



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Elaboración de formulaciones nanoestructuradas de Anfotericina B para el tratamiento de la Candidiasis, Aspergilosis y Leishmaniosis cutánea

Lilian Elisa Sosa Díaz

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

PROGRAMA DE DOCTORADO DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y
CONTROL DE MEDICAMENTOS

ELABORACIÓN DE FORMULACIONES NANOESTRUCTURADAS DE
ANFOTERICINA B PARA EL TRATAMIENTO DE LA CANDIDIASIS,
ASPERGILOSIS Y LEISHMANIOSIS CUTÁNEA

LILIAN ELISA SOSA DÍAZ
2018

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

PROGRAMA DE DOCTORADO DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO
Y CONTROL DE MEDICAMENTOS

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICA Y FÍSICOQUÍMICA

ELABORACIÓN DE FORMULACIONES NANOESTRUCTURADAS DE
ANFOTERICINA B PARA EL TRATAMIENTO DE LA CANDIDIASIS,
ASPERGILOSIS Y LEISHMANIOSIS CUTÁNEA

Memoria presentada por Lilian Elisa Sosa Díaz para optar al título de doctor por la
Universidad de Barcelona

Directores de Tesis:

Ana Cristina Calpena Campmany

Beatriz Clares Naveros

Doctoranda:

Lilian Elisa Sosa Díaz

Tutora:

Ana Cristina Calpena Campmany

LILIAN ELISA SOSA DÍAZ

2018

ÍNDICE

Abreviaturas.....	9
Agradecimientos	5
1. RESUMEN.....	12
1.1 LA PIEL Y SUS ANEJOS	14
1.1.1 Fisiología y funciones	14
1.1.2 Epidermis	15
1.1.3 Dermis.....	18
1.1.3.1 Anejos cutáneos.....	18
1.1.4 Hipodermis	21
1.2 VÍA CUTÁNEA.....	21
1.2.1 Administración tópica de fármacos	21
1.2.2 Ventajas e inconvenientes.....	22
1.2.3 Permeación cutánea	23
1.2.3.1 Vías de penetración cutánea	23
1.2.4 Factores que influyen en la absorción cutánea.....	25
1.3 MICOSIS CUTÁNEAS	32
1.3.1 Candidiasis.....	33
1.3.1.1 Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por <i>Candida spp.</i>	34
1.3.1.2 Candidiasis superficiales.....	36
1.3.1.3 Diagnóstico clínico de la candidiasis	40
1.3.2 Aspergilosis	44
1.3.2.1 Factores de virulencia para la infección de <i>Aspergillus spp.</i>	45
1.3.2.2 Diagnóstico clínico de la Aspergilosis.....	46
1.4 ANTIFÚNGICOS.....	48
1.4.1 Clasificación de los antifúngicos	50
1.4.1.1 Azoles.....	51
1.4.1.2 Alilaminas	51
1.4.1.3 Lipopéptidos.....	52
1.4.1.4 Pirimidinas fluoradas.....	53
1.4.1.5 Inhibidores de la mitosis celular fúngica: griseofulvina.....	53
1.4.1.6 Polienos.....	54
1.4.2 Anfotericina B.....	54
1.4.2.1 Estructura química.....	54
1.4.2.2 Solubilidad.....	55
1.4.2.3 Estados de agregación de la AmB	55
1.4.2.4 Mecanismo de acción	57
1.4.2.5 Farmacocinética de la AmB	59
1.4.2.6 Toxicidad de la AmB	60
1.4.2.7 Efectos adversos de la AmB	61
1.4.2.8 Mecanismos de resistencia de la AmB.....	61

1.4.2.9 Medicamentos comercializados con AmB.....	62
1.4.2.10 Tratamiento t3pico con AmB	62
1.5 LEISHMANIOSIS	63
1.5.1 Agente etiol3gico	63
1.5.2 Morfolog3a de la Leishmania.....	64
1.5.3 Ciclo biol3gico de Leishmania	65
1.5.4 Distribuci3n mundial.....	66
1.5.5 Formas cl3nicas de leishmaniosis.....	67
1.5.6 La leishmaniosis cut3nea: tipos y evoluci3n cl3nica.....	68
1.5.6.1 Leishmaniosis cut3nea aguda	69
1.5.6.2 Leishmaniosis cut3nea cr3nica	70
1.5.6.3 Leishmaniosis cut3nea difusa o diseminada	70
1.5.6.4 Leishmaniosis d3rmica post kala-azar	71
1.5.6.5 Vector transmisor de la leishmaniosis.....	71
1.5.7 Tratamiento farmacol3gico	73
1.5.7.1 Compuestos antimoniales pentavalentes	73
1.5.7.2 Paramomicina	74
1.5.7.3 Pentamidina	74
1.5.7.4 Alopurinol.....	75
1.5.7.5 Miltefosina (Milteforan®)	75
1.5.7.6 Azoles.....	76
1.5.7.7 Anfotericina B.....	76
1.5.8 Diagn3stico de la leishmaniosis.....	77
1.6 NANOEMULSIONES.....	80
1.6.1 Concepto y tipos.....	80
1.6.2 Ventajas de las NE	82
1.6.3 Elecci3n de los componentes de las NE	83
1.6.4 Elaboraci3n de las NE: Diagrama de fases	86
1.7 HIDROGELES	87
1.7.1 Concepto y ventajas.....	87
1.7.2 Clasificaci3n.....	89
1.7.3 Hidrogeles termosensibles.....	91
1.7.3.1 Polox3meros	95
1.7.3.2 Polox3mero 407	98
2. OBJETIVOS, CONTRIBUCI3N Y PLAN DE TRABAJO.....	101
2.1 OBJETIVO GENERAL	103
2.2 PLAN DE TRABAJO	103
3.MATERIALES Y M3TODOS	107
3.1 MATERIALES	107
3.2 INSTRUMENTOS	109
3.3 MATERIAL AUXILIAR	110
3.4 METODOLOG3A.....	112
3.4.1 Nanoemulsiones con AmB.....	112

3.4.1.1 Excipientes.....	112
3.4.1.2 Solubilidad del AmB en los excipientes.....	119
3.4.2 Nanogel de AmB	122
3.4.2.1 Formulación y elaboración.....	122
3.4.2.2 Determinación de la temperatura y tiempo de gelificación del hidrogel con AmB.	122
3.4.3 Cuantificación de la AmB.....	123
3.4.3.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución	123
3.4.3.2 Espectrofotometría UV/VIS	129
3.4.4 Tamaño de gota y micela	131
3.4.5 Estudio morfológico de la nanoemulsión por Microscopía Electrónica de Transmisión	133
3.4.6 Estudio morfológico del hidrogel por Microscopía Electrónica de Barrido.....	134
3.4.7 Determinación del pH.....	136
3.4.8 Contenido de AmB en las formulaciones	138
3.4.9 Estabilidad.....	138
3.4.10 Predicción de estabilidad de las formulaciones a corto	139
3.4.11 Deteminación de la extensibilidad	140
3.4.12 Estudio reológico.....	143
3.4.13 Estudio de cesión <i>in vitro</i>	147
3.4.14 Estudios de permeación <i>ex vivo</i>	150
3.4.15 Estudios de retención en piel.....	152
3.4.16 Propiedades biomecánicas de la piel humana.....	153
3.4.17 Estudios Primarios de Irritación Dérmica (PDI): test de Draize	157
3.4.18 Estudios microbiológicos.....	159
3.4.18.1 Actividad antifúngica <i>in-vitro</i> frente a <i>Candida spp.</i>	159
3.4.18.2 Actividad antifúngica <i>invitro</i> para <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404.....	162
3.4.19Análisis parasitario.....	164
3.4.19.1 Curvas de crecimiento de promastigotes	164
3.4.19.2 Determinación de la IC50 en promastigotes	164
3.4.19.3 Determinación de la IC50 en amastigotes	168
3.4.20 Ensayos de citotoxicidad.....	170
3.4.21 Análisis microscópico de hongos y parásitos	173
3.4.21.1 Comportamiento de <i>Candida spp.</i> frente a las formulaciones mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	173
3.4.21.2 Comportamiento de promastigotes frente a las formulaciones de AmB mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	175
4. RESULTADOS	179
4.1 SOLUBILIDAD DE LA AmB.....	179
4.2 ELABORACIÓN DEL DIAGRAMA TERNARIO	181
4.3 FORMULACIÓN DEL HIDROGEL CON AmB	183
4.4 VALIDACIÓN ANALÍTICA MEDIANTE ESPECTROFOTO-METRÍA UV-VIS.....	184
4.5 VALIDACIÓN ANALÍTICA MEDIANTE CLAR	187

4.6 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LA NANOEMULSIÓN DE AmB.....	190
4.7 ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA NANOEMULSIÓN CON AMB	193
4.8 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DEL HIDROGEL CON AmB	194
4.9 ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL HIDROGEL DE AmB.....	197
4.10 ESTUDIO DE ESTABILIDAD A CORTO PLAZO.....	198
4.11 EXTENSIBILIDAD	199
4.12 PROPIEDADES REOLÓGICAS	201
4.13 PROPIEDADES BIOFARMACÉUTICAS	205
4.13.1 Cinética de liberación <i>in vitro</i>	205
4.13.2 Estudios de permeación <i>ex-vivo</i> y retención de AmB en la piel.....	208
4.14 IMPACTO SOBRE LAS PROPIEDADES BIOMECÁNICAS.....	209
4.15 ESTUDIOS DE TOLERANCIA: TEST DE DRAIZE	212
4.16 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i>	214
4.17 MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA DE LAS FORMULACIONES DE AmB APLICADA A <i>Candida albicans</i>	218
4.18 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD LEISHMANICIDA.....	224
4.18.1 Evaluación de la citotoxicidad de los excipientes y las formulaciones sobre macrófagos no parasitados	224
4.19 CURVAS DE CRECIMIENTO DE LEISHMANIA.....	228
4.20 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA NANOEMULSIÓN DE AmB SOBRE PROMASTIGOTES DE 4 ESPECIES DE LEISHMANIA.....	229
4.21 COMPORTAMIENTO DE LOS PROMASTIGOTES FRENTE A LAS FORMULACIONES DE AmB MEDIANTE SEM.....	232
5. CONCLUSIONES.....	235
6. REFERENCIAS.....	240

Agradecimientos

Desde niña soñé con muchas cosas, unas tantas se han cumplido y otras no...siempre soñé con volar alto, conocer nuevos lugares, países, personas, culturas e ideologías, pero jamás pensé que todo esto se haría realidad...Y ahora sigo siendo como esa niña soñadora que un día fui y que siempre seré, pues como dijo Walt Disney:

“Si puedes soñarlo puedes hacerlo, recuerda que todo esto comenzó con un ratón”

Quiero empezar agradeciendo a todas aquellas personas que a lo largo de mi vida me han hecho creer que no puedo, pues gracias a ellas he tenido el coraje de luchar para convencerme a mi misma de todo lo contrario, pues las personas siempre hablan de sus limitaciones y no de las mías.

Dios mío, gracias por haberme dado toda la fuerza necesaria para lograr este sueño, ¡gracias! a pesar de tantas dificultades personales, profesionales, de salud etc. me brindaste la oportunidad de cumplir este gran anhelo profesional y personal, no cabe duda que aunque a veces me desesperé y te cuestioné, tus tiempos son perfectos. A ti la honra y la gloria...

Dra. Ana Calpena, muchísimas gracias por su cariño, entrega y por alegrarnos las largas tardes y noches con sus ocurrencias y naturalidad, es como una madre para mí y una gran amiga... no pude haber tenido mejor tutora que usted. Mil gracias por sus enseñanzas, su paciencia, sus consejos... mi admiración, cariño y respeto por siempre.

Dra. Beatriz Clares, muchísimas gracias por su preocupación y dedicación pero sobre todo por lidiar con los revisores, admiro su tenacidad.

Dra. Lyda Halbaut, como agradecer todo su apoyo desinteresado, infinitamente agradecida por horas y horas revisando y corrigiendo la redacción de la tesis, pocos seres humanos como usted.

También quiero agradecer a la *Dra. Cristina Riera, Nuria Bozal y Óscar Domenech*, quienes sin ser tutores directos de esta tesis trabajaron como tal. Gracias por compartir conmigo sus valiosos conocimientos y sobre todo por hacerlo de tan linda manera...y a dos grandes personas y compañeras: *Diana Berenguer y Magdalena Alcover*, gracias por compartir sus conocimientos conmigo.

A la *Dra. María Luisa García*, por haberme dado la oportunidad de poder entrar a su programa de máster y doctorado.

Edgardo Sosa y Lilian Díaz, no voy a terminar de agradecerle a Dios el haber sido tan perfecto y darme la oportunidad de tenerlos en mi vida como los maravillosos padres que son. Gracias infinitas por el apoyo brindado en todos los sentidos. Padre, te admiro por tu inteligencia, honestidad, rectitud y sobre todo por la humildad de tu corazón. Madre, eres mi mejor amiga, la persona que me ha levantado de los abismos en los que he caído, admiro tu paciencia, tu amor abnegado, tu fortaleza y la forma tan natural de ver las cosas y problemas de la vida, esa fe inquebrantable que mueve montañas. No soy madre y no sé si llegaré a serlo, pero me pregunto si estaré a tu altura. Gracias a los dos por estar al pendiente de cada paso que doy y sobre todo por vivir junto a mí y de manera tan intensa cada experiencia, cada sueño, cada fracaso y aun mas en la distancia. Los amo hasta la eternidad.

A mis hermanos amados, *Edgardo y Ramón Andrés*, quienes son mi otro yo, mis manitos amados, gracias por quererme y estar siempre pendientes de mí.

A mi sobrinita, mi *Abigail* bella, esa niña que me recuerda tanto a mí en aquellos años de inocencia, tan llena de sueños y expectativas... espero logres volar tan alto como lo mereces, te amo mi niña... enterneces mi corazón cada vez que te miro.

A mi *maxito*, mi pequeño amor, mi amiguito por 13 largos años, quien me espera siempre con alegría... ojala los humanos tuviéramos la nobleza, fidelidad y lealtad de un perro.

Amy García, mi hermana por elección, esa alma gemela que Dios me dio desde hace 17 años, gracias mi mejor amiga porque solo nosotras conocemos cada dificultad, tristeza, decepción, alegrías, sueños, y tantas cosas compartidas... creo que escribiría toda una novela con tantas buenas y malas pasadas juntas... gracias mil gracias porque siempre estas al pendiente aunque todo este ``charco`` nos separe. Has sido un apoyo inimaginable en todos estos años, afortunadamente vivimos en la era de la tecnología pues así ni la distancia nos puede separar.

Ixmucane Padilla, mi otra hermanita, cuanto te quiero y agradezco esa amistad tan pura que nos ha unido desde el año 2000. Como me rio y disfruto cuando

estoy con vos, me das tanta fuerza y entusiasmo, tu corazón tan bello y tu fe me han levantado cientos de veces.

Sherlyn Fonseca, Amiga y hermana, que puedo decirte, jamás voy a estar a tu altura, sos lo máximo... gracias por esperarme siempre, por aceptarme en cada faceta de mi vida, me conoces como nadie... y a tu familia quien es mi otra familia, no tengo palabras para agradecer ese amor y apoyo incondicional...

A mis amiguis las lisiadas... *Silvi, Pame, Trixy*... cuantas experiencias, gracias porque cada día sin falta estamos conectadas, es increíble como ni la diferencia de horarios, ni los ritmos de vida tan diferentes que tenemos nos han podido separar, pero sobre todo: Gracias por tomar un avión (que ya de por si es tan caro) para venir a verme y acompañarme unos días... las amo... y a mi amiga desde la infancia: *Helen Alvarado*, sin vos muchas cosas no hubiesen sido posibles, gracias por tu apoyo y cariño sincero siempre...

A mis amigas y compañeras desde el máster: *María Elisa Alea Reyes*, Dios te envió a mi vida como un ángel, desde aquel desastroso año 2012, fuiste una luz para mi, te adoro mi tata, gracias por tu apoyo incondicional siempre... *Ximena Mora Cubillos*, amiga tu luz y tus consejos aun en la distancia han sido vitales para poder seguir este camino, siempre tus palabras tan acertadas me han hecho respirar cientos de veces en las que me he sentido ahogada... *Aimee Vasconcelos*, gran compañera y amiga, con tus ocurrencias me has hecho sonreír aun en muchas dificultades. Gracias a ustedes he podido conocer grandes personas como *María Carolina y Angie*, quienes han compartido conmigo innumerables momentos.

A *Fanita*, una madre, amiga y compañera de piso incomparable, mis días se hacen tan llevaderos y tranquilos contigo a mi lado, te quiero con mi corazón.

Irina Carpentieri, mi bella amiga; mil gracias por el apoyo brindado desde que te conocí en el máster, desde ese primer día te convertiste en mi hermana mayor, gracias por hacerme parte de tu vida.

A *Carolina Espinoza, Marcelle Abreu y María Rincón*, me pregunto ¿Qué habría sido de mí sin su presencia en esta última etapa del doctorado? Su apoyo, cariño, consejos, compañía, ocurrencias y vivencias han sido de las mejores experiencias de mi vida. Gracias a Dios por sus vidas y existencia.

Y a todos los pasajeros de este tren, a los que han estado y ya no... a los que siguen aquí, pues para bien o para mal me han enseñado a ser quien soy hoy... Y ahora a esperar con ansias nuevas sorpresas...

Abreviaturas

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Adquirida

CDC: Centro de Control de Enfermedades

ADS: Agar Dextrosa de Sabouraud

AmB: Anfotericina B

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

CYP450: Citocromo Fósforo 450

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LC: Leishmaniosis cutánea botón del Oriente

LCD: Leishmaniosis cutánea difusa

LMC: Leishmaniosis mucocutánea

AMG: Antimoniato de meglumina

EGS: Estibogluconato de sodio

NE: Nanoemulsión

HLB: Balance hidrofílico-lipofílico

DMSO: Dimetilsulfóxido

PPO: Óxido de polipropileno

PEO: Óxido de polietileno

UCST: Temperatura Crítica de Miscibilidad Superior

LCST: Temperatura Crítica de Miscibilidad Inferior

CMC: Concentración Micelar Crítica

CMT: Temperatura Micelar Crítica

FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos

LD: Límite de Detección

LC: Límite de Cuantificación

OMS: Organización Mundial de la Salud

DLS: Dispersión Dinámica de la Luz

TEM: Microscopia de Transmisión Electrónica

SEM: Microscopia Electrónica de Barrido

AFM: Microscopia de Fuerza Atómica

TEWL: Pérdida de agua transepitelial

SCH: Hidratación del estrato córneo

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

IC50: Concentración Inhibitoria 50

CC50: Concentración Citotóxica 50

IS: Índice de Selectividad

I.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1. RESUMEN

La piel constiyuye una de las primeras líneas de defensa de nuestro organismo y, como tal, puede sufrir la agresión de numerosos microorganismos y parásitos. Entre estas patalogías cabe mencionar las micosis y la leishmaniosis que pueden tratarse con una variedad de fármacos presentados bajo diferentes formas farmacéuticas diseñadas para las vías de administración correspondientes, siendo las vías más habituales la cutánea, oral y parenteral.

Para el tratamiento de afecciones de la piel y sus anejos, la vía cutánea en principio es la de elección, sin embargo, en algunos casos no aporta los resultados terapéuticos esperados, frecuentemente debido a una escasa penetración y/o retención del fármaco a nivel dérmico. Esta falta de eficacia podría paliarse con el uso de vehículos tales como nanoemulsiones e hidrogeles termorreversibles, dando lugar a nuevas formulaciones que podrían usarse como alternativa a los medicamentos de administración oral o parenteral para el tratamiento de patologías cutáneas.

La Anfotericina B podría ser un buen candidato, dado su potencial nefrotóxico por vía oral y la ausencia en Europa de medicamentos con este principio activo para su administración cutánea.

Si estas nuevas formulaciones fueran viables, supondrían una buena alternativa, dado que en principio se reducirían considerablemente los posibles efectos indeseables del fármaco. Además, comparado con los inyectables, presentarían el beneficio de una administración no invasiva e indolora.

Para el desarrollo de la Tesis se ha realizado un amplio estudio bibliográfico preliminar que viene sintetizado en el capítulo 1 de la memoria. Seguidamente, en el capítulo 2, se exponen los objetivos y plan de trabajo establecido. Los demás capítulos tratan de la parte experimental con sus conclusiones finales.

