

Caracterización de cristales líquidos con *Miconazol* en sistemas bifásicos por microscopía de polarización

Characterization of liquid crystals with *Miconazole* in biphasic systems by polarized microscopy

Susana Lavaselli¹, José Ignacio Mangiameli¹, Bibiana D. Riquelme^{2,3}

¹ Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Departamento de Farmacia, Rosario, Argentina.

² Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Departamento de Química-Física, Rosario, Argentina.

³ Instituto de Física Rosario (CONICET-UNR), Grupo de Física Biomédica, Rosario, Argentina

<http://dx.doi.org/10.30827/ars.v6i1i3.10268>

Artículo original Original Article

Correspondencia Correspondence

Bibiana D. Riquelme
briquel@fbioyf.unr.edu.ar
riquelme@ifir-conicet.gov.ar

Financiación Fundings

Este trabajo fue realizado con el financiamiento de la Universidad Nacional de Rosario mediante los subsidios Resolución 3236/2018 y Resolución 5601/2018.

Conflicto de interés Competing interest

Los autores declaran no tener conflictos de intereses

Agradecimientos Acknowledgements

Los autores desean expresar su agradecimiento al Esp. Farm. Osvaldo Di Sapio y a la Dra. Victoria Rodríguez del Área Farmacobotánica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR) por su colaboración para la obtención de las imágenes microscópicas.

Received: 27.08.2019
Accepted: 08.04.2020

RESUMEN

Introducción: las emulsiones son un tipo de preparado farmacéutico muy utilizado en aplicación tópica consistentes en sistemas bifásicos de aceite-agua o agua-aceite, donde el principio activo deseado se incorpora en una de las fases dependiendo de su solubilidad. Diversos estudios demuestran que la estabilidad es mayor en emulsiones con estructuras líquido-cristalinas. El principio activo liposoluble *Miconazol*, que actúa como antimicótico, se solubiliza en la fase oleosa de la emulsión y en la fracción de la cadena hidrocarbonada de los cristales líquidos.

Método: se utilizaron técnicas microscópicas para analizar las características de una emulsión convencional y de otra con cristales líquidos, a las que se les incorporó el principio activo *Miconazol*. Se determinaron las dimensiones de las gotas de la fase interna y mediante microscopía de polarización se caracterizaron los cristales líquidos.

Resultados: el análisis de las imágenes microscópicas permitió determinar que en las formulaciones con cristales líquidos con y sin *Miconazol*, aproximadamente el 80 % de las gotas tienen dimensiones en el intervalo 0,5µm - 1µm. Las observaciones microscópicas con luz polarizada nos permitieron determinar que los cristales líquidos tienen birrefringencia con la formación de cruces de extinción uniaxiales negativas, las cuales son características de las fases liotrópicas laminares con texturas cónicas focales.

Conclusiones: los resultados muestran que el agregado de *Miconazol*, no interfiere con la formación de la estructura de los cristales líquidos, por lo que estas dependen de los componentes de la formulación y de la técnica de preparación.

Palabras clave: *Miconazol*; emulsiones; cristales líquidos.

ABSTRACT

Introduction: emulsions are a type of pharmaceutical preparation widely used in topical applications consisting of two-phase systems of oil-in-water or water-in-oil, where the desired active ingredient is incorporated into one of the phases depending on its solubility. Several studies show that stability is greater in emulsions with liquid-crystalline structures. The liposoluble active substance Miconazole, which acts as an antifungal agent, is solubilized in the oil phase of the emulsion as well as in the fraction of the hydrocarbon chain in liquid crystals.

Method: microscopic techniques were used to analyze the characteristics of both a conventional emulsion and another one containing the liquid crystals. Miconazole was incorporated into both emulsions; drop dimensions in the internal phase were determined and the liquid crystals were characterized by polarization microscopy.

Results: through the analysis of the microscopic images of the formulation with liquid crystals with *Miconazole* and without *Miconazole*, it was possible to determine that approximately 80% of the drops have dimensions ranging from 0.5µm - 1µm. Microscopic observations with polarized light allowed us to determine that liquid crystals have birefringence with the formation of negative uniaxial extinction crosses, which are characteristic of lamellar lyotropic phases with focal conical textures.

