

Artículo original

Comparación del efecto inhibitorio sobre *C. albicans*, del ketoconazol incorporado en mesofases líquido-cristalinas, con el de formas farmacéuticas comerciales

Alfonso Santiago Téllez,* Alejandro Palma Ramos,* Carlos Tomás Quirino Barreda,**
Laura Estela Castrillón Rivera,* José Jesús Juárez Sandoval,** Jorge Ismael Castañeda Sánchez*

RESUMEN

Introducción: El glicerol monooleato (GMO) es un lípido polar conocido como potenciador de la permeación de fármacos a través de la piel; explicándose su acción, entre otros factores, por su interacción con las bicapas fosfolipídicas de la epidermis; las cuales, al igual que el GMO, pueden existir en diversas mesofases líquido-cristalinas. Investigaciones anteriores han demostrado que el GMO y sus derivados comercializados como excipientes polifuncionales, se dispersan en agua formando mesofases líquido-cristalinas liotrópicas nanoestructuradas (NCLL) cúbicas (cubosomas) o hexagonales (hexosomas); consiguiendo así, por su similitud con los lípidos de la epidermis, incrementar la probabilidad de retención corneo-dérmica y/o la absorción transdérmica de fármacos. **Objetivo:** Formular y comparar un agente antifúngico con actividad terapéutica de forma tópica con las presentaciones comerciales. **Material y métodos:** En este trabajo se elaboraron cristales líquidos liotrópicos de tamaño nanométrico (NCLLs) conteniendo ketoconazol (KTZ), se evaluó su efecto antimicótico y se comparó con el efecto del KTZ en presentaciones comerciales (tabletas de 200 mg y suspensión oral al 2%). **Resultados:** El sistema NCLLs+KTZ mostró un efecto antimicótico mayor al de los preparados comerciales y por la relativa simplicidad de la elaboración de éste, así como la ventaja representada por su diseño de aplicación tópica, representa una alternativa más segura y eficaz para el tratamiento de las micosis con ketoconazol, y otros sistemas nanométricos actualmente en desarrollo. **Conclusión:** Se logró una buena potencia antimicótica del ketoconazol al incorporarlo en NCLLs (CMI 24 µg/mL KTZ), por lo que un NCLLs es una buena opción como sistema acarreador de fármacos.

Palabras clave: Cristales líquidos liotrópicos, ketoconazol, hexosomas, efecto antimicótico.

ABSTRACT

Introduction: Glycerol monooleate (GMO) is a polar lipid known as a drug permeation enhancer through the skin; its action being explained among other factors, by its interaction with the phospholipid bilayers of the epidermis; which, like the GMO, can exist in different liquid-crystalline mesophases. Previous research has shown that GMO and its derivatives marketed as polyfunctional excipients, are dispersed in water to form liquid nanostructured lyotropic crystalline mesophiles (NCLL) cubic (cubosomes) or hexagonal (hexosomes); thus achieving, due to its similarity with the lipids of the epidermis, increasing the probability of corneal-dermal retention and/or the transdermal absorption of drugs. **Objective:** Formulate and compare an antifungal agent with topical therapeutic activity with commercial presentations. **Material and methods:** In this work, nano-sized lyotropic liquid crystals (NCLLs) containing ketoconazole (KTZ) were elaborated, their antifungal effect was evaluated and compared with the effect of KTZ in commercial presentations (200 mg tablets and 2% oral suspension). **Results:** The NCLLs + KTZ system showed a higher antifungal effect than commercial preparations and due to the relative simplicity of its elaboration,

* Laboratorio de Inmunobiología.

** Laboratorio Farmacia Molecular y Liberación Controlada.

as well as the advantage represented by its topical application design, represents a safer and more effective alternative for the treatment of mycoses with ketoconazole, and other nanometric systems currently under development. Conclusion: A good antifungal potency of ketoconazole was achieved when incorporated into NCLLs (CMI 24 µg/mL KTZ), so that NCLLs are a good option as a drug carrier system.