1. SUMMARY

The skin constitutes one of the first lines of defense of our organism and, as such, it can suffer the aggression of many microorganisms and parasites. These pathologies include the mycosis and leishmaniasis that can be treated with a variety of drugs presented under different pharmaceutical forms designed for the corresponding routes of administration, the most common oral, cutaneous and parenteral pathways.

For the treatment of skin conditions and their annexes, the skin route in principle is the one of choice, however, in some cases it does not provide the expected therapeutic results, often due to poor penetration and / or retention of the drug at the dermal level. This lack of efficiency could be mitigated by the use of vehicles such as nanoemulsions and thermorreversible hydrogels, giving rise to new formulations that could be used as an alternative to oral or parenteral administration medications for the treatment of cutaneous pathologies.

Amphotericin B may be a good candidate, given its oral nephrotoxic potential and the absence in Europe of medications with this active ingredient for its skin administration.

If these new formulations were viable, they would be a good alternative, since in principle the potential undesirable effects of the drug would be considerably reduced. In addition, compared with injectables, they would present the benefit of non-invasive and painless administration.

For the development of the Thesis, a comprehensive preliminary bibliography study has been carried out which is summarized in Chapter 1 of the report. Next, in Chapter 2, the objectives and established work plan are set out. The other chapters deal with the experimental part with its final conclusions.

1.1 LA PIEL Y SUS ANEJOS

1.1.1 Fisiología y funciones

La piel es la cubierta externa del cuerpo humano y, por su tamaño y funciones, uno de sus órganos más importantes. Cubre una superficie aproximada de 2 m², recibe un tercio de la sangre que circula por el cuerpo, tiene tendencia a la elasticidad y su espesor es de unos pocos milímetros ($2,97 \pm 0,28$ mm aproximadamente), pero varía según la región de que se trate (1, 2). Actúa como una barrera contra agresiones mecánicas, químicas, de agentes tóxicos, del calor, el frío, las radiaciones ultravioleta y los microorganismos patógenos. Además, es esencial para el mantenimiento del equilibrio de los fluidos corporales impidiendo la posible pérdida de agua, ayuda a conservar el equilibrio térmico y la transmisión de gran cantidad de información externa que accede al organismo por el tacto y los receptores del dolor, como la presión y temperatura (3).

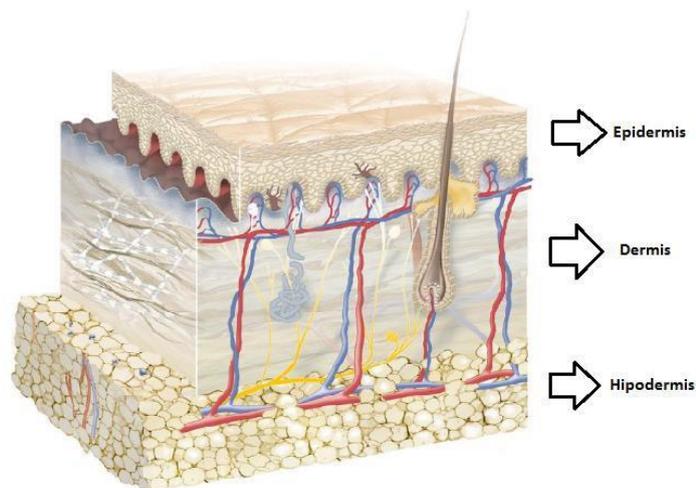


Figura 1. Estructura de la piel: epidermis, dermis, hipodermis (4).

La piel se compone de tres capas principales: epidermis, dermis y subcutis o tejido subcutáneo (hipodermis) (figura 1), cada una de las cuales está formada por varias subcapas. Contiene además, glándulas sebáceas, sudoríparas y folículos pilosos, los cuales desempeñan diversos papeles en su función global de protección.

1.1.2 Epidermis

Es la capa más externa de la piel y protege frente a toxinas, bacterias, hongos y pérdida de líquidos. Consta de 5 estratos o subcapas de células, llamadas queratinocitos, que se detallan a continuación (figura 2):

- **Capa basal (o estrato basal):** es la capa más interna, donde se producen los queratinocitos. Es la encargada de la regeneración y replicación de las células epidérmicas. Además de los queratinocitos, en ella también se generan melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel.
- **Capa espinosa (estrato espinoso):** es la penúltima capa de la epidermis; la forman células que están unidas por puentes intercelulares a modo de espinas con continuidad citoplasmática. Caracterizada por una serie de células más o menos cuboidales que según van ascendiendo, se van aplanando.
- **Capa granular (estrato granuloso):** está compuesta por células que contienen gránulos de queratohialina cuya degradación final produce las sustancias higroscópicas responsables de la hidratación de la piel. Además, en este estrato comienza la queratinización: las células producen gránulos duros y, a medida que estos empujan hacia arriba, cambian a queratina y lípidos epidérmicos.
- **Capa clara (estrato lúcido):** está ubicada entre la capa granulosa y la capa córnea. Formada por una sola capa de células sin núcleo que contienen helidina, una sustancia oleosa. Las células están densamente comprimidas, aplanadas y no pueden distinguirse unas de otras.
- **Capa córnea (estrato córneo):** es la capa más externa de la epidermis y la barrera fundamental contra el medio ambiente, siendo la principal responsable de la impermeabilidad de la piel y de la resistencia a la difusión de fármacos o cualquier otra sustancia. Comprende, en promedio, unas 20

subcapas de células muertas, aplanadas, llamadas corneocitos. Estas células muertas se desprenden regularmente en un proceso conocido como descamación.

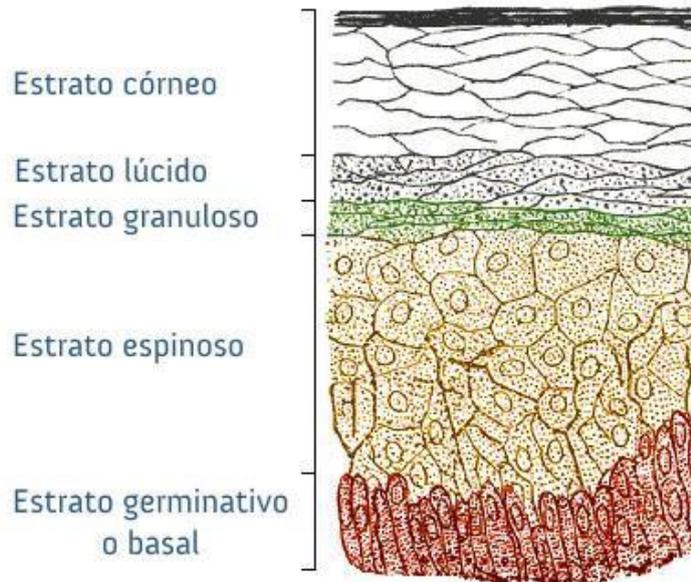


Figura 2. Composición de la epidermis (4).

Las células van avanzando a través de los estratos a distinta velocidad. La velocidad con la que ascienden depende, entre otros factores, de la descamación, y por tanto de que exista un estímulo externo que promueva la pérdida de las primeras capas de la piel, de manera que otras células empiecen a dividirse con mayor rapidez en las capas más profundas de la epidermis.

A medida que las células ascienden se van diferenciando, pierden el núcleo y aparecen granulaciones y vesículas, cambiando sobre todo su composición proteica. La proteína fundamental que se sintetiza es la queratina que va aumentando en porcentaje a medida que las células van ascendiendo hasta llegar al estrato córneo.

La queratina son fibras de proteína, formadas desde el estrato basal, que se van asociando unas con otras dando lugar a los protofilamentos que, a su vez, dan lugar a las profibrillas. Son pequeñas y poco resistentes. Sin embargo, a medida

que se alcanza el estrato córneo, mayor será su diámetro y tamaño. Las fibrillas están unidas por una sustancia llamada queratohialina y una serie de lípidos que las rodean. Todo esto confiere una alta resistencia a la última capa de la epidermis ante los agentes externos (5).

Además, la epidermis está cubierta por una emulsión de agua y lípidos conocida como película hidrolipídica que, mantenida por secreciones de las glándulas sudoríparas y sebáceas, contribuye a que la piel sea flexible y actúa como barrera adicional frente a bacterias y hongos (figura 3) (6).

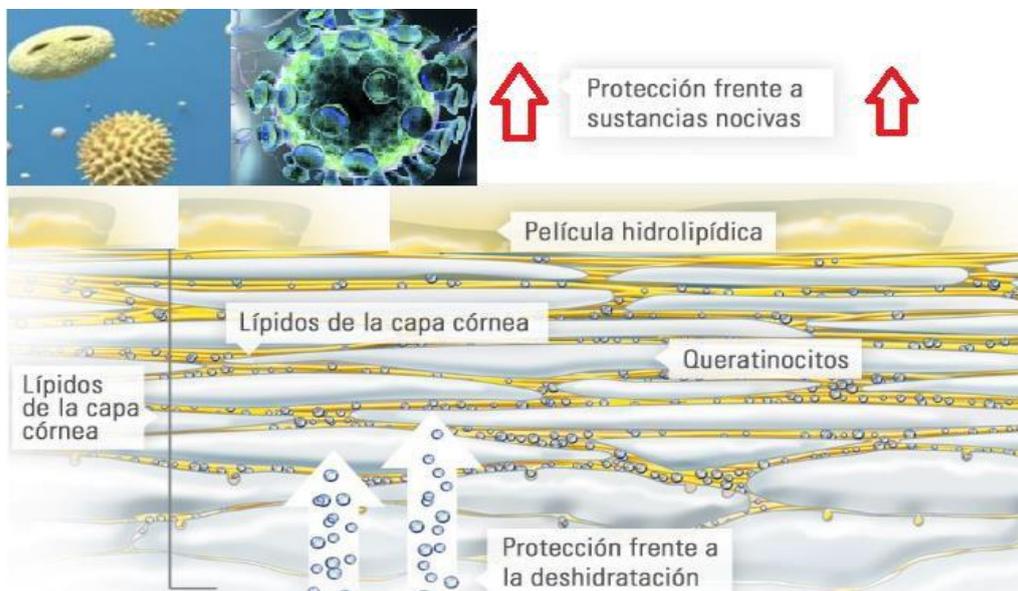


Figura 3. Interior de la capa córnea, las células se unen entre sí por medio de lípidos (4).

Entre la dermis y la epidermis se encuentra la membrana basal. Es una membrana plasmática enrollada con gran superficie que permite el intercambio de nutrientes entre la dermis y la epidermis, ya que en la epidermis no hay riego sanguíneo, y evita el desplazamiento de las 2 capas.

1.1.3 Dermis

Es un componente sustancial del cuerpo humano dado que proporciona nutrientes y sistemas de soporte como colágeno, elastina, tejido conectivo y ácido hialurónico, responsable de fijar agua y mantener el aspecto sano de la piel. También juega un papel importante en la regulación de la temperatura, la presión y el dolor. La dermis contiene los vasos linfáticos y receptores sensitivos. En ella se asientan los anejos cutáneos (figura 4) (7).

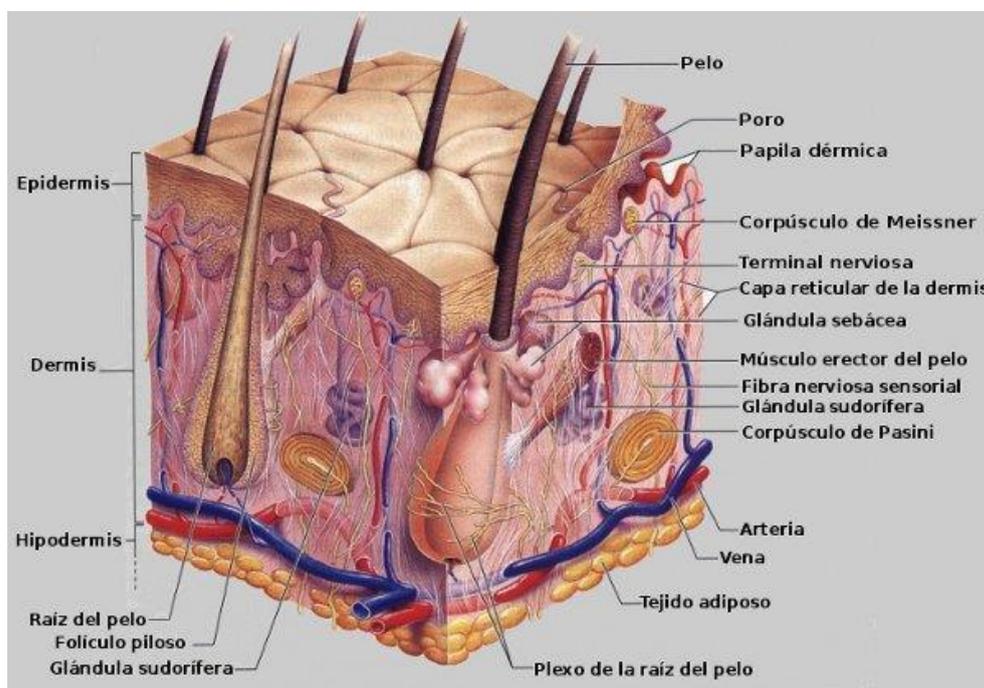


Figura 4. La piel y su estructura (8).

1.1.3.1 Anejos cutáneos

a) Folículo piloso

Nace y asienta su raíz en la dermis; atraviesa la epidermis y desemboca en la superficie de la piel. Cada pelo consta de raíz y tallo. La raíz está incluida en el folículo piloso. Está formada por el bulbo piloso, dentro del cual está la papila dérmica, con los vasos y los nervios. Las células adyacentes a la papila forman la matriz del pelo. Son células conjuntivas de gran vitalidad y bien irrigadas. Se

dividen rápidamente, desplazando a las existentes a medida que crecen. Por una parte originan la cutícula que envuelve el pelo y por otra, se queratinizan y forman el pelo propiamente dicho. Hacia el primer tercio de su longitud se encuentra anexada una glándula sebácea que secreta el sebo, proporcionando flexibilidad y suavidad al pelo.

La parte que sobresale de la piel es el tallo que posee morfológicamente tres capas:

- *Cutícula* (capa escamosa): representa el manto protector del pelo contra la desecación y la penetración de sustancias extrañas.
- *Corteza* (capa fibrosa): estructura fibrilar que consta de fibrillas, microfibrillas y protofibrillas, que se unen mediante una masa compacta y amorfa que las cohesiona.
- *Médula* (conducto medular): forma el cordón celular interno del pelo.

b) Glándula sebácea

Está formada por los adipocitos. Inicialmente estas células son semejantes a las de los estratos de la epidermis pero posteriormente se llenan de lípidos y pierden el núcleo. Están presentes en gran número en el cuero cabelludo. Es un órgano secretor formado por un conjunto de lóbulos, irrigados por la trama vascular, que poseen una serie de conductos por los cuales circula el sebo. El conducto de cada lóbulo vierte el material lipídico sintetizado a un conducto mayor que desemboca casi siempre en la parte superior de un folículo piloso. El sebo secretado lubrica el pelo y el vello, e impide que la piel se deseque (9).

c) Glándula sudorípara

Está formada por células epiteliales y en su interior se forma un canal central a partir de las células periféricas.

Se distinguen en dos tipos de glándulas sudoríparas:

- **Glándulas apocrinas:** poseen un conducto secretor que desemboca en un folículo piloso. Son glándulas tubulares, mayores que las ecrinas, cuya parte secretora forma un ovillo localizado en la dermis. Su localización también es muy significativa y permite realizar una clasificación de las mismas en:
 - Glándulas ciliares* situadas entre los folículos de las pestañas.
 - Glándulas ceruminosas* localizadas en el conducto auditivo externo y son productoras de la secreción cérea típica del oído.
 - *Glándulas situadas en la región anogenital*, en las areolas mamarias y en las axilas (9).
- **Las glándulas sudoríparas apocrinas:** se hallan sometidas a un control hormonal y sólo inician el proceso secretor cuando se alcanza la pubertad, decreciendo con la edad. Su secreción es escasa y sólo se vierte al exterior de forma esporádica. Se trata de un líquido viscoso, de aspecto lechoso, cuyo pH es neutro o débilmente alcalino. La composición del sudor apocrino es variable, presentando además de agua, una fracción lipídica, azúcares, amoníaco y aminoácidos (9).

d) Glándulas exocrinas

El contenido lo vierten directamente sobre la superficie de la epidermis favoreciendo la emulsión epicutánea. Se hallan distribuidas por casi toda la superficie corporal en un número aproximado de 3 millones. La presencia máxima corresponde al área palmo-plantar. Son glándulas tubulares simples de origen epidérmico, situadas en la dermis, excepto en los márgenes de los labios, en el glande del pene y en el lecho ungüéal. El control de la secreción lo realizan fibras nerviosas simpáticas colinérgicas postganglionares.

El sudor ecrino es un líquido acuoso claro que contiene sólo un 0,5% de sólidos. En él abunda el cloruro sódico, junto a la glucosa, ácido láctico y urea. Su pH oscila entre 4,2 y 5,5 (9).

1.1.4 Hipodermis

Es la tercera y última capa de la piel, también conocida como tejido subcutáneo, se encuentra debajo de la dermis, a la que está conectada por una unión dermo-hipodérmica. Está formada principalmente por adipocitos, células dedicadas al almacenamiento de la grasa y que representan entre el 15% y el 30% de la masa corporal total. Una de sus funciones más importantes es conservar la temperatura corporal y darle flexibilidad a la piel. Su grosor varía dependiendo de las partes del cuerpo y puede ser diferente entre las personas.

1.2 VÍA CUTÁNEA

1.2.1 Administración tópica de fármacos

Cualquier afección dermatológica se caracteriza por presentar alteraciones en la estructura o funcionalidad de la piel. Estas afecciones cutáneas pueden ser de muy diversa etiología, sintomatología y clínica. En función del caso precisará de medicación sistémica o no. En ocasiones el tratamiento cutáneo es la única vía para tratar una patología, en otras ocasiones representa una estrategia coadyuvante a la vía sistémica, y en otros casos, es una buena alternativa a las limitaciones de la vía sistémica.

Por otro lado, la administración de fármacos por vía tópica puede tener dos objetivos y/o efectos. Por un lado conseguir un efecto local, únicamente en el lugar donde se aplica, localizando su acción y/o reduciendo efectos secundarios no deseados, o bien, un efecto sistémico. Es decir, existe la posibilidad de que la piel sea atravesada por fármacos de diferente naturaleza.

Tanto para evitar como para conseguir la permeación transdérmica de un fármaco hasta la circulación sistémica será fundamental conocer las vías de penetración cutánea y los factores que afectan la absorción de fármacos (5).

1.2.2 Ventajas e inconvenientes

La administración tópica de fármacos presenta ciertas ventajas respecto a otras convencionales. Se mencionan a continuación:

- Evita el tracto gastrointestinal y la biotransformación del efecto de primer paso hepático.
- El fármaco se libera en un lugar específico.
- Hay control del porcentaje de absorción.
- Puede formularse como un compuesto de liberación retardada.
- Puede proporcionar una dosis constante.
- Reduce los efectos sistémicos secundarios.
- Es de fácil aplicación.
- La superficie es fácilmente accesible (hay posibilidad de controlar y/o eliminar la forma farmacéutica).

A pesar de sus múltiples ventajas, la vía tópica también presenta algunos inconvenientes, entre ellos:

- Supone una barrera al paso de agentes externos, lo que limita la permeación de un gran número de principios activos.
- No es adecuada para fármacos dermoirritantes o que puedan provocar reacciones de intolerancia y alergias.
- Metabolismo o biotransformación de algunos fármacos debido a las enzimas endógenas de la piel (5).

1.2.3 Permeación cutánea

El proceso de permeación cutánea se divide en 3 etapas bien diferenciadas (10).

- **Penetración:** es el proceso por el cual el fármaco entra en la primera capa de la piel. El proceso de penetración implica la liberación del principio activo del vehículo que lo contiene, debe por tanto disolverse y difundir hacia la interfase vehículo-estrato córneo. Para que esto ocurra, es importante que el vehículo o formulación sea adecuado, ya que es el que modula el proceso de liberación del fármaco en la piel.
- **Permeación:** esta fase consiste en el paso del fármaco a través de la piel de una capa a otra, regido por un proceso de difusión pasiva. El estrato córneo es la barrera que debe atravesar el principio activo para ir difundiendo a través de las distintas capas de la piel. Como se ha comentado anteriormente, las vías que pueden usarse en esta fase son la epidérmica y la transapendicular.
- **Absorción:** en esta fase se produce el paso del principio activo a la circulación sistémica (11, 12).