Conclusions: the results show that the addition of *Miconazole* does not interfere with the formation of the structure of the liquid crystals. Therefore, the formation of liquid crystals depends both on the components of the formulation and the preparation technique.

Keywords: *Miconazole*; emulsions; liquid crystals.

INTRODUCCIÓN

La aplicación de productos farmacéuticos sobre la piel es un método terapéutico utilizado desde los inicios de la medicina⁽¹⁾. La piel debido a sus características particulares, permite la administración de fármacos de manera local o regional, minimizando potenciales efectos secundarios sistémicos⁽²⁾. En la farmacoterapia es fundamental lograr la adhesión del paciente al tratamiento para que cumpla con la posología, dado que está directamente relacionada con la biodisponibilidad⁽³⁾.

En el caso de la aplicación tópica, un tipo de preparado farmacéutico muy utilizado son las emulsiones, consistentes en sistemas bifásicos de aceite-agua o agua-aceite donde un líquido se dispersa en otro, y el principio activo deseado se incorpora en una de las fases dependiendo de su solubilidad⁽⁴⁾. Sin embargo, uno de los mayores problemas de estas formulaciones es su estabilidad, la cual puede verse alterada de manera reversible o irreversible⁽⁵⁾. La pérdida de estabilidad es reversible cuando desaparece por agitación de la emulsión e incluye al cremado, la sedimentación y la floculación. Dentro de la inestabilidad irreversible está la coalescencia y la inversión de fases. Por este motivo, para lograr un producto adecuado es necesario lograr la mayor estabilidad posible de las emulsiones utilizadas⁽⁶⁾.

De acuerdo a la definición de la IUPAC el estado líquido-cristalino es un estado mesomórfico que posee un ordenamiento de largo alcance en lo que respecta a la orientación molecular y un ordenamiento parcial, o bien un desorden total, en lo referente a la posición de las moléculas. Este estado de la materia se presenta entre el estado sólido cristalino y el líquido isotrópico al variar por ejemplo la temperatura^(7,8). En los últimos años se han desarrollado emulsiones con estructuras líquido-cristalinas que aumentan la estabi-

lidad de la emulsión aumentando la resistencia mecánica de la interfase aceite-agua y la fijación de las gotitas de la emulsión a dichas estructuras⁽⁹⁻¹⁰⁾. Los principios activos liposolubles se alojan en las cadenas hidrocarbonadas y las hidrosolubles en la zona polar de la estructura líquido-cristalina. Estos sistemas formarían una emulsión relativamente más estable y permitirían la incorporación de los principios activos, tanto hidrosolubles como liposolubles, los cuales se irían liberando paulatinamente desde el seno de la emulsión, y más lentamente desde los cristales líquidos formados⁽¹¹⁾.

Una de las características particulares que poseen los cristales líquidos es su birrefringencia, fenómeno óptico por el cual cuando un haz de luz atraviesa el material cristalino, se descompone en dos rayos polarizados. Esta particularidad de los cristales líquidos resulta ser de utilidad en la identificación y caracterización de los mismos utilizando microscopía de polarización^(12,13).

El objetivo del presente trabajo fue analizar las características microscópicas de emulsiones convencionales y de emulsiones con cristales líquidos preparadas mediante la técnica descrita por Suzuki⁽⁹⁾ y aplicada posteriormente por Pasquali *et al.*⁽¹⁴⁾, a la que se incorporó el principio activo liposoluble *Miconazol*, el cual posee actividad terapéutica antimicótica⁽⁴⁾. Además, se analizó si la formación de los cristales líquidos es afectada o no por la presencia del antimicótico.

En la Figura 1 se presenta un esquema de la emulsión convencional y de la emulsión con cristales líquidos, donde se observan las diferencias estructurales entre ellas. En la Figura 1a correspondiente a la emulsión convencional, la interfase consiste en una capa formada por las moléculas del emulgente con su parte hidrófila hacia el exterior y la fracción lipófila hacia el interior de la gota⁽⁴⁾. En cambio, la Figura 1b corresponde a una emulsión en la cual la interfase está constituida por una multicapa correspondiente a los cristales líquidos formados por el emulgente y las moléculas de alcoholes y ácidos grasos superiores⁽⁸⁾.

