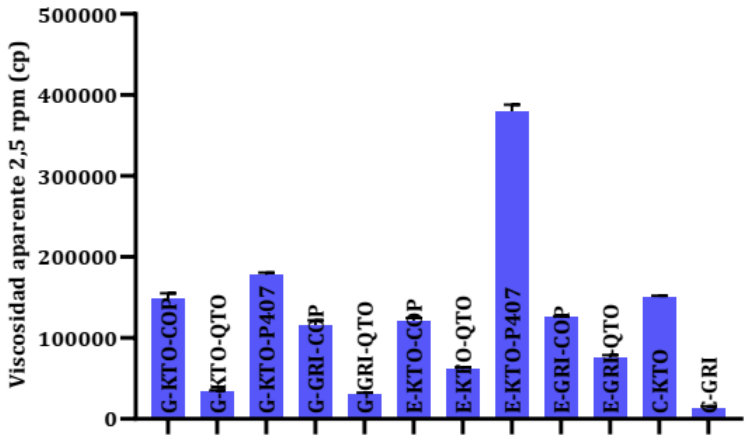



**Fig 3.6. Viscosidad aparente a 2,5 rpm de los geles, emulgeles y cremas empleados en este trabajo de tesis**

La viscosidad aparente de los sistemas a bajas velocidades de cizallamiento pueden relacionarse con el $F_e$ visto en el punto anterior[38]. Analizando los valores obtenidos, se observa que existe una relación inversa, a mayor viscosidad a velocidades de cizalla bajas, menor extensibilidad.

### 3.4.5. COMPORTAMIENTO REOLÓGICO

A los fines de determinar el comportamiento reológico de los sistemas elaborados, se midieron los valores de η, SS y SR en función de diversas velocidades de cizalla crecientes, desde 0 hasta 100 rpm. Se confeccionaron las curvas de fluidez (SS vs SR) y de viscosidad (ηaparente vs SR) para cada uno de los sistemas gel, que se muestran en las figuras 3.7. a 3.11.

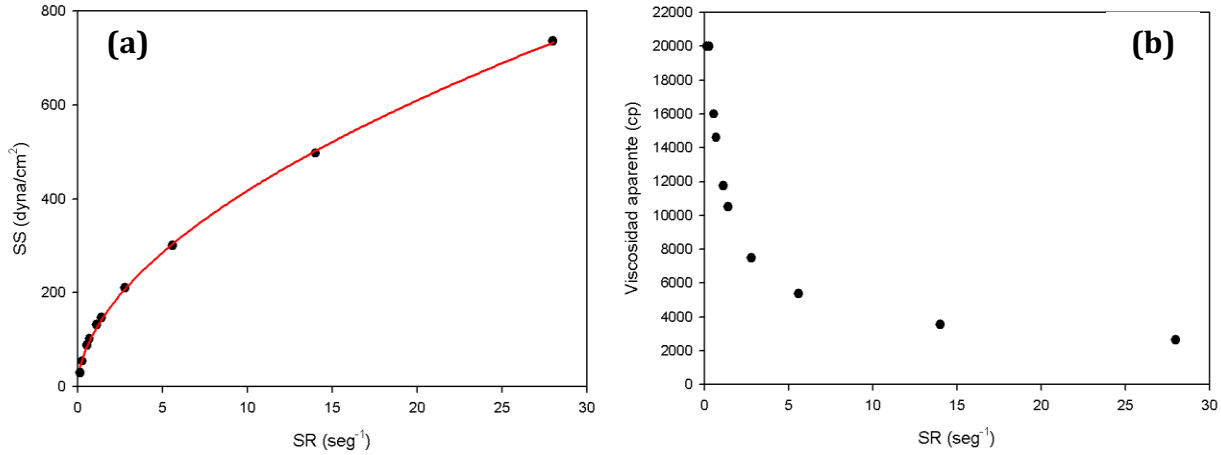



**Fig 3.7. Curvas de fluidez (a) y de viscosidad (b) de G-KTO-COP**

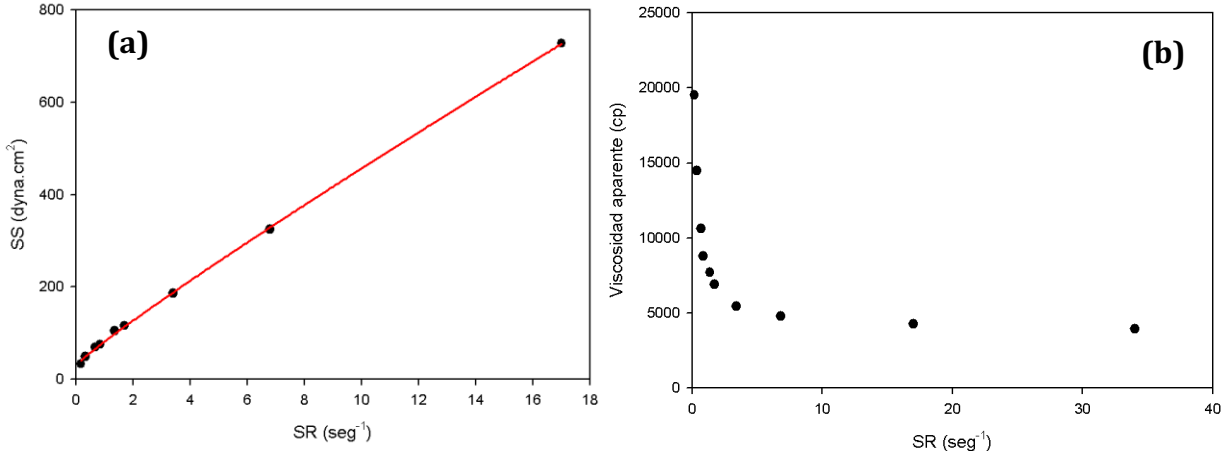



**Fig 3.8. Curvas de fluidez (a) y de viscosidad (b) de G-KTO-QTO**

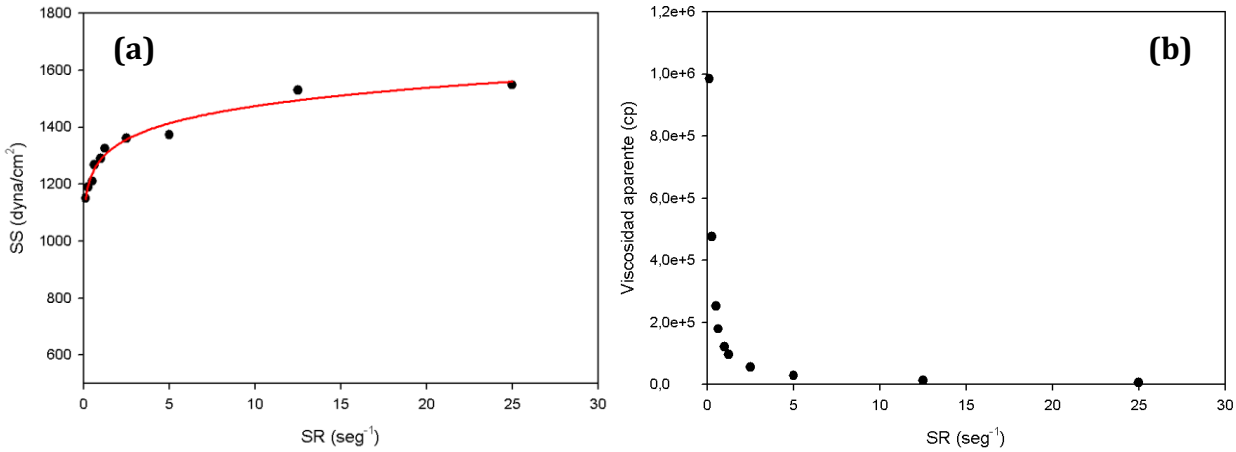



**Fig 3.9. Curvas de fluidez (a) y de viscosidad (b) de G-KTO-P407**

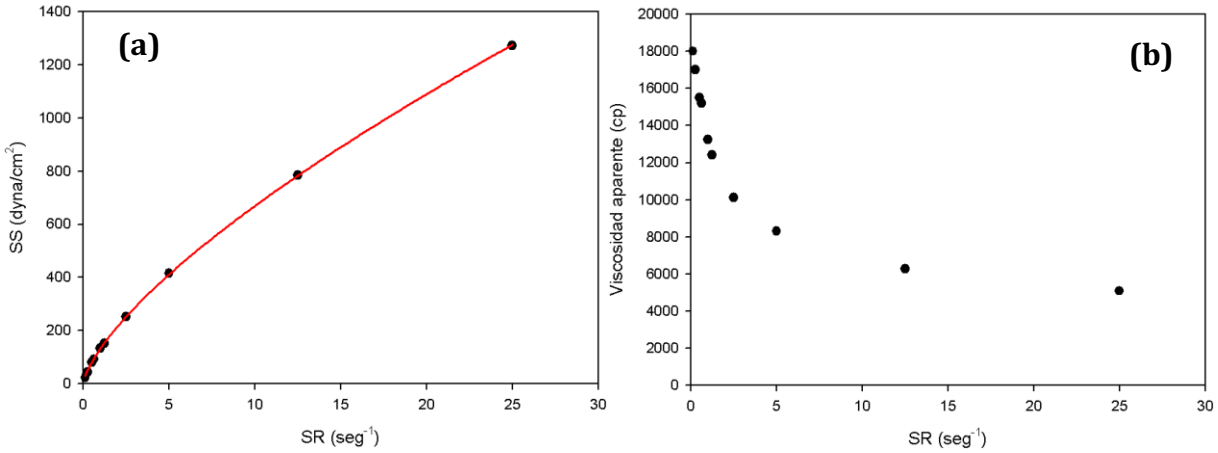



**Fig 3.10. Curvas de fluidez (a) y de viscosidad (b) de G-GRI-COP**

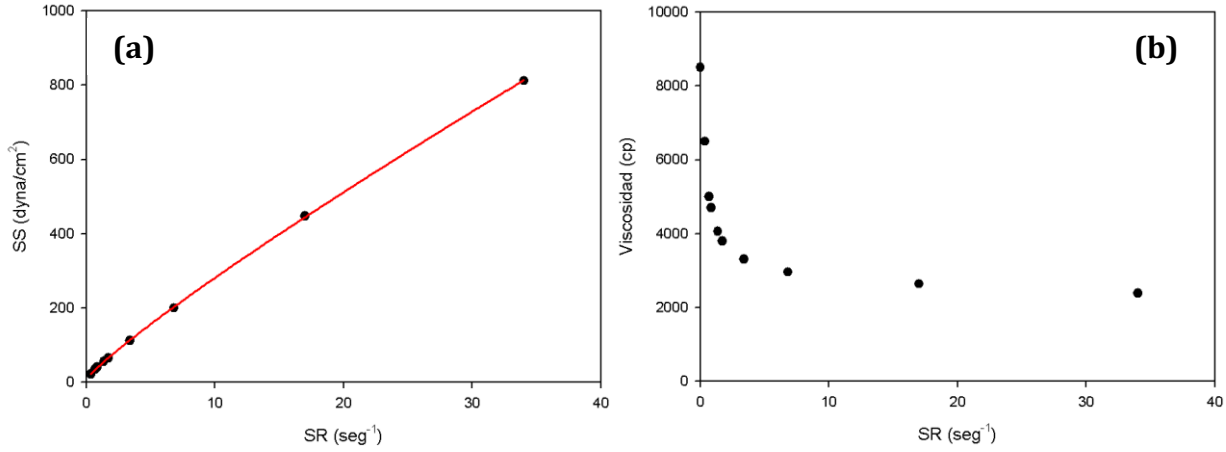



**Fig 3.11. Curvas de fluidez (a) y de viscosidad (b) de G-GRI-QTO**

Ninguno de los sistemas gel exhibió una relación lineal en las curvas de fluidez y de viscosidad, lo que demuestra un comportamiento no newtoniano. En particular, se observa

en las gráficas que las curvas de fluidez arrojan gráficos de naturaleza hiperbólica y que la viscosidad disminuye en función del esfuerzo de cizalla aplicado, ambas situaciones correspondientes a fluidos no newtonianos reofludificantes[36].

Los geles poliméricos preparados son producto del entrecruzamiento de cadenas poliméricas, por la formación de enlaces no covalentes (entrecruzamiento físico). En general, su comportamiento reológico se explica en función del "desarme" de sus estructuras "en ovillo" al estado de reposo hacia estructuras alineadas hacia la dirección del flujo determinado por el esfuerzo de cizalla, con una menor interacción entre las cadenas de polímeros adyacentes, lo que aumenta la movilidad de las mismas, originando, por lo tanto, una menor viscosidad[39] (Fig 3.12). El comportamiento de los geles elaborados corresponde a lo reportado por la bibliografía[40-43].

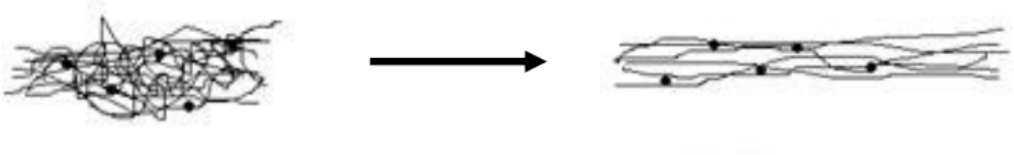


**Fig 3.12. Visualización de las cadenas poliméricas en reposo y alineadas en función de la dirección del flujo en geles poliméricos físicos**

En las figuras 3.13. a 3.19. se muestran las curvas de fluidez y viscosidad correspondientes a los sistemas emulsionados (cremas y emulgeles):