1.2.3.1 Vías de penetración cutánea

Tras la aplicación de un medicamento sobre la piel, deben considerarse los tres siguientes pasos que atañan al fármaco (figura 5):

- **Liberación** desde el vehículo que lo incorpora hasta la superficie de la piel.
- **Disolución** del fármaco en los componentes de la capa superficial.
- **Difusión**, pudiendo llegar hasta circulación sistémica (13).



Figura 5. Esquema de los procesos implicados en la penetración dérmica (14).

Esta difusión puede producirse a través de dos vías principales que se describen a continuación.

a) Vía transepidérmica

Ésta es la vía más importante en la penetración de activos y se produce por difusión intercelular o intracelular (figura 6).

La difusión intercelular es de naturaleza fundamentalmente lipídica, por lo que el fármaco pasa a través de la matriz lipídica, entre los corneocitos del estrato córneo. Los fármacos lipófilos difunden a través de estos lípidos extracelulares y los más polares a través de la parte hidrófila de dichos lípidos.

En el caso de la difusión por vía intracelular, el fármaco pasa a través de los corneocitos, salvando repetidos repartos entre el principio activo y las regiones hidrófilas y lipófilas de las bicapas lipídicas; esto hace que el paso del fármaco a través de esta vía sea menos importante. Los compuestos apolares penetran por difusión a través de los lípidos intracelulares, mientras que los polares lo hacen a través de la queratina hidratada presente en los queratinocitos (15).

b) Vía apendicular

El fármaco pasa a través de las glándulas sudoríparas y folículos pilosebáceos. Esta forma de entrada es más rápida que las anteriores, aunque se considera una ruta minoritaria (16).

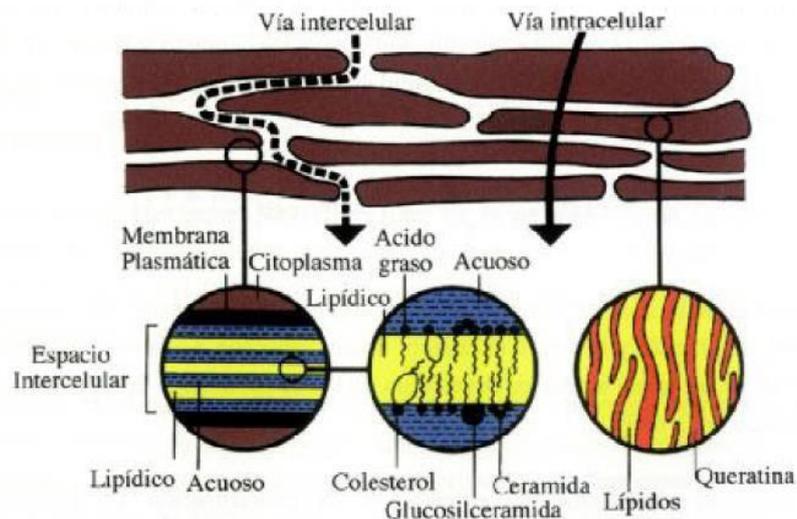


Figura 6. Esquema de las vías de penetración de los fármacos a través de la piel (14).

1.2.4 Factores que influyen en la absorción cutánea

Entre los factores que afectan la absorción de fármacos se encuentran factores biológicos, fisicoquímicos, farmacológicos, farmacocinéticos y biofarmacéuticos. Las variaciones debidas a las propias características de la piel en un individuo determinado pueden afectar en gran medida la absorción de un fármaco. Entre los factores biológicos destacan:

- **Edad:** conlleva importantes alteraciones estructurales, funcionales, mecánicas y de circulación. Aunque la mayoría de los estudios son poco concluyentes varios de ellos demuestran que la piel de niños y recién nacidos, así como la de los ancianos, es más permeable que la del adulto (16).
- **Zona corporal:** el área menos permeable para el paso de sustancias es la planta del pie (grosor del estrato córneo: 600 μm), seguida de los tobillos y la palma

de la mano (grosor del estrato córneo: 400 μm). El antebrazo y la espalda presentan una permeabilidad mayor, seguida del cuero cabelludo, las axilas y frente (17).

- **Estado de la piel:** existen determinadas patologías que afectan el estado de la piel, pudiendo alterar su función de barrera y aumentar la permeabilidad de la misma a xenobióticos, fármacos o microorganismos. La permeabilidad aumenta en casos de descamación cutánea, agresión química o física e inflamación.
- **Grado de hidratación del estrato córneo:** si incrementa el contenido de agua, la permeabilidad a los fármacos aumenta, hecho que se verá favorecido con el efecto oclusivo. Cuando el nivel de hidratación es menor al 10% se considera que la queratina está deshidratada, se produce descamación del estrato córneo y se altera la absorción (18).
- **Flujo sanguíneo:** al aumentar el flujo sanguíneo, el tiempo de residencia del fármaco en la dermis disminuye, por tanto, el gradiente de concentración, favorece el paso del fármaco de la superficie cutánea a la dermis. Si el flujo sanguíneo de la zona es bajo o disminuye, la sustancia no puede difundirse a medida que penetra, es decir que este es un factor limitante para la absorción del fármaco (19).
- **Metabolismo:** la epidermis es un tejido que presenta actividad enzimática. En la superficie de la piel se producen reacciones de oxidación y reducción, reacciones de hidrólisis y reacciones de conjugación. Al ser la piel un órgano metabólicamente activo, algunas sustancias se metabolizan durante su paso a través de la piel (20, 21).
- **Factores ambientales:** entre ellos está el efecto vasoconstrictor-relacionado con el flujo sanguíneo-que la disminución de la temperatura ambiental tiene sobre la superficie de la piel y la consecuente disminución de la permeabilidad.

Además, el ligero masaje con que se aplican las formas tópicas genera un aumento del flujo sanguíneo local y favorece la absorción del fármaco.

► **Factores físico-químicos:** entre los relacionados con el fármaco, caben resaltar: el coeficiente de difusión, el coeficiente de reparto, solubilidad, concentración y, en el caso de fármacos ionizables, el pH.

- *Coefficiente de difusión*

La difusión de una molécula a través de una membrana viene determinada por la resistencia que oponga el medio a su migración. Esta resistencia depende fundamentalmente de las características del penetrante, de las posibles interacciones con moléculas del vehículo o de la membrana, y de la viscosidad y de la temperatura del medio. Si se asume que las moléculas del penetrante son similares entre sí en cuanto a tamaño, y que adoptan una conformación más o menos esférica, el coeficiente de difusión, **D**, se puede calcular aplicando la ley de Stokes- Einstein (22):

$$D = \frac{K \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

Donde **K** es la constante de Boltzman, **T** la temperatura absoluta, **r** el radio de la molécula y **η** la viscosidad del medio.

A partir de esta ecuación se puede deducir, como demuestran los estudios realizados por Marzulli, que a medida que aumenta el tamaño o peso molecular de la sustancia, la difusión tendrá lugar con una mayor dificultad (23). Sin embargo, esto no es cierto en todos los casos, ya que generalmente un incremento del peso molecular se traduce en un aumento del carácter lipófilo de la molécula, y es este factor el de mayor influencia en la capacidad de difusión de la sustancia a través de una membrana, como demuestran los resultados obtenidos por Scheuplein (1973) para la serie homóloga de los alcoholes alifáticos. Por otro lado, moléculas que presentan grupos polares, como es el caso de los esteroides antiinflamatorios, pueden

formar enlaces con los componentes de la membrana, que conduce a la obtención de constantes de difusión pequeñas (24).

- *Coefficiente de reparto*

La lipofilia de un compuesto es un factor relevante en la absorción transdérmica del mismo. Se trata de un parámetro de gran importancia, ya que a la hora de establecer correlaciones absorción-lipofilia, la afinidad relativa que presenta un soluto por el medio acuoso que lo rodea y la membrana cutánea marca su paso a través de la piel (25).

Para la determinación del coeficiente de reparto (**P**) se recurre a un sistema bifásico, de modo que: $P = C_d / C_a$

En donde C_d y C_a es la concentración de la sustancia en el disolvente orgánico y en el agua, respectivamente.

Existen estudios que demuestran que cuanto mayor lipofilia presenta el compuesto mayor será su permeabilidad a través de la piel. Sin embargo, un coeficiente de reparto elevado no siempre es indicativo de una mayor permeabilidad, ya que sustancias altamente lipófilas pueden acumularse en el estrato córneo, con lo que se ve dificultada su posterior absorción.

- *Solubilidad*

La solubilidad del fármaco afectará a la liberación, ya que al aumentar la concentración de fármaco disuelto en el vehículo, el gradiente de concentración entre el fármaco y la superficie cutánea será mayor, lo que se traduce en una mayor cantidad de fármaco liberado. La actividad termodinámica depende de la concentración y solubilidad del fármaco, así como de interacciones fármaco-fármaco y fármaco-vehículo. La actividad termodinámica del fármaco en el vehículo será máxima cuando se utilicen soluciones saturadas. Este parámetro indica la tendencia del fármaco a escapar del vehículo. Otros autores recomiendan utilizar soluciones supersaturadas o suspensiones con el fin de que no disminuya la

concertación de fármaco disuelto durante el proceso de liberación del mismo. En este caso se tendrá que tener en cuenta la velocidad de disolución del fármaco. Por otro lado, debe existir un equilibrio entre la afinidad del fármaco-vehículo y la afinidad fármaco-piel/mucosa, ya que una afinidad extrema hacia uno de ellos significará que el fármaco permanecerá mayoritariamente en el sitio más afín. Por tanto, los fármacos lipófilos disueltos en medios acuosos se absorberán antes que si se encuentran en un solvente lipófilo a la misma concentración. La mayoría de fármacos son ácidos o bases débiles por lo que a pH fisiológico se encuentran parcialmente ionizados, presentando una solubilidad pH dependiente. Los fármacos que se encuentran ionizados difunden con mayor dificultad que los que se encuentran en su forma molecular.

- *Concentración de fármaco*

Según la ley de Fick para la difusión, la velocidad de transferencia de una sustancia desde zonas de alta concentración a las de baja concentración es proporcional al gradiente de concentración. Además, a mayor fármaco solubilizado en el vehículo sin poseer una selectividad selectiva con este, presentará una mayor actividad termodinámica. Ésta aumentará si se incrementa la concentración del fármaco en la fórmula o manipulando el vehículo para disminuir la solubilidad del fármaco en éste (26).

- *pH*

Puesto que muchos medicamentos son ácidos y bases débiles, es importante tener en cuenta la influencia del pH, ya que la proporción en la que se encuentran ionizados depende tanto del pK_a del compuesto como del pH del líquido biológico en el que se encuentra el fármaco (27). Se ha podido observar que la forma no ionizada de un fármaco presenta un mayor coeficiente de reparto lípido-agua que la correspondiente forma ionizada,

por lo que cabría esperar una mayor permeabilidad en el estrato córneo para la fracción no ionizada.

Los factores fisicoquímicos no sólo hacen referencia al fármaco, sino también al vehículo utilizado. La elección del vehículo es fundamental para la biodisponibilidad del fármaco. Entre los principales criterios destacan:

- *Oclusión*

La oclusión (de sistemas transdérmicos, apósitos oclusivos y bases lipófilas) ha demostrado aumentar la permeabilidad de algunos fármacos. Por tanto a medida que aumenta la fase acuosa en la formulación, el poder oclusivo de la misma disminuye. Respecto a los mecanismos implicados en este proceso, se piensa que pueden ser debidos a la acumulación de agua dentro de la piel, hinchando los corneocitos y aumentando el agua de la matriz intercelular (28). Por otro lado, también aumenta la temperatura de la piel y disminuye la pérdida de co-solventes por evaporación (29). No obstante, en algunos casos la oclusión puede provocar irritación y favorecer el crecimiento microbiano (30).

- *Viscosidad*

Cuanto menor sea la viscosidad del vehículo, en general, mayor será la liberación del fármaco ya que tendrá un mayor coeficiente de difusión. La elección de la formulación y su comportamiento reológico apropiado determinará el tiempo de residencia y la exposición local del fármaco en el sitio requerido (31).

- *Posología*

Con el fin de entender el efecto de los excipientes sobre la penetración transepidérmica, es recomendable la aplicación de dosis finitas en el compartimento donador (> 100 mg de formulación por cm^2). La aplicación de dosis infinitas da lugar a una relativamente constante fuerza de entrada del fármaco a través de la piel, permitiendo alcanzar estados estacionarios

plasmáticos. Sin embargo, en la práctica diaria no se aplican dosis tan elevadas, sino aproximadamente de 2-5 mg/cm², dando lugar a una fina capa de la formulación (10-30 µm), que es menos de lo necesario para que se sature de fármaco el estrato corneo (32).

Se obtiene así un modelo de dosis finitas. Por otro lado, los efectos que tienen los excipientes sobre la piel pueden afectar a la penetración transdérmica de forma diferente a cuando se aplican en forma de dosis única o siguiendo un esquema de múltiples dosis. Para estudiar el efecto de la frecuencia de dosis, es más aconsejable realizar un estudio de múltiples dosis finitas.

Para que un fármaco sea eficaz por vía tópica es necesario que sea preparado en la concentración necesaria y con los excipientes adecuados. Si no se cumplen estas condiciones, se puede comprometer la eficacia del preparado por factores como que la incompatibilidad farmacéutica inactive el fármaco, que el vehículo no sea apropiado para la zona a tratar o que se fije tanto al principio activo que impida su liberación en la piel.

El excipiente-base debe ser de fácil aplicación, no tóxico, no irritante ni alergénico, y químicamente estable. En definitiva, la elección de la forma galénica de administración es tan importante como el fármaco porque condiciona la efectividad del tratamiento (absorción y duración de la acción) (33).

Finalmente cabría considerar los siguientes puntos:

- *Extensión de la superficie de aplicación:* generalmente se define por los centímetros cuadrados de piel expuesta al preparado.
- *Frecuencia de la aplicación:* como norma general se asume que una o dos aplicaciones diarias bastan para la mayoría de los preparados, entre otras razones porque los procesos cinéticos a través de la piel son lentos; hay que

tener presente que el estrato córneo actúa como reservorio, permitiendo una penetración gradual del medicamento hacia las capas más profundas. Por otra parte, las aplicaciones múltiples aumentan la absorción y la biodisponibilidad (34).

- *Forma de aplicación:* el vendaje oclusivo, la fricción y la hidratación mediante inmersión en agua aceleran la penetración de ciertos fármacos, aumentando su absorción hasta 10 veces (35), aunque también se pueden incrementar los efectos adversos.

1.3 MICOSIS CUTÁNEAS

Las micosis cutáneas son infecciones fúngicas de la piel de carácter benigno aunque de gran prevalencia, siendo una de las principales causas de consulta dermatológica en la actualidad (36-38). Las primeras referencias datan de la Grecia clásica, donde se les denominaba herpes por su aspecto circular.

Los hongos capaces de causar micosis superficiales en el ser humano son, en su mayoría, saprófitos del hombre, y son capaces de convivir de forma permanente con él sin causar infección, pero en determinadas condiciones pueden comportarse como agentes patógenos y propiciar la enfermedad. Aproximadamente un 0,1% de todas las especies existentes conocidas, son capaces de causar alguna patología al ser humano. Estos microorganismos pueden aislarse en pacientes sanos, sin embargo, son capaces de causar infecciones en personas con elevado riesgo (diabéticos, pacientes con VIH/sida, pacientes con enfermedades autoinmunes consumiendo fármacos inmunosupresores, pacientes trasplantados, pacientes oncológicos, consumo de anticonceptivos).

Las micosis cutáneas pueden clasificarse en tres grandes grupos: dermatofitosis o tiñas, candidiasis y pitiriasis.

1.3.1 Candidiasis

Son las infecciones causadas por especies pertenecientes al género *Cándida spp.*, en el que se incluyen organismos unicelulares llamados levaduras, aunque algunos pueden producir filamentos (hifas y pseudohifas), tanto en vivo como en cultivo. Este género incluye especies haploides y diploides que tienen propiedades bioquímicas variables y pueden reproducirse sexual o asexualmente. Forman parte de la flora de la piel, las faneras, las mucosas, el tracto gastrointestinal y el aparato genitourinario del ser humano, y también se han aislado en animales, plantas, objetos inanimados y el medio ambiente. Se conocen más de 200 especies de *Candida spp.*, entre ellas la *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. famata*, *C. zeylanoides*, *C. dubliniensis* y la *C. albicans*, que es la más prevalente y origina el 50% de las candidiasis (39).

Las candidiasis afectan la piel, las uñas y las mucosas superficiales. Tienen diferentes presentaciones: localizadas, diseminadas o profundas, cuadros sistémicos u otros en que lo más relevante es la respuesta alérgica. Pueden aparecer en personas con o sin factores predisponentes, aunque son más frecuentes en estas últimas (40). Entre los factores predisponentes se encuentran los siguientes:

- **Locales:** aumento de la humedad, sudoración, maceración cutánea por obesidad, ropa apretada u oclusiva, zonas con mucho roce cutáneo, uso de prótesis o de apósitos no permeables. Las causas locales son muy importantes, especialmente porque son factores en cierta medida evitables.
- **Fisiológicos:** lactantes, paciente geriátrico, menstruación y embarazo.
- **Sistémicos:** endocrinopatías como diabetes mellitus y enfermedades tiroideas, leucemias y linfomas, hiperuricemia, deficiencia de hierro y síndrome de Cushing.

- **Enfermedades debilitantes e inmunodeficiencias:** infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), neoplasias o desnutrición severa.
- **Por medicamentos o tratamientos médicos:** anticonceptivos, corticosteroides, antibióticos de amplio espectro, inmunosupresores, citotóxicos y radioterapia.

13.1.1 Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida spp.*

Los factores de virulencia causados por *Candida spp.* incluyen la habilidad para sobrevivir como microorganismos comensales, la adherencia a células y tejidos del hospedador, la secreción de enzimas degradativas y el cambio de morfología del mismo (41) (figuras 7 y 8).

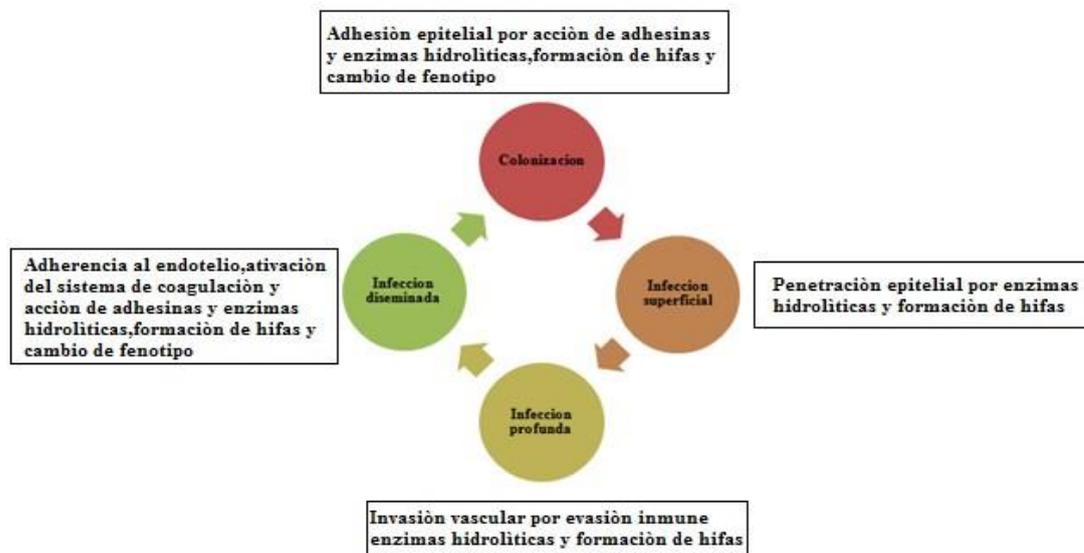


Figura 7. Etapas de la infección por *Candida spp.* y los mecanismos de virulencia que intervienen en cada etapa, adaptado de (42).