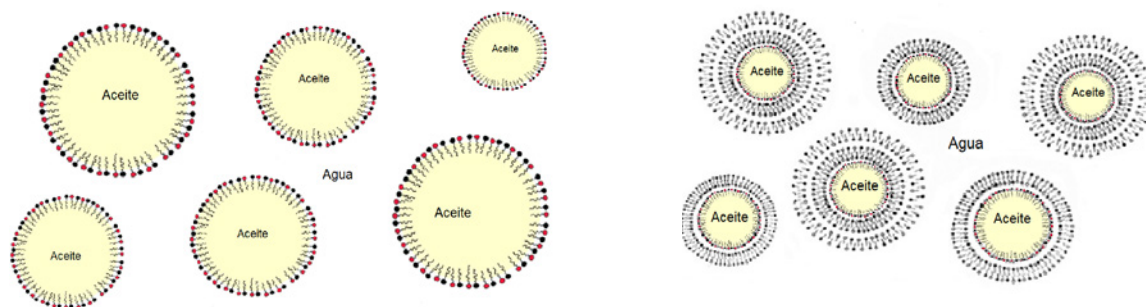


Figura 1. (a) Emulsión tipo aceite en agua; (b) Emulsión con estructuras líquido cristalinas en su interfase.

MÉTODOS

Para el presente estudio se prepararon tres emulsiones a fin de compararlas entre sí y caracterizar los cristales líquidos formados. La primera emulsión (a) se formuló por el método convencional con el agregado de *nitrato de miconazol*, las otras dos se elaboraron utilizando la técnica descrita por Pasquali *et al.*⁽¹⁴⁾ para la formación de cristales líquidos: una emulsión sin principio activo (b), y otra con el agregado de *nitrato de miconazol* (c). Todas las formulaciones se realizaron por triplicado.

El *nitrato de miconazol*, tanto en la muestra (a) como en la (c), se incorporó a la fase acuosa en la cual es soluble. Como esa fase presenta pH alcalino debido a que contiene trietanolamina, y dado el coeficiente de difusión y afinidad del *nitrato de miconazol*, este se hidrolizó y al mezclarse la fase acuosa con la oleosa, el *miconazol* pasó a la fracción oleosa en la muestra (a), y a la fase oleosa y a las estructuras hidrocarbonadas de los cristales líquidos en la muestra (c).

Las fases de la emulsión estaban compuestas de la siguiente manera:

- la fase oleosa conformada por el ácido esteárico (15,00%), la vaselina líquida (20,00%) y el propilparabeno (0,03%);
- la fase acuosa preparada con el metilparabeno (0,07%), la trietanolamina (4,14%), el agua y en las muestras (a) y (c) además el *nitrato de miconazol* (1%).

La muestra (a), se preparó por la técnica convencional: se agregó la fase acuosa con la totalidad del agua a la fase

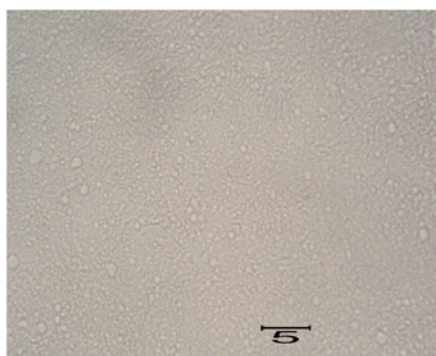
oleosa, ambas a una temperatura de 70°C con agitación manual hasta la formación de la emulsión.

Las muestras (b) y (c) fueron elaborados con la siguiente técnica que permite la formación de los cristales líquidos: una vez producidas las fases y manteniendo una temperatura media de 70°C a baño María, se preparó la emulsión utilizando un agitador de paleta de velocidad variable (Eurostar digital, IKA Labortechnik). La fase oleosa se incorporó sobre una parte de la fase acuosa mientras se inició la agitación lenta (50 rpm), evitando la incorporación de aire. Una vez que se formó el núcleo de la emulsión, la velocidad se aumentó gradualmente hasta alcanzar 500 rpm mientras se agregaba el agua restante. Luego, la agitación se mantuvo constante durante 10 minutos mientras la temperatura bajaba progresivamente. Todas las sustancias utilizadas fueron calidad Farmacopea Argentina 7ma ed.