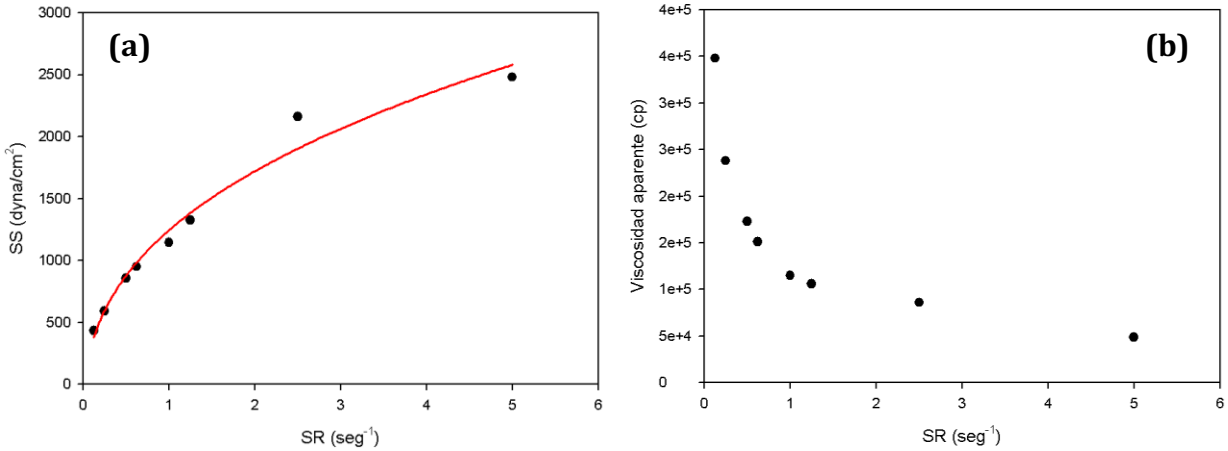



**Fig 3.13. Curvas de fluidez (a) y de viscosidad (b) de C-KTO**

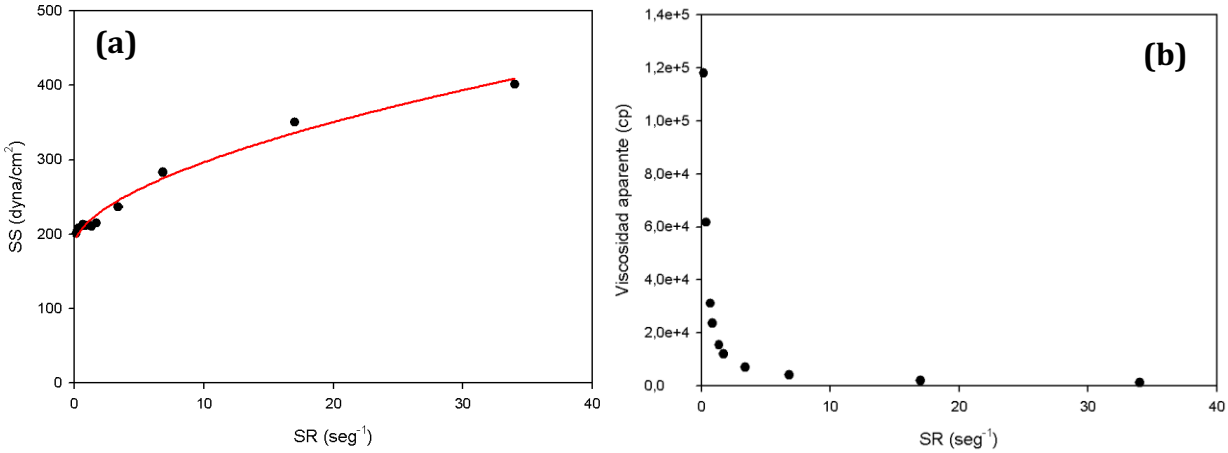



**Fig 3.14. Curvas de fluidez (a) y de viscosidad (b) de E-KTO-COP**

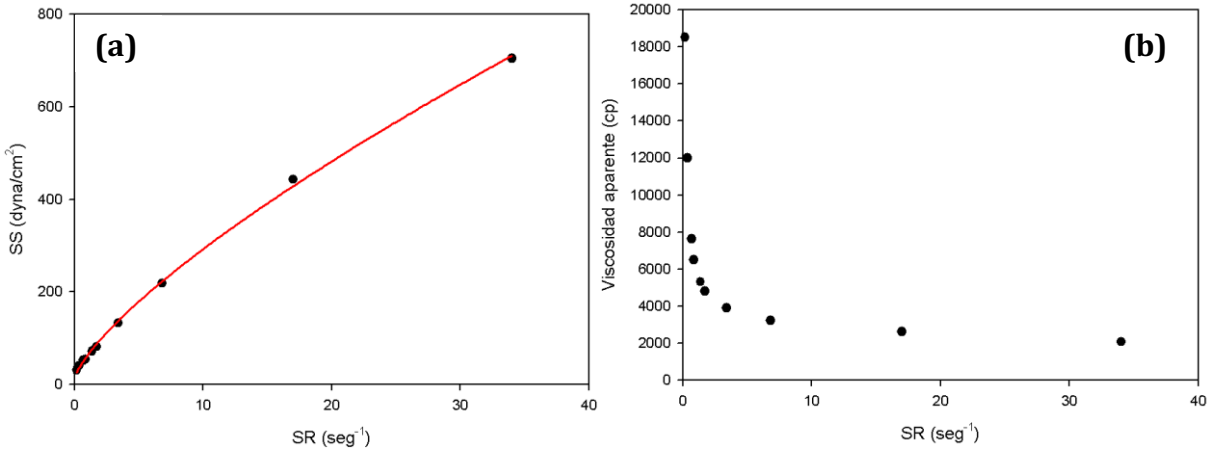



**Fig 3.15. Curvas de fluidez (a) y de viscosidad (b) de E-KTO-QTO**

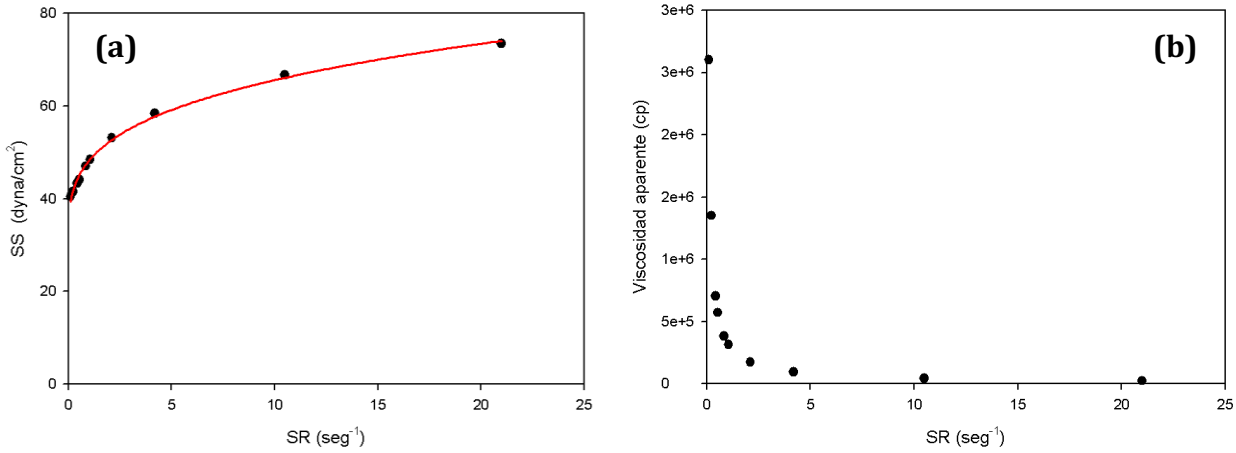



**Fig 3.16. Curvas de fluidez (a) y de viscosidad (b) de E-KTO-P407**

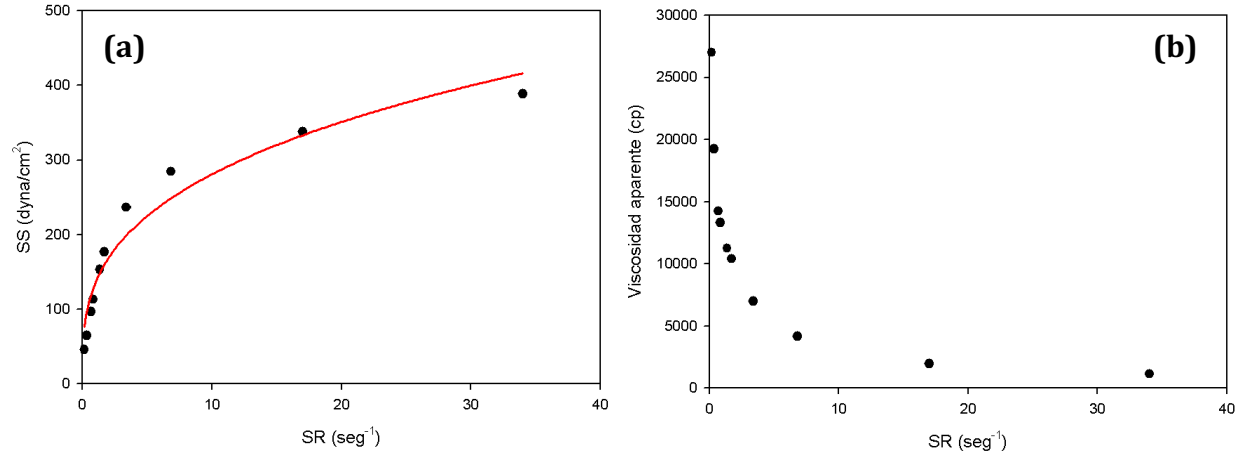



**Fig 3.17. Curvas de fluidez (a) y de viscosidad (b) de C-GRI**

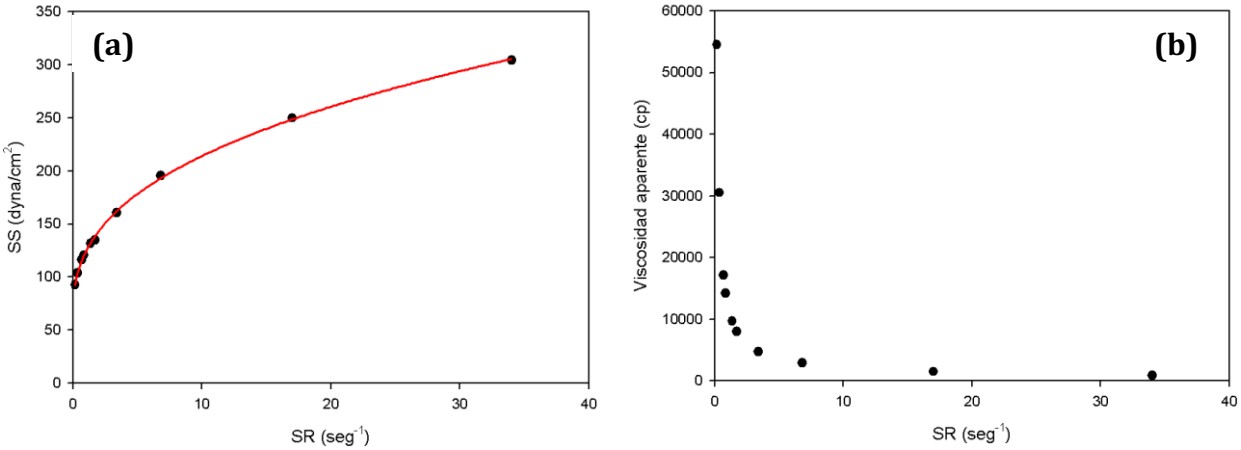



**Fig 3.18. Curvas de fluidez (a) y de viscosidad (b) de E-GRI-COP**

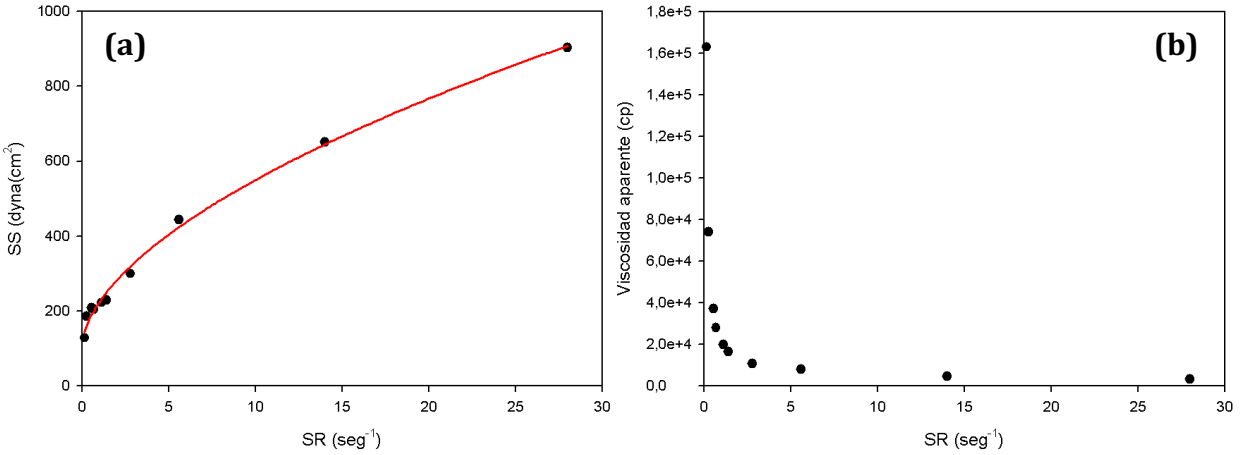



**Fig 3.19. Curvas de fluidez (a) y de viscosidad (b) de E-GRI-QTO**

En las emulsiones (tanto las emulsiones convencionales como los emulgeles) el comportamiento reológico obtenido es coincidente con descripto en la bibliografía. Las gotas de fase interna (esféricas, en su concepción teórica) comienzan a formar capas alineadas en la dirección del flujo en función del esfuerzo de cizalla aplicado y terminan deformándose a medida que aumenta dicho esfuerzo hacia formas elipsoidales, coincidentes con el plano de corte, ofreciendo, por lo tanto, menor resistencia al flujo y menor viscosidad[20] (fig 3.20.). Adicionalmente, en los emulgeles, también se produce la deformación de las cadenas poliméricas presentes en la fase externa, tal como se describió anteriormente para los sistemas gelificados.

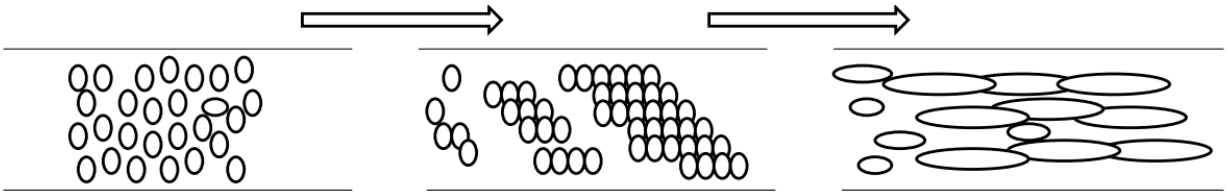


**Fig 3.20. Esquematización de la deformación de los glóbulos de fase interna de una emulsión debida a esfuerzos de cizalla**

Otra característica observada en todos los sistemas, en mayor o menor medida, es que no comenzaron a fluir inmediatamente (las curvas no parten del origen), sino que requirieron superar un determinado valor de esfuerzo de cizalla aplicado para comenzar a fluir. Este comportamiento se describe, dentro del campo de la Reología, como sistemas plásticos, en donde para esfuerzos de cizalla menores a un valor determinado el sistema actúa como un sólido elástico y no sufre deformaciones significativas. El valor a partir del cual el sistema comienza a experimentar variación en su viscosidad se conoce como límite de fluencia (umbral de fluencia, tensión de fluencia, "yield stress") y se representa como $\tau_0$, y se debe fundamentalmente a fuerzas de van der Waals intercatenarias poliméricas (en el caso de los geles), interglobulares (en el caso de las emulsiones), o ambos (en el caso de los emulgeles), las cuales deben superarse para que se inicie el flujo del sistema[20,26].

Para asignar el modelo reológico, se ajustaron los datos obtenidos a las diversas ecuaciones ya mencionadas en Materiales y Métodos (tabla 3.4.)

| | $r^2$ Modelo Ostwald De Waele | $r^2$ Modelo Casson | $r^2$ Modelo Herscheld Bulkley | $r^2$ Modelo Bingham |
|---|---|---|---|---|
| **G-KTO-COP** | 0,9994 | 0,9642 | 0,9993 | 0,9500 |
| **G-KTO-QTO** | 0,9953 | 0,9991 | 0,9995 | 0,9986 |
| **G-KTO-P407** | 0,9675 | 0,8706 | 0,9635 | 0,7062 |
| **G-GRI-COP** | 0,9999 | 0,9861 | 0,9999 | 0,9798 |
| **G-GRI-QTO** | 0,9997 | 0,9997 | 0,9999 | 0,9977 |
| **E-KTO-COP** | 0,8909 | 0,9775 | 0,9788 | 0,9294 |
| **E-KTO-QTO** | 0,9983 | 0,9970 | 0,9989 | 0,9855 |
| **E-KTO-P407** | 0,9796 | 0,9575 | 0,9950 | 0,8371 |
| **E-GRI-COP** | 0,9892 | 0,9732 | 0,9942 | 0,8941 |
| **E-GRI-QTO** | 0,9834 | 0,9850 | 0,9943 | 0,9517 |
| **C-KTO** | 0,9667 | 0,9438 | 0,9643 | 0,8694 |
| **C-GRI** | 0,9430 | 0,7884 | 0,9350 | 0,7206 |

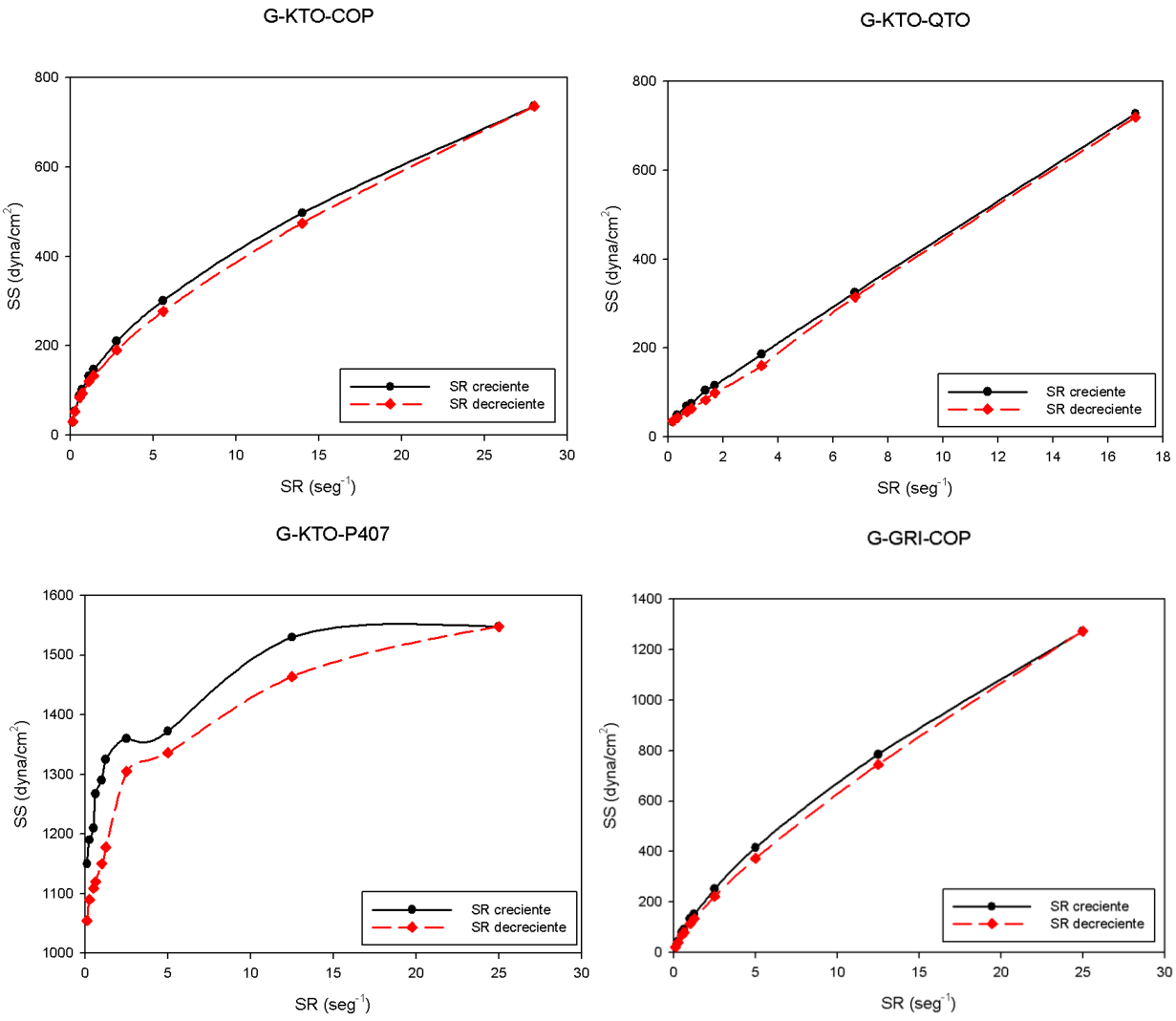
**Tabla 3.4. Valores de $r^2$ para los diferentes modelos reológicos considerados**

Las curvas de flujo de todos los sistemas ajustaron al modelo de Herscheld Bulkley, que se aplica habitualmente a sistemas no newtonianos que presentan tensión de fluencia. Involucra, además del valor de tensión de fluencia, el índice de consistencia (k), vinculado a la viscosidad, y el índice de flujo (n), que indica el grado en que el material no cumple con el flujo newtoniano (n=1). Para los fluidos Herschel-Bulkley (también llamados viscoplásticos), n siempre es mayor o menor a 1. Si $n < 1$, el fluido es reofluidificante, lo que significa que su viscosidad aparente disminuye a medida que aumenta la velocidad de corte; por el contrario, si $n > 1$, el fluido es reoespesante (aumenta su viscosidad aparente con el aumento de la velocidad de corte)[36,44]. Los valores del índice de flujo fueron inferiores a 1 en todos los casos, lo que indica que se trata de sistemas reofluidizantes, en consonancia con los perfiles obtenidos en las curvas de fluidez y de viscosidad.

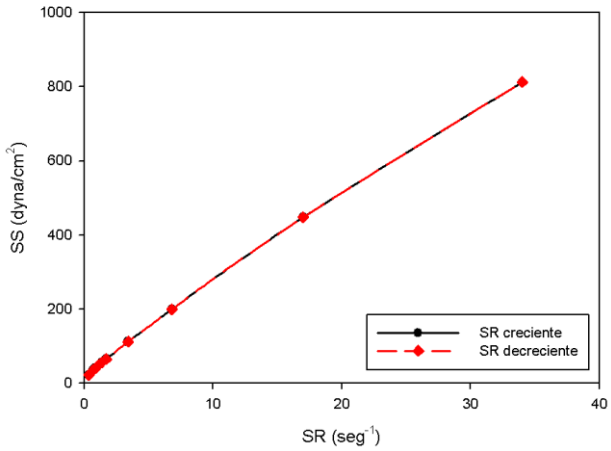
Las formulaciones más o menos semisólidas para aplicación dérmica con propiedades plásticas presentan flujo nulo y son viscosas en condiciones estáticas (lo que favorece su estabilidad), pero se vuelven más fluidas al ejercer fricción para su aplicación. Este

comportamiento resultante es útil para mejorar la aplicación y el área de extensión del semisólido sobre la piel[45].

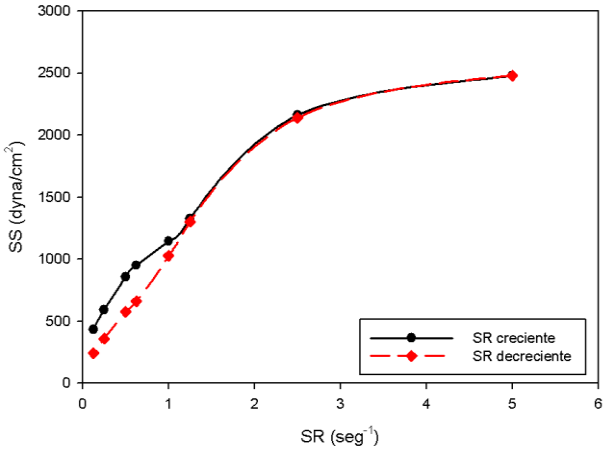
A fin de completar los estudios reológicos, se analizó el comportamiento de cada sistema desacelerando la velocidad de cizalla aplicada una vez llegada a la velocidad máxima de 100 rpm. De esa forma se obtuvieron los gráficos de fluidez con una curva ascendente (de 0 a 100 rpm) y descendente (de 100 a 0 rpm), que se muestran en las figuras 3.21.