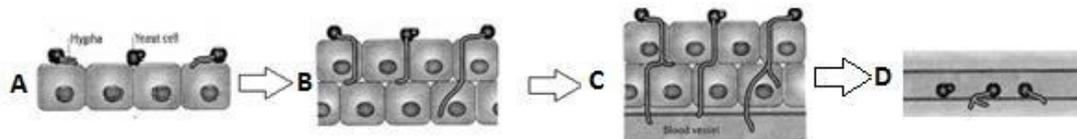


Figura 8. Invasión de tejido por *Candida spp.*: (A) adhesión y colonización; (B) penetración e invasión de hifas; (C) diseminación vascular; (D) colonización y penetración endotelial. Adaptado de (45-47).

Para que la *Candida spp.* infecte el tejido queratinizado requiere de la acción de adhesinas, enzimas y proteínas, enumeradas a continuación:

- La adhesión de la *Candida spp.* a la matriz extracelular de la piel se lleva a cabo por la presencia de adhesinas como Ala1p, Als1p y Hwp1p, Ywp1, Pra1 y Saps. Los polisacáridos, glicoproteínas y lípidos presentes en la superficie del hongo también promueven la fácil adhesión de éste a las células y tejidos del hospedador (42).
- Una de las proteínas responsables de la adherencia del hongo a los tejidos que contienen colágeno, como puede ser la piel, es la Int1p, que se une a los receptores I y IV de colágeno (43).
- Entre las enzimas degradativas o hidrolíticas responsables de la penetración de *Candida spp.* se encuentran unas proteínas de la familia Aspartil-proteínasa que hidrolizan las proteínas del hospedero como el colágeno, laminina, fibronectina, mucina, lactoferrina e inmunoglobulina, infectando primordialmente la epidermis y la mucosa oral.
- *Candida spp.* puede cambiar su morfología de levadura, pasar de redonda u ovoide (blastoconidia) a filamentosa y elongada (hifa y pseudohifa), logrando mayor virulencia, capacidad de evadir el sistema inmune y de suprimir la respuesta pro-inflamatoria del huésped (44). La forma de levadura es útil para facilitar la diseminación del hongo en el torrente sanguíneo al adherirse a las células endoteliales (45), mientras que la hifa es responsable de la invasión celular (46).

- El cambio de fenotipo se acompaña por alteraciones en la expresión de antígenos, morfología colonial y afinidades de *Candida spp.* a los tejidos.

13.12 Candidiasis superficiales

Si el sistema inmune no logra controlar la infección y/o el hongo es altamente virulento el hongo puede diseminarse sistémicamente a través del torrente sanguíneo. Así pues, pueden encontrarse tanto las candidiasis superficiales (infectando piel y mucosas) así como las candidiasis invasivas (infectan órganos internos). El presente trabajo se centra en las infecciones superficiales, debido a su mayor frecuencia de aparición.

Según la clasificación de Segal y Elad (1998) las candidiasis superficiales se dividen en infecciones cutáneas, infecciones de las uñas e infecciones de las mucosas (tabla 1).

Tabla 1. Candidiasis superficiales, clasificación según Segal y Elad (1998).

Candidiasis superficiales	Cuadro clínico
Infecciones cutáneas	- Intertrigo candidiásico de grandes y pequeños pliegues. - Erosión interdigital - Eritema perianal. - Otitis externa. - Candidiasis mucocutánea crónica.
Infecciones de las uñas	Paroniquia/oniquia.
Infecciones de las mucosas	Candidiasis orofaríngea.
	Candidiasis vaginal (vulvovaginitis).

- *Intertrigo candidiásico*: es la infección cutánea por *Candida spp.* más frecuente (figura 9). Suele afectar a personas con factores predisponentes como obesidad, diabetes o tratamientos con esteroides. Se localiza en zonas

cutáneas húmedas, expuestas al roce o a la maceración, como el área submamaria, las axilas o las ingles. La clínica de la infección se caracteriza por la aparición de eritema acompañado de prurito. En ocasiones pueden observarse vesículas, pústulas y complicarse con infecciones bacterianas secundarias (47).



Figura 9. Intertrigo candidiásico de pliegues grandes (48).

- *Erosión interdigital:* es una variedad del intertrigo candidiásico que afecta los espacios interdigitales de las manos, principalmente en personas que suelen tenerlas muy húmedas o lavárselas continuamente. Los dedos de los pies también pueden ser afectados (figura 10), sobre todo cuando se utilizan zapatos cerrados o permanecen húmedos (47).



Figura 10. Erosión interdigital de pliegues pequeños (48).

- *Eritema perianal*: esta entidad clínica aparece en niños que utilizan pañales y se caracteriza por afectar la zona perianal, crural e inguinal (figura 11). También es conocida como eritema del pañal (47).



Figura 11. Eritema de pañal (48).

- *Otitis externa*: *Candida spp.* puede causar, sobre todo en enfermos inmunodeprimidos, infecciones del pabellón auricular (figura 12) que generalmente son polimicrobianas, ya que se aíslan bacterias junto a las levaduras (47).



Figura 12. Otomicosis causada por *Candida albicans* (48).

- *Candidiasis mucocutánea crónica*: es un tipo de lesión muy variable en la que se han descrito eritemas localizados, lesiones verrugosas (granulomas candidiásicos) y placas hiperqueratósicas. Pueden ser localizadas o

generalizadas y afectan cualquier área cutánea y las mucosas (figura 13), además de las uñas (47).



Figura 13. Candidiasis mucocutánea crónica localizada en la lengua (48).

- *Paroniquia/oniquia crónica o aguda:* se caracteriza por la inflamación intensa del pliegue proximal de la uña (figura 14), a menudo con vesículas, pústulas o ampollas, dolor y pérdida de cutícula. Pueden observarse interrupciones completas del crecimiento ungüeal o crestas transversales (47).



Figura 14. Paroniquia candidiásica (48).

- *Candidiasis orofaríngea:* aparecen placas blancas en la lengua y cara interna de las mejillas, que pueden extenderse a la faringe (figura 15), laringe y estómago. Generalmente es asintomática, sin embargo, si no se trata a tiempo puede causar dolor y dificultades para deglutir, lo que podría dificultar la alimentación (47).

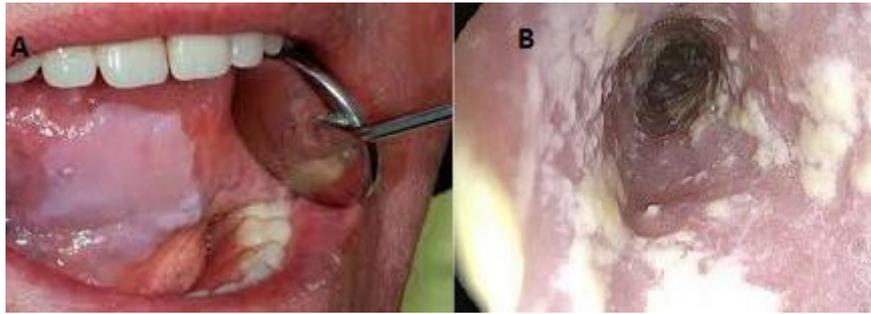


Figura 15. Candidiasis orofaríngea: (A) candidiasis orofaríngea de lengua; (B) candidiasis orofaríngea extendida hacia el esófago (48).

- *Vulvovaginitis*: provoca la inflamación de la vulva y/o vagina (figura 16), prurito, ardor, alteraciones del flujo vaginal, irritación y dispareunia, entre otros síntomas (47).

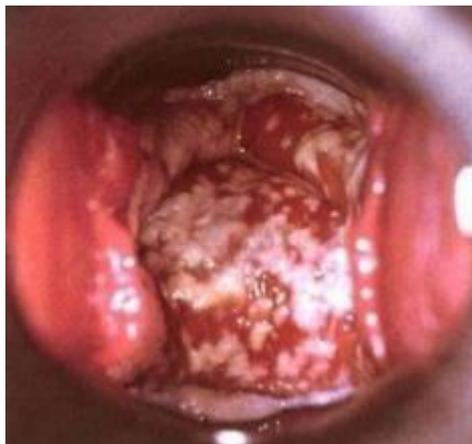


Figura 16. Vaginitis causada por *Candida albicans* (48).

13.13 Diagnóstico clínico de la candidiasis

- ✓ **Examen directo en fresco**: se debe realizar un raspado de la zona de la piel, cuero cabelludo, uñas, mucosas (oral o vaginal) que se encuentren afectadas, la muestra se deposita en un portaobjetos y se agregan a éstas dos gotas de hidróxido de potasio (KOH) al 15% para ser observadas directamente en el microscopio. En la figura 17 se observan las cándidas (49).



Figura 17. Examen microscópico en fresco con KOH al 15%. Imagen CDC tomada de Dr. Stuart Brown (50).

✓ **Tinción de Gram:** Con ayuda de un hisopo humedecido con PBS pH 7,4, se realiza un frotis de la zona de la piel, cuero cabelludo, uñas, mucosas (oral o vaginal) que se encuentren afectadas. Se realiza una tinción de Gram (Cristal violeta durante 1 minuto, lugol 1 minuto, alcohol: acetona 30 segundos y safranina 1 minuto). Podrán apreciarse levaduras únicas o en gemación (blastoconidios) con o sin la presencia de pseudomicelio. En frotis las estructuras son Gram positivas (color morado). Se da mayor validez al papel patógeno de *Candida spp.*, cuando se aprecian más de cuatro levaduras por campo, cuando son observadas a un aumento de 40X y/o existe pseudomicelio (figura 18) (51).

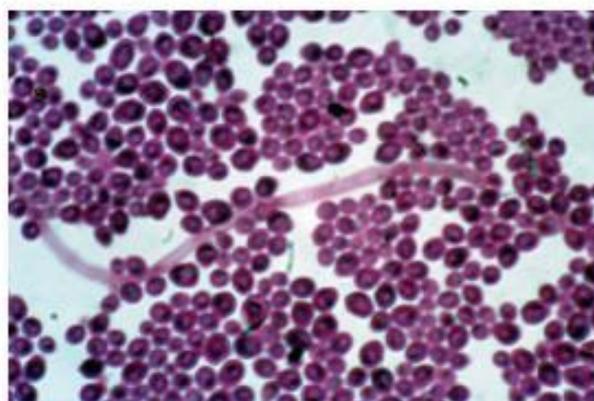


Figura 18. Aspecto microscópico de *Candida albicans*. Tinción de Gram, tomado de María José Linares Sicilia y Francisco Solís Cuesta (51) .

- ✓ **Cultivo en agar dextrosa Sabouraud con y sin cicloheximida:** con ayuda de un hisopo humedecido con PBS pH 7,4, se realiza un frotis de la zona de la piel, cuero cabelludo, uñas, mucosas (oral o vaginal) que se encuentren afectadas. Se observará un crecimiento de colonias levaduriformes, de bordes enteros, limitadas, poco elevadas y de color blanco (figura 19). Crecen en un promedio de 3 a 5 días a temperatura ambiente y de 1 a 2 días a 30°C. Algunas cepas de *Candida albicans* son resistentes a la cicloheximida. El crecimiento de colonias 'puras' aisladas del mismo producto en cultivos consecutivos, apoya el papel patógeno de *Candida spp.*(49).



Figura 19. Cultivo en agar dextrosa Sabouraud. Colonias de *Candida spp.* Imagen: CDC tomada de Dr. William Kaplan (50).

- ✓ **Pruebas inmunológicas.** La intradermorreacción con candidina tiene su mayor utilidad en el seguimiento clínico del paciente y su pronóstico. Las pruebas serológicas (IFI, ELISA) se utilizan en candidiasis sistémica y granulomatosa (49).
- ✓ **Pruebas fisiológicas y bioquímicas:** utilización de medios de cultivo cromogénicos (agar BIGGY/Nickerson, agar Pagano-Levine, CROMO-AGARCandida®, CANDI-SELECT®, etc.). Estas pruebas se venden como kits comerciales.

- ✓ **Formación de pseudomicelio, hifas y clamidoconidios en agar harina de maíz con Tween 80:** Para ello se preparan placas conteniendo este agar que ya se encuentra comercialmente y se agrega un porcentaje de Tween® 80. Con ayuda de un hisopo humedecido con PBS pH 7,4, se realiza un frotis de la zona de la piel, cuero cabelludo, uñas, mucosas (oral o vaginal) que se encuentren afectadas, se siembra en el agar y se incuba a 30°C. Se observará la formación de pseudomicelio, hifas y clamidoconidios (figura 20).

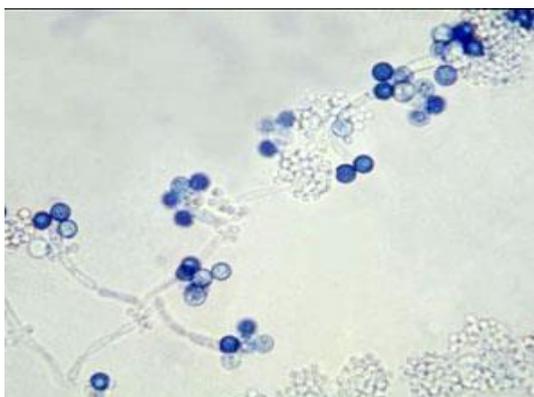


Figura 20. Cultivo agar harina de maíz con Tween® 80. Hifas y clamidoconidios = *C. albicans* o *C. dubliniensis*. Imagen: CDC tomada de Dr. Godon Roberstad (50).

- ✓ **Estudios anatomopatológicos.** La citología e histopatología, pueden demostrar los elementos parasitarios (figura 21): levaduras redondas u ovales únicas o con blastoconidios, con o sin formación de pseudomicelio (49).



Figura 21. Corte histopatológico de piel. Levaduras y pseudofilamentos de *Candida spp.* (50).

1.3.2 Aspergilosis

La aspergilosis es una infección causada por un microorganismo llamado *Aspergillus spp.*, un hongo filamentoso saprofítico que puede infectar a hospedadores como plantas, insectos, aves y mamíferos. Existen diversas especies de este hongo, siendo la más frecuente el *Aspergillus fumigatus*, pero otros potenciales patógenos son el *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* (52, 53).

Las infecciones por *Aspergillus spp.* se inician con la inhalación de unas esporas llamadas conidios, que producen aspergilosis pulmonar. Su desarrollo en humanos depende del estado inmunológico del huésped y la mayoría de los pacientes presentan previamente enfermedad pulmonar crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, sepsis, insuficiencia hepática, enfermedad granulomatosa crónica o cirugías recientes (54, 55).

La mayor incidencia de aspergilosis se produce en pacientes con enfermedades hematológicas. Habitualmente es considerado de alto riesgo lo siguiente: neutropenias profundas (neutrófilos $< 100/\text{mm}^3$) y prolongadas (> 14 días) o la existencia de un déficit importante de la inmunidad celular a consecuencia de la quimioterapia, radioterapia, infección por citomegalovirus, enfermedad del injerto contra el huésped o el tratamiento con corticoides, anti-TNF o alemtuzumab (56, 57).

También se han reportado otomicosis producidas por el *Aspergillus niger* (figura 22), que afecta el epitelio escamoso del conducto auditivo externo, causando prurito, descamación, en ocasiones dolor y a menudo hipoacusia por oclusión (tapón de hifas, cerumen y restos epiteliales). En la mayoría de los casos, la membrana del tímpano es respetada y raramente se perfora (58).



Figura 22. Otomicosis causada por *Aspergillus niger* (59).

En animales como gatos y caballos se ha observado aspergilosis en los ojos (60, 61) y las aves la padecen en la tráquea y las vías respiratorias (figura 23), generando riesgo de zoonosis (62).



Figura 23. Aspergilosis en mamíferos y aves: (A) en el ojo de un gato; (B) en el ojo de un caballo; (C) en la tráquea de un cisne (62).

1.3.2.1 Factores de virulencia para la infección de *Aspergillus spp.*

Existen micotoxinas que actúan como factores de virulencia del *Aspergillus spp.*, (figura 24) pues suprimen la inmunidad del huésped y potencian la infectividad del hongo (63). Entre estas micotoxinas se encuentran las aflatoxinas, gliotoxina y ocratoxina A. La gliotoxina ha atraído el mayor interés de los especialistas debido a sus potentes propiedades inmunosupresoras y citocidas (causa apoptosis en ciertos tipos de células del sistema inmune, incluyendo neutrófilos, eosinófilos, granulocitos, macrófagos y timocitos) (64).

Además, puede reducir la función mucociliar, dañando la células epiteliales respiratorias humanas y facilitando así la infección de *Aspergillus spp.* en los pulmones (65). La gliotoxina reduce la adherencia y la fagocitosis de elementos fúngicos, mientras que la aflatoxina afecta la fagocitosis, la muerte intracelular y la producción espontánea de superóxido, facilitando la supervivencia del hongo (66).

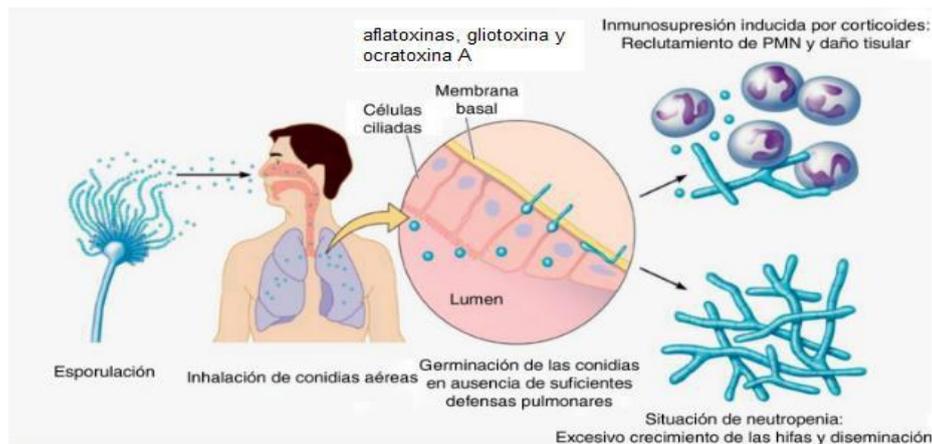


Figura 24. Patogénesis y virulencia de infecciones causadas por *Aspergillus spp.* (66).

1.3.2.2 Diagnóstico clínico de la Aspergilosis

Dentro de las aspergilosis tópicas en humanos se encuentran la aspergilosis en oído causando otomicosis, en piel (pacientes quemados) y en fosas nasales. Considerando que el oído medio e interno son estériles, y que el externo suele contener flora comensal cutánea, es fundamental realizar, previamente a la toma de muestras, una limpieza de la parte externa con un algodón humedecido. La recogida del material ótico se efectúa bajo visión directa con microscopio, extrayendo el contenido con una cucharilla o con una torunda de algodón humedecida, procurando arrastrar convenientemente. El transporte de la muestra al laboratorio debe hacerse con rapidez para evitar el sobre crecimiento de la flora saprofita acompañante y el deterioro de la patógena (67).

- ✓ **Examen directo en fresco:** si hay exudados se debe hacer examen directo, frotis y cultivo. El examen directo aclarado con KOH al 15% o teñido con un colorante simple, en ocasiones permite visualizar las hifas hialinas y septadas y las cabezas aspergilaes (figura 25).

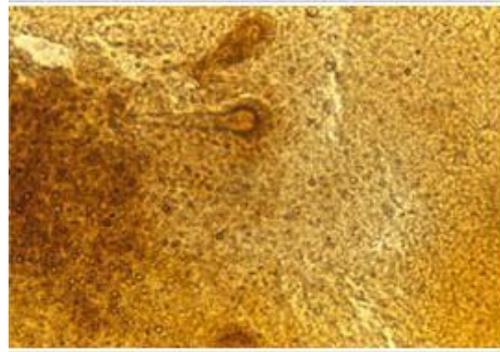


Figura 25. Examen directo de exudado de senos nasales de un paciente con sinusitis donde se observa restos celulares y cabezas aspergilaes. Imagen tomada de Dr. LJ Méndez Tovar (68).

- ✓ **Tinción de Gram:** en el frotis teñido con Gram, observamos los filamentos septados de aproximadamente 5 a 7 μm de diámetro, ramificados en ángulo de 45° (figura 26). Las estructuras micóticas, generalmente se tiñen de manera irregular (67).

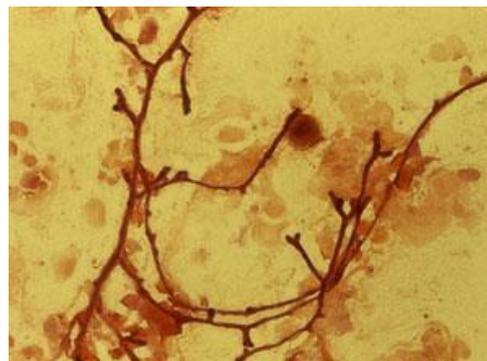


Figura 26. Frotis de muestra ótica teñido con Gram. Se observan filamentos septados y las ramificaciones en ángulos cercanos a 45° que sugieren infección por *Aspergillus spp.* Imagen tomada de Dr. LJ Méndez Tovar (68).