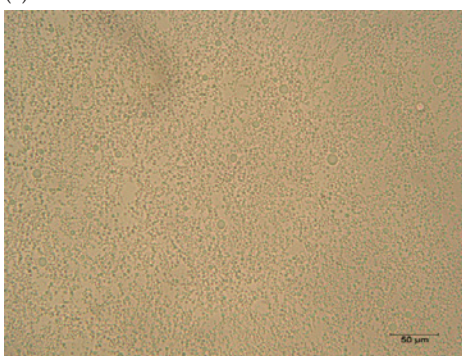
Observación y caracterización microscópica

La observación al microscopio de las emulsiones preparadas se realizó tanto por microscopía convencional como por microscopía con luz polarizada con objetivo 40x en todos los casos. La observación de las estructuras de cristales líquidos se realizó usando un microscopio de polarización (Carl Zeiss, modelo Axiolab) con una cámara digital (Olympus SP35) y la medición del tamaño de partículas se realizó con un microscopio convencional (Olympus CH30).

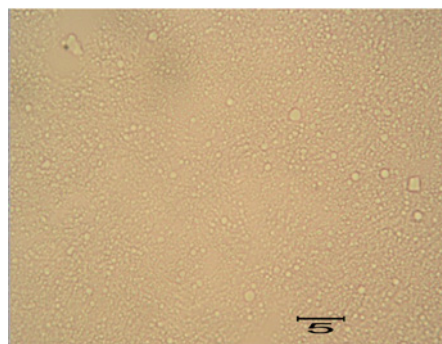
En la Figura 2 se muestran ejemplos de las imágenes obtenidas en formato JPG (2048x1536) por microscopía convencional de las emulsiones a las 48 horas de la preparación.



(a)



(c)



(b)

Figura 2. Imágenes obtenidas por microscopía convencional a las 48 horas de preparadas de: (a) Emulsión preparada por el método convencional con *Miconazol*; Emulsiones con cristales líquidos (b) sin *Miconazol* y (c) con *Miconazol*.

El tamaño de las gotas se midió en todas las muestras a la dilución 1:10. Para ello se registraron imágenes microscópicas digitales correspondientes a 10 campos distintos de cada muestra. Mediante una técnica comparativa con las imágenes de una regla graduada, se determinó la equivalencia entre pixeles y μm utilizando el software ImageJ. Luego, en cada imagen se contó la cantidad de gotas que tenían diámetros en los intervalos 0 - 0,5 μm , 0,5 μm - 1 μm , 1 μm - 2 μm , 2 μm - 3 μm y 3 μm - 4 μm .

RESULTADOS

Al caracterizar las imágenes microscópicas como las mostradas en el ejemplo de la Figura 2, se observó una distribución relativamente homogénea de los glóbulos de la fase oleosa con diversos tamaños de gotas, pudiéndose constatar la presencia de gotas secundarias⁽¹⁵⁾ tal como se aprecia en el detalle de la Figura 3.