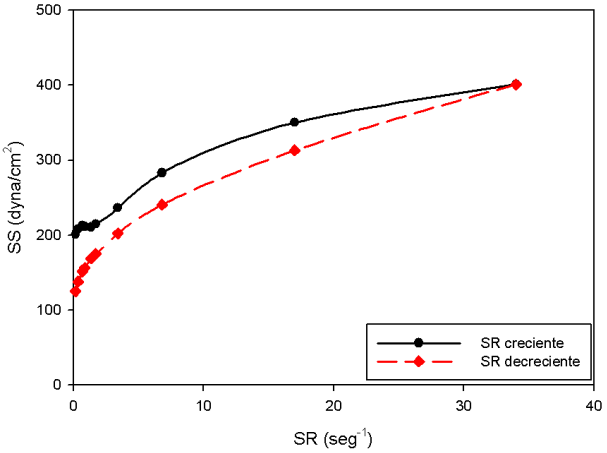
G-GRI-QTO



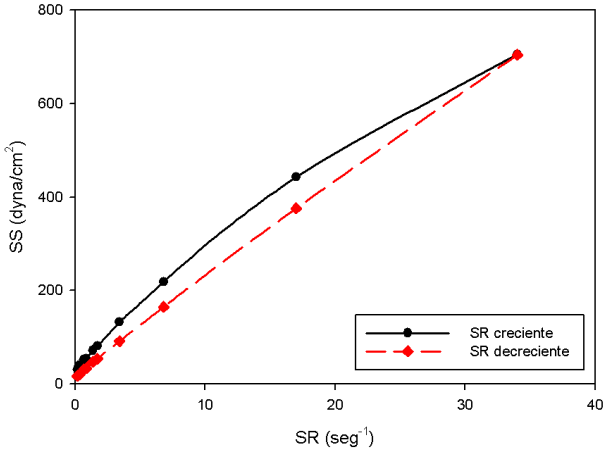

C- KTO



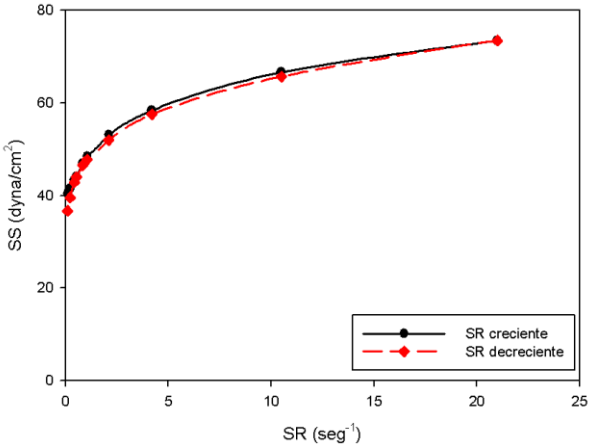

E-KTO-COP




E-KTO-QTO




E-KTO-P407



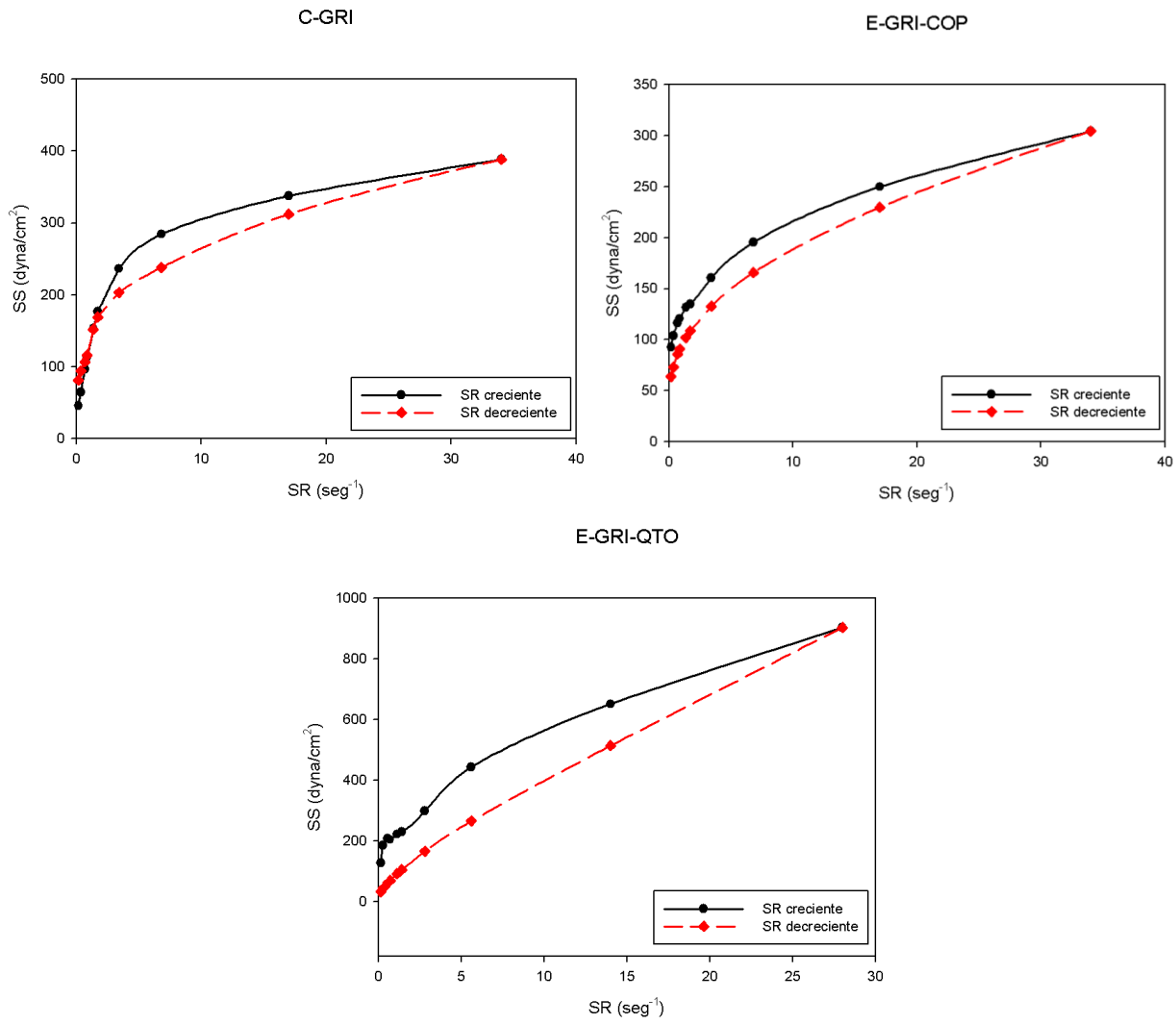



**Fig 3.21. Curvas de fluidez de los sistemas en función de SR crecientes y decrecientes**

Al analizar las curvas ascendentes y descendentes obtenidas, se observa en la mayoría de los sistemas (excepto en G-GRI-QTO) que ambas ramas no coinciden, total o parcialmente, ubicándose la rama descendente por debajo de la rama ascendente. Esto indica que, siempre o en algún momento del ensayo, a igual velocidad de cizallamiento la viscosidad del sistema es menor en la curva descendente que en la curva ascendente. Esta situación es consistente con una condición que presentan algunos sistemas no newtonianos reofluidizantes, conocida como Tixotropía, y que se define como la recuperación isotérmica y relativamente lenta de la viscosidad de un sistema perdida por cizallamiento, al dejar reposar ese sistema[36]. Dicho de otra forma, la ruptura de la microestructura del sistema producida por el cizallamiento aplicado no se recupera inmediatamente cuando se

disminuye la velocidad de cizalla aplicada. Se observa también que en algunos sistemas el final de la curva descendente no coincide con el inicio de la curva ascendente, lo cual implica que el sistema no recupera su estructura original al retirar el esfuerzo aplicado; este comportamiento posiblemente se explica por los tiempos del ensayo realizado; probablemente, si el sistema no ha sufrido deformación permanente, con mayor tiempo alcance los valores de viscosidad originales.

El área encerrada por ambas curvas se denomina bucle de histéresis, área de histéresis o lazo de histéresis[35]. El área de histéresis puede considerarse como una estimación cuantitativa del grado de tixotropía que presenta un sistema, y generalmente se admite que cuanto mayor es el área de histéresis, más fuertes son las propiedades tixotrópicas del mismo[36,46]. En tabla 3.5. se muestran los valores del Indice de tixotropía (α) calculado a partir de las gráficas para cada uno de los sistemas.

| Sistema | α |
|---|---|
| **C-KTO** | 4,31 |
| **G-KTO-COP** | 3,40 |
| **G-KTO-QTO** | 3,24 |
| **G-KTO-P407** | 23,32 |
| **E-KTO-COP** | 8,93 |
| **E-KTO-QTO** | 10,3 |
| **E-KTO-P407** | 1,10 |
| **C-GRI** | 6,88 |
| **G-GRI-COP** | 3,73 |
| **G-GRI-QTO** | 0,00 |
| **E-GRI-COP** | 7,70 |
| **E-GRI-QTO** | 17,88 |

**Tabla 3.5. Índice de tixotropía (α) calculado para los sistemas en estudio**

El comportamiento tixotrópico es una ventaja en las formulaciones semisólidas tópicas, favoreciendo la aplicación, ya que la viscosidad de la formulación disminuye con la fricción,

mejorando su extensibilidad; al detener la fricción la viscosidad aumenta (más o menos rápidamente según el sistema), mejorando la retención en la piel[47].

### 3.4.6. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *in vitro* DE KTO Y GRI INCLUIDO EN LAS FORMULACIONES ELABORADAS

Se evaluó la actividad antifúngica in vitro frente a *Candida parapsillosis* de las formulaciones elaboradas con KTO, empleando como controles una solución de KTO en DMSO y una crema comercial. En la figura 3.22. se muestran la placa de viabilidad del inóculo, las placas control y las placas de inhibición de crecimiento de los sistemas en ensayo al cabo de 48 hs.

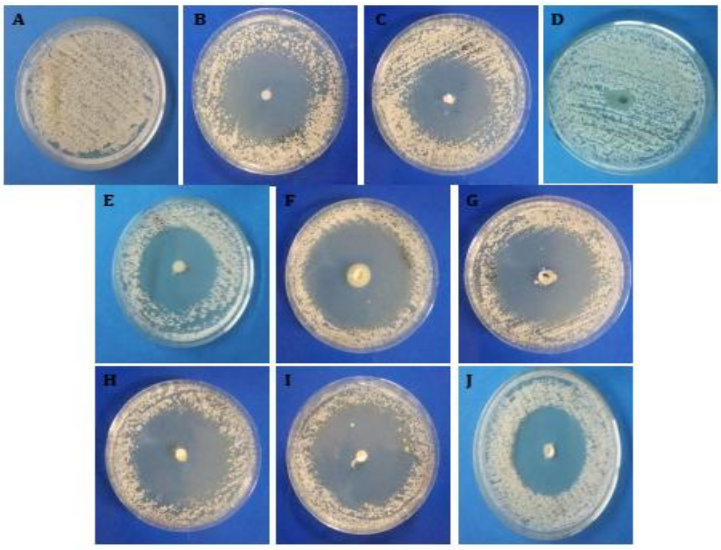



**Fig 3.22. (A) Control de viabilidad del inóculo; (B) Solución KTO; (C) Crema KTO; (D) QTO; (E) G-KTO-COP; (F) G-KTO-QTO; (G) G-KTO-P407; (H) E-KTO-COP; (I) E-KTO-QTO; (J) E-KTO-P407**

El gel conteniendo QTO sin KTO mostró una pequeña zona de inhibición, que puede explicarse en función de las propiedades antifúngicas de este polímero sobre levaduras, previamente reportadas. Un posible mecanismo para estas propiedades es la reacción entre los grupos amino protonados del QTO con moléculas de la superficie microbiana cargadas negativamente[48,49].

En las fig 3.23. se muestra el análisis estadístico comparativo de los halos de inhibición obtenidos para los sistemas en estudio conteniendo KTO frente a una solución de KTO (a) y a la crema de referencia (b) usados como control.

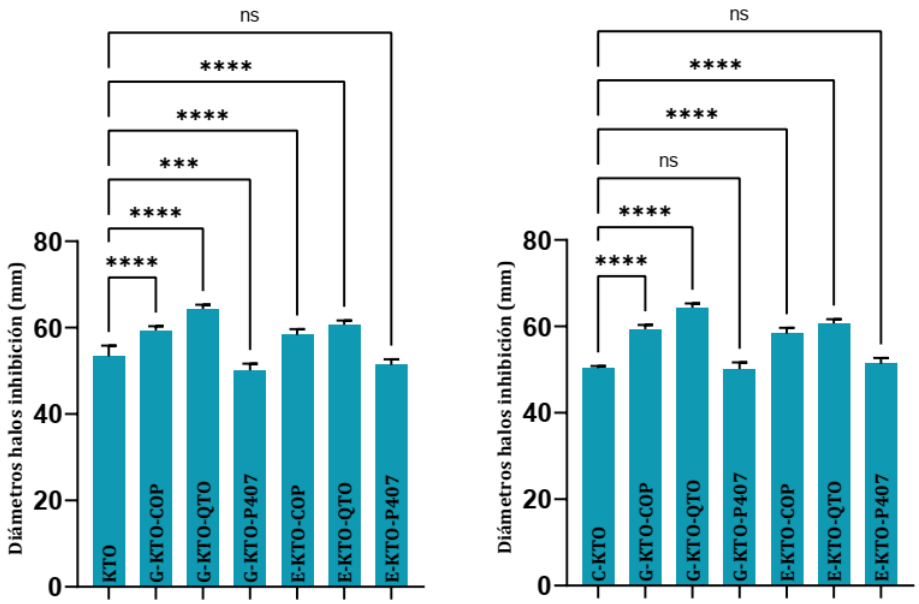



**Fig 3.23. Comparación de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos con los sistemas en estudio conteniendo KTO [ns: p>0,05; (*): p≤0,05; (**): p≤0,01; (***): p≤0,001; (****): p≤ 0,0001]**

Todos los sistemas en estudio fueron capaces de inhibir el crecimiento de C. parapsillosis, lo que es una evidencia indirecta de su capacidad para ceder el IFA.

Con respecto a la solución de KTO empleado como control, los sistemas conteniendo P407 presentaron menores halos de inhibición, posiblemente debido a la gran viscosidad que presentan, factor que retrasa la difusión del IFA dentro de la matriz, por lo que se obtuvo una inhibición menor dentro de los tiempos del ensayo. El resto de los sistemas presentaron mayores halos de inhibición que la solución control ($p < 0,05$), particularmente los sistemas que contienen QTO, en donde la mayor difusión alcanzada puede atribuirse a tres factores:

- efecto sumatorio de la actividad antifúngica de QTO;
- estas formulaciones presentan un pH ligeramente ácido, al cual KTO es más soluble, sumándose la mayor solubilidad de KTO a pH ácido y la capacidad incorporadora de QTO
- menor viscosidad de las fórmulas, que permiten una difusión más rápida del IFA

Con respecto a la crema comercial empleada como control, la misma presentó un halo de inhibición menor que la solución de KTO, lo que se atribuye a la presencia del IFA suspendido en la base. Los sistemas conteniendo P407 no presentaron diferencias significativas con respecto a la crema control, posiblemente por la viscosidad que presentan (la crema control tiene una viscosidad relativamente alta). El resto de los sistemas presentaron mayores halos de inhibición ($p < 0,05$), en especial QTO, por los motivos ya explicados anteriormente.

De manera similar, se evaluó la actividad antifúngica in vitro frente a *Tricophyton mentagrophytes* de las formulaciones elaboradas con GRI, empleando como controles una solución de GRI en DMSO y la crema de GRI elaborada con excipientes convencionales.
En la figura 3.24. se muestran las placas de viabilidad del inóculo, las placas control y las placas de inhibición de crecimiento de los sistemas en ensayo al cabo de 4 días

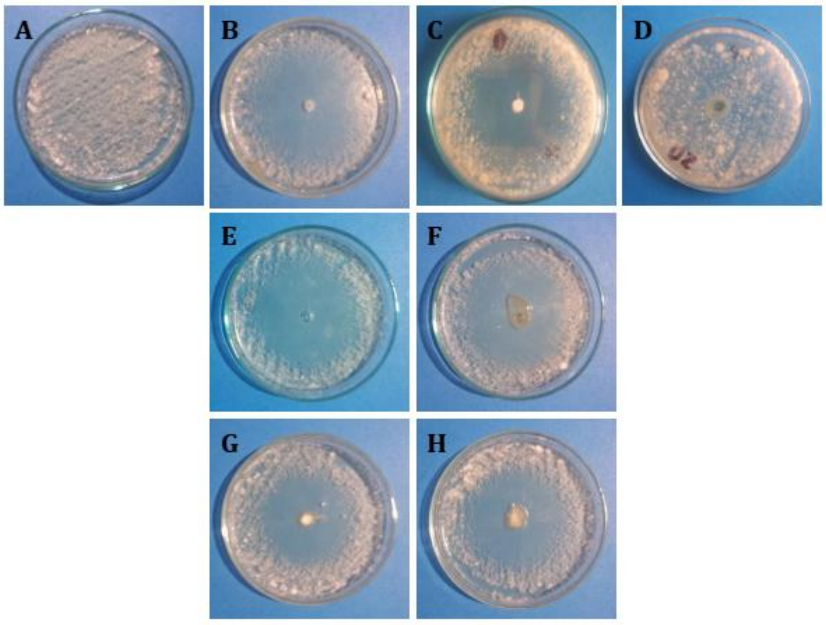



**Fig 3.24. (A) Control de viabilidad del inóculo; (B) Solución GRI; (C) Crema GRI; (D) QTO; (E) G-GRI-COP; (F) G-GRI-QTO; (G) E-GRI-COP; (H) E-GRI-QTO**

El gel conteniendo QTO sin carga de KTO mostró una pequeña zona de inhibición, que puede explicarse en función de las propiedades antifúngicas de este polímero sobre dermatofitos previamente reportadas[50].

En las fig 3.25. se muestra el análisis estadístico comparativo de los halos de inhibición obtenidos para los sistemas en estudio conteniendo GRI frente a una solución de GRI (a) y a la crema de referencia (b) usados como control.

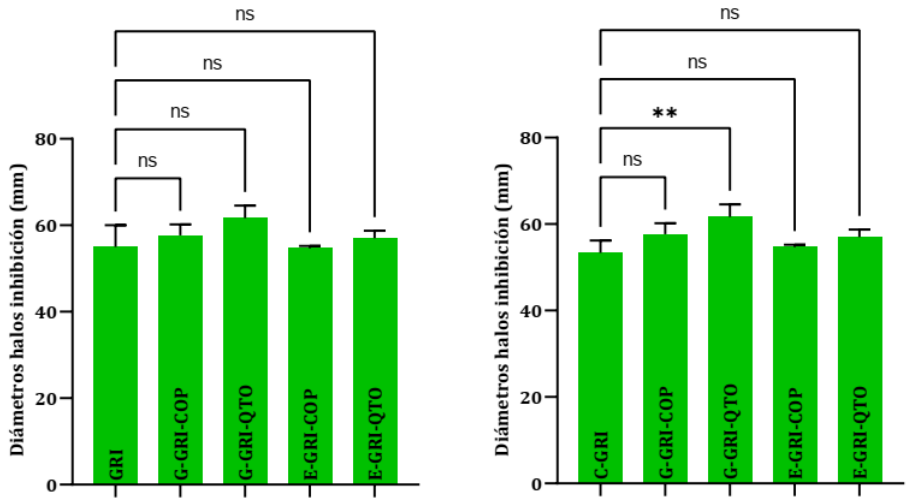



**Fig 3.25. Comparación de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos con los sistemas en estudio conteniendo GRI [ns: p>0,05; (**): p≤0,01]**

Con respecto a la solución control de GRI, ninguno de los sistemas en ensayo presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en sus halos de inhibición. Nuevamente, los sistemas conteniendo QTO presentaron los mayores halos, que podemos explicar en función de la actividad antifúngica de QTO y la menor viscosidad del gel y del emulgel.

Con respecto a la crema empleada como control, sólo el gel en base a QTO presentó una diferencia significativa ($p < 0,05$), presentando el mayor halo de inhibición comparado con la crema control.

# CAPÍTULO 3 - CONCLUSIONES

⇒ Todos los sistemas ensayados, así como las cremas empleadas como control, mostraron valores de pH dentro del rango establecido para formulaciones de aplicación dérmica.

⇒ El signo de las emulsiones (cremas y emulgeles) verificado por el método de colorantes fue el correspondiente al diseño planteado (emulsiones O/A).

⇒ Los factores de extensibilidad de los sistemas en estudio fueron acordes a lo reportado en la bibliografía para formas farmacéuticas semisólidas. Los geles en base a QTO presentaron altos valores de Fe, en coincidencia con su aspecto más fluido, lo que los hace más apropiados como tales para ser empleados en formulaciones líquidas viscosas.

⇒ Los valores de viscosidad aparente, determinados a 2,5 rpm con husillo 29, fueron coincidentes con el aspecto físico de las formulaciones y mostraron una relación inversa al factor de extensibilidad.

⇒ El comportamiento reológico de las formulaciones control y en estudio, analizado a través de las curvas de fluidez y de viscosidad, fue de tipo no newtoniano reofluidizante, en concordancia con lo reportado en la bibliografía, tanto para los geles como para los sistemas emulsivos. Todos los sistemas presentaron tensión de fluencia, característico de los sistemas reofluidizantes plásticos, mayor para aquéllos sistemas de mayor viscosidad, y ajustaron matemáticamente al modelo Herscheld-Bulkley, que se aplica habitualmente a sistemas no newtonianos que presentan tensión de fluencia. A excepción del sistema G-GRI-QTO, todos las demás formulaciones presentaron tixotropía en diversa magnitud, según las condiciones del ensayo.

⇒ Todas las formulaciones conteniendo KTO y GRI fueron capaces de inhibir el crecimiento de *C. parapsillosis* y de T. mentagrophytes respectivamente, evidencia indirecta de una adecuada liberación de los IFAs a partir de las formulaciones. Las formulaciones conteniendo QTO mostraron mayores halos de inhibición, en función de las propiedades antifúngicas propias de este polímero

# CAPÍTULO 3 - CONCLUSIONES

⇒ Considerando estos resultados es posible concluir que todas las formulaciones mostraron características adecuadas para su administración por vía dérmica, con una actividad antifúngica adecuada en comparación con una solución del IFA empleada como control.

# CAPÍTULO 3 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1-Pharmasalmanac [sede Web]. Nueva York: David Alvaro, Ph.D. ed; [acceso 05/07/2018]. Trends in the Topical Delivery of Dermatology Medications [1 pantalla]. Disponible en: https://www.pharmasalmanac.com/articles/trends-in-the-topical-delivery-of-dermatology-medications

2-Williams AC. Topical and Transdermal Drug Delivery. En: Aulton ME, Taylor KMG (eds). Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines. 4º ed. China: Churchill Livingstone Elservier; 2013. p. 675-697.

3-Surber C, Smith EW. The Mystical Effects of Dermatological Vehicles. Dermatology. 2005; 210:157–168.

4-Jankowski A, Dyja R, Sarecka-Hujar B. Dermal and Transdermal Delivery of Active Substances from Semisolid Bases. Indian J. Pharm. Sci. 2017; 79(4):488-500.

5-Gupta P, Garg S. Recent Advances in Semisolid Dosage Forms for Dermatological Application. Pharm. Technol. 2002: 144-162.

6-Garcês A, Amaral MH, Sousa Lobo JM, Silva AC. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. Eur. J. Pharm. Sci. 2018; 112:159–167.

7-Ricciatti-Sibbald D, Sibbald RG. Dermatologic Vehicles. Clin. Dermatol. 1989; 7(3):11-24.

8-Mayba JN, Gooderham MJ. A Guide to Topical Vehicle Formulations. J. Cutan. Med. Surg. 2018; 22(2):207–212.

9-Juvé J, Viscasillas A, del Pozo A. Geles en Dermofarmacia: Conceptos generales y elementos para su formulación. Aula de la Farmacia. 2007: 58 – 68.

10-Chambers Fox S. Drug Delivery to the Skin. Remington Education. Pharmaceutics. Londres: Pharmaceutical Press; 2014. p 401-430.