- ✓ **Cultivo en agar dextrosa Sabouraud con y sin cicloheximida** (figura 27). Aunque los especímenes deben sembrarse en medio de agar dextrosa Sabouraud (ADS) simple y ADS con antibióticos, este género de hongos es sensible a la cicloheximida, por lo que sólo se desarrolla sobre ADS simple (67).

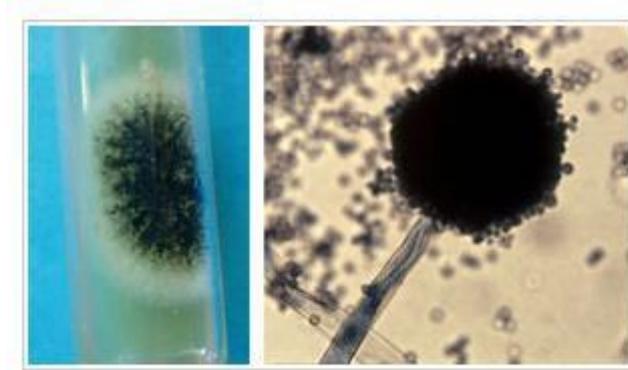


Figura 27. *Asperillus niger* sugiere color negro por el aspecto macroscópico de las colonias, las hifas son incoloras (hialinas). Imagen tomada de Dr. LJ Méndez Tovar (68).

- ✓ **Diagnóstico inmunológico:** existe un antígeno que se detecta por ELISA y que en los últimos años ha despertado gran interés y este es la 1-3 glucana. En un estudio demostró su utilidad en 37 de 41 casos con Aspergilosis comprobada. Actualmente se utiliza la prueba de aglutinación de látex sensibilizado, que de acuerdo a diversos grupos de investigadores tiene una sensibilidad de 68% (67).

1.4 ANTIFÚNGICOS

El concepto de agente antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, afectando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien sea directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped.

La era de los antifúngicos inicia en el siglo XX, a mediados de la década de los 50, con el descubrimiento de la anfotericina B, y 20 años más tarde comienza el uso de otras sustancias químicas como la flucitosina. Desde entonces no ha cesado el diseño de nuevas moléculas para combatir las infecciones fúngicas invasoras (figura 28), que han aumentado sustancialmente en las últimas dos décadas en relación con la aparición de la epidemia del sida, uso de quimioterapia intensiva en pacientes oncohematológicos, empleo de fármacos antirechazo en pacientes receptores de trasplante y la mayor utilización de dispositivos intravasculares (69).

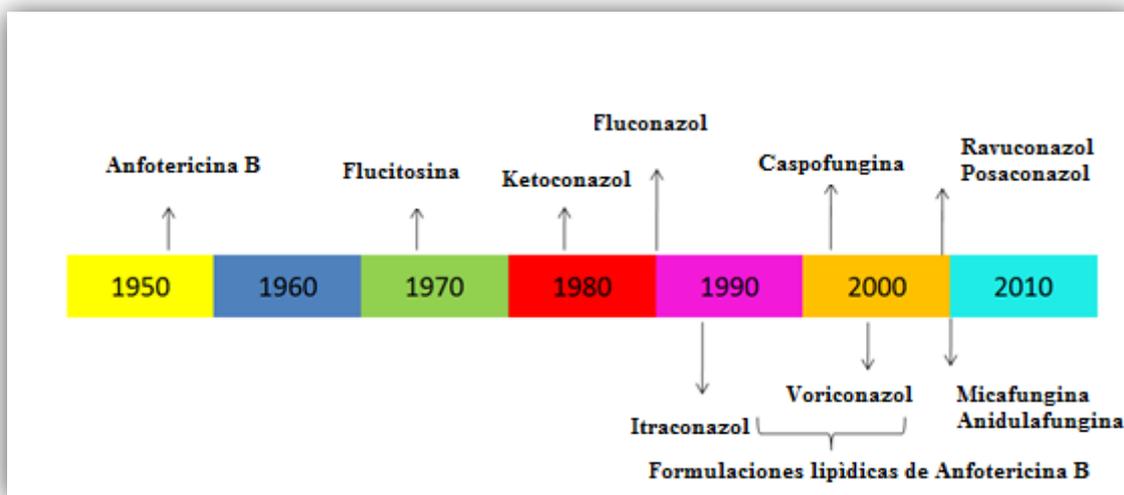


Figura 28. La era de los antifúngicos.

1.4.1 Clasificación de los antifúngicos

Los antifúngicos pueden clasificarse de acuerdo con su estructura química (tabla 2) o su lugar de acción en (tabla 3) (70).

Tabla 2. Clasificación de los antifúngicos de acuerdo con su estructura química.

Polienos	Nistatina, natamicina y anfotericina B
Azoles	Imidazol: miconazol y clotrimazol. Triazoles: fluconazol, itraconazol y ketoconazol. Triazoles de segunda generación: voriconazol, ravuconazol y posaconazol.
Alilaminas	Terbinafina, naftifina.
Lipopéptidos	Papulacandinas. Triterpenosglicosilados. Equinocandinas: caspofungina, anidulofungina y micafungina.
Pirimidinas fluoradas	Flucitosina.
Otros	Yoduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato y griseofulvina.

Tabla 3. Clasificación de los antifúngicos de acuerdo con su lugar de acción.

Antifúngicos que interactúan en pared celular	Lipopéptidos
Antifúngicos que interactúan en membrana celular	Polienos, azoles y alilaminas
Antifúngicos que interactúan en núcleo	Pirimidinas fluoradas

A continuación se detalla la clasificación de los antifúngicos de acuerdo con su estructura.

1.4.1.1 Azoles

Los azoles forman una familia heterogénea de fármacos, entre ellos el fluconazol (figura 29), que comparten la presencia de un anillo azólico central y con ello el mecanismo de acción antifúngico, que consiste en la inhibición de la síntesis del ergosterol. También presentan características farmacocinéticas diferenciadas, con una absorción oral completa de voriconazol y menor de fluconazol, que aumenta con alimentos en el caso de posaconazol e itraconazol. Todos presentan una distribución tisular elevada que se manifiesta en concentraciones plasmáticas muy reducidas, especialmente en el caso del posaconazol e itraconazol, que se metabolizan principalmente en el hígado con la intervención de diversas isoenzimas del citocromo P 450 (CYP450), a las que son capaces de inhibir, lo que condiciona una farmacocinética no lineal y un elevado riesgo de interacciones con otros fármacos (71).

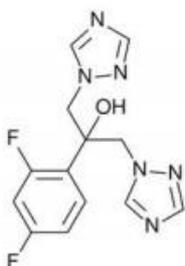


Figura 29. Estructura química del fluconazol (71).

1.4.1.2 Alilaminas

Las alilaminas, entre ellos la terbinafina (figura 30), inhiben la enzima escualenoepoxidasa y disminuyen la concentración de ergosterol, aumentando los niveles de escualeno. Como consecuencia, aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática, se altera la organización celular y disminuye el crecimiento del hongo. La ventaja principal de este grupo de fármacos es su alto margen de seguridad en el hombre, porque no tiene ningún efecto inhibitorio sobre el sistema del CYP450; debido a esto, comparado con los derivados

azólicos, presenta un menor potencial de interacción con otras drogas. Los efectos adversos son leves o moderados, transitorios, y se manifiestan a nivel gastrointestinal o cutáneo (72).

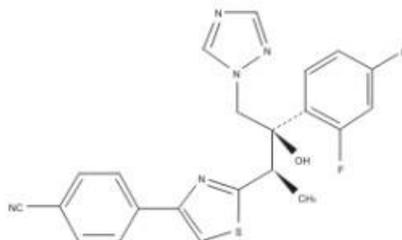


Figura 30. Estructura química de la terbinafina (Alilamina clásica en el tratamiento oral de la onicomiosis) (72).

1.4.1.3 Lipopéptidos

Los lipopéptidos como la caspofungina (figura 31) actúan inhibiendo la síntesis de glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-beta-glucano sintetasa, responsable de formar este polímero de la glucosa que es esencial para la estructura de la pared de la célula fúngica. La pared se debilita y se torna incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que la célula muere. Uno de los fármacos más utilizados a nivel clínico es la caspofungina, ya que su incidencia general de efectos adversos es de 13,8%, entre los cuales se enumeran la irritación local en el sitio de infusión (16%), fiebre, cefalea, flebitis, rash y elevación transitoria de enzimas hepáticas (10%) (73).

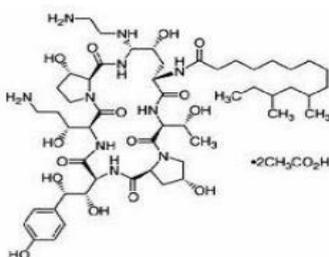


Figura 31. Estructura química de la caspofungina (73).

1.4.1.4 Pirimidinas fluoradas

Las pirimidinas fluoradas actúan como antimetabolitos. La más conocida de este grupo es la flucitosina o 5-fluorocitosina (figura 32), que inhibe el crecimiento y reproducción de los hongos. Este fármaco se convierte en 5-fluorouracilo (5-FU), el cual es fosforilado e incorporado al ARN, convirtiéndose en un desoxinucleótido. Inhibe la timidilatosintetasa e impide la síntesis de proteínas de la célula. Las reacciones adversas más graves son la leucopenia y trombocitopenia reversibles, toxicidad hepática, eosinofilia y exantema (74).

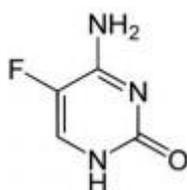


Figura 32. Estructura química de la flucitosina (73).

1.4.1.5 Inhibidores de la mitosis celular fúngica: griseofulvina

La griseofulvina (figura 33) fue autorizada para el uso humano en 1958. Detiene el crecimiento de la célula en la fase de mitosis y es utilizado comúnmente para el tratamiento de las dermatofitosis. En más del 50% de los pacientes al inicio del tratamiento se producen cefaleas; también ocurren molestias gastrointestinales, síntomas neurológicos, reacciones de hipersensibilidad (urticaria, eritema multiforme, enfermedad del suero y necrólisis epidérmica tóxica) y reacciones de fotosensibilidad. Debido a estos efectos adversos, se prefiere el uso de otros agentes antifúngicos como la terbinafina (75).

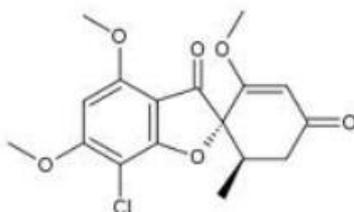


Figura 33. Estructura química de la griseofulvina (75).

1.4.1.6 Polienos

La nistatina y la anfotericina B (AmB) son los polienos más utilizados. La nistatina (figura 34) fue el primer antifúngico polieno tópico específico, sin embargo, actualmente tiene poca utilidad en el tratamiento de las candidiasis cutáneas, aunque se sigue usando en las candidiasis oral, esofágica, gastrointestinal y vulvovaginal (76).

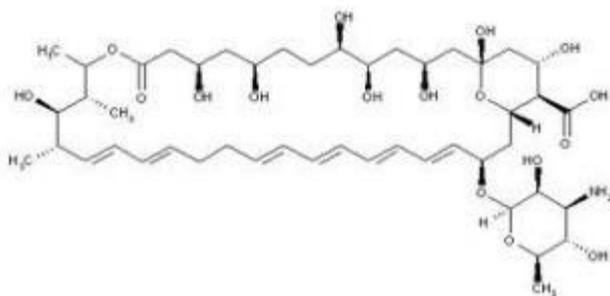


Figura 34. Estructura química de la nistatina (76).

La AmB fue descubierta en 1955 por W. Goldet. Se trata de un antimicrobiano aislado del *Streptomyces nodosus*, obtenido de la vegetación del río Orinoco en Tembladora (Venezuela). La síntesis química de la molécula completa fue descrita por Nicolaou en 1987 (52). Dado que en la presente Tesis se ha seleccionado la AmB como fármaco para llevar a cabo los estudios experimentales, se dedica el siguiente apartado a la descripción y propiedades de dicho principio activo.

1.4.2 Anfotericina B

La AmB es una molécula anfotérica, de ahí su nombre, ya que puede comportarse como ácido o como base con dependencia del pH, y presenta un peso molecular de 924,08 g/mol (77).

1.4.2.1 Estructura química

Desde el punto de vista estructural (figura 35), la AmB se caracteriza por tener un anillo macrocíclico con un grupo lactónico interno y un grupo cromóforo constituido por siete dobles enlaces conjugados. Además, es una molécula anfifílica que presenta dos caras: una lipofílica (hidrófoba) constituida por una cadena heptaénica que alarga la estructura del anillo macrocíclico y da rigidez a la molécula, y otra cara hidrofílica (polar) compuesta por siete grupos hidroxilos y un grupo éster. En el anillo macrocíclico presenta un ácido carboxílico y una cadena lateral de micosamina con un grupo amino primario; ambos grupos juegan un papel clave en la actividad biológica que tiene la AmB (78).

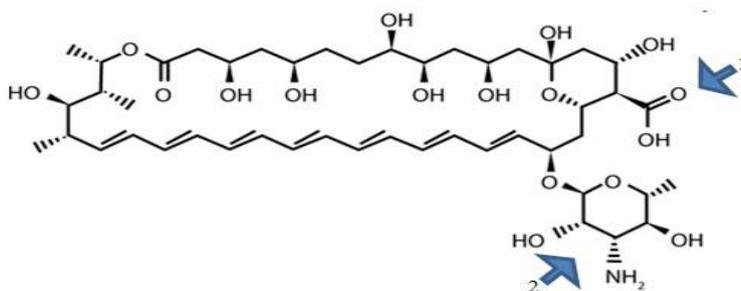


Figura 35. Estructura química de la AmB: (1) grupos carboxilos; (2) grupos aminos (78).

1.4.2.2 Solubilidad

La AmB se presenta como un polvo amarillo o anaranjado, higroscópico, muy poco soluble en solventes acuosos y en la mayoría de los disolventes orgánicos

En la tabla 4 se describe la solubilidad de la AmB en diferentes solventes (79).

Debido a su poca solubilidad, la AmB es de difícil incorporación en matrices farmacéuticas, para mejorar esto se pueden usar sustancias auxiliares del tipo surfactantes como lauril sulfato de sodio o desoxicolato (80).

1.4.2.3 Estados de agregación de la AmB

El estado de agregación de la AmB es un parámetro complejo ya que no condiciona solo la toxicidad sino también la actividad y la farmacocinética del fármaco, siendo difícil de controlar debido a que en la solución existe un complejo equilibrio entre las diferentes especies, fenómeno que puede alterarse cuando la formulación se diluye (79).

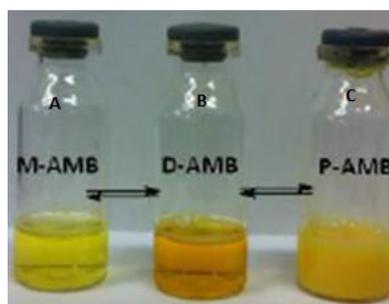


Figura 36. Estados de agregación de la AmB: (A). estado monomérico; (B) estado dimérico; (C) estado poliagregado (79).

Tabla 4. Solubilidad de la AmB en diversos solventes orgánicos e inorgánicos.

Solvente	Solubilidad de la AmB (mg/mL)
Dimetilsulfóxido	30 – 40
Etilenglicol	2,6
Dimetilformamida	2-4
Metanol	2
Acido acético	1-2
Propilenglicol	1-2
Etanol	0,5
Acetona	0,35
Alcohol isopropílico	0,11
Agua alcalina o agua acida	0,1
Cloroformo	0,08
Ciclohexano	0,02
Éter de petróleo	0,01
Agua a pH fisiológico	<0,001

La AmB puede encontrarse en estado monomérico, dimérico y poliagregado (figura 36), siendo este último el que presenta menos toxicidad. Cuando se halla en estado monomérico, a medida que la concentración de moléculas de AmB en el medio acuoso se incrementa, empiezan a formarse agregados denominados dímeros u oligómeros, que dan lugar a una dispersión coloidal traslúcida de color amarillo anaranjado. Si se sigue aumentando la concentración de AmB, el grado de agregación de los oligómeros es mayor y se obtienen suspensiones opacas amarillentas (79).

1.4.2.4 Mecanismo de acción

Podríamos dividir el mecanismo de acción de la AmB frente a los hongos en dos: uno que actúa en la membrana de la pared celular del hongo y otro que provoca estrés oxidativo.

En el primer mecanismo (figura 37), la AmB se une a los esteroides de la membrana citoplasmática de las células fúngicas, produciendo una alteración de la permeabilidad, generando poros y una pérdida de protones, cationes y metabolitos que son esenciales para la vida del hongo, por lo que esto puede conducir a su muerte celular. Esta alteración en la permeabilidad que produce la anfotericina B en las membranas se ha utilizado para introducir otros agentes en las células fúngicas, como el 5-fluorouracilo. Así, el uso de AmB puede producir efectos reversibles a bajas concentraciones y efectos letales a altas concentraciones (81). Recientemente, se ha propuesto que la AmB puede llevar a cabo su acción por medio de dos vías diferentes: (1) uniéndose a los esteroides, dando lugar a la formación de un poro (incrementando la permeabilidad de la membrana celular a cationes intracelulares), y (2) "secuestrando" a los esteroides, alterando la estabilidad de la membrana celular (82). Una vez que la AmB entra en contacto con las células, el primer tipo de poros que se formaría serían los no acuosos, que se caracterizan por ser permeables a los cationes monovalentes,

pero poco permeables a los aniones monovalentes. A continuación se formarían los poros acuosos, caracterizados por ser permeables tanto a cationes como a aniones monovalentes y también a otras moléculas de mayor tamaño, como la glucosa (83).

Respecto al segundo mecanismo de acción (figura 38), se ha demostrado que la AmB produce un daño oxidativo en las células fúngicas, mediante una cascada de reacciones oxidativas, y que los metabolitos oxidados actúan como factores de estimulación de los macrófagos que contribuyen a la acción antifúngica. Asimismo, se ha puesto de manifiesto que la AmB es capaz de actuar no sólo a nivel de la expresión de los genes implicados en la síntesis del ergosterol, sino que también es capaz de inducir la expresión de genes relacionados con el estrés celular, pudiendo provocar autooxidación (84).

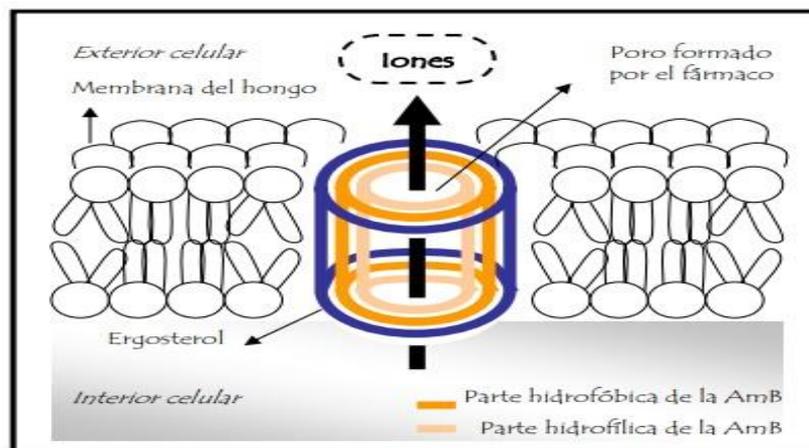


Figura 37. Mecanismo de acción de los antifúngicos poliénicos. La unión al ergosterol daña la membrana. Se produce liberación de iones y daño irreversible del hongo. Fuente: Adaptado de (84).