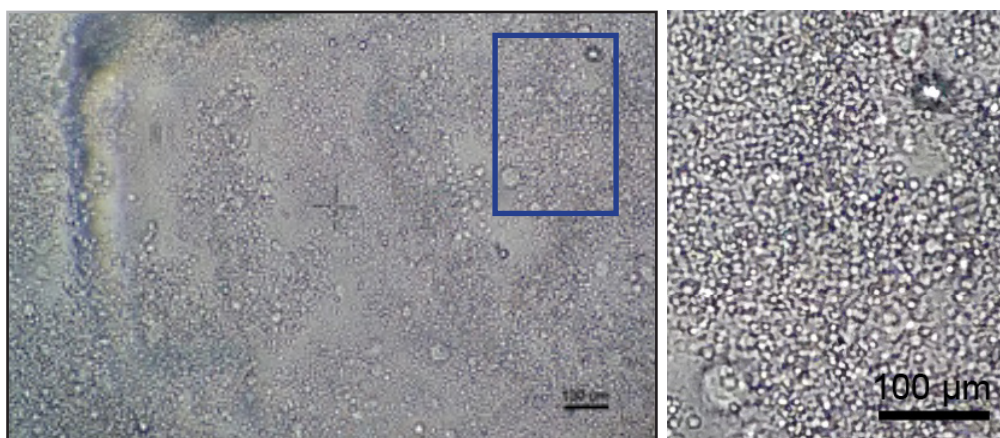


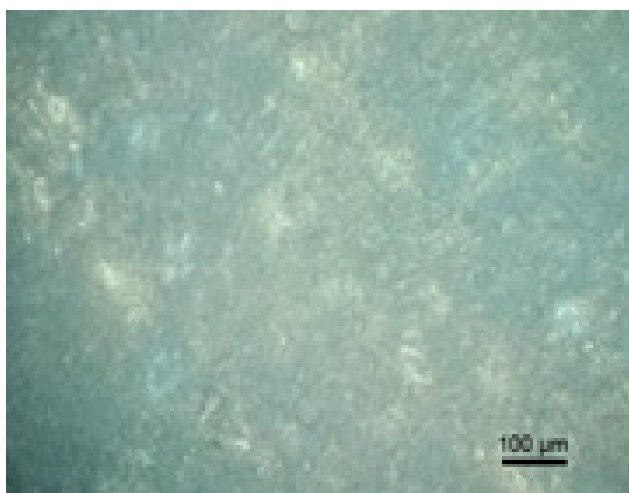
Figura 3. Detalle de la imagen de la muestra (c) donde se observa claramente la formación de gotas secundarias.

En la Tabla 1 se presenta el número promedio de gotas de los distintos tamaños de las muestras analizadas. En la muestra (a) se observa que más del 50% de los glóbulos de la fase interna tienen tamaños en el intervalo de 1 a 3 μm siendo de mayor tamaño que los de las muestras (b) y (c). Se puede observar que tanto en las muestras con cristales líquidos sin *Miconazol* como en las que tienen *Miconazol*, alre-

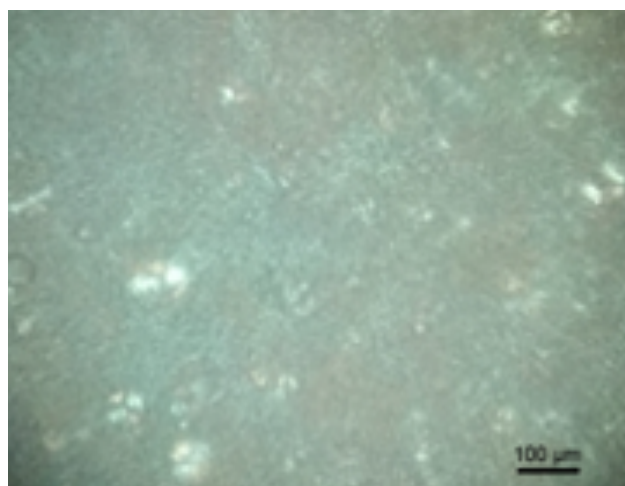
dedor del 80% de las gotas poseen tamaños en el intervalo 0,5 hasta 1 μm , valores similares a los obtenidos por Lavaselli *et al.*⁽¹⁶⁾ en emulsiones con cristales líquidos utilizando el principio activo *Econazol*.

Tabla 1. Valores medios y porcentajes de la cantidad de los distintos tamaños de gotas en las emulsiones: (a) convencional; con cristales líquidos (b) sin *Miconazol*, y (c) con *Miconazol*.

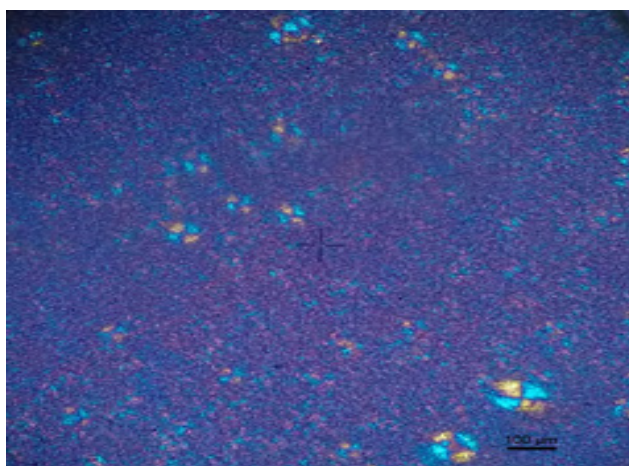
Diámetro [μm]	(a) Convencional con <i>Miconazol</i>		(b) Con cristales líquidos sin <i>Miconazol</i>		(c) Con cristales líquidos con <i>Miconazol</i>	
	N°	%	N°	%	N°	%
0 - 0,5	16	10,1	1	0,8	1	0,8
0,5 - 1	30	19	112	88,2	97	79,5
1 - 2	49	31	14	11,0	24	19,7
2 - 3	35	22,2	0	0	0	0
3 - 4	28	17,7	0	0	0	0