Key words: Lyotropic liquid crystals, ketoconazole, hexosomes, antifungal effect.

INTRODUCCIÓN

Los cristales líquidos (CL) son una fase intermedia o mesofase de la materia, denominados así al presentar propiedades intermedias a las de los sólidos cristalinos anisotrópicos como el cuarzo y diamante y las de los líquidos isotrópicos como el agua y las soluciones verdaderas. Los materiales que presentan dichas características se denominan mesógenos y sus moléculas suelen tener determinadas geometrías: planas (discóticas), alargadas (calamíticas y de banana); organizándose de manera que se pueden mover libremente, pero en al menos una dirección se ordenan de manera periódica y diferente.¹

El tipo de moléculas, y las condiciones en que se genera su interacción y organización, explica que se formen dichos materiales y que éstos cambien en propiedades como el color con variaciones de temperatura; denominándose en tal caso, cristales líquidos termotrópicos (CLT) y cuando se forman por el autoensamblado de determinadas concentraciones (5 a 20% p/p) de moléculas alargadas anfifílicas en presencia de agua u otros disolventes y en cierto intervalo de temperatura (20 y 80°), se nombran cristales líquidos liotrópicos (CLL); requiriendo estos, en la mayor parte de los casos, la aplicación de energía mecánica o ultrasonido.¹⁻³

Diversas investigaciones han demostrado que el glicerol monooleato (GMO), molécula lipídica alargada de carácter anfifílico, así como sus derivados comercializados como excipientes polifuncionales —como el Peceol®—, se dispersan en agua formando mesofases líquido-cristalinas liotrópicas nanoestructuradas (NCLL) cúbicas (cubosomas) o hexagonales (hexosomas); las cuales tienen una considerable capacidad para solubilizar fármacos y biomoléculas, tanto hidrosolubles como liposolubles y, por su similitud con los lípidos de la epidermis, logran incrementar la probabilidad de retención córneo-dérmica y/o la absorción transdérmica de fármacos y biomoléculas, representando una alternativa para conseguir una farmacoterapia más segura y eficaz para muchos compuestos.⁴⁻¹⁰

En la búsqueda del perfeccionamiento de las formulaciones antimicrobianas tópicas para aumentar el

tiempo de permanencia de la composición sobre la zona de interés de la piel y/o sus apéndices, se han utilizado agentes viscosantes, gelificantes, oclusivos, promotores de la absorción y profármacos; desarrollándose también nanopartículas como liposomas, dendrímeros, nanopartículas lipídicas sólidas, entre otras.¹¹⁻¹⁴

Es así que surgió el interés por obtener una composición líquido-cristalina para administrar ketoconazol (KTZ) por vía tópica, que pudiera representar una alternativa antifúngica más eficaz que las cremas y ungüentos convencionales, así como de mayor seguridad que los medicamentos orales (tabletas de 200 mg y suspensión al 2%), actualmente en desuso por la hepatotoxicidad asociada a la administración oral del fármaco.¹⁵

En este trabajo se compara la actividad antimicótica del KTZ contenido en cristales líquidos liotrópicos hexosómicos (CLLs+KTZ), con el efecto obtenido con muestras de presentaciones comerciales (tabletas y suspensión). Los hongos que se presentan con mayor frecuencia ocasionando micosis cutáneas en nuestro medio son los dermatofitos en sus tres géneros anamorfos: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, así como las levaduras de los géneros *Candida* y *Malassezia*.¹⁶⁻¹⁸ Los hongos *C. albicans* y los dermatofitos tienen características especiales que les confieren la habilidad de infectar tejido queratinizado; por lo que se consideró un modelo de patógeno adecuado para este estudio. En la preparación de los CLLs+KTZ se utilizó la metodología desarrollada en nuestro laboratorio.¹⁰

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de los NCLLs

Los hexosomas (NCLLs) con y sin KTZ se obtuvieron siguiendo la composición y la metodología previamente establecidas por nuestro grupo de investigación,¹⁰ que consiste en una mezcla de monooleato de glicerilo (Peceol®) y monolaurato de propilenglicol (Lauroglycol® 90, ambos donados por Gattefossé-Químicos Lyontec, México), Poloxámero 407 (Pluronic® F-127) adquirido de Sigma-Aldrich, México y agua desionizada (AGUAM® México).