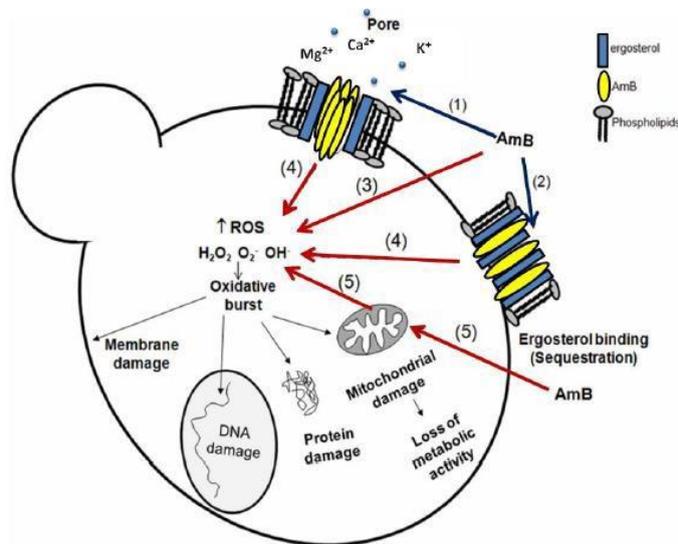


Figura 38. Mecanismo de acción de la AmB, estrés oxidativo. Fuente: adaptado de (84).

1.4.2.5 Farmacocinética de la AmB

La absorción de la AmB por la vía oral es mínima (5%), por lo que la vía de administración de elección para el tratamiento de infecciones causadas por micosis sistémicas es la vía intravenosa (IV). Este fármaco se une ampliamente a proteínas plasmáticas (90-95%). Su volumen de distribución (Vd) es elevado, aproximadamente de 4L/kg.

La AmB alcanza altas concentraciones en hígado, bazo, pulmón y riñones. En líquido pleural, peritoneal, sinovial y humor acuoso las concentraciones que alcanza son del 50-60% de la concentración plasmática mínima. Penetra mal en líquido cefalorraquídeo (LCR) (2-4%), aumentando en casos de inflamación meníngea. Atraviesa bien la placenta. No se dispone de ensayos clínicos que determinen la eliminación por leche humana ni la seguridad en la utilización en embarazadas. Es metabolizada parcialmente en el hígado y eliminada por bilis (a través de las heces fecales). Entre el 2 y 5% se elimina por la vía renal de forma muy lenta. La semivida de eliminación en un adulto con la función renal normal es de 24 horas, pero después de un tratamiento crónico la semivida de eliminación puede alargarse hasta los 15 días (85).

1.4.2.6 Toxicidad de la AmB

La toxicidad de la AmB se debe principalmente a la interacción de esta molécula con el colesterol presente en las membranas biológicas de las células de los mamíferos, en vez de con el ergosterol de las células fúngicas. Es aquí donde la importancia de los estados de agregación de la AmB toma relevancia. Probablemente la AmB en estado monomérico presenta mayor selectividad por el ergosterol, sin embargo, cuando comienzan a formarse los dímeros se produce, además, la interacción con el colesterol de las membranas biológicas de las células de los mamíferos, que igualmente provoca la formación de poros o canales y genera graves problemas de toxicidad (86).

Se ha demostrado que la AmB en estado dimérico es más hemolítica (más tóxica) que la AmB monomérica. No obstante, cabe destacar que a pesar de que la AmB dimérica presenta una toxicidad hemolítica importante, las formulaciones que contienen dicho fármaco en estado poliagregado (mayor tamaño de partícula) resultaron ser menos tóxicas, confirmando que, a mayor tamaño de la partícula de los agregados de AmB, menor será su toxicidad hemolítica (87). También se ha demostrado que los estados de agregación de la AmB influyen en la distribución del fármaco en el organismo, hecho que está altamente relacionado con su actividad y toxicidad. Cuando los sistemas de partículas se inyectan por vía intravenosa pueden ser reconocidos como agentes extraños, siendo opsonizados, reconocidos por el sistema fagocítico mononuclear y posteriormente retirados de la circulación plasmática, pasando a ser acumulados en los tejidos y, por ende, aumentando su toxicidad (88).

Al considerar todos estos descubrimientos se puede afirmar que la AmB en estado poliagregado sería más fácilmente opsonizada y, por tanto, más fácilmente vectorizada hasta órganos diana, hecho clave para el tratamiento de

ciertas patologías (89, 90). Es por ello que la vectorización de AmB en micropartículas, nanopartículas, liposomas, etc., podría disminuir la toxicidad del poliagregado y con ello se pueden emplear dosis terapéuticas más altas y seguras con mayor eficacia (91).

1.4.2.7 Efectos adversos de la AmB

Entre sus efectos adversos frecuentes se encuentran: náuseas, vómitos, diarrea, dolor epigástrico, fiebre en más del 50% de pacientes tratados, escalofríos, cefalea, dolor muscular y articular, malestar general, trastornos en la función renal y tromboflebitis en el sitio de la inyección.

Como efectos adversos ocasionales se encuentran: hipertensión, hipotensión, arritmias cardíacas, paro cardíaco, erupciones cutáneas, reacciones anafilácticas, visión borrosa, tinnitus, pérdida de la audición, vértigo, neuropatía periférica, convulsiones, depresión, incoherencia verbal, delirio, sangramiento digestivo y trastornos hepáticos.

Entre los efectos adversos raros se encuentran: trombocitopenia, leucopenia, agranulocitosis, eosinofilia y trastornos de la coagulación (92).

1.4.2.8 Mecanismos de resistencia de la AmB

La resistencia a polienos (AmB) se ha descrito en levaduras (*Candida spp.*) y hongos filamentosos (*Aspergillus spp.*).

En levaduras, la mutación de la enzima C-5-6 esterol desaturasa (producto de la transcripción del gen ERG3 y ERG11), implicada en la síntesis del ergosterol, confiere resistencia moderada a la AmB. Estos genes también están vinculados a la resistencia cruzada a la AmB y a los azoles (93).

En el caso de la tolerancia al estrés oxidativo, la exposición a concentraciones subinhibitorias de fluconazol puede inducir en las levaduras una respuesta que

las hace más resistentes al estrés oxidativo (causado por ROS) y al estrés nitrosativo (causado por NO), generando mayor tolerancia al estrés oxidativo causado por la AmB (94).

En *Aspergillus spp.*, la situación es más complicada ya que, a pesar de detectarse numerosos fallos terapéuticos, no existe ninguna metodología que sea capaz de relacionarlos con la resistencia fenotípica a la AmB mediante la detección de concentraciones inhibitorias mínimas (4) elevadas (95).

En general, se ha postulado que el escaso número de cepas con resistencia a los polienos está relacionado con dos factores: a) la toxicidad de estos fármacos, que obliga a utilizarlos en tratamientos cortos, y b) la asociación de la resistencia con la deficiencia de ergosterol, lo que supondría una desventaja evolutiva y, por tanto, le daría menos posibilidades de ser seleccionado en vivo (96).

1.4.2.9 Medicamentos comercializados con AmB

Se resume en la tabla 5 los medicamentos que contienen AmB.

Tabla 5. Medicamentos comercializados de AmB administrados por la vía intravenosa.

Formulación	Tamaño (μm)	Estructura	Dosis (mg/kg)
Fungizone®	0,035	Micelas	1,5 mg/kg
Abelcet®	1,6-11	En forma de cinta	2,5 mg/kg
Amphocil®	0,11-0,14	En forma de disco	1,5 mg/kg
Ambisome®	0,06-0,08	Liposomas unilaminares	3-5 mg/Kg

1.4.2.10 Tratamiento tópico con AmB

Una de las grandes ventajas de la administración cutánea de la AmB para el tratamiento de micosis superficiales es su acción localizada y aplicación directa en el sitio de la infección, reduciendo los efectos adversos sistémicos, pues la

cantidad de AmB en plasma ha sido prácticamente indetectable (97, 98). Sin embargo, su efectividad dependerá de la capacidad de impregnarse y distribuirse a través de la piel.

Actualmente la única formulación tópica de AmB comercializada es Fungizome 0,1% gel, disponible solamente en la India (99). Asimismo, se han estudiado muchas estrategias de formulación, siendo los materiales nanoestructurados una herramienta valiosa para el tratamiento de infecciones fúngicas (100). Se ha informado de sistemas de administración de AmB en forma de nanopartículas (101), microtubos (102), liposomas (103), nanoemulsiones (98, 104) y nanogeles (105). Esta tesis se centra en estos dos últimos nanosistemas.

1.5 LEISHMANIOSIS

1.5.1 Agente etiológico

La leishmaniasis, constituye un conjunto de enfermedades causadas por un protozoo flagelado perteneciente a diferentes especies del género *Leishmania*. Es un parásito, intracelular obligado del humano y otros mamíferos, que produce lesiones a niveles cutáneo, mucocutáneo y visceral.

La enfermedad fue descrita en 1903 por Leishman y Donovan en la India. Se trata de una patología infecciosa que se transmite a los humanos por la picadura de flebótomos hembra infectados. En América, la *Leishmania* es un protozoo parásito perteneciente a la familia Trypanosomatidae, orden Kinetoplastida que se clasifica taxonómicamente tal como se indica a continuación.

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora

Clase	Zoomastigophorea
Orden	Kinetoplastida
Suborden	Trypanosomatina
Familia	Trypanosomatidae
Género	Leishmania

El género *Leishmania* incluye más de dos docenas de especies, la mayoría de las cuales parasita al ser humano. De todas ellas, *L. donovani* (*L. archibaldi* en el este de África) y *L. infantum* (*L. chagasi* en el Nuevo Mundo), tienen un tropismo preferentemente visceral y el resto preferencia cutánea o mucocutánea. No obstante, algunas de estas especies víscerotrópicas pueden dar lugar a una afectación exclusivamente cutánea, como es el caso de *L. infantum*, agente que causa la leishmaniosis cutánea en España y en el resto de la cuenca mediterránea occidental y *L. chagasi*, molecularmente idéntica a *L. infantum*, también responsable de formas cutáneas en el Nuevo Mundo. Igualmente se han descrito casos de afectación visceral por *L. tropica* en zonas endémicas y en veteranos de la guerra del Golfo (106).

1.5.2 Morfología de la *Leishmania*

Las leishmanias son parásitos digénicos, que se presentan bajo una forma intracelular, **amastigote**, que se multiplica dentro de células del sistema mononuclear fagocítico del mamífero huésped y una forma flagelada, **promastigote**, en el interior del intestino del vector y en los medios de cultivo (figura 39).

Los amastigotes se presentan como cuerpos redondeados u ovalados (cuerpos de Leishman-Donovan) de 2-6 μm de diámetro, en los que se identifican un núcleo, un kinetoplasto puntiforme y un flagelo interno, éste último sólo visible al microscopio electrónico. Los promastigotes son alargados, de alrededor de 20 μm

por 2-3 μm de diámetro, con un núcleo central, un flagelo externo, anterior, rodeado de membrana plasmática, de longitud similar al cuerpo del parásito y un kinetoplasto, ubicado en el extremo anterior, en la proximidad del origen del flagelo (106-108).

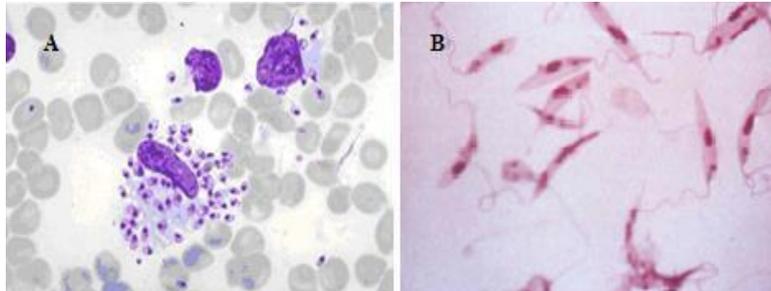


Figura 39. Morfología de la Leishmania : (A) forma amastigote; (B) forma promastigote (109).

1.5.3 Ciclo biológico de Leishmania

El ciclo de vida de *Leishmania* incluye fases residentes en insectos vectores, los flebótomos, y en el hospedador vertebrado. El ciclo comienza cuando una hembra de flebótomo infectada chupa sangre de una persona o de un animal e inyecta la etapa promastigote del parásito bajo la piel. Los promastigotes son entonces envueltos por macrófagos (células blancas especializadas cuya principal función es envolver y digerir). Sin embargo, en el caso de *Leishmania* en vez de ser digeridos, los promastigotes patogénicos se transforman en amastigotes y se multiplican en las células del huésped (inclusive en los macrófagos).

Cuando un flebótomo no infectado chupa sangre de un huésped infectado, ingiere células infectadas con amastigotes. En el insecto, los amastigotes se transforman a promastigotes, se multiplican en el intestino medio, y luego emigran a las piezas bucales, de donde pueden infectar a otro huésped durante la próxima picadura del insecto (figura 40).

La mayoría de las leishmaniosis son zoonóticas (normalmente existen en animales) pero pueden ser transmitidas por ellos a los humanos. También existen formas antroponóticas en las cuales los humanos son los principales huéspedes.

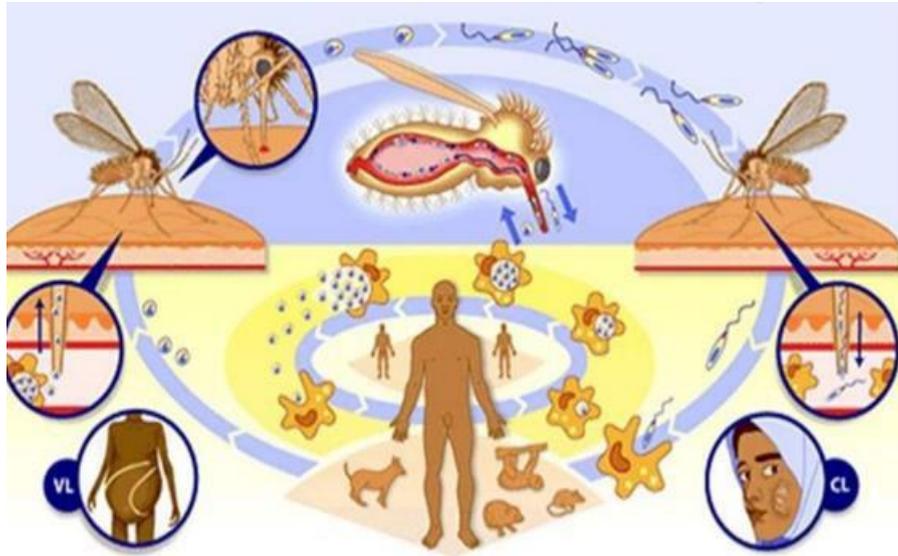


Figura 40. Ciclo biológico de la leishmaniosis adaptado de (110).

1.5.4 Distribución mundial

La leishmaniosis está presente en México, Centroamérica, Suramérica (excepto Uruguay y Chile), el sur de Europa, Asia, el Medio Oriente, y África, especialmente África Oriental y Norte. Cerca de 350 millones de personas viven en sitios que son vulnerables a la enfermedad. Según los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC), aproximadamente 1,5 millones de nuevos casos de leishmaniosis cutánea y 500.000 casos de leishmaniosis visceral ocurren cada año (figura 41).

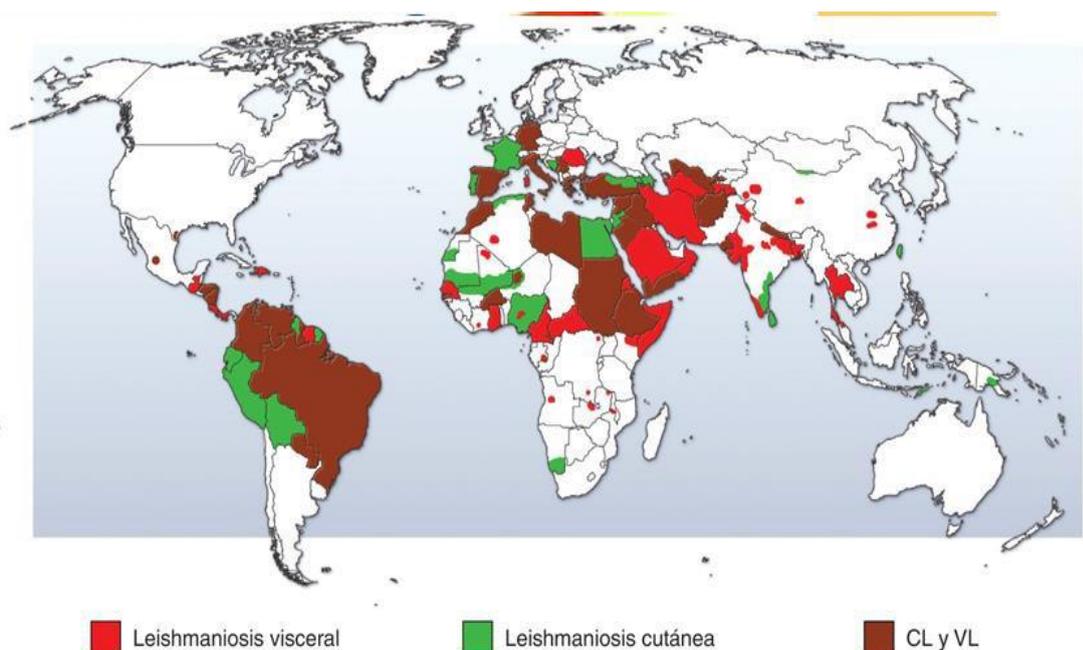


Figura 41. Distribución mundial de la leishmaniosis en sus diferentes formas (111).

1.5.5 Formas clínicas de leishmaniosis

Los síntomas de infección pueden variar ampliamente. La presentación particular de la enfermedad refleja una compleja interacción entre la especie de parásito involucrada, su tropismo y la reacción inmunológica del hospedador.

Existen cuatro formas clínicas de la enfermedad, siendo más recurrentes las leishmaniosis cutánea y visceral (figura 42).



Figura 42. (A) leishmaniosis cutánea (botón de oriente); (B) muco-cutánea, (C) leishmaniosis visceral (112).

- **Leishmaniosis cutánea** (LC - botón del Oriente, úlcera de Bagdad): es la forma más común de la enfermedad. Produce un gran número de lesiones o úlceras en la piel y membranas que sanan por sí solas en unos meses, pero pueden dejar cicatrices desagradables y limitativas. Las especies infectantes en el Viejo Mundo son: *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* y *L. infantum* y en el Nuevo Mundo: *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. peruviana*.
- **Leishmaniosis mucocutánea** (LMC-espundia): enfermedad polimorfa de la piel y de las mucosas causada por varios protozoos pertenecientes a especies del género *Leishmania*; que existen como parásitos intracelulares obligados en los seres humanos y otros huéspedes mamíferos. La enfermedad comienza con una mácula y luego una pápula que crece y se transforma en úlcera indolora y poco activa cuando no hay infección bacteriana. Esta infección puede progresar a la destrucción masiva y desfigurante de los tejidos de la boca, paladar blando y tabique nasal. Las especies infectantes en el Viejo Mundo son: *L. aethiopica* y en el Nuevo Mundo son: *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis*.
- **Leishmaniosis visceral** (LV-*kala-azar*): es la forma de la enfermedad más grave y causa la muerte en casi el 100% de los casos que no reciben tratamiento. Los síntomas incluyen: fiebre episódica, malestar general, pérdida de peso, anemia e inflamación de los órganos internos (bazo e hígado). La progresión de la enfermedad es muy variable. La duración normal es de 12 a 16 semanas, pero casos individuales pueden durar de una a más de 20 semanas. Algunas veces, una forma secundaria de la enfermedad conocida como *leishmaniosis dérmica post-kala-azar* aparece de unos meses a años después de recobro de leishmaniosis visceral. La enfermedad comienza como pequeñas lesiones en la piel de la cara que agrandan gradualmente y se esparcen por todo el cuerpo. Las lesiones pueden llegar a formar desfigurantes estructuras inflamadas que

pueden causar ceguera si llegan a los ojos. Esta condición es diferente a la más leve leishmaniosis cutánea ya descrita, Las especies infectantes en el Viejo Mundo son: *L. donovani* y *L. infantum* y en el Nuevo Mundo: *L. chagasi* (molecularmente idéntica a la *L. infantum*) (112, 113).

1.5.6 La leishmaniosis cutánea: tipos y evolución clínica

En el lugar de la picadura, aparece una pápula eritematosa, inespecífica, similar a cualquier picadura de mosquito, que se resuelve espontáneamente, o, tras un periodo variable, en un promedio entre una semana y tres meses dando lugar a una lesión específica de leishmaniosis cutánea. La duración de la incubación depende de diversos factores, como la especie de *Leishmania* y la cantidad de parásitos inoculados; también parece ser más corta en los visitantes a un área endémica que en los residentes en la misma (114).