(a)



(b)



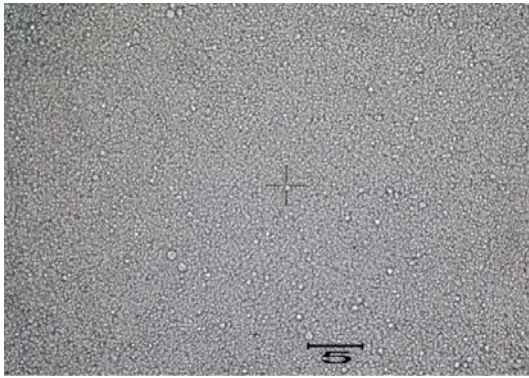
(c)

Figura 4. Imágenes obtenidas por microscopía de luz polarizada a 48 horas de preparadas de: (a) Emulsión preparada por el método convencional con *Miconazol*; emulsiones con formación de cristales líquidos (b) sin *Miconazol* y (c) con *Miconazol*.

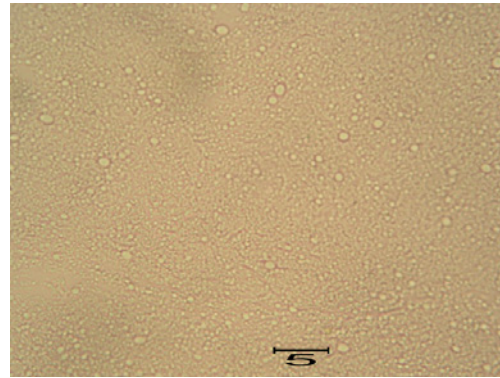
En la Figura 4 se muestran ejemplos de las imágenes obtenidas de las emulsiones observadas con luz polarizada. En estas imágenes se puede constatar la presencia de estructuras birrefringentes sólo en las muestras (b) y (c), por lo que se verifica la presencia de estructuras líquido-cristalinas en las muestras preparadas por la técnica descrita por Pasquali *et al.*⁽¹⁴⁾. El análisis de las imágenes de los cristales líquidos formados permite caracterizarlos como birrefringentes con la formación de cruces de extinción uniáxicas negativas.

Las muestras se observaron nuevamente al microscopio óptico, tanto convencional como con luz polarizada a los 12 meses de preparadas, constatando la persistencia de las estructuras líquido-cristalinas birrefringentes en las muestras (b) y (c).

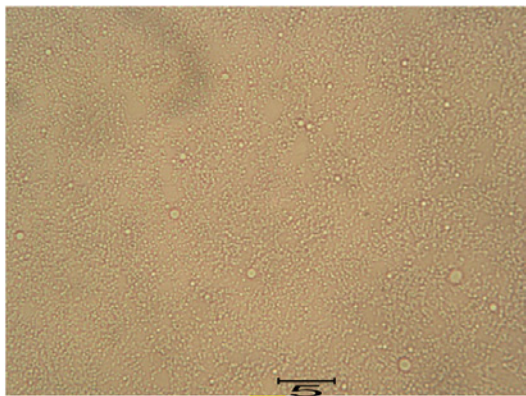
En la Figura 5 se muestran ejemplos de las imágenes obtenidas en formato JPG (2048x1536) por microscopía convencional de las emulsiones a los 12 meses de preparadas.



(a)

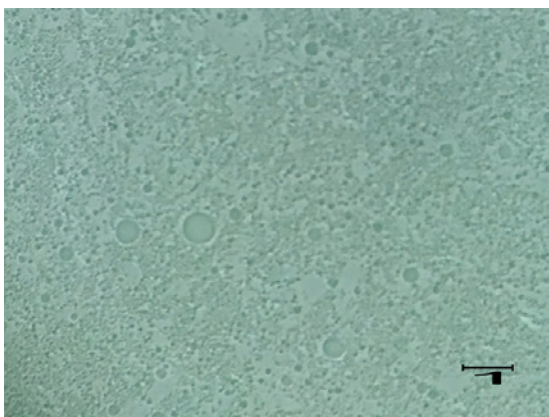


(b)