Para este estudio, se preparó un lote de NCLL sin KTZ, así como un lote del mismo sistema nanoestructurado cargado con 24 y 42 µg/mL de KTZ.

Determinación del efecto antimicótico de formas farmacéuticas comerciales con ketoconazol por el método Kirby-Bauer¹⁹

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

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

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

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

Para comparar el efecto inhibitorio o antifúngico del sistema NCLLs conteniendo KTZ con las formas farmacéuticas comerciales de KTZ, se realizaron cinéticas de crecimiento de levaduras *C. albicans* en medio de cultivo líquido (caldo). Se inoculó con 0.5 mL de suspensión de *C. albicans* en fase exponencial un matraz con 250 mL de caldo Sabouraud al que se le adicionó KTZ disuelto en metanol al 80% previamente extraído de la matriz de excipientes insolubles de las formas farmacéuticas: tabletas de KTZ comercial de 200 mg y suspensión de KTZ al 2%. El **cuadro I** muestra las concentraciones de KTZ analizadas a partir de las dos formas farmacéuticas. Se incubó a 37 °C. Se tomó una muestra de 2 mL de la suspensión

CUADRO I. CONCENTRACIONES UTILIZADAS DE KETOCONAZOL COMERCIAL EN CALDO SABOURAUD.

KTZ en tabletas µg/mL	KTZ en suspensión µg/mL
20	20
30	30
40	40

Concentraciones utilizadas en las cinéticas de crecimiento de *C. albicans* en caldo Sabouraud que contienen KTZ proveniente de: tabletas y suspensión oral.

de levaduras, se midió la absorbancia y se relacionó con la concentración de UFC/mL. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro UV/Vis marca HP a una longitud de onda de 540 nm. Se muestreó cada cuatro horas y se siguió la cinética desde el tiempo cero hasta 130 horas.

Las cinéticas de crecimiento de *C. albicans* ayudaron para comparar el efecto antimicótico de las formas farmacéuticas comerciales con los NCLLs, tomando como testigo el crecimiento normal de la levadura en el medio de cultivo de Sabouraud: tabletas comerciales, suspensión oral comercial.

RESULTADOS

En el ensayo de Kirby-Bauer, se observó que los NCLLs no difunden en la placa de agar al 1.5%. La **figura 1** muestra los halos de inhibición del disco de referencia comercial, mientras que no se presentan halos de inhibición en los discos impregnados con los NCLLs, por lo cual se realizó la técnica cilindro/placa con reducción del porcentaje de agar.

El efecto antimicótico de las dos formas farmacéuticas comerciales conteniendo ketoconazol (**Cuadro I**), tabletas y suspensión oral, en los halos de inhibición de los medicamentos son semejantes a los halos que presentan los discos de referencia con 50 µg KTZ, tal como se aprecia en las **figuras 2 y 3**.

En el **cuadro II** se muestran los diámetros de los halos de inhibición de cada muestra analizada, el comportamiento es muy parecido al del disco de referencia.

La **figura 4** muestra el efecto inhibitorio de las formas farmacéuticas comerciales, (tabletas y suspensión oral), comparadas con los NCLLs con KTZ y como control el crecimiento de *C. albicans* en el caldo de Sabouraud sin KTZ.



Se observa el halo de inhibición del disco de referencia con 50 µg/mL de KTZ comercial en el círculo, y la flecha marca el disco impregnado con NCLLs, en donde no se aprecia claramente el halo de inhibición.

Figura 1. Comparación del efecto inhibitorio de cristales líquidos liotrópicos de tamaño nanométrico y discos con ketoconazol de referencia.