11-Ajazuddin, Alexander A, Khichariya A, Gupta S, Patel RJ, Giri TK et al. Recent Expansions in an Emergent Novel Drug Delivery Technology: Emulgel. J Control Release. 2013; 171(2):122-32.

12-Panwar AS , Upadhyay N, Bairagi M, Gujar S, Darwhekar GN, Jain DK. Emulgel: A review. Asian J. Pharm. Life Sci. 2011; 1(3):333-343.

13-3V Sigma S.P.A. División Cosmética. Informe técnico. Polygel W30®. Bérgamo (Italia); Edición 1/1.

# CAPÍTULO 3 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

14-Bonferoni MC, Giunchedi P, Scalia S, Rossi S, Sandri G, Caramella C. Chitosan Gels for the Vaginal Delivery of Lactic Acid: Relevance of Formulation Parameters to Mucoadhesion and Release Mechanisms. AAPS PharmSciTech. 2006; 7 (4) Article 104 (http://www.aapspharmscitech.org).

15-Schmolka IK. Artificial Skin I. Preparation and properties of Pluronic F-127 gels for treatment of burns. J. Biomed. Mater. Res. 1972; 6:571:582.

16-Alía Fernández Montes E. Control de calidad de fórmulas dermatológicas. Farmacia Profesional. 2003; 17(2):70-75.

17-Molinero Leyva MJ, García Gámiz ML. Control de calidad del producto terminado. En Formulación magistral: Prácticas de laboratorio. 1º ed. Madrid: Ediciones Paraninfo S.A.; 2014. p. 229-230.

18-Garg A, Aggarwal D, Garg S, Singl AK. Spreading of Semisolid Formulations An Update. Pharm Tech. 2002; 84:105.

19-Kessler Nunes Deuschle VC , Deuschle RAN, Rocha Bortoluzzi M, Athayde ML. Physical chemistry evaluation of stability, spreadability, in vitro antioxidant, and photo-protective capacities of topical formulations containing Calendula officinalis L. leaf extract. Braz. J. Pharm. Sci. 2015; 51(1):63-75.

20-Padilha Vianna-Filhoa R, Oliveira Petkowicz CL, Meira Silveira JL. Rheological characterization of O/W emulsions incorporated with neutral and charged polysaccharides. Carbohydr. Polym. 2013; 93:266–27.

21-More Solutions to Sticky Problems: A guide to getting more from your Brookfield Viscosimeter& Rheometer. AMETEK Brookfield, Inc. ©2017.

22-Benchabane A, Bekkour K. Rheological properties of carboxymethylcellulose (CMC) solutions. Colloid Polym Sci. 2008; 286:1173–1180.

23-Rodero L, Córdoba S , Vivot W , Campo M, Corfield P, Olguín C et al. Método de difusión con discos para la determinación de sensibilidad a fluconazol en aislamientos de Candida spp. Rev. Argent. Microbiol. 2006; 38: 155-163.

24-Badawi AA, Sakran WS, Ramadan MA, El-Mancy SMS. Improvement of the microbiological activity of topical ketoconazole using microemulsion systems. J. Drug Del. Sci. Tech. 2012; 22(6): 473-478.

# CAPÍTULO 3 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

25-Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal Disk Diffussion Susceptibility Testing of Yeasts M-44. 3ed Ed. Diciembre 2018.

26-Agarwal RK, Gupta S, Mittal G, Khan F, Roy S, Agarwal A. Antifungal Susceptibility Testing of Dermatophytes by Agar Based Disk Diffusion Method. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2015; 4(3): 430-436.

27-Nweze EI, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Agar-Based Disk Diffusion Assay for Susceptibility Testing of Dermatophytes. J. Clin. Microbiol. 2010; 48(10): 3750–3752.

28-Maha HL, Sinaga KR, Masfria. Formulation and evaluation of miconazole nitrate nanoemulsion and cream. Asian J. Pharm. Clin. Res. 2018; Vol 11(3): 319-321.

29-Citra Ariani Edityaningrum K, Feby Zulien LW. Optimization of water fraction gel formula of Binahong Leaf (Anredera cordifolia (Ten.) Steen) with gelling agent of Sodium Alginate and Carboxymethyl Chitosan Combination. Trad. Med. J.2018; 23(3):97-105.

30-Ministerio de Salud de la Nación. Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos. Farmacopea Argentina. 7º ed. Volumen II, p. 123.

31-European Pharmacopoeia 8th Edition, July 2013. Chapter 4 Reagents.

32-Chen MX, Alexander KS, Baki G. Formulation and evaluation of antibacterial creams and gels containing metal ions for topical application. Pharmaceutics. Vol 2016, Article ID 5754349, 10 pages.

33-Debebe D, Gabriel T, Brhane Y, Temesgen A, Nigatu M, Marew T. Comparative in vitro evaluation of brands of clotrimazole cream formulations marketed in Ethiopia. J. Drug Deliv. Ther. 2018; 8(1):17-22.

34-Ramanauskienė K, Inkėnienė AM, Leskauskaitė D. Modeling of the composition of a semisolid propolis preparation, and evaluation of its quality. FARMACIA. 2012; Vol 60(4):535-543.

35-Lee CH, Moturi V, Lee Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. J. Control. Release. 2009;136: 88–98.

36-Martin A. Rheology. En Sinko PJ, Singh Y (eds). Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 6º ed. China; Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 469-491.

37-El-Houssieny EM, Hamouda HM. Formulation and evaluation of clotrimazole from Pluronic F127 gels. Drug Discov. Ther. 2010; 4(1):33-43.

38-Mangas-Sanjuán V, Pleguezuelos-Villa M, Merino-Sanjuán M, Hernández MJ, Nácher A, García-Arieta A et al. Assessment of the inter-batch variability of microstructure parameters in topical semisolids and impact on the demonstration of equivalence. Pharmaceutics 2019, 11, 503.

39-López-Castejón ML, Bengoechea C, López Collado S, Aguilar JM. Propiedades reológicas y microestructurales de geles prebióticos de Inulina. Afinidad [online]. 2020; 77(591):175-181. Disponible en https://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/377163 [acceso 15-10-2021].

40-De La Paz N, Pérez D, Fernández M, Soler DM, Rodríguez Y, Nogueira A. Estabilidad física de bases emulsionadas e hidrosolubles con quitosana y acetato de quitosana. J. Pharm. Pharmacogn. Res. 2017; 5(5):288-300.

41-El-hefian EA, Yahaya AH. Rheological study of chitosan and its blends: An overview. Maejo Int. J. Sci. Technol. 2010; 4(02), 210-220.

42-Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A Review of Poloxamer 407: Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. Pharm. Res. 2006; 26(12):2709-2728.

43-Park E-K, Song K-W. Rheological Properties of Poloxamer 407 Solutions and Gels. Annual Transactions of the Nordic Rheology Society. 2011; 19.

44-Brookfield DV-II+PRO Viscosimeter. Operating instructions. Manual M03-165-F0612. Brookfield Engineering Lab. Inc., Middleboro, U.S.A.

45-Alam S, Algahtani MS , Ahmad MZ, Ahmad J. Investigation Utilizing the HLB Concept for the Development of Moisturizing Cream and Lotion: In-Vitro Characterization and Stability Evaluation. Cosmetics 2020, 7, 43; www.mdpi.com/journal/cosmetics

46-Benchabane A, Bekkour K. Rheological properties of carboxymethylcellulose (CMC) solutions. Colloid Polym Sci. 2008; 286:1173–1180.

47-Berenguer D , Alcover MM , Sessa M , Halbaut L , Guillén C , Boix-Montañés A et al. Topical Amphotericin B Semisolid Dosage Form for Cutaneous Leishmaniasis: Physicochemical Characterization, Ex Vivo Skin Permeation and Biological Activity. Pharmaceutics. 2020, 12, 149; www.mdpi.com/journal/pharmaceutics

48-Palmeira-de-Oliveira A, Ribeiro MP, Palmeira-de-Oliveira R, Gaspar C, Costa-de-Oliveira S, Correia IJ et al. Anti-*Candida* Activity of a Chitosan

Hydrogel: Mechanism of Action and Cytotoxicity Profile. Gynecol. Obstet. Invest. 2010;70:322–327.

49-Jiménez Mejía R, Arceo Martínez MT, Loeza Lara PD. Quitosano: actividad antimicrobiana y mecanismos de acción. e-CUCBA (Publicación de la Universidad de Guadalajara). 2018; 9:17-23.

50-Ribeiro Lópes AI. Application of chitosan in the control of fungal infections by dermatophytes [tesis doctoral]. Porto (Portugal): Universidad Católica Portuguesa; 2013.

# CAPÍTULO 4

# ENSAYOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

## CAPÍTULO 4 - ÍNDICE

**Objetivos específicos** 153

**Lista de abreviaturas y símbolos** 154

**Índice de figuras** 155

**Índice de tablas** 156

**Índice de ecuaciones** 157

**Introducción**

4. Liberación de IFAs a partir de formas farmacéuticas semisólidas 158

4.1. Modelos matemáticos de liberación de IFAs 158

4.1.1. Modelos difusionales 158

4.1.1.1. Primera ley de Fick 158

4.1.1.2. Segunda ley de Fick 158

4.1.2. Modelo cinético de orden cero 159

4.1.3. Modelo cinético de primer orden 159

4.1.4. Modelo Higuchi 159

4.1.5. Modelo de Korsemeyer-Peppas 161

4.2. Métodos para la cuantificación de la liberación de IFAs *in vitro* 162

4.2.1. Equipos 162

4.2.1.1. Celdas de difusión 162

4.2.2. Membranas 163

4.2.3. Medio receptor 164

4.2.4. Temperatura 165

4.2.5. Velocidad de agitación 165

4.2.6. Aplicación de la dosis 165

4.2.7. Muestreo 166

**Materiales y Métodos**

4.2. Materiales 168

## CAPÍTULO 4 - ÍNDICE


4.3. Métodos 168
4.3.1. Ketoconazol 168
4.3.1.1. Selección de parámetros para ELIV 168
4.3.1.1.1. Ensayos preliminares 168
4.3.1.1.2. Selección de la velocidad de agitación, de la membrana y del medio receptor 169
4.3.1.2. Ensayos de liberación *in vitro* KTO a partir de los sistemas semisólidos 170
4.3.2. Griseofulvina 171
4.3.2.1. Selección de parámetros para ELIV 171
4.3.2.1.1. Ensayos preliminares 171
4.3.2.1.2. Selección de la velocidad de agitación, de la membrana y del medio receptor 172
4.3.2.2. Ensayos de liberación *in vitro* GRI a partir de los sistemas semisólidos 172
4.3.3. Análisis estadístico 173

**Resultados y Discusión**

4.4.1. Ketoconazol 174
4.4.1.1. Selección de variables de proceso 174
4.4.1.1.1. Selección de la temperatura 174
4.4.1.1.2. Selección del medio receptor (ensayos preliminares) 174
4.4.1.1.3. Selección de la membrana (ensayo preliminar) 176
4.4.1.1.4. Selección de la velocidad de agitación y del medio receptor 178
4.4.1.2. Ensayo de liberación in vitro de KTO a partir de los sistemas semisólidos 180
4.4.2. Griseofulvina 186
4.4.2.1. Selección de variables de proceso 186
4.4.2.1.1. Selección de la temperatura 186
4.4.2.1.2. Selección del medio receptor (ensayos preliminares) 186
4.4.2.1.3. Selección de la membrana (ensayo preliminar) 187
4.4.2.1.4. Selección de la velocidad de agitación y del medio receptor 188

4.4.2.2. Ensayo de liberación in vitro de GRI a partir de los sistemas semisólidos 189

**Conclusiones** 194

**Referencias bibliográficas** 195

- **Descripción de los procesos de liberación de IFAs a partir de formas farmacéuticas semisólidas de uso tópico.**

- **Determinación de los parámetros adecuados para la realización de los ensayos de liberación in vitro (ELIV).**

- **Cuantificación de la fracción de IFA liberado a partir de las formas semisólidas elaboradas con los polímeros en estudio y establecer la cinética de liberación, comparando los resultados obtenidos con cremas de referencia.**

# CAPÍTULO 4 – LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| IFA/IFAs | Ingrediente/s Farmacéutico/s Activo/s |
| ELIV | Ensayo Liberación *In Vitro* |
| IVRT | *In Vitro* Release Testing |
| J | Flujo |
| dC | Cambio en la concentración de soluto |
| D/Dm | Coeficiente de difusión |
| dx | Cambio en la distancia |
| C | Concentración de IFA liberada |
| $C_0$ | Concentración inicial de IFA |
| $k_0$ | Constante de velocidad de orden 0 |
| t | Tiempo |
| k | Constante de velocidad de orden 1 |
| Q | Cantidad de IFA liberada acumulada en el medio receptor |
| $K_H$ | Constante de liberación de Higuchi |
| Cs | Solubilidad del IFA en la matriz |
| $M_t/M_\infty$ | Fracción de IFA liberado a tiempo “t” |
| K | Constante de velocidad de liberación Korsmeyer-Peppas |
| N | Exponente de liberación |
| l | tiempo de retardo |
| USP | United States Pharmacopeia |
| CDV | Celda de difusión vertical |
| $\lambda_{exc}$ | Longitud de onda de excitación |
| $\lambda_{em}$ | Longitud de onda de emisión |
| Cn | Concentración a tiempo “n” |
| V | Volumen de celda |
| S | Superficie |
| A | Area de membrana expuesta |

# CAPÍTULO 4 –ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.1. Celdas de difusión vertical 163
Figura 4.2. Estabilidad de KTO en los posibles medios receptores 176
Figura 4.3. Microfotografías electrónicas de barrido de membranas microporosas de ésteres de celulosa y de polisulfona 177
Figura 4.4. Comparación de la cantidad de KTO liberada en dos medios receptores y a dos velocidades de agitación 179
Figura 4.5. Perfiles de liberación KTO a partir de los geles elaborados y la crema comercial de referencia 181
Figura 4.6. Perfiles de liberación KTO a partir de los emulgeles elaborados y la crema comercial de referencia 181
Figura 4.7. Comparación cantidad KTO liberada acumulada a partir de los geles y la crema de referencia 182
Figura 4.8. Comparación cantidad KTO liberada acumulada a partir de los emulgeles y la crema de referencia 183
Figura 4.9. Ajuste de datos experimentales al modelo Korsemeyer-Peppas 185
Figura 4.10. Estabilidad de GRI en los posibles medios receptores 187
Figura 4.11. Perfiles de liberación GRI a partir de los geles elaborados y la crema de referencia 190
Figura 4.12. Perfiles de liberación GRI a partir de los emulgeles elaborados y la crema de referencia 190
Figura 4.13. Comparación cantidad GRI liberada acumulada a partir de los geles y la crema de referencia 191
Figura 4.14. Comparación cantidad GRI liberada acumulada a partir de los emulgeles y la crema de referencia 191
Figura 4.14. Ajuste de datos experimentales al modelo Higuchi 192

# CAPÍTULO 4 – ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1.Ensayos de solubilidad de KTO en los posibles medios receptores 175
Tabla 4.2.Porcentajes de KTO recuperados por inmersión de las membranas en ensayo en una solución del IFA 177
Tabla 4.3. Cantidad KTO liberada acumulada en función de dos medios receptores y dos velocidades de agitación 179
Tabla 4.4. Valores de r2 en la modelización de la cinética de liberación de KTO 184
Tabla 4.5. Valores de K y n para los sistemas en ensayo según modelización por Korsemeyer Peppas 185
Tabla 4.6. Ensayos de solubilidad de GRI en los posibles medios receptores 186
Tabla 4.7. Porcentajes de GRI recuperados por inmersión de las membranas en ensayo en una solución del IFA 187
Tabla 4.8. Cantidad GRI liberada acumulada en función de dos medios receptores y dos velocidades de agitación 189
Tabla 4.9. Valores de r2 en la modelización de la cinética de liberación de GRI 192
Tabla 4.10. Valores de KH para los diferentes sistemas en ensayo 193

# CAPÍTULO 4 – ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 4.1. Primera ley de Fick 158
Ecuación 4.2. Segunda ley de Fick 159
Ecuación 4.3. Cinética de liberación de orden 0 159
Ecuación 4.4. Cinética de liberación de orden 1 159
Ecuación 4.5. Ecuación general modelo de Higuchi 160
Ecuación 4.6. Ecuación según el modelo de Higuchi para IFAs suspendidos en la base 160
Ecuación 4.7. Ecuación según el modelo de Higuchi para IFAs solubilizados en la base 161
Ecuación 4.8. Ecuación Korsemeyer-Peppas 161
Ecuación 4.9. Ecuación para el cálculo de la cantidad de IFA liberada acumulada por unidad de superficie expuesta en función del tiempo 169

# 4. LIBERACIÓN DE IFAs *in vitro* A PARTIR DE FORMAS FARMACÉUTICAS SEMISÓLIDAS

## 4.1. MODELOS MATEMÁTICOS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

Se han desarrollado muchos modelos para describir la cinética y el mecanismo de liberación de IFAs de los productos farmacéuticos (orden cero, primer orden, modelo de Higuchi, Peppas, entre otros)[1].

### 4.1.1. MODELOS DIFUSIONALES[1-3]

#### 4.1.1.1. PRIMERA LEY DE FICK

La difusión de las moléculas se define como velocidad de transferencia de masa (dM/dt) y se expresa como flujo (J); así J es la tasa de transferencia de masa a través de un área de superficie unitaria de una barrera (membrana). Esta ley postula que el flujo se produce desde la zona de mayor concentración a la de menor concentración, siendo proporcional al gradiente de concentración. En una dimensión, la ley se expresa según la Ecuación 4.1.:

$$J = -D.\frac{dC}{dx} \qquad \text{Ecuación 4.1.}$$

donde:

J = flujo

dC = cambio en la concentración del soluto

D = coeficiente de difusión del soluto ($cm^2/s$)

dx = cambio en la distancia (cm)

#### 4.1.1.2. SEGUNDA LEY DE FICK

Esta ley establece que el cambio en la concentración en función del tiempo en un lugar específico es proporcional al cambio en el gradiente de concentración en ese punto en el tiempo (Ecuación 4.2).

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D.\left[\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2}\right] \qquad \text{Ecuación 4.2.}$$

donde x, y y z son las coordenadas espaciales.

### 4.1.2. MODELO CINÉTICO DE ORDEN CERO

Describe un sistema en donde la velocidad de liberación del fármaco es independiente de su concentración (Ecuación 4.3).

$$C = C_0 - k_0.t \qquad \text{Ecuación 4.3.}$$

donde

C = cantidad de IFA liberado (suponiendo que la liberación se produce rápidamente después de la disolución del fármaco).

$C_o$ = cantidad inicial de IFA

$k_o$ = constante de velocidad de orden cero

t = tiempo

### 4.1.3. MODELO CINÉTICO DE PRIMER ORDEN

Este modelo se utiliza para describir la absorción y eliminación de algunos fármacos, aunque es difícil entender el mecanismo sobre la base teórica. La liberación de fármaco que sigue la cinética de primer orden puede expresarse mediante la ecuación 4.4.

$$\log C = \log C_0 - \frac{k}{2{,}303} \qquad \text{Ecuación 4.4.}$$

donde

$C_o$ = concentración inicial de droga

k = Constante de primer orden

t = tiempo

### 4.1.4. MODELO HIGUCHI

El modelo de Higuchi[4-6] es probablemente el más utilizado para describir la velocidad de liberación de los fármacos a partir de sistemas matriciales. Sus publicaciones en 1961, 1962 y 1963 permitieron el desarrollo de muchos modelos teóricos para describir la liberación de agentes activos muy solubles, solubles y poco solubles contenidos en sistemas sólidos y semisólidos.

El modelo se basa en las siguientes consideraciones:

- la concentración inicial del fármaco en la matriz es mucho más alta que la solubilidad del fármaco
- la difusión del fármaco se produce solo en una dimensión
- las partículas del fármaco son mucho más pequeñas que el espesor del sistema
- el hinchamiento de la matriz y su disolución son insignificantes
- el coeficiente de difusión del fármaco es constante
- en el medio receptor se mantienen condiciones perfectas de sumidero (condiciones "sink")

La Ecuación 4.5. es la expresión general de este modelo:

$$Q = K_H.\sqrt{t} \qquad \text{Ecuación 4.5.}$$

donde

Q = cantidad de IFA liberado en el compartimento receptor a tiempo "t"

$K_H$ = constante de liberación de Higuchi

t = tiempo

A partir de la ecuación 4.5., se han desarrollado dos modelos teóricos, uno en el que el fármaco existe como una suspensión en la base (Modelo I, Ecuación 4.6.) y el otro en el que el fármaco existe como una solución en la base (Modelo II, Ecuación 4.7.):

$$M = \sqrt{2.D_m.Cs.\left(Q-\frac{C_s}{2}\right).t} \qquad \text{Ecuación 4.6.}$$

donde

M = cantidad de fármaco liberado en el medio receptor por $cm^2$

$C_s$ = solubilidad del fármaco en la matriz de liberación.