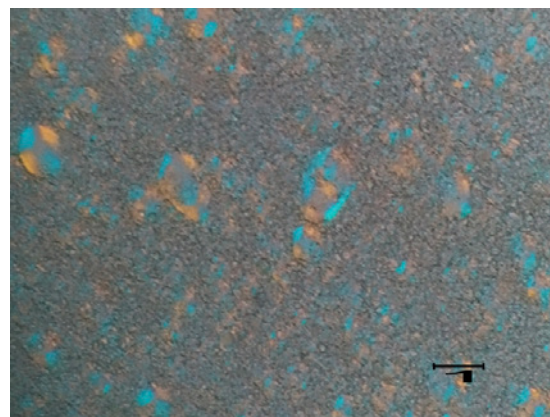


(c)

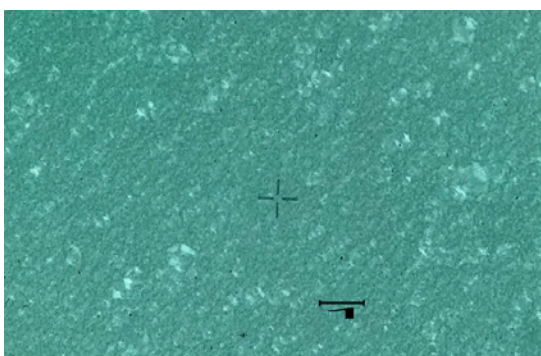
Figura 5. Imágenes obtenidas por microscopia convencional a los 12 meses de preparadas de: (a) Emulsión preparada por el método convencional con *Miconazol*; Emulsiones con cristales líquidos (b) sin *Miconazol* y (c) con *Miconazol*.



(a)



(b)



(c)

Figura 6. Imágenes obtenidas por microscopia de luz polarizada a los 12 meses de preparadas: (a) Emulsión preparada por el método convencional con *Miconazol*; emulsiones con formación de cristales líquidos (b) sin *Miconazol* y (c) con *Miconazol*.

En la Figura 6 se muestran ejemplos de las imágenes obtenidas de las emulsiones observadas con luz polarizada a los 12 meses de preparadas. En estas imágenes se puede constatar la presencia de estructuras birrefringentes sólo en las muestras (b) y (c), por lo que se verifica la presencia de estructuras líquido-cristalinas en las muestras a los 12 meses de su preparación utilizando la técnica descrita por Pasquali *et al.*⁽¹⁴⁾.

DISCUSIÓN

Mediante el análisis de las imágenes obtenidas por microscopía convencional se observó que en la emulsión convencional los glóbulos de la fase interna son mayores a los que presentan las emulsiones con cristales líquidos. La presencia de gotas secundarias en las formulaciones con estructuras líquido-cristalinas coincidió con lo descrito por Pasquali *et al.*⁽¹⁴⁾ en este tipo de preparados.

El análisis de las imágenes obtenidas por microscopía de polarización, mostró que los cristales líquidos presentes en las emulsiones (b) y (c) poseen la estructura de cruces de extinción uniaxiales negativas características de las fases liotrópicas laminares con texturas cónicas focales^(17,18).

En un trabajo previo, Lavaselli *et al.* estudiaron emulsiones con cristales líquidos obtenidas por medio de la misma técnica con los principios activos *Econazol*⁽¹⁶⁾ y *Terbinafina*⁽¹⁹⁾, las cuales presentaron cristales líquidos de similares características a los observados en el presente trabajo.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se comprueba que el agregado de *Miconazol* como principio activo no influye en la formación de las estructuras líquido-cristalinas por la técnica empleada. Además, considerando los resultados obtenidos previamente en las preparaciones con *Econazol*⁽¹⁶⁾ y *Terbinafina*⁽¹⁹⁾ se puede inferir que el agregado de estos principios activos no interfiere con la formación de los cristales líquidos, por lo que la fase laminar depende de los componentes utilizados en la formulación y de la técnica empleada para prepararla.