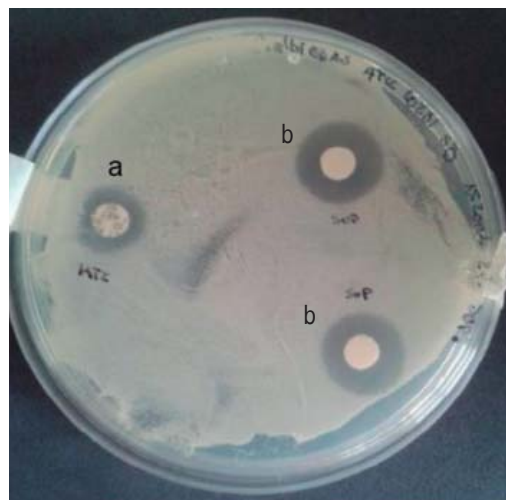
Con esto se puede observar el comportamiento inhibitorio de las diferentes presentaciones de KTZ incorporado al medio de cultivo.

El crecimiento en las primeras 24 horas se observa muy bajo, de aproximadamente 200×10^3 UFC/mL o menos en los NCLLs con KTZ en las dos concentraciones probadas (24 y 42 µg/mL) y en los ensayos con tabletas y suspensión oral comerciales a una concentración de 30 µg/mL de KTZ, comparados con el crecimiento del control que son NCLLs sin KTZ en el caldo de cultivo a las 24 horas que presentó aproximadamente 10×10^6 UFC/mL. Las concentraciones de 40 µg/mL de KTZ en tabletas y suspensión oral presentaron valores de 200×10^3 UFC/mL comparables con los valores encontrados con los NCLLs con KTZ en el crecimiento de *C. albicans* a las 24 horas. De tal manera que el efecto inhibitorio de crecimiento más notable lo presentan las preparaciones de NCLLs con KTZ en sus dos concentraciones y el KTZ en tabletas y suspensión oral de 40 µg/mL a las 24 horas. Los NCLLs con KTZ y el KTZ en tabletas y en suspensión a una concentración de 40 µg/mL, presentaron una inhibición de 98% respecto a los niveles mostrados por los NCLLs con KTZ aproximadamente a las 24 horas. Con el análisis ANOVA de una vía se encontró que no



Ensayo Kirby-Bauer a partir de tabletas con ketoconazol. Se aprecian los halos de inhibición del crecimiento: a) disco de referencia 50 µg. b) discos de KTZ a partir de tabletas (presentación comercial).

Figura 2. Ensayo Kirby-Bauer con ketoconazol a partir de tabletas comerciales.



En ensayo Kirby-Bauer con suspensión oral de KTZ. Se aprecian los halos de inhibición del crecimiento: a) disco de referencia 50 µg. b) discos de KTZ en suspensión (presentación comercial).

Figura 3. Ensayo Kirby-Bauer con ketoconazol a partir de una suspensión oral.