$D_m$ = coeficiente de difusión del fármaco en la matriz semisólida

Q = cantidad total del fármaco en solución y suspendida en la matriz

t = tiempo

$$M = 2.C_0.\sqrt{\frac{D.t}{\pi}} \qquad \text{Ecuación 4.7.}$$

donde

M = cantidad de fármaco liberado en el medio receptor por $cm^2$

$C_o$ = concentración de fármaco en la matriz de liberación

D = coeficiente de difusión del fármaco a través de la matriz

El gráfico de la cantidad de fármaco liberado por unidad de área de membrana ($mg/cm^2$) en función de la raíz cuadrada de tiempo da como resultado una línea recta. La pendiente de la línea presenta la velocidad de liberación del componente activo.

### 4.1.5. MODELO DE KORSEMEYER-PEPPAS (LEY DE POTENCIA)

Korsemeyer y otros (1983)[3,5] derivaron una relación semiempírica para describir la liberación de fármaco desde un sistema polimérico. Este modelo matemático, también conocido como "Ley de Potencia", se utiliza con mucha frecuencia para describir la liberación de fármaco de varias formas farmacéuticas de liberación modificada diferentes.

El modelo relaciona la liberación del fármaco con el tiempo transcurrido elevado a un exponente n, empleando los datos de liberación inferiores al 60%, mediante la ecuación 4.8.:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K.t^n \qquad \text{Ecuación 4.8.}$$

donde

$M_t / M_\infty$ = fracción de IFA liberado a tiempo "t"

K = constante de velocidad de liberación

n = exponente de liberación

t = tiempo

Dependiendo del valor de n que mejor ajuste al perfil de liberación de un fármaco en un sistema matricial, es posible establecer una clasificación del comportamiento observado:

- Modelo Fickiano (Caso I)
- Modelos no Fickianos (Caso II, Caso anómalo y Súper Caso II)

En el modelo fickiano (Caso I), n = 0,5 y la liberación del medicamento se rige por difusión.

Cuando n=1, el modelo es no fickiano Caso II; la velocidad de liberación del fármaco corresponde a una cinética de orden cero y el mecanismo que impulsa la liberación del fármaco es el hinchamiento o la relajación de las cadenas poliméricas.

Cuando 0,5<n<1, el modelo es no fickiano (Caso anómalo) y el mecanismo de liberación del fármaco se rige tanto por difusión como por hinchamiento y relajación de cadenas poliméricas.

Cuando n>1, el modelo es no fickiano Súper Caso II, en donde se produciría un incremento en el proceso de plastificación en la capa gel del sistema como resultado de una disminución en las fuerzas atractivas entre las cadenas poliméricas que incrementa la movilidad de las macromoléculas.

## 4.2. MÉTODOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE IFAs *IN VITRO* A PARTIR DE SISTEMAS SEMISÓLIDOS

### 4.2.1. EQUIPOS

Existen 3 equipos ampliamente utilizados en numerosos trabajos científicos, y que además están codificados por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) en su monografía <1724> "SEMISOLID DRUG PRODUCTS—PERFORMANCE TESTS": Celdas de difusión, Celdas de flujo continuo y Celdas de inmersión.

#### 4.2.1.1. CELDAS DE DIFUSIÓN

Las celdas de difusión[6-8] se pueden clasificar en horizontales, verticales o de flujo en función de su diseño físico.

La celda de difusión vertical (CDV, más conocida como celda de Franz), es uno de los equipos más ampliamente utilizados para estudios de difusión in vitro de fármacos a partir de formas de dosificación tópica (Fig 4.1). Cada CDV consta de dos cámaras: una cámara donante y una cámara receptora, ambas separadas por una membrana, y termostatizadas a temperatura constante. Una capa del producto bajo evaluación se coloca en la cámara donante en la parte superior de la membrana, que se encuentra en contacto con el medio receptor por su lado inferior.

Las principales ventajas de la CDV son su facilidad de operación y su gran tamaño de muestra, lo que garantiza resultados consistentes. Además, la técnica es simple, confiable, reproducible y adecuada para la evaluación de geles, cremas, pomadas y líquidos.

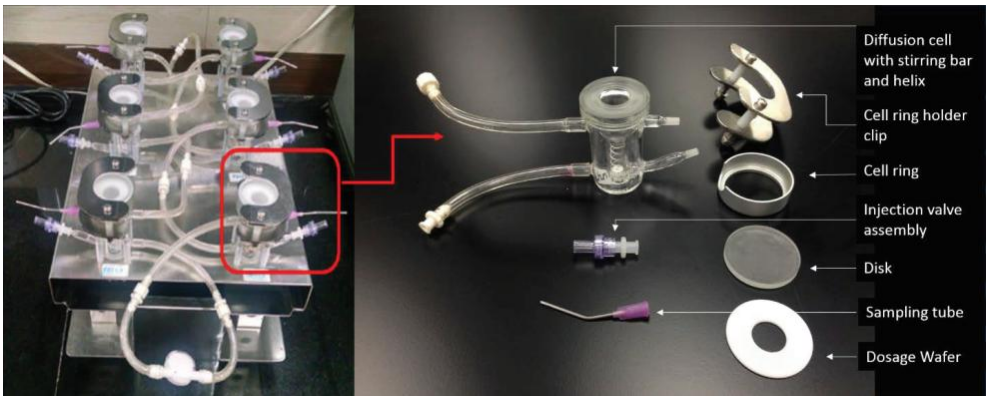



**Fig 4.1. Celdas de difusión vertical[9]**

### 4.2.2. MEMBRANAS

Las membranas utilizadas en los ELIV[10-12] deben tener mínimo espesor y gran porosidad, ser inertes frente a la formulación, ser compatibles con el medio receptor, ofrecer mínima o nula resistencia a la difusión del IFA, ser estables y fáciles de usar.

En los ELIV se emplean generalmente membranas sintéticas. Su función es actuar como un soporte inerte para la formulación, manteniendo un contacto permanente con ella y con el medio receptor, y no como barrera a la difusión del fármaco. Además, aseguran

homogeneidad y uniformidad lote a lote, lo que es difícil de conseguir con las membranas biológicas.

La membrana ideal debe tener una porosidad superior al 60%, tortuosidad de 1 y ser relativamente delgada (~ 10 μm). Sin embargo, las diversas membranas disponibles comercialmente presentan diferencias entre sí, en cuanto a material, espesor, tamaño de poros, porcentaje de porosidad y tortuosidad; esto lógicamente puede conducir a que diferentes tipos de membranas produzcan diferentes valores de flujo de fármaco, tal como ha sido demostrado en diversos estudios.

Existen varios tipos de membranas sintéticas, tales como acetato / nitrato / ésteres mixtos de celulosa, polisulfona, politetilfluoroetileno, nylon, policarbonato y teflón, entre otras.

### 4.2.3. MEDIO RECEPTOR

La selección de un medio receptor apropiado[7,10,11,13] es muy importante. Es crítico asegurar la solubilidad del fármaco en él y mantener condiciones de sumidero ("sink") durante todo el ensayo a fin de evitar distorsiones por saturación. Para lograr las condiciones "sink", el medio receptor debe tener una alta capacidad para disolver el IFA, y su concentración en el medio receptor no debe exceder el 30% de la solubilidad del IFA en dicho medio en cualquier momento del ensayo. Además, debe considerarse el pH, cuya elección debe basarse en el perfil de solubilidad del IFA en función del pH y el pH de la formulación. El IFA debe ser estable en el fluido receptor, a fin de asegurar la estabilidad durante el ensayo y durante el almacenamiento después de la recolección, si se desea. La deaireación del medio receptor es esencial para prevenir la formación de burbujas en la interfaz con la membrana, ya que éstas reducen el área de contacto entre la membrana y el medio, lo que lleva a resultados inconsistentes. El medio receptor utilizado para fármacos solubles en agua generalmente es un tampón acuoso. Sin embargo, para los productos formulados con un compuesto activo insoluble en agua, la selección de un medio receptor adecuado para mantener la condición de sumidero es un desafío. En estos casos suele ser necesario modificar el pH y/o agregar cosolventes, agentes solubilizantes (surfactantes) o agentes complejantes.

### 4.2.4. TEMPERATURA

La temperatura de prueba generalmente se mantiene a 32 ± 1°C durante todo el experimento para reflejar la temperatura normal de la piel cuando se aplica una forma de dosis semisólida a la piel. Aunque a veces se han usado temperaturas elevadas, las temperaturas más altas pueden provocar cambios físicos en la fórmula (por ejemplo, disminución de la viscosidad) que pueden afectar la tasa de liberación del activo. Las desviaciones pueden justificarse cuando los productos son para sitios de acción específicos, como por ejemplo las cremas vaginales[1,3,7,10].

### 4.2.5. VELOCIDAD DE AGITACIÓN

El medio receptor se debe forzar durante todo el experimento a una velocidad constante, generalmente con una barra magnetizada. La agitación del medio es importante para asegurar homogeneidad en la fase receptora y eliminar la posibilidad de formación de una capa estática de fármaco directamente por debajo de la membrana. Se han informado varias velocidades de agitación, desde 400 a 800 rpm[3,7].

### 4.2.6. APLICACIÓN DE LA DOSIS

#### 4.2.6.1. Método de aplicación

Las técnicas de dosis infinitas implican la aplicación de la formulación en cantidad suficiente de forma que cualquier cambio en la concentración del donante durante el período de tiempo experimental, causado por difusión o evaporación, sea insignificante (es decir, la dosis es efectivamente infinita). Esto es deseable si los objetivos experimentales incluyen el cálculo de los parámetros de difusión, como los coeficientes de permeabilidad, como en los ELIV, o para la investigación de mecanismos de penetración[14].

#### 4.2.6.2. Dosis de aplicación

Tanto la USP como la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (USFDA) recomiendan aplicar una dosis no menor de 300 mg del producto en la cámara donante, que suele ser suficiente para cubrir completamente la superficie de la membrana expuesta. Se justifican cantidades mayores para garantizar que se mantenga una dosis

infinita durante todo el experimento; también pueden emplearse cantidades inferiores a 300 mg siempre que la formulación cubra completamente la superficie de la membrana y se mantenga una dosis infinita en la cámara del donante en el punto final de muestreo del experimento[13].

#### 4.2.6.3. Modo de aplicación

Debido a que existen múltiples diseños de celdas de difusión, el enfoque para aplicar la forma de dosificación en la cámara donante puede variar; también las propiedades físicas (por ejemplo, la viscosidad) de la forma de dosificación pueden ser un factor en la mejor manera de administrar el producto farmacológico en la cámara del donante. Se han implementado varios métodos, como el uso de una espátula de metal o silicona para distribuir la forma de dosificación en el centro de la oblea de teflón en las CDV o el uso de jeringas de diferentes volúmenes para verter el producto directamente sobre la superficie expuesta de la membrana. El enfoque debería afectar mínimamente a la reología de la forma de dosificación y ser reproducible, de modo que las tasas de liberación no se vean afectadas por el método de aplicación[13].

### 4.2.7. MUESTREO

#### 4.2.7.1. Tiempos de muestreo

Se sugiere que las muestras se recolecten durante al menos un período de 6 h, con reposición de medio fresco, tomando no menos de cinco muestras (los intervalos típicos de las muestras son 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 6 h), aunque a veces puede requerirse una duración superior a 24 horas[15]. Sin embargo, la liberación del fármaco a partir de formas de dosificación semisólidas puede desviarse de la linealidad en tiempos prolongados, y la desviación generalmente ocurre cuando se ha liberado más de aproximadamente 35% - 45% del fármaco[1].

#### 4.2.7.2. Volumen de muestreo

Para los sistemas celulares de difusión vertical muestreados manualmente, se recomienda un volumen de enjuague de aproximadamente 0.3 a 0,5 ml y un volumen de recolección

igual, con un volumen máximo de extracción y reemplazo determinado a fin de no producir dilución[15].

## 4.2. MATERIALES

Geles elaborados: G-KTO-COP, G-KTO-QTO, G-KTO-P407, G-GRI-COP, G-GRI-QTO)

Emulgeles elaborados: E-KTO-COP. E-KTO-QTO, E-KTO-P407, E-GRI-COP, E-GRI-QTO)

Cremas de referencia: C-KTO (crema comercial), C-GRI (elaboración propia)

Fosfato monosódico Cicarelli, Fosfato disódico Cicarelli, Polisorbato 20 Cicarelli fueron adquiridos en Norces (Rosario, Argentina); Sodio Laurilsulfato (SLS) Parafarm fue adquirido en Droguería Saporiti (CABA, Argentina). Etanol 96º calidad F.A. "Porta" fue adquirido en farmacia comunitaria.

Membranas de Acetato de celulosa (Sartorius, dm medio de poros 0,45 μ, dm 47 mm) fueron adquiridas en Norces (Rosario, Argentina). Membranas de Polisulfona (Pall, dm medio de poros 0,45 μ, dm 25 mm) fueron adquiridas en Bioesanco (CABA, Argentina).

## 4.3. MÉTODOS

### 4.3.1. KETOCONAZOL

#### 4.3.1.1. SELECCIÓN DE PARÁMETROS PARA ELIV

##### 4.3.1.1.1. Ensayos preliminares

**Ensayos de solubilidad de KTO en los medios receptores candidatos**

Se prepararon las siguiente soluciones:

- tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 5,5[16]
- tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 5,5 / etanol96º 80:20[17,18]
- tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 5,5 + 1% Polisorbato 20
- tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 5,5 + 1% SLS

A 10 ml de cada una de las soluciones preparadas se agregó un exceso de KTO, sometiendo los sistemas a agitación durante 24 hs a 180 rpm (agitador orbital con plataforma Boeco PSU-15I). Se filtraron las muestras y se midió la intensidad de emisión de fluorescencia ($\lambda_{exc}$ 293 nm, $\lambda_{em}$ 382 nm). Se calculó la cantidad de KTO disuelta (concentración de saturación) en cada una de las soluciones en base a curvas de calibración previamente

realizadas para cada solución en ensayo (gráficas no mostradas). Los ensayos se realizaron por triplicado.

**Ensayo de estabilidad de KTO en los posibles medios receptores**

Se prepararon soluciones de KTO 20 μg/ml en cada uno de los posibles medios receptores, que se conservaron en envases cerrados y protegidos de la luz. Las soluciones se analizaron por espectrofluorometría durante 48 hs, a distintos intervalos de tiempo[19].Los ensayos se realizaron por triplicado.

**Ensayo de retención de KTO en las membranas candidatas**

Se sumergió cada una de las membranas en estudio en 10 ml de una solución de KTO 20 μg/ml en DMSO/buffer fosfatos pH 7,4 en sendos recipientes cerrados durante 6 hs. Como control, se empleó 10 ml de la solución de KTO sin membrana sumergida. Posteriormente se retiraron las membranas y se determinó la cantidad de KTO en cada una de las soluciones por espectrofluorometría ($\lambda_{exc}$ 293 nm, $\lambda_{em}$ 382 nm). Los ensayos se realizaron por duplicado[20].

**4.3.1.1.2. Selección de la velocidad de agitación, de la membrana y del medio receptor**

Se realizaron ELIV con diferentes combinaciones de parámetros (medio receptor – membrana – velocidad de agitación), en un equipo de CVD de 6 celdas (Hanson Microette System), empleando la crema C-KTO como referencia y una temperatura de 32ºC. Los ensayos se realizaron por duplicado. Se seleccionó la combinación de parámetros que proporcionó el mayor flujo de liberación de KTO, respetando condiciones "sink" según la ecuación 4.9[21- 23]:

$$Q = \frac{\left[ C_n.V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i.S \right]}{A} \qquad \text{Ecuación 4.9.}$$

donde

Q = cantidad acumulada de IFA liberado por unidad de superficie de membrana (μg/cm$^2$)

$C_n$ = concentración de IFA al tiempo "n" de muestreo (μg/ml)

V = volumen de la celda (ml)

$\sum_{i=1}^{n-1} C_i$ =suma de las concentraciones de IFA determinadas en los intervalos de muestra desde 1 hasta n-1 (μg/ml)

S = volumen de muestreo (ml)

A = superficie expuesta de la membrana (cm$^2$)

#### 4.3.1.2. ENSAYOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO* KTO A PARTIR DE LOS SISTEMAS SEMISÓLIDOS

Los ELIV de KTO a partir de las formulaciones elaboradas se realizaron utilizando un equipo de CDV de 6 celdas (Hanson), cuyo compartimento receptor tiene un volumen de 7 ml y un área de difusión de 1,54 cm$^2$.

Se empleó la membrana seleccionada según 4.3.1.1.2., que se saturó con el medio receptor determinado en 4.3.1.1.2. durante 30 minutos antes del ensayo.

Las celdas se termostatizaron a 32°C, se llenaron con el medio receptor y se colocaron las membranas. Se colocó el anillo que delimita el compartimento donante sobre la membrana y se aplicaron 0,5 g de las formulaciones en estudio. La dosis se extendió uniformemente con ayuda de una espátula de teflon y se fijó cada celda con el adaptador correspondiente.

La agitación se fijó en la velocidad seleccionada según el ensayo 4.3.1.1.2. Se tomaron muestras de 0,3 ml a los 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 min, con posterior reposición de medio receptor fresco luego de cada extracción, en igual volumen.

Cada una de las muestras extraídas se diluyó a 2,5 ml con el medio receptor y se analizaron por espectrofluorometría ($\lambda_{exc}$ 293 nm, $\lambda_{em}$ 382 nm), calculándose la cantidad de KTO liberada acumulada en función del tiempo, según la ecuación 4.11.

Se graficó la cantidad de KTO liberada/cm$^2$ en función del tiempo, y se ajustó a los diversos modelos de liberación a fin de determinar la cinética de liberación.

Los ensayos se realizaron por duplicado para cada formulación en ensayo.

## 4.3.2. GRISEOFULVINA

### 4.3.2.1. SELECCIÓN DE PARÁMETROS PARA ELIV

#### 4.3.2.1.1. Ensayos preliminares

**Ensayos de solubilidad de GRI en los medios receptores candidatos**

Se prepararon las siguiente soluciones:

- tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 6,4[24].
- tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 6,4 / Propilenglicol 80:20[25].
- tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 6,4 + 2% Polisorbato 20[26].
- tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 6,4 + 1% SLS

A 10 ml cada una de las soluciones preparadas se agregó un exceso de GRI, sometiendo los sistemas a agitación durante 24 hs a 180 rpm (agitador orbital Boeco PSU-15I). Se filtraron las muestras y se midió la intensidad de emisión de fluorescencia ($\lambda_{exc}$ 303 nm, $\lambda_{em}$ 443 nm). Se calculó la cantidad de GRI disuelta en cada una de las soluciones en base a curvas de calibración previamente realizadas para cada medio (gráficas no mostradas). Los ensayos se realizaron por triplicado.

**Ensayo de estabilidad de GRI en los posibles medios receptores**

Se prepararon soluciones de GRI 20 μg/ml en cada uno de los posibles medios receptores, que se conservaron en envases cerrados y protegidos de la luz. Las soluciones se analizaron por espectrofluorometría durante 48 hs, a distintos intervalos de tiempo. Los ensayos se realizaron por triplicado.

**Ensayo de retención de GRI**

Se sumergió cada una de las membranas en estudio en 10 ml de una solución de GRI 20 μg/ml en DMSO/buffer fosfatos pH 7,4 en sendos recipientes cerrados durante 6 hs. Como control, se empleó 10 ml de la solución de GRI sin membrana sumergida. Posteriormente se

retiraron las membranas y se determinó la cantidad de GRI remanente en la solución por espectrofluorometría ($\lambda_{exc}$ 303 nm, $\lambda_{em}$ 443 nm). Los ensayos se realizaron por duplicado.

**4.3.2.1.2. Selección de la velocidad de agitación, de la membrana y del medio receptor**

Se realizaron ELIV con diferentes combinaciones de parámetros (medio receptor – membrana – velocidad de agitación), utilizando un equipo de CVD de 6 celdas (Hanson) empleando la crema C-GRI como referencia y una temperatura de 32ºC. Se seleccionó la combinación de parámetros que proporcionó el mayor flujo de liberación de GRI, según la ecuación 4.11.

**4.3.2.2. ENSAYOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO* GRI A PARTIR DE LOS SISTEMAS SEMISÓLIDOS**

Los ELIV de GRI a partir de las formulaciones elaboradas se realizaron utilizando un equipo de CDV de 6 celdas (Hanson), cuyo compartimento receptor tiene un volumen de 7 ml y un área de difusión de 1,54 $cm^2$.

Se empleó la membrana seleccionada según 4.3.2.1.2., que se saturó con el medio receptor determinado en 4.3.2.1.2. durante 30 minutos antes del ensayo.

Las celdas se termostatizaron a 32°C, se llenaron con el medio receptor y se colocaron las membranas. Se colocó el anillo que delimita el compartimento donante sobre la membrana y se aplicaron 0,5 g de las formulaciones en estudio. La dosis se extendió uniformemente con ayuda de una espátula de teflon y se fijó cada celda con el adaptador correspondiente.

La agitación se fijó en la velocidad seleccionada según el ensayo 4.3.1.1.2. Se tomaron muestras de 0,3 ml a los 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 min, con posterior reposición de medio receptor fresco luego de cada extracción, en igual volumen.