Dado que es fundamental determinar la estabilidad de los sistemas a lo largo del tiempo, se repetirán estos estudios a los 24 meses. También se propone para un trabajo futuro la evaluación de la estabilidad física de los sistemas emulsivos con *Miconazol* respecto a su comportamiento al ser sometidos a los ensayos de *Test de centrifugación*, *Stress Térmico* y *Estabilidad acelerada*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Valverde JL. Historia General de la Farmacia. El medicamento a través del tiempo. Ediciones Sol, SA. Madrid. 1986.
2. Goldsmith L, Katz S, Gilchrest B, Paller A. Fitzpatrick. Dermatología en Medicina general. 8° edición. Editorial Médica Panamericana, 2014.
3. Añache JM, Devissaguet J, Guyot-Hermann AM. Biofarmacia. Editorial El Manual Moderno. México, 1983.
4. Remington. Farmacia: Ciencia y práctica de la Farmacia. Dirigido por Alfonso R. Gennaro, 20° edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 2003.
5. Becher P. Emulsions, Theory and practice. 1965. DOI: 10.1021/ed042p692.2
6. Lavaselli SA, Rasia RJ. Reología y estabilidad de excipientes para productos dermatológicos, elaborados con concentraciones variables del mismo emulgente. Acta Farm Bonaer. 2004; 23(1):59-66.
7. Templer R, Attard G. The world of liquid crystals. New Sci. 1991; 25-29.
8. Pasquali RC. Estructuras líquido cristalinas y sus aplicaciones farmacéuticas y cosméticas. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Buenos Aires, 2006.
9. Suzuki T, Takei H, Yamazaki S. Formation of fine three-phase emulsions by the liquid crystal emulsification method with arginine \square -branched monoalkyl phosphate. J Colloid and Interf Sci. 1989; 129(2):491-500. DOI: 10.1016/0021-9797(89)90463-3
10. Lavaselli S, Pedemonte C, Mazon J, Lillini G, Fekete M, Bregni C, Pasquali RC. Influence of the liquid crystalline characteristics of emulsions of oil in water on its stability, HLB and rheological properties. Biocell. 2011; 35(2):A177.
11. Lillini G, Pedemonte C, Lavaselli S. Liquid crystalline emulsion as controlled liberation system compared to a conventional emulsion. Study of physical stability and rheological. Conference Proceeding, Int J Pharm Sci Res. 2014; 107 p.
12. Chávez G, Parra I, Luzardo M, Bravo B, Márquez N. Caracterización de cristales líquidos por microscopía óptica en sistemas surfactante polietoxilado-alcano-agua. Quím Nova. 2013; 36(9). DOI: 10.1590/S0100-40422013000900011
13. Pasquali RC, Bregni C, Serrao R. Características e identificación de los cristales líquidos liotrópicos. Rev Mex Cienc Farm. 2006; 37(2):38-53.
14. Pasquali RC, Bregni C. Emulsiones líquida-cristalinas estabilizadas con estearato de trietanolamina y ácido esteárico: influencia del método de preparación en las propiedades y en la formación de gotas secundarias. Ars Pharm. 2006; 47(2):219-237. [http://hdl.handle.net/10481/27935]
15. Suzuki T, Tsutsumi H, Ishida A. Secondary droplet emulsion: mechanism and effects of liquid crystal formation in o/w

- emulsion. *J. Dispersion Sci. Technol.* 1984; 5(2):119-141. DOI: 10.1080/01932698408943213
16. Lillini G, Pasquali R, Pedemonte C, Bregni C, Lavaselli SA. Estudio de la estabilidad de emulsiones con estructuras líquido-cristalinas y su aplicación farmacéutica mediante el agregado de un principio activo liposoluble: Econazol. *Rev Colomb Cienc Quim Farm.* 2016; 45(1):5-20. DOI:10.15446/rcciquifa.v45n1.58011
 17. Rosevear FB. The microscopy of the liquid crystalline neat and middle phases of soaps and synthetic detergents. *J Am Oil Chem Soc.* 1954; 31:628-639. DOI: 10.1007/BF02545595.
 18. Rosevear FB. Liquid crystals: The mesomorphic phases of surfactant compositions. *J Soc Cosmet Chem.* 1968; 19:581-594.
 19. Lavaselli SA, Pedemonte CI, Mazon JI, Lillini GJ, Di Sapio O, Pasquali RC. Liquid-crystalline emulsions with terbinafine sulfate for topical application. *Biocell.* 2012; 36(1):A43.