1.5.6.1 Leishmaniosis cutánea aguda

Es la forma más habitual y comprende aquellos casos de menos de un año de evolución. La localización preferente es la cara (figura 43) y, en general, áreas descubiertas, por la natural accesibilidad a la picadura (114).



Figura 43. Imagen de leishmaniosis cutánea aguda (114).

Ocasionalmente, la picadura se produce en las mucosas expuestas, nasal (figura 44), labios, lengua, paladar, o laringe por inhalación del mosquito, dando lugar a una lesión que progresa con clínica variable, según la

localización. Puede simular un forúnculo de la ventana nasal, un angioedema de labio o una queilitis granulomatosa, o manifestarse como ronquera apareciendo en la laringoscopia como un pólipo de cuerda vocal, una leucoqueratosis o una masa de aspecto epiteliomatosa(115).



Figura 44. Imagen de leishmaniosis cutánea de inoculación mucosa (115).

1.5.6.2 Leishmaniosis cutánea crónica

Las lesiones suelen ser más polimorfas: grandes placas induradas de borde papuloso, eczematiformes, verrucosas, de aspecto queloideo(figura 45). A la dificultad clínica del diagnóstico se suma una menor sensibilidad del examen microscópico de frotis, de los cultivos y de la histopatología, debido a la escasez de amastigotes en las lesiones. La respuesta al tratamiento es habitualmente peor que en las formas agudas (116, 117).



Figura 45. Imagen de leishmaniosis cutánea crónica (117).

1.5.6.3 Leishmaniosis cutánea difusa o diseminada

Se inicia con una pápula o nódulo que se disemina inicialmente en la vecindad y luego a distancia con la aparición de numerosos nódulos, en cara y resto del cuerpo, de modo similar a la lepra (figura 46). Las lesiones suelen ser asintomáticas y sin tendencia a la ulceración. Esta forma tiene mala respuesta al tratamiento y tiende a recidivar, aunque no hay afectación visceral (118).



Figura 46. Imagen de leishmaniosis cutánea difusa (118).

1.5.6.4 Leishmaniosis dérmica post kala-azar

Esta aparece como secuela en los pacientes de leishmaniosis visceral aparentemente curados, alrededor de un año. El cuadro consiste en la aparición de una erupción constituida por máculas, pápulas, o nódulos, con escasa tendencia a la ulceración, en cara (figura 47), también en tronco y extremidades (118, 119).



Figura 47. Imagen de leishmaniosis dérmica post-kala-azar (119).

1.5.6.5 Vector transmisor de la leishmaniosis

Los flebotomíneos son pequeños insectos responsables de la transmisión de la Leishmaniosis, pertenecen al orden Díptera, familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae, con más de 800 especies agrupadas, hasta hace poco, en dos géneros de importancia médica, *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en América, ambas se describen a continuación.

a) Genero *Lutzomyia*

Estos son insectos hematófagos nocturnos también conocidos como "moscas de la arena" son responsables de la infección en hombres y otros mamíferos como los cánidos, roedores y murciélagos (figura 48) (120). En el Viejo Mundo, los vectores de la leishmaniosis son dípteros nematóceros del género *Phlebotomus*. Sólo las hembras se alimentan de sangre al cabo de unos 2 días de emerger de la pupa, por una picadura indolora y nocturna, mientras que los machos se alimentan del néctar de las flores.



Figura 48. *Lutzomyia longipalpis* responsable de la transmisión de la leishmaniosis en la región de las Américas (120).

b) Género *Phlebotomus*

En el Viejo Mundo, los flebótomos son los responsables primarios de la transmisión de la leishmaniosis y son habitantes de las regiones mediterráneas y tropicales (figura 49). Sólo las hembras se alimentan de sangre por una picadura indolora y nocturna, mientras que los machos se alimentan del néctar de las plantas. Al picar, el insecto inyecta anticoagulantes para que la sangre siga fluyendo. La picadura deja una pápula enrojecida que puede permanecer asintomática por varias horas, antes del comienzo de la picazón.



Figura 49. *Phlebotomus perniciosus* responsable de la transmisión de la leishmaniosis en la región de Europa (120).

1.5.7 Tratamiento farmacológico

Actualmente existen varias terapias en el tratamiento de la leishmaniosis. Los compuestos más utilizados son los antimoniales pentavalentes considerados los fármacos de primera elección para el tratamiento y control de la leishmaniosis (121).

1.5.7.1 Compuestos antimoniales pentavalentes

Los compuestos derivados del antimonio pentavalente se han utilizado desde los años 40 como los principales agentes terapéuticos de primera línea para el tratamiento de la leishmaniosis. Este grupo está formado por dos compuestos (figura 50), el antimonio de meglumina (AMG) (Glucantime®) y el estibogluconato de sodio (EGS) (Pentostam®) y (122). Los antimoniales inhiben la glucólisis y la oxidación de los ácidos grasos, e inducen la disminución de la biosíntesis energética del amastigote.

El mecanismo antiparasitario no se conoce en profundidad (123, 124).

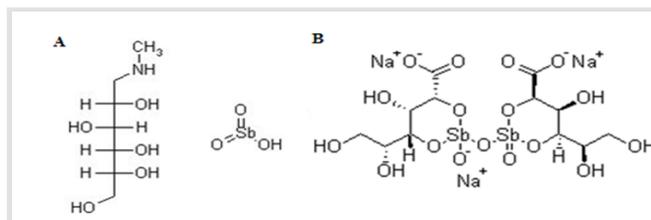


Figura 50. Antimoniales pentavalentes:(A) Antimoniato de meglumina; (B) Estibogluconato de sodio (123).

1.5.7.2 Paramomicina

Es un antibiótico aminoglucósido(figura 51). Actúa sobre el ribosoma bloqueando la síntesis proteica del parásito (125).

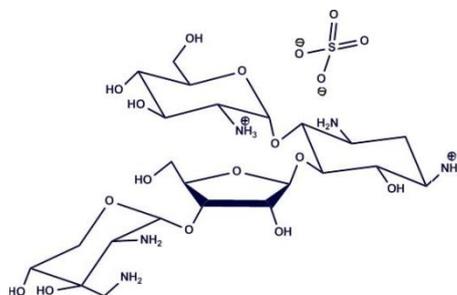


Figura 51. Estructura química de la paramomicina (126).

1.5.7.3 Pentamidina

Es una diamina aromática (figura 52) considerada como terapia de segunda línea. Inhibe la síntesis de proteínas y de fosfolípidos, produciendo un daño irreversible a la mitocondria. Además produce importantes efectos tóxicos (daño en el páncreas, riñón y médula ósea) (127).

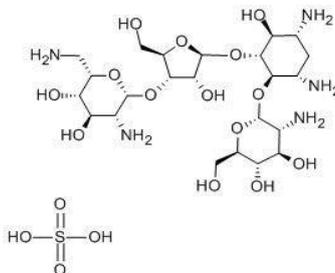


Figura 52. Estructura química de la pentamidina (127).

1.5.7.4 Alopurinol

Es una pirazolopirimidina (figura 53), un análogo estructural de la hipoxantina que compite en la reacción catalizada por la xantina oxidasa evitando la síntesis normal de xantina. Leishmania, así como muchos otros protozoos, no es capaz de sintetizar de nuevo las bases púricas para la formación de los ácidos nucleicos y las tienen que obtener de sus huéspedes. Al incorporar como base púrica la xantina obtenida a partir del alopurinol, se produce una modificación del ARN del parásito que impide la síntesis proteica y, por tanto, bloquea el crecimiento del protozoo (128).

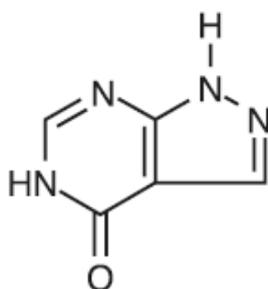


Figura 53. Estructura química del Alopurinol (128)

1.5.7.5 Miltefosina (Milteforan®)

Es un derivado fosfolipídico (figura 54), relacionado estructuralmente con los fosfolípidos que componen la membrana de las células. Originalmente se desarrolló como medicamento antineoplásico, pero se descubrió que poseía actividad antiprotozoaria. Representa el primer agente oral eficaz contra la leishmaniasis que sólo debe administrarse una vez al día. Tiene un mecanismo de acción diferente a los demás, interrumpe las vías de señalización celular y la síntesis de la membrana celular del parásito mediante diferentes mecanismos (129).

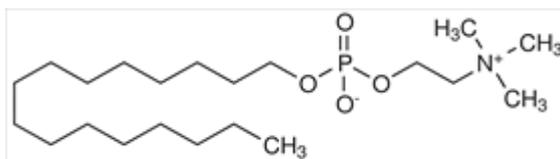


Figura 54. Estructura química de la Miltefosina (129)

1.5.7.6 Azoles

Estos antifúngicos inhiben la síntesis de ergosterol de la membrana del parásito. El ketoconazol (figura 55) presenta toxicidad hepática y se puede administrar por vía oral. Se ha demostrado su eficacia en el tratamiento de la leishmaniosis cutánea (130).

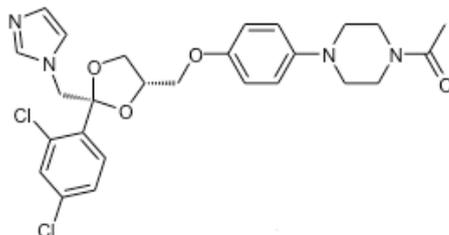


Figura 55. Estructura química del ketoconazol (130).

1.5.7.7 Anfotericina B

En el apartado anterior, relativo al tratamiento farmacológico de micosis cutáneas, se ha descrito los mecanismos de acción de este fármaco. Cabe añadir que la pared celular de los promastigotes y amastigotes, al igual que la de candidas, están compuestas de ergosterol, sitio diana de este fármaco que, tal como se ha indicado, actúa formando poros en la pared celular, provocando también en el parásito la salida de iones y sustancias esenciales, provocando así la muerte celular.

1.5.8 Diagnóstico de la leishmaniosis

Para el diagnóstico de la leishmaniosis cutánea se requiere la obtención de muestras de piel. Se puede realizar mediante raspado o biopsia de la lesión (del borde de la más reciente y activa) o aspirado (inyectar suero salino estéril y obtener 3-5 muestras de lugares distintos).

En países donde los recursos son limitados se llevan a cabo pruebas como el

frotis directo o la prueba de Montenegro (esta última prueba diagnóstica ya no es utilizada en países del primer mundo) explicadas a continuación:

- ✓ **Frotis directo:** El examen directo puede realizarse de dos maneras: haciendo un raspado del borde interno de la úlcera o haciendo una incisión y raspando el borde activo de la lesión. Si existen dos o más lesiones debe escogerse para el examen directo la que tenga un menor tiempo de evolución. Las muestras se fijan con metanol para luego ser coloreados con una solución de Giemsa al 10% o con colorante de Wright. Estas muestras se observan al microscopio de luz con un aumento de 100 X(objetivo de inmersión), para buscar los amastigotes que pueden encontrarse intra o extracelularmente.El examen directo se interpreta como positivo cuando se encuentran uno o más amastigotes (figura 56). Se considera como negativo cuando no se encuentran amastigotes después de haber recorrido un mínimo de 100 campos. Si el primer examen directo es negativo, debe repetirse el procedimiento en la misma forma señalada. Si dos exámenes directos son negativos, y persiste la sospecha clínica de leishmaniasis, debe practicarse biopsia (50).

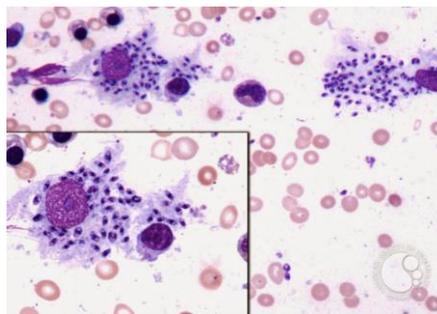


Figura 56. Muestra de amastigotes tomados de una lesión en piel (50).

- ✓ **Prueba de Montenegro:** esta es una prueba inmunológica de hipersensibilidad retardada semejante a la prueba de la tuberculina con alta sensibilidad y especificidad; sin embargo, no permite establecer una diferencia entre infección actual o pasada. Consiste en la aplicación por vía intradérmica de 0,1 mL de un antígeno de Leishmania (leishmanina) en la cara anterior del antebrazo, debiendo efectuarse la lectura a las 48 o 72 horas en la zona de aplicación. Se considera positiva la lectura (figura 57) cuando el diámetro de la inoculación causada por la intradermorreacción es igual o mayor de 5 mm y es una prueba que se utiliza para la confirmación de una leishmaniosis cutánea (50).



Figura 57. Prueba de Montenegro positiva (131).

Otra prueba determinante para el diagnóstico de leishmaniosis es el cultivo de las muestras obtenidas en medio sólidos y/o líquidos detallados a continuación.

- ✓ **Cultivo del agente etiológico en medio sólido:** es determinante para el diagnóstico de la leishmaniasis ya que en ello se puede observar la fase promastigote del parásito. Es un procedimiento más costoso y requiere de tiempo para el diagnóstico. Su mayor utilidad es para el estudio epidemiológico y conocer que especies y subespecies de leishmania están involucradas. A pesar de ello, los medios universalmente aceptados y más frecuentemente utilizados son los medios bifásicos de agar sangre (medio de Novy, Nicolle y McNeal o NNN modificado) y los medios monofásicos o

líquidos (Schneider, RPMI, etc.), habitualmente enriquecidos con glutamina o/y suero fetal bovino desactivado (10-20%). Estos medios son de difícil aplicación y uso en las áreas endémicas de los países pobres, ya que el costo y la necesidad de importación dificultan su aprovechamiento. Un hecho esencial, cuando se utilizan medios enriquecidos con suero bovino fetal, es que debe efectuarse un ensayo previo del lote para comprobar si permite el crecimiento y multiplicación de las leishmanias.

Existen otras técnicas para el diagnóstico de la leishmaniasis las cuales se basan en la detección de anticuerpos específicos contra *Leishmania*. Tienen sensibilidad y especificidad variable según forma clínica. Ofrecen apoyo diagnóstico para las leishmaniasis cutáneas y en caso de la leishmaniasis visceral son pruebas determinantes, entre estas tenemos: Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba ELISA.

- ✓ **Inmunofluorescencia Indirecta:** técnica capaz de detectar la presencia de anticuerpos de *Leishmania*, principalmente de tipo IgG, en el suero del paciente sospechoso (50). También se puede realizar la Inmunofluorescencia directa a partir de las muestras obtenidas de la lesión, no obstante, esta técnica es más útil para el diagnóstico de la Leishmaniasis Visceral (figura 58).

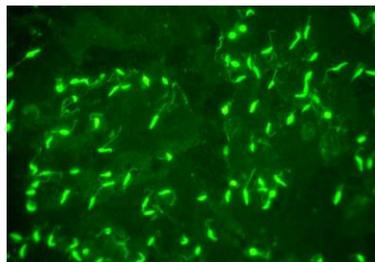


Figura 58. Inmunofluorescencia directa de un suero con anticuerpos específicos (131).

✓

- ✓ **Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA):** técnica que, al igual que la IFI, permite la detección de anticuerpos específicos contra el parásito en el suero del paciente sospechoso (50).

Existen modernas técnicas para la detección de leishmaniosis cutánea y visceral (técnicas de biología molecular), sin embargo, debido a los pocos recursos disponibles en países de América Latina, este tipo de pruebas no suelen ser de rutina.

- ✓ **Técnicas de biología molecular:** La amplificación química del ADN se realiza mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction* o PCR) de las muestras de raspado y de cultivos. Se pueden utilizar sobre diferentes dianas, por ejemplo: genes del ARN ribosómico, ADN del kinetoplasto, genes de ARN derivados del miniexón, genes de la región de la b-tubulina y el gen gp63 responsable de la síntesis de la principal glicoproteína de superficie externa y factor de virulencia del parásito. Los productos de amplificación de ADN se realizan mediante electroforesis (figura 59) en gel, no obstante actualmente una variante muy utilizada: la qPCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real) que monitoriza el proceso de amplificación a tiempo real permitiendo la cuantificación además de la identificación de leishmania a nivel de género y especie según los cebadores o sondas a utilizar (132,134).

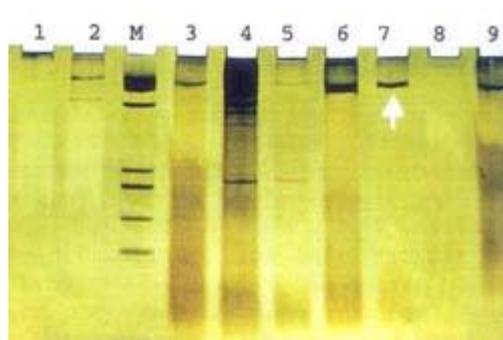


Figura 59. PCR del gen gp63 proveniente de pacientes con lesiones cutáneas (133).

1.6 NANOEMULSIONES

1.6.1 Concepto y tipos

Las nanoemulsiones (NE) también denominadas miniemulsiones, emulsiones ultrafinas, y emulsiones submicroscópicas son dispersiones coloidales de dos líquidos inmiscibles con tamaño de gota del orden de 20-500 nm y estrecha distribución. Comúnmente una NE contiene aceite, agua y tensoactivos (135). Debido al reducido tamaño de gota, las NE se presentan como transparentes o translúcidas y poseen una elevada estabilidad cinética, frente al cremado, sedimentación, floculación y coalescencia (136). Estas propiedades hacen de las NE sistemas muy interesantes en el campo de química, alimentación, farmacia y cosmética.

A pesar de su elevada estabilidad cinética, las NE no se forman espontáneamente, y se las define como termodinámicamente inestables, siendo necesaria la aportación de energía para su formación (137).

Aunque la mayoría de las publicaciones sobre nanoemulsiones las elaboran por métodos de emulsificación de alta energía, en los últimos años existe un interés creciente en el estudio de la formación de nanoemulsiones por condensación o métodos de emulsificación de baja energía (basados en las transiciones de fase que tienen lugar durante el proceso de emulsificación).

- **Métodos de alta energía:** utiliza homogenizadores de alta presión, agitadores de alta velocidad y ultrasonidos entre otros, que rompen las gotas de la emulsión. La emulsificación ultrasónica suele ser muy eficiente, pero solo es apropiado para pequeños lotes (138). La eficiencia del proceso del tiempo de ultrasonidos a diferentes amplitudes y la naturaleza del monómero, cuanto más hidrofóbico mayor será el tiempo requerido (139). La adición de tensoactivo permite disminuir la energía necesaria para la formación de la

nanoemulsión. No obstante, el tensioactivo también puede producir coalescencia de las gotas recién formadas debido a la colisión entre ellas (135). El tamaño de partícula obtenido dependerá del instrumento empleado, así como del tiempo y temperatura utilizado durante la preparación y de los propios componentes de la fórmula (140). Este método de preparación permite tener un mayor control sobre el tamaño de gota y una mayor variedad de ingredientes disponibles (141).

- *Métodos de baja energía:* también son llamados métodos de condensación. Estos aprovechan la energía contenida en el sistema para formar gotas de pequeño tamaño (142). La emulsificación se lleva a cabo cambiando los parámetros que afectan al balance hidro-lipófilico del sistema, como la temperatura y composición, por este motivo la selección de los excipientes a utilizar es un paso crítico (143). Así se pueden distinguir dos procedimientos: a temperatura constante (variando la composición) o bien a composición constante (variando la temperatura). Este último método también es conocido como método de la temperatura de inversión de fases, siendo el método de baja energía más utilizado (137).

Existen NE agua-en-aceite y NE aceite-en-agua. En las NE agua-en-aceite (denominadas W/O por sus iniciales en inglés), la fase dispersa es agua y la fase dispersante es aceite, el contenido de agua es típicamente menor al 25%. En las NE aceite-en-agua (denominadas O/W), el contenido del componente acuoso es generalmente mayor a 31%, pudiendo tener hasta un 80% de agua; en este tipo de emulsión la fase dispersa es un aceite y la fase dispersante es agua (144).