Cada una de las muestras extraídas se diluyó a 2,5 ml con el medio receptor y se analizaron por espectrofluorometría ($\lambda_{exc}$ 303 nm, $\lambda_{em}$ 443 nm), calculándose la cantidad de GRI liberada acumulada en función del tiempo, según la ecuación 4.11.

Se graficó la cantidad de GRI liberada/$cm^2$ en función del tiempo, y se ajustó a los diversos modelos de liberación a fin de determinar la cinética de liberación.

Los ensayos se realizaron por duplicado para cada formulación en ensayo.

### 4.3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se informan como la media de las mediciones realizadas. Se empleó el análisis de varianza (ANOVA) para la comparación entre grupos, y prueba de rangos múltiples de Tuckey cuando fuera necesario. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

## 4.4.1. KETOCONAZOL

### 4.4.1.1. SELECCIÓN DE VARIABLES DE PROCESO

#### 4.4. 1.1.1. SELECCIÓN DE LA TEMPERATURA

La temperatura de prueba se mantuvo a 32°C ± 1°C durante todo el ensayo, valor adoptado comúnmente como parámetro para simular las condiciones del estrato córneo[23].

#### 4.4.1.1.2. SELECCIÓN DEL MEDIO RECEPTOR (ENSAYOS PRELIMINARES)

Para la selección del medio receptor, la guía SUPAC SS FDA proporciona un punto de partida: establece que "se puede usar un medio receptor apropiado, como un tampón acuoso para IFAs solubles en agua o un medio hidroalcohólico para IFAs poco solubles en agua"[27]. Asimismo, es aconsejable utilizar un medio que se asemeje al estado fisiológico de la piel y que proporcione una alta solubilidad para el IFA [1].

La baja solubilidad acuosa de KTO hace necesario la utilización de agentes que aumenten su solubilidad, pero que al mismo tiempo proporcionen condiciones de sumidero ("sink"); SUPAC menciona el uso de soluciones hidroalcohólicas para IFAs poco solubles, pero también pueden emplearse otros recursos, como modificación de pH, agentes complejantes, agentes tensoactivos[1].

La elección del pH del medio debe basarse en factores tales como el pH de la formulación y el perfil de pH-solubilidad del ingrediente activo y el pH de la membrana diana (la piel, en este caso). Sin embargo, el perfil de solubilidad de KTO exige un pH ≤ 3 para su solubilización, que no representa las condiciones de la piel. El pH del medio receptor debería ajustarse para estar en el rango de 5-6 ± 0.05 para reflejar las condiciones fisiológicas de la piel[1].Teniendo en cuenta el pH de la superficie de la piel, y la revisión bibliográfica realizada, se seleccionaron cuatro posibles medios receptores: un tampón fosfato monosódico-fosfato disódico a pH 5,5 ($M_1$), adicionado de un cosolvente (etanol 96º) ($M_2$), de un agente tensoactivo no iónico (Polisorbato 20) ($M_3$) y de un agente tensoactivo aniónico (LSNa) ($M_4$).

La solubilidad del IFA en el medio receptor y su estabilidad en solución son variables importantes a considerar en la selección del mismo[19].

Los resultados de los ensayos de solubilización se muestran en Tabla 4.1.

| | Solubilidad KTO (µg/ml) |
|---|---|
| Tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 5,5 | **30,43 ± 0,15** |
| Tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 5,5 / etanol 96º 80:20 | **191,30 ± 0,10** |
| Tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 5,5 + 1% Polisorbato 20 | **107,40 ± 0,30** |
| Tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 5,5 + 1% SLS | **97, 15 ± 0,28** |

**Tabla 4.1.Resultados de los ensayos de solubilidad de KTO en los posibles medios receptores seleccionados**

KTO es un compuesto dibásico débil, prácticamente insoluble en agua, excepto a pH menor a 3, donde se solubiliza completamente por la protonación de los grupos amino. La solubilidad en agua disminuye en forma exponencial en función del aumento de pH, al ir aumentando el porcentaje de la forma no ionizada (menos soluble)[28,29]. A pH 5,5 ($M_1$) KTO mostró una baja solubilidad, por encontrarse en un medio completamente acuoso y con un valor de pH donde predomina la forma no ionizada. Si bien este medio es el fisiológicamente más compatible, la baja solubilidad de KTO podría limitar el proceso de difusión al no favorecer el gradiente de concentración a ambos lados de la membrana.

La utilización de un cosolvente (etanol) favoreció la solubilización de KTO en medio acuoso. La cosolvencia (o codisolvencia) es un recurso tecnológico habitualmente utilizado para la elaboración de soluciones con IFAs poco solubles en agua, mediante el cual el agregado de un disolvente menos polar que el agua (pero miscible con ella y disolvente del IFA) permite aumentar la solubilidad de los mismos[30]. Etanol presenta una constante dieléctrica (ε) de 24,3, menor que la del agua (80,1)[31] y es un buen disolvente de KTO (26 mg/ml), según estudios realizados sobre la solubilidad de KTO en mezclas hidroalcohólicas por Hashemzadeh y col[17].

El uso de agentes tensoactivos en combinación con el tampón a pH 5,5 también incrementó la solubilidad de KTO en medio acuoso. Los agentes tensoactivos presentan la propiedad de formar micelas a una determinada concentración (concentración micelar crítica), capaces de incluir en sus dominios IFAs poco solubles en agua, aumentando su solubilidad en dichos medios[30,32]. Sin embargo, son agentes espumógenos, y de hecho ambos medios $M_3$ y $M_4$ presentaron espuma al ser sometidos a procesos de agitación, en especial $M_4$. La presencia de espuma y burbujas de aire afecta sustancialmente a la realización de los ELIV[33], lo que determinó que se descarten estas soluciones como posibles medios receptores.

**Estabilidad de KTO en los medios receptores propuestos**

En la figura 4.2. se muestran los resultados obtenidos en este ensayo:

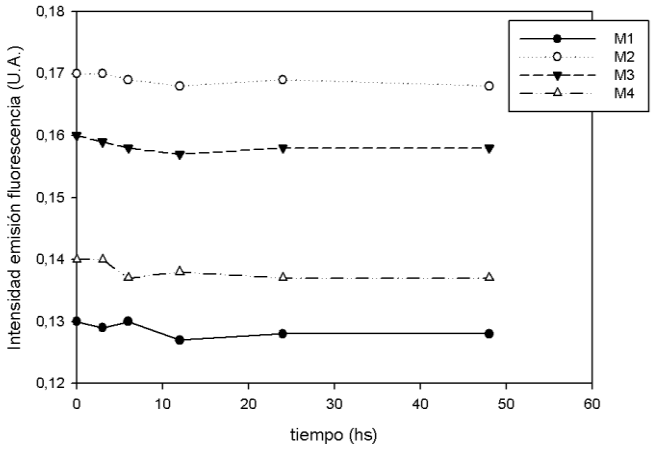



**Fig 4.2.Estabilidad KTO en los posibles medios receptores**

Como se observa a través de la variación en la intensidad de emisión de fluorescencia de KTO en los cuatro posibles medios receptores, podemos concluir que el IFA permaneció estable en todos ellos durante el tiempo establecido para el ensayo.

**4.4.1.1.3. SELECCIÓN DE LA MEMBRANA (ENSAYO PRELIMINAR)**

Las membranas porosas sintéticas usadas en los ELIV no están destinadas a imitar las condiciones del estrato córneo, sino solamente dividir los compartimentos dador y receptor y a ofrecer un soporte semipermeable para la formulación, sin ejercer función barrera.

Según las guías SUPAC, los materiales recomendados son derivados celulósicos, polisulfona, polipropileno, poliamida y poliacrilatos[27]. Diversos estudios publicados[12,34,35] evidencian diferencias en los valores de flujo de IFA según la membrana utilizada, lo que demuestra que tienen efecto en los resultados obtenidos, y que su selección es un tema no menor al momento de establecer las condiciones de ensayo[36].

Se seleccionaron para los ELIV dos tipos de membranas, Acetato de Celulosa y Polisulfona.

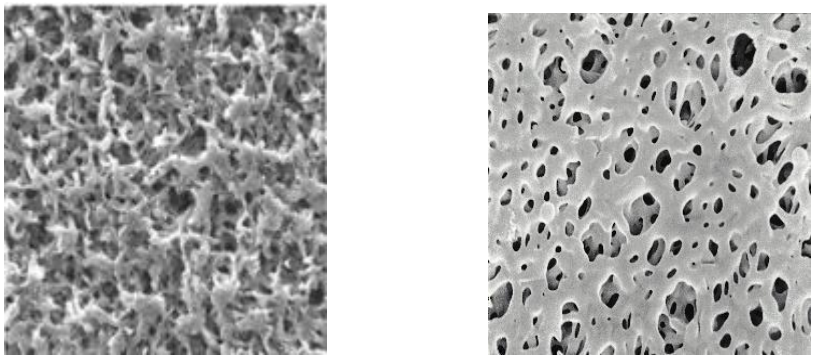


**Fig 4.3. Microfotografías electrónicas de barrido de membranas microporosas de ésteres de celulosa (A) y de polisulfona (B)**

Para determinar la influencia de la constitución de las membranas en estudio, se realizaron ensayos de retención de KTO utilizando una solución de KTO de concentración conocida.

Los porcentajes de KTO residuales en las soluciones de prueba se muestran en Tabla 4.2.:

| Membrana | % KTO |
|---|---|
| Polisulfona | 98,54 ± 0,22 |
| Acetato de celulosa | 95,79 ± 0,50 |
| Solución KTO control | 99,80 ± 0,30 |

**Tabla 4.2.Porcentajes de KTO recuperados por inmersión de las membranas en ensayo en una solución del IFA**

La membrana ideal no debe interaccionar química ni físicamente con el IFA, a fin de no ejercer efectos en los procesos de difusión; sin embargo, es muy raro que una membrana no

presente ninguna interacción. Debe seleccionarse aquélla que presente la menor interacción posible[15,36].

El porcentaje de recuperación de KTO fue mayor con respecto a las membranas de Polisulfona, lo que indica una menor retención del IFA en su estructura. En virtud de estos resultados se decidió la utilización de las membranas de Polisulfona como medio semipermeable para continuar con los ELIV.

#### 4.4.1.1.4. SELECCIÓN DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN Y DEL MEDIO RECEPTOR

Habiendo descartado los medios receptores que incluyen agentes tensoactivos por la producción de espuma y las membranas de Acetato de celulosa por su mayor capacidad de retención de KTO, se procedió a determinar el medio receptor y la velocidad de agitación a través de ELIV, bajo los siguientes parámetros de proceso:

- C-KTO como medio donante del IFA (0,5 g/celda)
- membrana de Polisufona como medio semipermeable
- temperatura de ensayo 32°C
- tiempos de muestreo: 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 min
- volumen de muestreo y reposición: 0,3 ml
- y empleando las siguientes combinaciones de parámetros:
    - Tampón fosfatos pH 5,5 – Velocidad de agitación 400 rpm
    - Tampón fosfatos pH 5,5 – Velocidad de agitación 500 rpm
    - Tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 5,5 / etanol 96º 80:20 – Velocidad de agitación 400 rpm
    - Tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 5,5 / etanol 96º 80:20 – Velocidad de agitación 500 rpm

Los resultados de este ensayo se muestran en tabla 4.3 y en la figura 4.4.:

| Medio receptor | Velocidad de agitación | Cantidad KTO liberada acumulada (µg /cm²) |
|---|---|---|
| M1 | 400 rpm | **8,60 ± 0,21** |
| M1 | 500 rpm | **10,90 ± 0,46** |
| M2 | 400 rpm | **49,83 ± 1,31** |
| M2 | 500 rpm | **59,39 ± 1,21** |

**Tabla 4.3. Cantidad KTO liberada acumulada en función de dos medios receptores y dos velocidades de agitación**

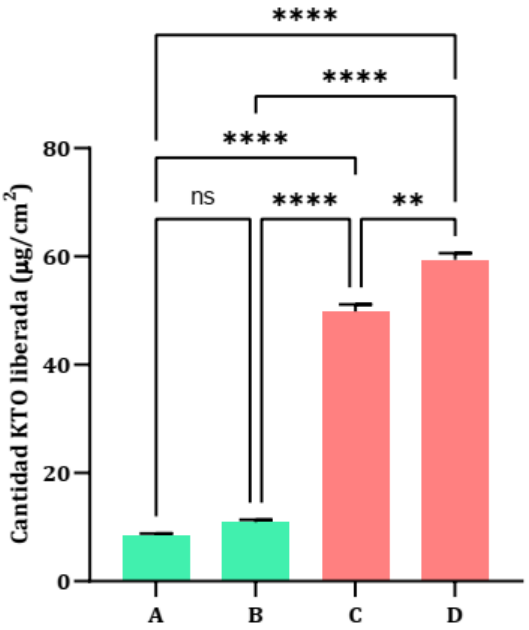



**Fig 4.4. Comparación de la cantidad de KTO liberada en dos medios receptores y a dos velocidades de agitación [ns: p>0,05; (*): p≤0,05; (**): p≤0,01; (****): p≤ 0,0001]**

Se observa que los valores acumulados de KTO en el medio receptor tampón fosfatos pH 5,5 fue menor, sin observarse diferencias significativas (p > 0,05) entre ambas velocidades de agitación. Esta situación se debe, como ya mencionáramos anteriormente, a la baja solubilidad de KTO en este medio, lo que sin duda proporciona resultados distorsionados sobre la cesión del IFA, ya que la cantidad acumulada está limitada por la baja solubilidad del IFA en el medio, y no por el proceso de difusión desde la forma semisólida.

La utilización del tampón fosfatos pH 5,5 adicionado de etanol 20% proporcionó mayores cantidades acumuladas de KTO en solución, que puede explicarse por la acción codisolvente de etanol. Se observó una mayor cesión con la utilización de 500 rpm, siendo esta diferencia significativa ($p < 0,05$).

Además de lograr una buena solubilidad del IFA, el medio receptor debe proporcionar condiciones "sink" (sumidero). Esto implica que en ningún momento del ensayo se alcance la saturación del medio receptor, lo que provocaría una disminución en el flujo del IFA desde la forma farmacéutica, con la consiguiente distorsión de los resultados obtenidos. Las condiciones "sink" están definidas en la USP, y establecen que la solubilidad de saturación del IFA en el medio receptor debe ser al menos tres veces mayor que la concentración del IFA en dicho medio al finalizar el ensayo[37] o, dicho de otra forma, que el volumen del medio receptor debe ser al menos tres veces mayor que el necesario para disolver la dosis del IFA que se está ensayando[19], o que la concentración acumulada del IFA en el medio receptor al terminar el ensayo debe ser menor al 30% respecto de la solubilidad de saturación del IFA en dicho medio[38]. Los dos medios receptores proporcionaron condiciones "sink" en función de las concentraciones de saturación mostradas en Tabla 4.3., si bien a 500 rpm las cantidades acumuladas se observan muy cercanas al límite superior para cumplir esta condición.

Los resultados obtenidos permitieron seleccionar para continuar los ensayos el medio receptor constituido por tampón fosfatos pH 5,5/etanol 80:20 y una velocidad de agitación de 500 rpm.

### 4.4.1.2. ENSAYO DE LIBERACIÓN *IN VITRO* DE KTO A PARTIR DE LOS SISTEMAS SEMISÓLIDOS

Habiendo fijado las condiciones para la realización de los ELIV, se procedió a realizar los ensayos sobre todas las formas farmacéuticas elaboradas y de referencia. En las Figuras 4.5 y 4.6 se muestran los perfiles de liberación obtenidos .

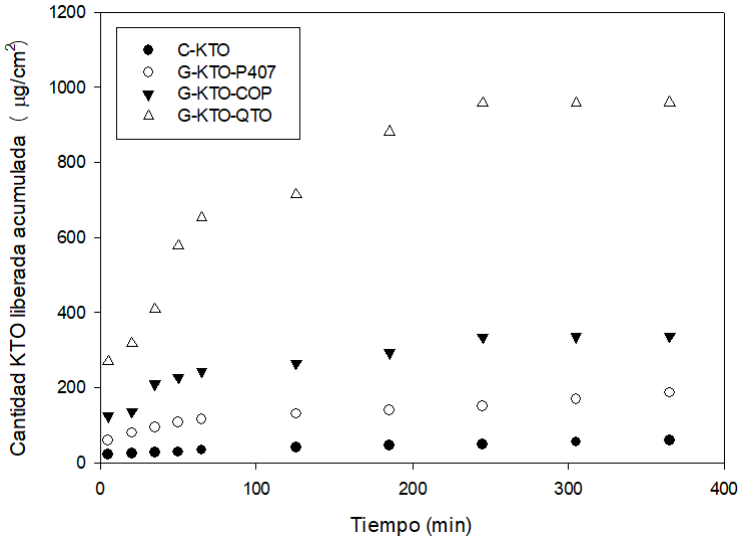



**Fig 4.5. Perfiles de liberación KTO desde los geles en ensayo y la crema comercial de referencia**

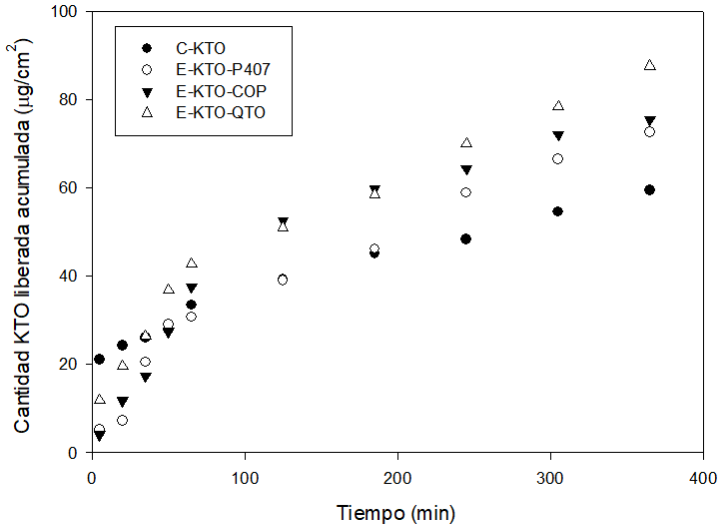



**Fig 4.6. Perfiles de liberación KTO desde los emulgeles en ensayo y la crema comercial de referencia**

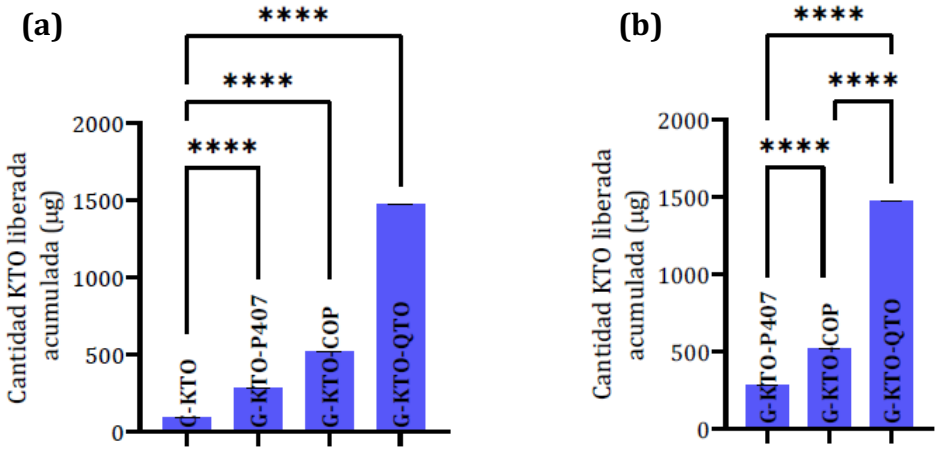



**Fig 4.7. Comparación cantidad KTO liberada acumulada a partir de los geles y la crema de referencia (a) y a partir de los geles (b) al cabo de 6 hs de ensayo [(****): p≤ 0,0001]**

En la fig 4.7 (a) se observa la cantidad de KTO liberada a partir de los tres geles elaborados, en comparación con la crema empleada como referencia. Al cabo de 6 hs de ensayo, la cantidad de KTO liberada fue de 285,2 ± 1,44 µg, 520,2 ± 1,40 µg y 1477,00 ± 1,56 µg para G-KTO-P407, G-KTO-COP y G-KTO-QTO respectivamente, mientras que para C-KTO la cantidad de IFA liberado fue sólo 91,68 ± 1,08 µg. Las diferencias fueron significativas en todos los casos ($p<0,05$).

La mayor velocidad y tasa de liberación de KTO a partir de los geles se atribuye a la mayor solubilidad aparente de KTO en las redes poliméricas de Cop A/P-25I y de QTO, así como en la micelas de P407. En la crema el IFA se encuentra suspendido, y además presenta una cierta afinidad por los componentes de fase oleosa, lo que retrasa su difusión en el excipiente, ya que debe disolverse previamente.