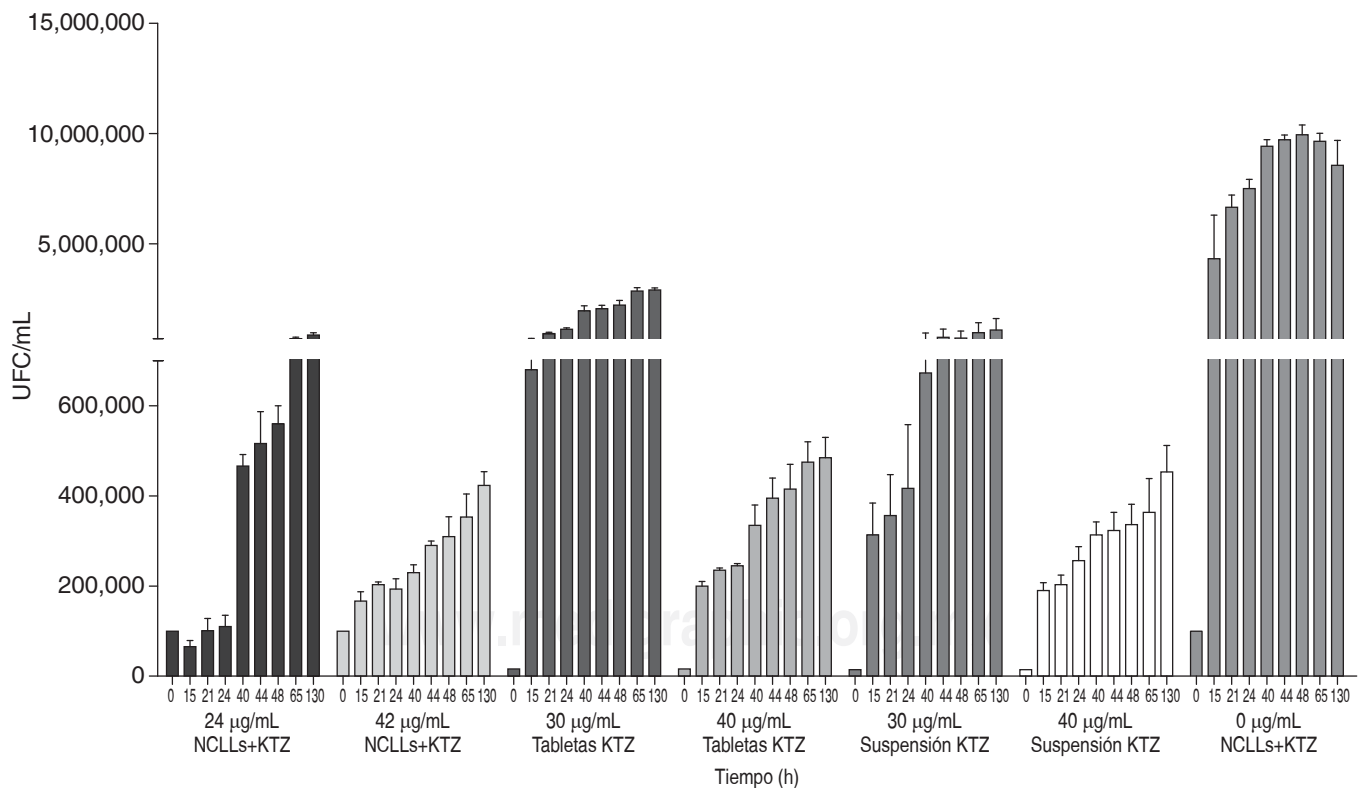
hay diferencia estadísticamente significativa entre la inhibición que ejercen las tabletas (40 µg/mL KTZ), la suspensión oral (40 µg/mL KTZ) y NCLLs (24 y 42 µg/mL KTZ), $p > 0.05$.

CUADRO II. DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN EN EL CRECIMIENTO DE *C. ALBICANS* PARA LAS PRESENTACIONES COMERCIALES DE KETOCONAZOL (TABLETAS Y SUSPENSIÓN ORAL), POR EL MÉTODO DE KIRBY-BAUER.

Discos con 50 mg de ketoconazol Testigo	Ø mm	Discos con 50 mg de ketoconazol Testigo	Ø mm
Tabletas		Suspensión oral	
1	14	1	16
2	13	2	15
3	13	3	18
4	11	4	18
5	14	5	17
6	13	6	14

DISCUSIÓN

Al analizar la potencia inhibitoria del KTZ sobre el crecimiento de *C. albicans*, las cinéticas de crecimiento mostraron que el KTZ en vehículos convencionales presenta un comportamiento dosis dependiente, es decir claramente se observa que a mayor dosis mayor efecto inhibitorio, encontrándose como CMI 40 µg/mL. Al probar el efecto inhibitorio del KTZ incorporado dentro del NCLLs se observó alta actividad antimicótica. El perfil de inhibición del NCLLs a las diferentes concentraciones muestra una buena uniformidad, es decir a pesar de haber aumentos en la concentración de KTZ de 24 y 42 µg/mL los nanocristales se mantienen estables con buena liberación del fármaco; al mismo tiempo, el sistema nanométrico utilizado proporciona grandes ventajas sobre otros nanoacarreadores, al ser mucho más sencilla su elaboración, proporciona ventajas por la fluidez de su estructura y su capacidad de mo-