Como ya se mencionara, la liberación de IFAs a partir de sistemas semisólidos es un proceso gobernado principalmente por difusión. El aumento de solubilidad aparente de KTO en los medios poliméricos favorece este proceso, ya que se traduce en un aumento de $C_0$, y de esta forma el gradiente de concentraciones a ambos lados de la membrana es mayor. Los resultados obtenidos son coincidentes con un trabajo publicado por Nunes[39], donde se compara la liberación de KTO a partir del gel y de la crema codificados en USP

La comparación entre la cantidad de KTO liberada a partir de los tres geles en ensayo (fig 4.7 (b))también arrojó diferencias significativas ($p < 0,05$). La menor liberación obtenida en el caso del gel con P407 puede atribuirse al hecho que los geles de P407 constan de una gran población de micelas, estrechamente empaquetadas, y el IFA debe liberarse y difundir a través de los canales acuosos extra micelares de la matriz del gel, etapa que suele ser limitante[40]. Por otro lado, la viscosidad de este sistema es mayor que la de los otros geles, tal cual se vió en el capítulo 3, y esta variable es inversamente proporcional a la difusión de KTO dentro de la base gelificada. La mayor tasa de liberación a partir del gel de Quitosano en comparación a los otros geles puede atribuirse asimismo a la menor viscosidad que presentó esta formulación.

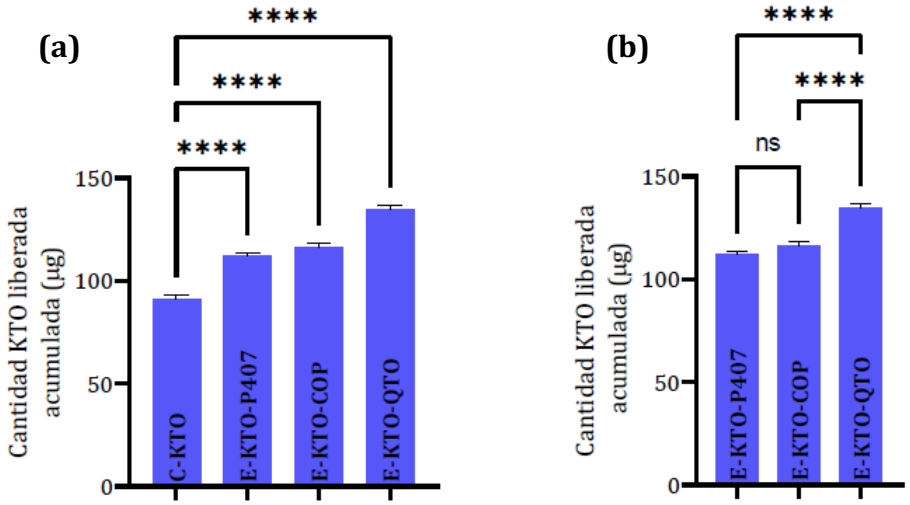



**Fig 4.8. Comparación cantidad KTO liberada acumulada a partir de los emulgeles y la crema de referencia al cabo de 6 hs de ensayo [ns: p>0,05; (****): p≤ 0,0001]**

En la fig 4.8 (a) se observa la comparación en la cantidad de KTO liberada acumulada a lo largo de 6 hs de ensayo a partir de los emulgeles elaborados y la crema empleada como referencia. Todos los emulgeles presentaron mayores tasas de liberación (112,2 ± 1,62 µg, 116,5 ± 1,67 µg y 134,5 ± 2,48 µg para E-KTO-P407, E-KTO-COP y E-KTO-QTO respectivamente) comparados con la crema (91,68 ± 1,08 µg) ($p < 0,05$). En trabajos previos se reportaron mayores tasas de liberación de IFAs a partir de emulgeles[41,42]. En este caso en particular puede relacionarse la mayor tasa de liberación de KTO a partir de los

emulgeles con la mayor cantidad de KTO presente en la fase externa acuosa gelificada, lo que favorece los procesos de difusión. Es de destacar la mayor tasa de liberación de KTO a partir de los geles, probablemente debido a la mayor afinidad de KTO por la fase hidrofóbica interna de los emulgeles.

Respecto a la comparación entre los emulgeles (Fig 4.8 (b)), no se observaron diferencias significativas entre los que contienen P407 y Cop A/P-25 I como gelificante de fase externa. El emulgel conteniendo QTO presentó una mayor tasa de liberación, debido probablemente a la menor viscosidad de la fórmula.

Para asignar el modelo al que responde la cinética de liberación, se ajustaron los datos a diversas ecuaciones y se obtuvo el $r^2$ a partir del análisis efectuado por el programa informático (Tabla 4.4.).

| Sistema | Orden 0 | Orden 1 | Higuchi | K-P |
|---|---|---|---|---|
| **C-KTO** | 0,87 ± 2,23 | 0,91 ± 0,10 | 0,90 ± 1,51 | 0,92 ± 0,04 |
| **G-KTO-P407** | 0,84 ± 3,48 | 0,72 ± 0,18 | 0,93 ± 1,33 | 0,98 ± 0,0009 |
| **G-KTO-COP** | 0,86 ± 5,70 | 0,73 ± 0,20 | 0,91 ± 3,21 | 0,96 ± 0,025 |
| **G-KTO-QTO** | 0,82 ± 9,58 | 0,70 ± 0,26 | 0,95 ± 8,27 | 0,97 ± 0,0072 |
| **E-KTO-P407** | 0,88 ± 8,25 | 0,12 ± 0,37 | 0,93 ± 6,10 | 0,98 ± 0,006 |
| **E-KTO-COP** | 0,77 ± 12,4 | 0,60 ± 0,26 | 0,94 ± 6,30 | 0,96 ± 0,008 |
| **E-KTO-QTO** | 0,87 ± 9,32 | 0,24 ± 0,24 | 0,95 ± 5,60 | 0,99 ± 0,004 |

**Tabla 4.4. Valores de r2 en la modelización de la cinética de liberación de KTO según distintos modelos**

El mejor ajuste, según los valores de r2, correspondió al modelo de Korsemeyer-Peppas (Gráficos 4.9 (a,b))

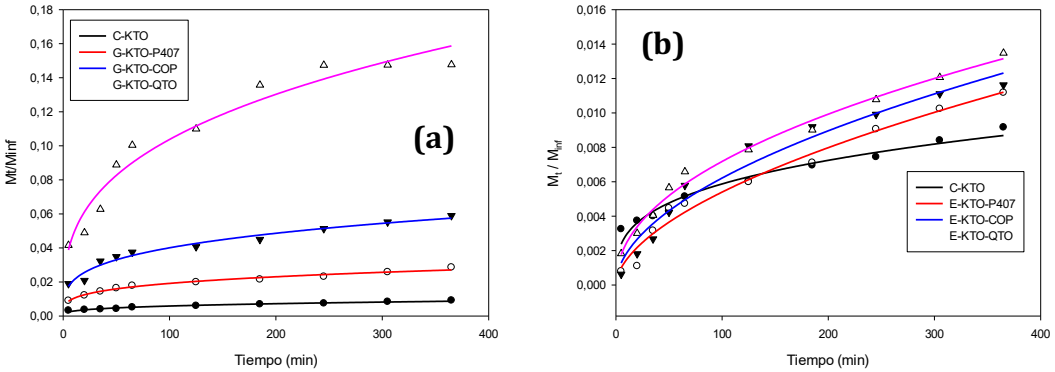



**Fig 4.9. Ajuste de los datos experimentales al modelo de Korsemeyer-Peppas: (a) Geles vs crema; (b) Emulgeles vs crema**

En Tabla 4.5. se muestran los valores de K y n.

| | K | n |
|---|---|---|
| **C-KTO** | 0,00146 ± 0,0001 | 0,30 ± 0,02 |
| **G-KTO-P407** | 0,0056 ± 0,0004 | 0,26 ± 0,015 |
| **G-KTO-COP** | 0,0111 ± 0,0012 | 0,28 ± 0,02 |
| **G-KTO-QTO** | 0,0200 ± 0,0025 | 0,36 ± 0,02 |
| **E-KTO-P407** | $0{,}0004 \pm 10^{-5}$ | 0,56 ± 0,04 |
| **E-KTO-COP** | 0,0005 ± 0,0001 | 0,53 ± 0,05 |
| **E-KTO-QTO** | $8{,}30.10^{-4} \pm 10^{-5}$ | 0,46 ± 0,02 |

**Tabla 4.5. Valores de K y n para los sistemas en ensayo**

Para la crema y los geles, el valor de n fue menor a 0,5, indicando un proceso de liberación fickiano, regido por proceso de difusión. En el caso de los emulgeles, los valores de n fueron ligeramente superiores a 0,5, lo que corresponde a un modelo no fickiano y el mecanismo de liberación del fármaco se rige tanto por difusión como por hinchamiento y relajación de cadenas poliméricas[43].

## 4.4.2. GRISEOFULVINA

### 4.4.2.1. SELECCIÓN DE VARIABLES DE PROCESO

#### 4.4. 2.1.1. SELECCIÓN DE LA TEMPERATURA

La temperatura de prueba se mantuvo a 32°C ± 1°C durante todo el ensayo, valor adoptado comúnmente como parámetro para simular las condiciones del estrato córneo[23].

#### 4.4.2.1.2. SELECCIÓN DEL MEDIO RECEPTOR (ENSAYOS PRELIMINARES)

Teniendo en cuenta el pH de la superficie de la piel, y la revisión bibliográfica realizada, se seleccionaron cuatro posibles medios receptores: un tampón fosfato monosódico-fosfato disódico a pH 6,4 ($M_1$), adicionado de un cosolvente (Propilenglicol) en proporción 80:20 ($M_2$), de un agente tensoactivo no iónico (Polisorbato 20 2%) ($M_3$) y de un agente tensoactivo aniónico (LSNa 1%) ($M_4$).

Los resultados de los ensayos de solubilización se muestran en Tabla 4.6.

| | **Solubilidad GRI (µg/ml)** |
|---|---|
| Tampón fosfato monosódico-fosfato disódico ph6,4 | **41,05 ± 0,72** |
| Tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 6,4 / propilenglicol 80:20 | **52,78 ± 0,15** |
| Tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH6,4 + 2% Polisorbato 20 | **157,35 ± 0,50** |
| Tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 6,4 + 1% LSNa | **195,60 ± 007** |

**Tabla 4.6.Solubilidad de GRI en los posibles medios receptores seleccionados**

Los resultados de los ensayos de estabilidad de GRI en los posibles medios receptores se muestran en la Fig 4.10.

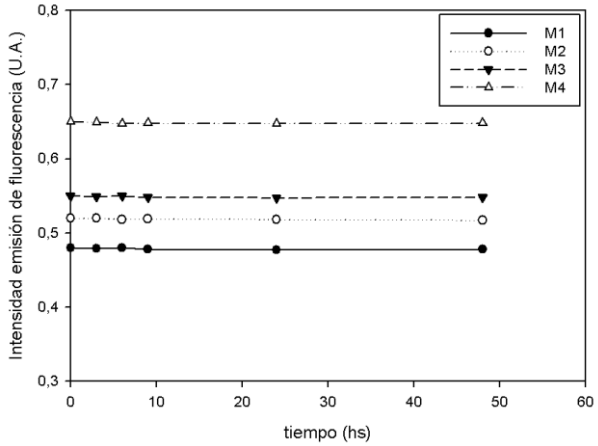



**Fig 4.10. Estabilidad GRI en los posibles medios receptores**

El uso de Propilenglicol (cosolvente) y de agentes tensoactivos proporcionó una mayor solubilidad de GRI en medios acuosos, en concordancia con estudios previamente realizados. Sin embargo, la presencia de espuma por agitación en las soluciones conteniendo Polisorbato 20 y LSNa afecta sustancialmente a la realización de los ELIV, por lo que se descartan como posibles medios receptores.

Se continuaron los ensayos con tampón fosfatos pH 6,4 (M1) y tampón fosfatos pH 6,4 + propilenglicol 80:20.

### 4.4.2.1.3. SELECCIÓN DE LA MEMBRANA (ENSAYO PRELIMINAR)

Se seleccionaron para los ELIV dos tipos de membranas, Acetato de Celulosa y Polisulfona.

Para determinar la influencia de la constitución de las membranas en estudio, se realizaron ensayos de retención de GRI utilizando una solución de GRI de concentración conocida.

Los porcentajes de GRI residuales en las soluciones de prueba se muestran en Tabla 4.7.:

| Membrana | % GRI |
|---|---|
| **Polisulfona** | **99,10 ± 0,38** |
| **Acetato de celulosa** | **94,50 ± 1,05** |
| **Solución GRI control** | **99,90 ± 0,80** |

**Tabla 4.7.Porcentajes de GRI recuperados por inmersión de las membranas en ensayo en una solución del IFA**

El porcentaje de recuperación de GRI fue mayor con respecto a las membranas de Polisulfona, lo que indica una menor retención del IFA en su estructura. En virtud de estos resultados se decidió la utilización de las membranas de Polisulfona como medio semipermeable para continuar con los ELIV.

#### 4.4.2.1.4. SELECCIÓN DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN Y DEL MEDIO RECEPTOR

Habiendo descartado los medios receptores que incluyen agentes tensoactivos por la producción de espuma y las membranas de Acetato de celulosa por su mayor capacidad de retención de GRI, se procedió a determinar el medio receptor y la velocidad de agitación a través de ELIV, bajo los siguientes parámetros de proceso:

- C-GRI como medio donante del IFA (0,5 g/celda)
- membrana de Polisufona como medio semipermeable
- temperatura de ensayo 32°C
- tiempos de muestreo: 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 min
- volumen de muestreo y reposición: 0,3 ml
- y empleando las siguientes combinaciones de parámetros:
    - Tampón fosfatos pH 6,4 – Velocidad de agitación 400 rpm (M1)
    - Tampón fosfatos pH 6,4 – Velocidad de agitación 500 rpm (M1a)
    - Tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 6,4 / propilenglicol 80:20 – Velocidad de agitación 400 rpm (M2)
    - Tampón fosfato monosódico-fosfato disódico pH 6,4 / propilenglicol 80:20 – Velocidad de agitación 500 rpm (M2a)

Los resultados de este ensayo se muestran en tabla 4.8 :

| Medio receptor | Velocidad de agitación | Cantidad GRI liberada acumulada (µg /cm²) |
|---|---|---|
| M1 | 400 rpm | **0,38 ± 0,20** |
| M1(a) | 500 rpm | **0,40 ± 0,30** |
| M2 | 400 rpm | **0,93 ± 0,55** |
| M2(a) | 500 rpm | **0,98 ± 0,60** |

**Tabla 4.8. Cantidad GRI liberada acumulada en función de dos medios receptores y dos velocidades de agitación**

La utilización del tampón fosfatos pH 6,4 adicionado de propilenglicol 20% proporcionó mayores cantidades acumuladas de GRI en solución, que puede explicarse por la acción codisolvente de propilenglicol. Se observó una mayor cesión con la utilización de 500 rpm, siendo esta diferencia significativa ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos permitieron seleccionar para continuar los ensayos el medio receptor constituido por tampón fosfatos pH 6,4/propilenglicol 80:20 y una velocidad de agitación de 500 rpm.

### 4.4.2.2. ENSAYO DE LIBERACIÓN *IN VITRO* DE GRI A PARTIR DE LOS SISTEMAS SEMISÓLIDOS

Habiendo fijado todas las condiciones para la realización de los ELIV, se procedió a realizar los ensayos sobre todas las formas farmacéuticas elaboradas y de referencia. Los datos obtenidos sobre la crema C-GRI en el punto 4.4.2.1.4. fueron utilizados en esta etapa a los fines de comparación.

En las Figuras 4.11 y 4.12 se muestran las gráficas obtenidas para este ensayo

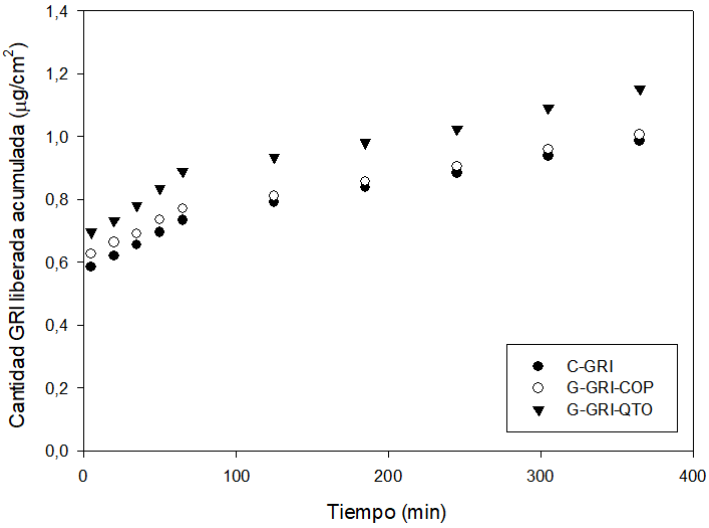



**Fig 4.11. Perfiles liberación GRI a partir de los geles en ensayo y la crema de referencia**

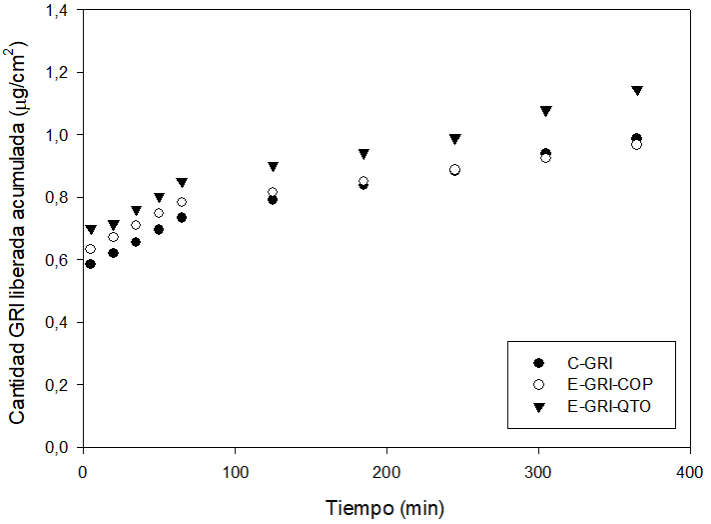



**Fig 4.12. Perfiles liberación GRI a partir de los emulgeles en ensayo y la crema de referencia**

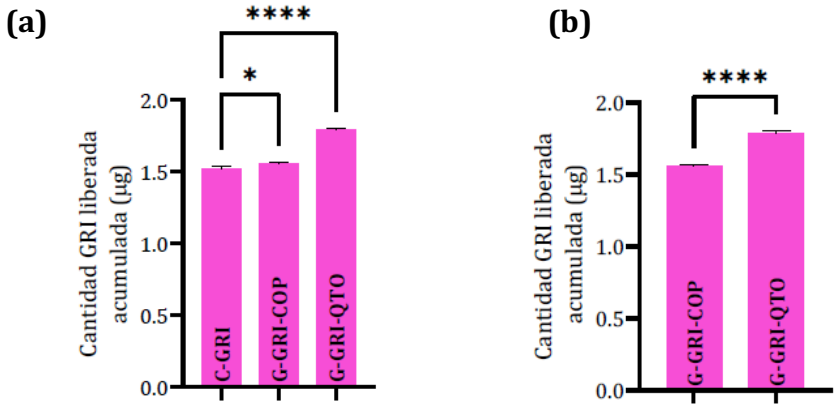



**Fig 4.13. Comparación de la cantidad de GRI liberada acumulada a partir de los geles y de la crema de referencia (a) y a partir de los geles (b) [(*): p≤0,05; (****): p≤ 0,0001]**

En la fig 4.13 (a) se observa la comparación entre la cantidad de GRI liberada acumulada a lo largo de las 6 hs de ensayo a partir de los geles y la crema elaborada como referencia. En todos los casos las tasas de liberación fueron muy bajas (inferiores al 0,1%). Los geles conteniendo Cop A/P-25I y QTO presentaron una mayor tasa de liberación (1,56 ± 0,011 µg y 1,79 ± 0,013 µg, respectivamente) en relación a la crema (1,517 ± 0,019 µg), si bien en el caso de G-GRI-COP esta diferencia fue muy poco significativa. Ambos geles (fig 4.13.(b)) presentaron diferencias significativas entre sí en cuanto a la tasa de liberación del IFA, probablemente debidas a la menor viscosidad del G-GRI-QTO.