Se observa la comparación del crecimiento de *C. albicans* con la presencia de KTZ en el caldo de cultivo Sabouraud. De izquierda a derecha NCLLs contenido con 24 y 42 µg/mL de KTZ, después KTZ extraído de tabletas comerciales a una concentración de 30 y 40 µg/mL, y KTZ proveniente de una suspensión comercial ajustado a 30 y 40 µg/mL, como control NCLLs sin ketoconazol.

Figura 4. Efecto inhibitorio de ketoconazol en las diferentes formas farmacéuticas.

dificar el patrón de liberación de los fármacos, todo esto con una alta penetración en piel y mucosas por su tamaño nanométrico y por su carácter anfifílico, características que le ayudan a su efecto antifúngico sobre infecciones mucocutáneas.²⁰

Este comportamiento fue reportado en otros trabajos con nanopartículas transportadoras de fármacos, en donde se describe que sistemas líquidos cristalinos formados con poloxámero presentan un patrón de liberación sostenida de fármacos (cafeína).²¹ Cabe aclarar que en esos trabajos se midió la liberación en celdas de Franz y espectrofotometría uv-vis, y no se probó la potencia del fármaco; en nuestro caso con los resultados que obtuvimos se demuestran dos aspectos: primero, que el fármaco es capaz de liberarse del interior de la nanoestructura, y segundo, se incrementa sustancialmente la potencia del antifúngico cuando está incorporado en el NCLLs comparando su efecto contra el fármaco libre o en una forma farmacéutica convencional. Este aumento no se debe a los componentes que forman las nanoestructuras, pues se analizó el perfil de inhibición del NCLLs sin KTZ a una concentración cinco veces mayor que la del NCLLs con KTZ, este perfil no mostró un alto efecto inhibitorio, no se acercó siquiera al que presenta la concentración de 10 µg/mL de KTZ. Otra ventaja de los NCLLs es su capacidad de comportarse como un fluido, mientras que por un lado se investigan y desarrollan liposomas flexibles o deformables que incrementen la penetrabilidad en la piel y mucosas,²²⁻²⁴ los NCLLs, por su naturaleza, son capaces de fluir fácilmente, y tienen propiedades muy similares a los liposomas flexibles. Sumado a esto la diferencia en el proceso de elaboración de NCLLs, proporciona enormes ventajas sobre casi todos los nano acarreadores, pues no se necesitan fuertes solventes ni tiempos largos de formación como con los liposomas y otras nanopartículas.

CONCLUSIÓN

Se logró una buena potencia antimicótica del ketoconazol al incorporarlo en NCLLs (CMI 24 µg/mL KTZ), por lo que un NCLLs es una buena opción como sistema acarreador de fármacos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ermarkov S, Beletskii A, Eismont O, Nikolaev V. *Liquid crystals in biotribology: synovial joint treatment. Biological and medical physics,*