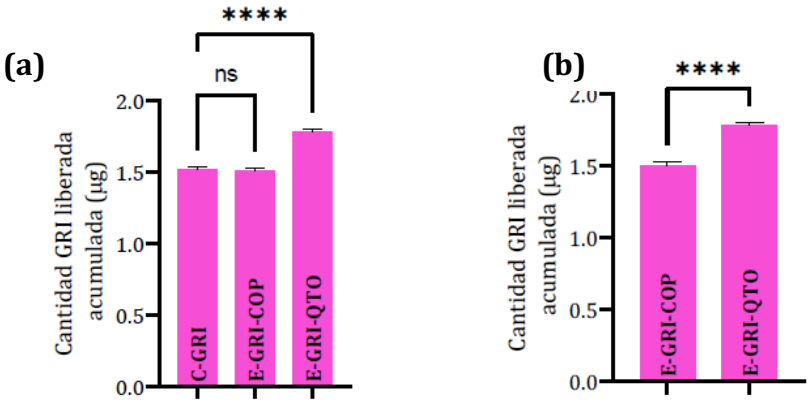



**Fig 4.14. Comparación de la cantidad de GRI liberada acumulada a partir de los emulgeles y de la crema de referencia (a) y a partir de los emulgeles (b) [ns: p>0,05; (****): p≤ 0,0001]**

Con respecto a los emulgeles, se observa en la fig 4.14 (a) que las tasas de liberación también fueron muy bajas. E-GRI-COP presentó una tasa de liberación ligeramente menor a C-GRI (1,505 ± 0,021 µg y 1,517 ± 0,019 µg respectivamente), aunque dicha diferencia no fue estadísticamente significativa. E-GRI-QTO evidenció una mayor liberación del IFA en los tiempos del ensayo (1,782 ± 0,011 µg) respecto a la crema de referencia ($p < 0,05$). Entre ambos emulgeles, E-GRI-QTO presentó una mayor liberación que E-GRI-COP, lo que se atribuye a la menor viscosidad de la formulación, tal cual se viera en el Capítulo 3.

Para asignar el modelo al que responde la cinética de liberación, se ajustaron los datos a diversas ecuaciones y se obtuvo el $r^2$ (Tabla 4.9).

| Sistema | Orden 0 | Orden 1 | Higuchi | K-P |
|---|---|---|---|---|
| **C-GRI** | 0,95 ±0,04 | 0,92 ± 0,05 | 0,99 ± 0,02 | 0,94 ± 10-5 |
| **G-GRI-COP** | 0,96 ± 0,04 | 0,93 ± 0,04 | 0,99 ± 0,02 | 0,93 ± 10-5 |
| **G-GRI-QTO** | 0,93 ± 0,06 | 0,89 ± 0,05 | 0,98 ± 0,03 | 0,94 ± 10-5 |
| **E-GRI-COP** | 0,92 ± 0,05 | 0,88 ± 0,05 | 0,98 ± 0,02 | 0,95 ± 10-5 |
| **E-GRI-QTO** | 0,96 ± 0,04 | 0,94 ± 0,04 | 0,97 ± 0,04 | 0,89 ± 10-5 |

**Tabla 4.9. Valores de r2 en la modelización de la cinética de liberación de GRI según distintos modelos**

El mejor ajuste, según los valores de r2, correspondió al modelo de Higuchi. En fig 4.15 (a y b) se muestran las curvas de regresión correspondientes y en Tabla 4.10. los valores de $K_H$, flujo (J) y coeficiente de difusión (D) para cada uno de los sistemas.

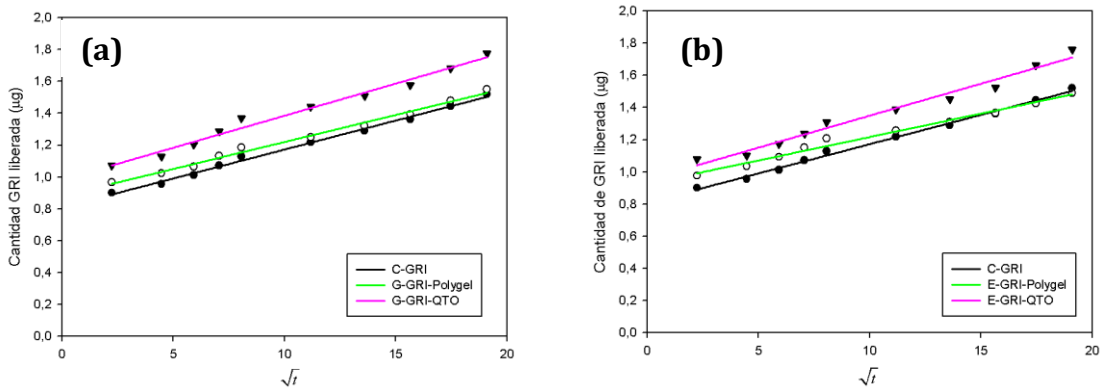



**Fig 4.15. Ajuste de los datos experimentales al modelo de Higuchi: (a) Geles vs crema; (b) Emulgeles vs crema**

| | $K_H$ | J (μg/min) | D ($cm^2$/min) |
|---|---|---|---|
| **C-GRI** | 0,04 ± 0,0009 | 0,0364 ± 0,0009 | $3.10^{-11}$ |
| **G-GRI-COP** | 0,03 ± 0,001 | 0,0339 ± 0,034 | $2,5.10^{-11}$ |
| **G-GRI-QTO** | 0,04 ± 0,002 | 0,0403 ± 0,04 | $3,61.10^{-11}$ |
| **E-GRI-COP** | 0,03 ± 0,001 | 0,0291 ± 0,03 | $1,66.10^{-11}$ |
| **E-GRI-QTO** | 0,04 ± 0,002 | 0,0397 ±0,04 | $3,61.10^{-11}$ |

**Tabla 4.10. Valores de KH para la liberación de GRI a partir de los sistemas en estudio y la crema de referencia**

# CAPÍTULO 4 - CONCLUSIONES

En este capítulo se se realizaron los ensayos correspondientes a determinar la capacidad de liberación de los IFAs modelo a partir de las formas semisólidas elaboradas y las empleadas como referencia.

Se seleccionó previamente en cada caso las condiciones para la realización de los ELIV (temperatura, medio receptor, tipo de membrana, velocidad de agitación)

⇒ En el caso de las formulaciones conteniendo KTO, aquellas que incluyeron en su composición los polímeros en estudio presentaron una mayor capacidad de cesión del IFA, comparado con una crema comercial empleada como referencia. Sus perfiles de liberación coincidieron con resultados previos informados en la bibliografía para productos tópicos. Todas las formulaciones mostraron una cinética de liberación correspondiente al modelo de Korsemeyer-Peppas; en el caso de los geles y la crema de referencia, el valor de n fue menor a 0,5, indicando un comportamiento de tipo fickiano (difusional); en el caso de los emulgeles, n fue ligeramente mayor a 0,5, indicando un comportamiento no fickiano, donde la liberación del IFA no sólo está gobernado por difusión sino también por el relajamiento de las cadenas poliméricas que constituyen la fase externa.

⇒ Con respecto a los sistemas conteniendo GRI, todos los sistemas que contienen los polímeros en estudio, con excepción del emulgel E-GRI-COP, evidenciaron una mayor liberación del IFA que la crema con excipientes convencionales empleadas como referencia, si bien las tasas de liberación fueron muy bajas (menores al 0,1%). En todos los casos la cinética de liberación correspondió al modelo de Higuchi, indicando un mecanismo de liberación fickiano (difusional).

# CAPÍTULO 4 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


1-Olejnik A, Goscianska J, Nowak I. Active Compounds Release from Semisolid Dosage Forms. J. Pharm. Sci. 2012; 101(11):4032-4045.

2-Xu X, Al-Ghabeish M, Krishnaiah YSR, Rahman Z, Khan MA. Kinetics of drug release from ointments: Role of transient-boundary layer. Int. J. Pharm. 2015; 494:31–39.

3-Kouser Shaikh H, Kshirsagar RV, Patil SG. Mathematical models for drug release characterization: a review. World J. Pharm. Pharm. Sci. 2015; 4(4): 324-338.

4-Higuchi T. Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension. J. Pharm. Sci. 1961; 50(10):874-876.

5-Bruschi ML. Mathematical models for drug release. En Marcos Luciano Bruschi (ed). Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd; 2015. p 63-86.

6-The Topical/Transdermal Ad Hoc Advisory Panel for the USP Performance Tests of Topical and Transdermal Dosage Forms. Topical and Transdermal Drug Products. Pharmacopeial Forum. 2009; 35(3):750-764.

7-Kanfer I, Rath S, Purazi P, Mudyahoto NA. In Vitro Release Testing of Semi-Solid Dosage Forms. Dissolution Technol. Agosto 2017. p 52-60.

8-USP38–NF33. <1724> SEMISOLID DRUG PRODUCTS—PERFORMANCE TESTS Page 1625.

9-Naik P, Shah S, Heany J, Hanson R, Nagansenker M. Influence of Test Parameters on release Rate of Hydrocortisone from Cream: Study Using Vertical Diffusion Cell. Dissolution Technologies. 2016; August 2016: 14-20.

10-Azarmi S, Roa W, Lobenberg R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. Int. J. Pharm. 2007; 328:12–21.

11-Williams AC. Topical and Transdermal Drug Delivery. En: Aulton ME, Taylor KMG (eds). Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines. 4º ed. China: Churchill Livingstone Elservier; 2013. pp 683-685.

12-Ng S-F, Rouse J, Sanderson D, Eccleston G. A Comparative Study of Transmembrane Diffusion and Permeation of Ibuprofen across Synthetic Membranes Using Franz Diffusion Cells. Pharmaceutics. 2010; 2: 209–223.

13-Klein RR, Heckart JL, Thakker KD. In Vitro Release Testing Methodology and Variability with the Vertical Diffusion Cell (VDC). Dissolution Technol. Agosto 2018 (acceso 20/08/2019). Disponible en www.dissolutiontechnologies.com

14-Brain KR, Walters KA, Watkinson AC. Methods for studying Percutaneous Absorption. En Walters KA (ed). Dermatological and Transdermal Formulations. New York: Marcel Dekker Inc.; 2002. p. 197-270.

15-Hanson Research Corporation. John Heaney. White paper: Diffussion Method Development Guideliness. Doc 0001, Rev A. Mayo 2014.

16-Jain A, Gautam SP, Gupta Y, Khambete H, Jain S. Development and characterization of ketoconazole emulgel for topical drug delivery. Der Pharmacia Sinica. 2010; 1(3):221-231.

17-Hashemzadeha N, Jouyban A. Solubility of Ketoconazole in Ethanol + Water Mixtures at Various Temperatures. Chem. Eng. Com. 2014; 202:9:1211-1215.

18-De Freitas ZMF, Ricci-Junior E, Bemvindo CS, Dos Santos EP, Storpirtis S, Chiann C et al. Development and Characterization of Ketoconazole Cream To Treat Superficial Mycoses: *In Vitro* Permeation and *In Vivo* Retention Studies. Lat. Am. J. Pharm. 2015; 34(7):1304-10.

19-Pawar HA, Joshi PR. Development and Validation of a Discriminating *In Vitro* Dissolution Method for Oral Formulations Containing Satranidazole. Int. J, Spectrosc. 2014; Article ID 624635 (7 pag): http://dx.doi.org/10.1155/2014/624635.

20-Tiffner KI, Kanfer I, Augustin T, Raml R, Raney SG, Sinner F. A comprehensive approach to qualify and validate the essential parameters of an in vitro release test (IVRT) method for acyclovir cream, 5%. Int. J. Pharm. 2018; 535:217-227.

21-Modi PB, Shah J**.** Optimization of an *in vitro* release test for topical formulations containing eberconazole nitrate and mometasone furoate**.** Der Pharma Chemica. 2015: 7(8):1-9.

22-Deo SS, Inam F, Karmarkar NP. Analytical Method Development for Determination of Performance of Adapalene in Adapalene 0.1% Gel Formulation Using Manual Diffusion Cell. Chem Sci Trans. 2013; 2(1):251-257.

23-Manescu O, Lupuleasa D, Miron D S, Budura E A, Radulescu F S. *In vitro* drug elease from topical antifungal pharmaceutical formulation. FARMACIA. 2011; 50(1):15-23.

24-Shishu, Aggarwal N. Preparation of hydrogels of griseofulvin for dermal application. Int. J. Pharm. 2006; 326:20–24.

25-Peira E, Gallarate M, Spagnolo R, Chirio D, Trotta M. Thermogelling microemulsions for topical delivery of griseofulvin. J. Drug Del. Sci. Tech. 2011; 21(6):497-501.

26-Aggarwal N, Goindi S, Khurana R. Formulation, characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. Col. Surf. B: Biointerfaces. 2013; 105:158–166.

27-U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Guidance for Industry Nonsterile Semisolid Dosage Forms). SUPAC-SS. Mayo 1997. Disponible en https://www.fda.gov/media/71141/download (acceso 18/11/2021)

28-Lubach JW, Chen JZ, Hau J, Imperio J, Coraggio M, Liu L et al. Investigation of the Rat Model for Preclinical Evaluation of pHDependent Oral Absorption in Humans. Mol. Pharm. 2013; 10: 3997- 4004.

29-Adachi M, Hinatsu Y, Kusamori K, Katsumi H, Sakane T, Nakatani M et al. Improved dissolution and absorption of ketoconazole in the presence of organic acids as pH-modifiers. Eur. J. Pharm. Sci. 2015; 76:225–230.

30- Vila Jato JL. Tecnología Farmacéutica Volumen I: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Madrid: Editorial Síntesis S.A.; 2001.

31-Faulí Trillo C. Tratado de Farmacia Galénica. Madrid: Luzán 5 S.A. Ed; 1993.

32-Rangel-Yagui CO, Pessoa-Jr A, Costa Tavares L. Micellar solubilization of drugs. J Pharm Pharmaceut Sci. 2005; 8(2):147-163.

33-Mitu MA, Lupuliasa D, Dinu-Pîrvu CE, Rădulescu FS, Miron DS, Vlaia L. Ketoconazole in topical pharmaceutical formulations. The influence of the receptor media on the in vitro diffusion kinetics. FARMACIA. 2011; 59(3):358-366.

34-Zatz JL. Drug Release of Semisolids: Effect of Membrane Permeability on Sensitivity to Products Parameters. Pharm. Res. 1995; 12(5):787-789.

35-Shah VP, Elkins J, Lam S-Y, Skelly JP. Determination of in vitro drug release from hydrocortisone creams. Int. J. Pharm. 1989; 53:53-59.

36-Ng S-F, Rouse JJ, Sanderson FD, Eccleston GM. The Relevance of Polymeric Synthetic Membranes in Topical Formulation Assessment and Drug Diffusion Study. Arch. Pharm. Res. 2012; 35(4):579-593.

37-Phillips DJ, Pygall SR, Cooper VB, Mann JC. Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. J Pharm Pharmacol. 2012; 64:1549–1559.

38-Murphy DJ, Lim D, Armstrong R, McCoy CF, Dallal Bashi YH, Boyd P et al. Refining the in vitro release test method for a dapivirine-releasing vaginal ring to match in vivo performance. Drug Delivery and Translational Research. [publicación online], Octubre 2021. https://doi.org/10.1007/s13346-021-01081-7.

39-Nunes MA. Comparison of ketoconazole USP 2% gel and ketoconazole 2% cream using optical microscopy. J Am Acad Dermatol (libro de resúmenes). Febrero 2007.

40- El-Houssieny BM, Hamouda HM, Formulation and evaluation of clotrimazole from pluronic F127 gels. Drug Discoveries & Therapeutics. 2010; 4(1):33-43.

41-Jain A, Gautam SP, Gupta Y, Khambete H, Jain S. Development and characterization of ketoconazole emulgel for topical drug delivery. Der Pharmacia Sinica. 2010; 1(3): 221-231.

42- de Lafuente Y, Ochoa-Andrade A, Parente ME, Palena MC, Jimenez-Kairuz A. Preparation and evaluation of caffeine bioadhesive emulgels forcosmetic applications based on formulation design using QbD tolos. Int J Cosm Sci. 2020;42: 548–556.

43-Fernández-Campos F, Obach M, Moreno MC, García A, González J. Pharmaceutical development of a generic corticoid semisolid. Formulation. J Drug Deliv Sci Tech. 2017; 42:227-236.

# CONCLUSIONES FINALES

Se analizaron las posibles interacciones entre los IFAs modelo y los polímeros en estudio, empleando espectrofluorometría como metodología instrumental.

El análisis de los espectros de emisión de fluorescencia de Ketoconazol en ausencia y en presencia de los polímeros en ensayo mostró que Quitosano, Copolímero Acrilato/Palmeth-25 Itaconato y los poloxámeros indujeron cambios, ya sea en la posición del pico de emisión máxima y/o en la intensidad de emisión. Quitosano y Copolímero Acrilato/Palmeth-25 Itaconato produjeron disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia, atribuible a la formación de complejos IFA-polímero no fluorescentes. Los poloxámeros produjeron un aumento en la intensidad de emisión y un desplazamiento del pico máximo hacia menores longitudes de onda, debido a la formación de micelas que incluyen al IFA en sus dominios hidrofóbicos, menos polares. La titulación espectrofluorométrica en KTO en presencia de concentraciones crecientes de los polímeros que evidenciaron interacciones arrojó curvas con un perfil hiperbólico, que se analizaron según un modelo de regresión no lineal de unión de ligandos. Se determinaron los valores de Cmin, CMC, $\Delta F\%$ y $K_a$. QTO, Cop A/P-25I y P407 mostraron la mejor capacidad de incorporación del IFA en función de esas tres variables. El análisis de los procesos de extinción de fluorescencia de KTO incluido en los polímeros en ensayo evidenció una mayor inclusión del IFA en los dominios hidrofóbicos de las soluciones poliméricas en el caso de QTO, Cop A/P-25I y P407. Según el análisis de estabilidad de KTO en los sistemas poliméricos, seguida por espectrofluorometría, KTO permaneció estable en los sistemas en estudio durante el tiempo establecido.

El análisis de los espectros de emisión de Griseofulvina en ausencia y presencia de los polímeros en estudio mostró que Quitosano, Copolímero Acrilato/Palmeth-25 Itaconato y los poloxámeros indujeron cambios, ya sea en la posición del pico de emisión máxima y/o en la intensidad de emisión, similares a lo enunciado para Ketoconazol. La titulación espectrofluorométrica de GRI con Quitosano y con Copolímero Acrilato/Palmeth-25 Itaconato proporcionaron gráficas con un perfil hiperbólico, que se analizaron según un modelo de regresión no lineal de unión de ligandos, calculándose Cmin, AF% y Ka. En el caso de los poloxámeros no fue posible obtener datos que permitieran realizar su análisis. Los valores de KSV obtenidos por

extinción de fluorescencia con acrilamida en presencia de QTO y Cop A/P-25 I fueron mayores que en ausencia de los polímeros, lo que no se asocia a la no inclusión de GRI en el entramado polimérico. En el análisis de estabilidad de GRI en los sistemas poliméricos, seguida por espectrofluorometría, el IFA permaneció estable en los sistemas ensayados durante el tiempo establecido.

Se elaboraron formas farmacéuticas semisólidas (geles y emulgeles) conteniendo los IFAs modelo y los polímeros seleccionados, y se procedió a su caracterización, en comparación con cremas de referencia. Todos los sistemas ensayados mostraron valores de pH dentro del rango establecido para formulaciones de aplicación dérmica. El signo de los emulgeles correspondió al diseño planteado (emulsiones O/A). Los factores de extensibilidad fueron apropiados según lo reportado por la bibliografía. El comportamiento reológico de las formulaciones control y en estudio fue de tipo no newtoniano reofluidizante, tanto para los geles como para los sistemas emulsivos. Todos los sistemas presentaron tensión de fluencia, característico de los sistemas reofluidizantes plásticos, mayor para aquéllos sistemas de mayor viscosidad, y ajustaron matemáticamente al modelo Herscheld-Bulkley, A excepción del sistema G-GRI-QTO, todos las demás formulaciones presentaron tixotropía en diversa magnitud, según las condiciones del ensayo. Todas las formulaciones conteniendo KTO y GRI fueron capaces de inhibir el crecimiento de *C. parapsillosis* y de T. mentagrophytes respectivamente, evidencia indirecta de una adecuada liberación de los IFAs a partir de las formulaciones.

Se realizaron ensayos de liberación in vitro para todas las formulaciones elaboradas y de referencia, seleccionando previamente los parámetros de procesos adecuados para cada IFA. Los perfiles de liberación respondieron a las cinéticas descriptas (Korsemeyer Peppas e Higuchi para Ketoconazol y Griseofulvina, respectivamente). Las tasas de liberación de las formulaciones elaboradas fueron mayores a las de las cremas de referencia, si bien, para el caso de Griseofulvina, las mismas tuvieron valores muy bajos (menor al 0,1%).

La utilización de Quitosano, Copolímero Acrilato/Palmeth-25 Itaconato y Poloxámero 407 en la elaboración de geles y emulgeles con Ketoconazol permitió la obtención de sistemas con características adecuadas para su aplicación sobre la piel y que

evidenciaron una mayor liberación del IFA respecto a una especialidad medicinal (crema) comercializada en nuestro país.

La utilización de Quitosano y Copolímero Acrilato/Palmeth-25 Itaconato en la elaboración de geles y emulgeles con Griseofulvina no cumplió totalmente con la hipótesis de trabajo; si bien se obtuvieron sistemas con características adecuadas, las tasas de liberación fueron muy bajas, al igual que la crema utilizada de referencia, con lo que difícilmente puedan lograrse las concentraciones necesarias para ejercer su efecto terapéutico.