- biomedical engineering.* Springer Int. Pub, Switzerland. 2016, pp. 37-56.
2. Sallam AS, Khalil E, Ibrahim H. Formulation of an oral dosage form utilizing the properties of cubic liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. *Eur J Pharm Biopharm.* 2002; 53: 343-352.
3. Quirino-Barreda CT, Gazga-Urioste C, Juárez-Sandoval JJ, Faustino-Vega A, Noguez-Méndez NA, Macín-Cabrera SA y cols. Cristales líquidos liotrópicos. Nanoestructuras biomiméticas para uso tópico medicinal. *MundoNano.* 2017; 10: 7-25.
4. Ganem-Quintanar A, Quintanar-Guerrero D, Buri P. Monoolein: a review of the pharmaceutical applications. *Drug Dev Ind Pharm.* 2000; 26: 809-820.
5. Bouwstra JA, Poncet M. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1758: 2080-2095.
6. Ferreira DA, Bentley MVL, Karlsson G, Edwards K. Cryo-TEM investigation of phase behaviour and aggregate structure in dilute dispersions of monoolein and oleic acid. *Int J Pharm.* 2006; 310: 203-212.
7. Lopes LB, Speretta FF, Bentley MV. Enhancement of skin penetration of vitamin K using monoolein-based liquid crystalline systems. *Eur J Pharm Sci.* 2007; 32: 209-215.
8. Hielscher T. *Ultrasonic production of nano-size dispersions and emulsions.* TIMA Editions, 2005; pp. 138-143.
9. Gon DL, Wook WJ, Ah NK, Yeul JL, Hoon SL, Sun WS et al. Effect of the glyceryl monooleate-based lyotropic phases on skin permeation using in vitro diffusion and skin imaging. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2014; 9: 324-329.
10. Quirino BC, Noguez MN, Rivera BE, Gazga UC, Pérez HG, Maldonado Campos JF, Palma RA, Castrilón RL, Juárez SJ, Santiago TA, Faustino VA, Gutiérrez ZA, Macín CS, Rubio MA, Ramírez PJ, Campos TJ. *Composición tópica con base en cristales líquidos liotrópicos IMPI.* No. Expediente: MX/a/2015/009845; Folio: MX/E/2015/054803. De fecha 30 de julio 2015. México.
11. Zhang L, Pornpattananangul D, Hu CM, Huan CM. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Curr Med Chem.* 2010; 17: 585-594.
12. Güngör S, Sedef Erdal M, Aksu B. New formulation strategies in topical antifungal therapy. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications.* 2013; 3: 56-65.
13. Faustino-Vega A, Quirino-Barreda CT, Vega-Rodríguez KD. Efecto del ketoconazol incluido en nanopartículas lipídicas sólidas en *Candida albicans*. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria.* 2013; 12: 95-102.
14. Jaya Raja Kumar K, Selvadurai M, Subramani P. Antifungal agents: new approach for novel delivery systems. *J Pharm Sci Res.* 2014; 6: 229-235.
15. Francisco Tejada Cifuentes. Hepatotoxicidad por Fármacos. *Revista Clínica de Medicina de Familia.* 2010; 3 (3) 177-191.
16. Larrondo MR, González AA, Hernández GL. Micosis superficiales. Candidiasis y pitiriasis versicolor. *Rev Cubana Med Gen Integr.* 2001; 17: 565-571.
17. Crespo EV, Delgado FV. Micosis cutáneas. *Med Clin.* 2005; 125: 467-474.
18. Gregory B. Structure and activity of the antifungal agents. *Rev Cubana Farm.* 2005; 39: 1-16.

19. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol.* 1966; 45: 493-496.
20. Rastogi R, Anand S, Koul V. Flexible polymersomes an alternative vehicle for topical delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2009; 72: 161-166.
21. Pasquali R, Bregni C. Structure of the main liquid crystalline lyotropic phases. *Acta Farm Bonaerense.* 2005; 24: 219-237.
22. Nesseem DI. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. *J Pharm Biomed Anal.* 2001; 26: 387-399.
23. Makai M, Csányi E, Németh Z, Pálkás J, Erős I. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. *Int J Pharm.* 2003; 256: 95-107.
24. Pavelic Z, Skalko BN, Jalsenjak I. Liposomes for treatment of vaginal infections. *Eur J Pharm Sci.* 1999; 8: 345-351.

Correspondencia:

Tomás Quirino Barreda

Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Calzada del Hueso Núm. 1100, Col. Villa Quietud, 04960, Del. Coyoacán, Ciudad de México.

Tel: 54837000, ext. 3622.

E-mail: cquirino@correo.xoc.uam.mx