1.6.2 Ventajas de las NE

Las NE presentan múltiples ventajas frente a otros sistemas coloidales, entre ellas (145):

- Facilitan la solubilización y protección de fármacos tanto lipófilos e hidrófilos.
- Aumento de la biodisponibilidad y mejora del perfil farmacocinético.
- Pueden ser administradas bajo diversas formas de dosificación y vías.
- Promueven una rápida y eficiente penetración del fármaco.
- Permiten el enmascaramiento de sabores desagradables.
- Protegen al fármaco de la hidrólisis y oxidación.
- Promueven aumento de la absorción y disminución de la variabilidad en el tracto gastrointestinal.
- Tienen buena aceptación por parte del paciente.
- Requieren comparativamente menos energía para su formación.
- Pueden ser formuladas en una gran variedad de formulaciones, tales como espumas, cremas, líquidos y aerosoles.
- Presentan elevada estabilidad cinética con buena estabilidad a la separación gravitacional, floculación y coalescencia.
- Se pueden esterilizar mediante filtración.
- Pueden ser fabricadas fácilmente a gran escala.

1.6.3 Elección de los componentes de las NE

La elección de los componentes dependerá de dos tipos de variables: las variables de composición y las variables de formulación fisicoquímica:

- Las variables de composición son las proporciones relativas de los constituyentes del sistema: aceite, surfactante y agua.
- Las variables de formulación fisicoquímica incluyen temperatura, presión y naturaleza de los constituyentes.

Tabla 6. Emulgentes/tensoactivos y disolventes utilizados en la producción de nanoemulsiones (147).

Emulgentes/tensoactivos	Tipo de tensoactivo	Disolventes
Polietilen glycol (148)	no iónico	Hexadecano
Aceite de ricino (Cremophor EL®)	no iónico	n-Decano
12- hydroxi estearato depolioxietileno-660-	no iónico	Isohexadecano
Polioxietileno 4-lauril eter	no iónico	Cloroformo
Span® 20	no iónico	n-Hexano
Span® 80	no iónico	Tetradecano
Tween® 20	no iónico	Acetato de etilo
Tween® 80	no iónico	Acetona
Tween® 40	no iónico	MCT
Tween® 60	no iónico	Aceite de girasol
Esteres de ácido grasos de sucrosa	no iónico	Aceite de maiz
Polioxietileno 6-lauril éter	no iónico	Etanol
Monolaurato de decaglicerol (ML750)	no iónico	Acido octanoico
Esteres de ácidos grasos de poliglicerol (PGEs)	no iónico	Aceites ricos en estearina
Alcanol-XC	anionico	Aceite de oliva
Dodecil sulfato de Sodio	anionico	Aceite de soya
Bromuro de Dodecil trimetilamonio	cationico	Aceite de sesamo
		Parafina
		D-limoneno

Se requiere más de una variable para definir cada uno de los constituyentes de la NE, por ejemplo: el tensoactivo está definido por su balance hidrófilo-lipófilo (HLB); en lo que respecta al agua, depende de los tipos y concentración de electrolitos que tenga disueltos; en cuanto al aceite, se ve influenciado por la longitud de la cadena hidrocarbonada, presencia de grupos funcionales e isomería de posición (146). La tabla 6 muestra los excipientes esenciales, más frecuentemente utilizadas en la fabricación de nanoemulsiones.

Para la elaboración de una NE debemos definir cada uno de los componentes de la fase acuosa, oleosa y sistema emulgente-coemulgente.

- **Fase oleosa:** es responsable de la solubilización de fármacos hidrófobos, por lo que se elige el aceite en el cual el fármaco presenta una mayor solubilidad.
- **Fase acuosa:** en esta fase se solubilizarán los fármacos hidrosolubles. El principal ingrediente será el agua en caso de activos no susceptibles.

➤ **Emulgente:** la forma más común de estabilizar las nanoemulsiones se basa en la adsorción del emulgente en la interfase entre las gotitas dispersadas y el medio de dispersión, reduciendo la tensión interfacial. El emulgente utilizado es generalmente un anfifílico, aunque también se emplean proteínas y lípidos. La acción de los tensoactivos hace que posean una muy baja tensión interfacial, facilitando la obtención de tamaños de gota nanométricos que asegura una gran estabilidad y excelente superficie de contacto entre la piel y el vehículo (149). Cabe mencionar que la separación de fases es la forma más común de desestabilización de las emulsiones. Al ser sistemas termodinámicamente inestables, las emulsiones tienden a la separación de fases que es la forma menos energética. En este sentido el tensoactivo seleccionado tendrá una relación directa con la estabilidad del sistema.

Dependiendo de la clase de emulgentes, existen diferentes maneras para lograr dicha estabilidad. Así los tensoactivos iónicos actúan proporcionando una carga eléctrica mientras que los tensoactivos no iónicos crean una barrera estérica a través de grupos moleculares voluminosos dirigidos hacia el medio de dispersión (150).

En general, se utilizan tensoactivos no iónicos (ésteres de glicerol, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos), por su buena tolerabilidad biológica así como por su habilidad para formar nanoemulsiones independientemente del pH y a la concentración de electrolitos en la fórmula (151).

Con el fin de racionalizar el comportamiento de los tensoactivos se debe determinar su balance hidrolipofílico (HLB). Este tiene en cuenta la contribución relativa del fragmento hidrófilo e hidrófobo en la molécula, por lo que los tensoactivos con HLB alto (8-18) se consideran solubles en agua y favorecen la formación de emulsiones de fase externa acuosa; los tensoactivos

de bajo HLB (3-6) se consideran lipófilos y favorecen la formación de emulsiones de fase externa oleosa.

Para seleccionar el tensoactivo específico se pueden seguir dos procedimientos:

- Se seleccionan los tensoactivos y co-tensoactivos en los cuales el fármaco sea más soluble (152).
 - Selección del tensoactivo que mayor solubilidad tenga en la fase oleosa.
- **Cotensoactivos:** son generalmente alcoholes o ésteres alcohólicos de cadena corta que se añaden con el fin de reducir aún más la tensión interfacial, facilitando la emulsificación del sistema. La adición de un cotensoactivo generalmente aumenta la estabilidad del sistema y la solubilidad del compuesto en el mismo (153, 154).

La tabla 7 muestra los emulsionantes/tensoactivos utilizados con mayor frecuencia.

Tabla 7. Componentes de las NE, fase oleosa, acuosa, tensoactivos y cotensoactivos.

Fase oleosa	Aceite de ricino, aceite de oliva, aceite de cacahuete, miristato de isopropilo, Labrafac [®] , Migliol [®] y vaselina líquida.
Fase acuosa	Agua, propilenglicol, Transcutol [®] P y mezcla de agua con alguno de estos componentes.
Tensoactivos	Ésteres de glicerol, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, aminas, sales de amonio cuaternario (Labrasol [®] , Labrafil [®] M 1944 CS, Plurol [®] oleico y Tween [®] 80).
Cotensoactivos	Transcutol [®] P, Plurol [®] oleico y Labrasol [®] .

1.6.4 Elaboración de las NE: Diagrama de fases

Los diagramas de fases permiten determinar la zona de existencia de una NE. Para ello se elabora un diagrama pseudoternario formado por mezclas de fase hidrófila, oleosa y mezcla de tensoactivo/co-tensoactivo a un ratio fijo y a una temperatura y presión atmosférica determinada.

Cada vértice del triángulo representa el 100% de un compuesto, mientras que la arista representa el 0% del mismo (figura 60). Estos puntos se unen y el área resultante comprende la composición que delimita la región de formación de la NE. De todos los triángulos probados, se suele seleccionar aquel que tiene un área de NE mayor, como se observa en la siguiente imagen:

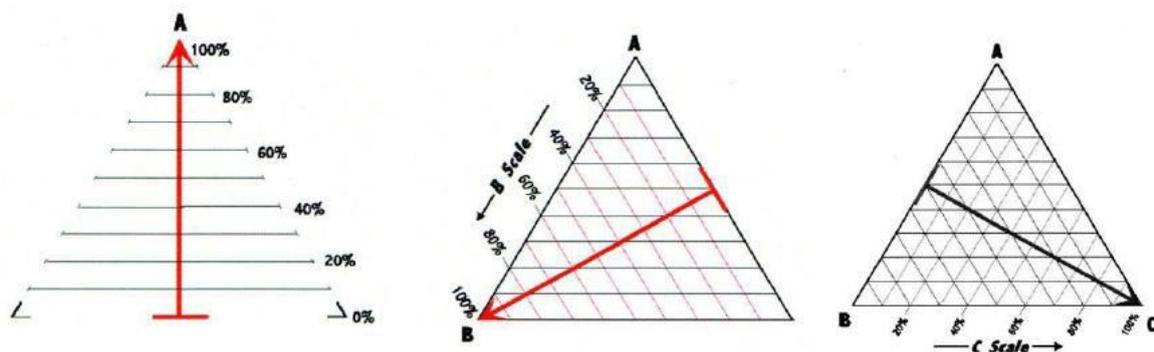


Figura 60. Elaboración de un diagrama de fases ternario (155).

Para determinar la región de formación de nanoemulsión en primer lugar se seleccionan las mezclas que hayan dado lugar a sistemas monofásicos y transparentes para luego determinar el tamaño de gota y el índice de polidispersión. Se sitúan entonces en el triángulo aquellas composiciones que hayan propiciado un tamaño de gota entre 20 y 200 nm y un índice de polidispersión menor a 0,2. Estos puntos se unen y el área resultante comprende las composiciones que delimitan la región de formación de nanoemulsión. De todas las series de formulaciones probadas, se suele seleccionar aquella que tenga un área de nanoemulsión mayor.

1.7 HIDROGELES

1.7.1 Concepto y ventajas

Un gel es una red tridimensional de polímeros reticulados química o físicamente que se hinchan en presencia del agua. Si el disolvente es agua, el gel se denomina hidrogel, si el disolvente es un solvente orgánico, el gel se denomina organogel. Los polímeros formadores de hidrogeles típicamente contienen grupos hidrofílicos tales como: -OH, -COOH, NH₂, -CONH₂, -CONH, -SO₃H(156, 157).

Los hidrogeles pueden ser sensibles a diferentes condiciones ambientales, como temperatura, pH y actividad enzimática (158). El pH es uno de los estímulos más común para la transformación del estado sol a gel, como en el caso de carbómeros. También existen los hidrogeles sensibles a la temperatura (159).

Debido a sus propiedades fisicoquímicas los hidrogeles son considerados sistemas biocompatibles seguros y eficaces para la vehiculización de fármacos (160). Sin embargo, se han limitado al transporte de fármacos hidrofílicos debido a la escasa incorporación y homogeneidad de fármacos hidrofóbicos. Con objeto de obviar esta limitación las investigaciones de las últimas décadas se han centrado en estudiar hidrogeles basados en redes compuestas de pequeñas micelas con un tamaño medio ≤ 200 nm. Esta estructura micelar (núcleo hidrofóbico-corona hidrófila), permite encapsular tanto compuestos hidrofílicos como hidrofóbicos.

Estos sistemas presentan una serie de propiedades óptimas para su aplicación en el campo biomédico tales como:

- Alto contenido en agua o fluidos biológicos que los hace compatibles con la mayoría de los tejidos vivos.
- Naturaleza blanda y elástica que minimiza la irritación de los tejidos.

- Superficie hidrófila que origina una baja tensión interfacial en contacto con los fluidos biológicos, lo que contribuye a una reducción de la adherencia de las proteínas y las células a esta superficie.
- Estructura altamente porosa que puede modularse mediante el control de la densidad de reticulación. Esta porosidad constituye un reservorio con alta capacidad de carga de activos terapéuticos (fármacos, proteínas, etc.) que le permite protegerlos de la degradación ambiental y posteriormente liberarlos por diferentes mecanismos.
- Capacidad de hinchamiento que proporciona alta permeabilidad para fármacos y metabolitos de bajo peso molecular (161).

Los hidrogeles poseen múltiples ventajas como sistemas de liberación modificada de fármacos en biomedicina y como matrices en ingeniería tisular, entre las que se encuentran:

- Mantenimiento de niveles plasmáticos terapéuticos durante más tiempo debido a la liberación prolongada.
- Selectividad terapéutica.
- Protección de las mucosas frente a fármacos irritantes.
- Reducción de la dosis administrada debido a un mayor aprovechamiento del fármaco.
- Disminución de los efectos secundarios.
- Mejora de la adherencia terapéutica de los pacientes.
- Menor coste terapéutico por paciente debido a que se requieren menos unidades de dosificación.
- Reducción de la pérdida de fármaco cuando el metabolismo de primer paso hepático es elevado.
- Capacidad de adhesión celular mediante ligandos unidos a la red.

- Capacidad de transporte de nutrientes a las células y otros productos desde las células.
- Posibilidad de cambio de estado líquido/gel (temperatura ambiente/temperatura fisiológica) lo que permite su administración mediante inyección *in vivo* (hidrogeles termosensibles) (162).

1.7.2 Clasificación

Los hidrogeles se pueden clasificar de diferentes formas dependiendo del criterio aplicado, por ejemplo en base a la naturaleza del gelificante, dimensión del sistema, carga, y la naturaleza de los enlaces cruzados (163), tal como se indica a continuación.

- a) En función del origen del gelificante que forma la red tridimensional, se identifican como naturales, sintéticos o hidrogeles híbridos (compuestos por mezclas de moléculas de origen natural y sintético).
- b) Si se considera la naturaleza química del entrecruzamiento de la red, se puede hablar de hidrogeles químicos, reticulados a través de enlaces covalentes e hidrogeles físicos, formados por interacciones de tipo físico. En algunos casos, los dos tipos de interacciones, físicas y químicas, pueden coexistir en un mismo hidrogel (164).

- ***Hidrogeles con reticulación química***

Como se ha indicado, los hidrogeles químicos se caracterizan por presentar reticulaciones de tipo covalente. Las estrategias utilizadas para producir la reticulación química de hidrogeles han sido variadas, usando en muchos casos reacciones clásicas de polimerización, tales como reacciones entre monómeros con grupos reactivos complementarios. En el caso de hidrogeles diseñados para aplicaciones que implican la polimerización en condiciones fisiológicas, hay que tener en cuenta que el entrecruzado químico de estos materiales se

debe producir sin causar daños a las células o moléculas que se encuentran combinadas con el hidrogel.

- *Hidrogeles con reticulación física*

Los hidrogeles físicos se caracterizan por estar constituidos por estructuras tridimensionales generadas mediante interacciones no covalentes, como por ejemplo, interacciones electrostáticas, hidrófobas o interacciones por enlaces de hidrógeno, siendo esta estructura tridimensional capaz de retener agua. Dentro de los hidrogeles físicos tienen gran importancia en biomedicina aquellos que, en agua, sufren una transición de fase reversible debido a un estímulo externo como por ejemplo un cambio de temperatura, pH, campo eléctrico, concentración iónica, etc.

- c) En el caso de hidrogeles por tipo de carga, los grupos funcionales presentes en las cadenas de los polímeros que conforman a los hidrogeles pueden ser: no iónicos, catiónicos, aniónicos y anfotéricos.
- d) Por otra parte, los hidrogeles pueden utilizarse con dimensiones macroscópicas, desde varias micras a varios centímetros, o en sistemas nanoestructurados, llamados nanogeles, que son dispersiones acuosas con tamaño de gota a nivel nanométrico (10-1000 nm). Poseen las características de los hidrogeles macroscópicos. Los nanogeles también presentan hidrofiliidad, flexibilidad en su fabricación, versatilidad, gran capacidad de absorción de agua y biocompatibilidad (165, 166). El nanogel puede ser utilizado para mejorar la solubilidad, biodisponibilidad, toxicidad y/o estabilidad del fármaco en el interior del organismo vivo, así como para producir su liberación controlada en un lugar específico. También puede actuar como un sistema que mejora y facilita la internalización celular del fármaco. Además, debe estar fabricado a partir de compuestos biodegradables que permitan una

liberación controlada y prolongada en el tiempo a medida que el nanogel se va degradando (167).

1.7.3 Hidrogeles termosensibles

Este tipo de hidrogeles se pueden clasificar en dos tipos:

- ✓ Hidrogeles termosensibles positivos, que por encima de una temperatura se encuentran en el estado sol y su gelificación se produce en el proceso de enfriamiento, cuando se alcanza la denominada Temperatura Crítica de Miscibilidad Superior (UCST, *Upper Critical Solution Temperature*).
- ✓ Hidrogeles termosensibles negativos, que por debajo de una temperatura se encuentran en el estado sol y su gelificación se produce en el proceso de calentamiento, cuando se alcanza la denominada Temperatura Crítica de Miscibilidad Inferior (LCST, *Lower Critical Solution Temperature*). Este fenómeno también se conoce como Gelificación Térmica Inversa (RTG, *Reverse Thermal Gelation*) (168).

Para la preparación de hidrogeles termosensibles se han utilizado materiales poliméricos que contienen en su estructura unidades termosensibles. Se han descrito un gran número de polímeros sintéticos (169).

La mayoría de los polímeros formadores de hidrogel termosensibles son copolímeros de bloques que contienen polietilenglicol (PEG) acoplado a otros bloques poliméricos hidrófobos. Estos copolímeros de bloque se componen de bloques A y bloques B dispuestos como ABA o BAB. Los bloques A, incluyendo PEG, proporcionan biocompatibilidad, baja inmunogenicidad y solubilidad en agua, mientras que los bloques B (Figura 61) incluyendo poli (óxido de propileno) (PPO), poliésteres tales como (poli (D, L-láctido) (10), poli (D, L-lactida-co-glicólido) (PLGA), poli (ϵ - caprolactona) (PCL) y poli [(R) -3-

hidroxibutirato] (PHB), polifosfazenos, e incluso polipéptidos, aportan hidrofobicidad y proporcionan capacidad de carga de fármacos hidrofóbicos así como propiedades de micelización y gelificación (170).

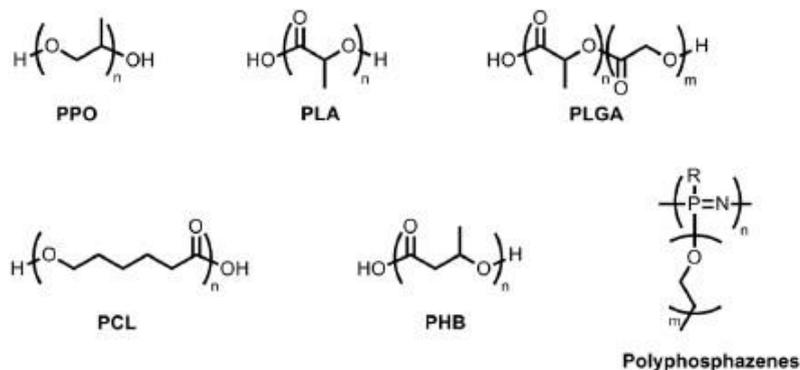


Figura 61. Bloques de polímero hidrofóbico formadores de geles termosensibles en copolímeros tribloque. PPO: poli (óxido de propileno), PLA: (poli (D, L-láctido), PLGA: poli (D, L-láctido-co-glicólido), PCL: poli (ε - caprolactona), PHB: poli [(R) -3-hidroxibutirato] (170).

a) Hidrogeles con bloques hidrofóbicos PLA

Se han sintetizado hidrogeles con grupos acrilados en los extremos de los bloques de PLA (PLA-PEG-PLA) que convirtieron las micelas autoensambladas en nanogeles fotocruzados después de la irradiación ultravioleta (171). Los nanogeles de PLA-PEG-PLA fotoreticulados presentan tamaños micelares de 150 a 250 nm. Ambos poliésteres, PLA y PLGA, utilizados como bloques B hidrofóbicos de copolímeros tribloque, han demostrado que proporcionan una excelente biodegradabilidad, una alta temperatura de gelificación y una liberación prolongada para fármacos hidrofóbicos (172, 173).

b) Hidrogeles con bloques hidrofóbicos de PLGA

Uno de los productos termosensibles más populares es el copolímero tribloque compuesto por PLGA y PEG dispuestos en PLGA-PEG-PLGA, el cual se presenta en estado sol a bajas temperaturas (2-15 °C) y se convierte en gel a la temperatura corporal, 37 °C. A temperaturas inferiores a la temperatura crítica de gelificación

(CGT), los copolímeros PLGA-PEG-PLGA crean bucles que comparten segmentos PLGA en el centro y forman micelas. A medida que la temperatura aumenta hacia la CGT, las interacciones hidrofóbicas entre los segmentos de PLGA aumentan, dando lugar a una fuerte agregación micelar, pérdida de fluidez y gelificación. El mecanismo de gelificación permite compuestos con diferente hidrofiliidad incorporados en la matriz micelar formando la estructura básica de hidrogeles. Las moléculas de fármaco hidrófobas pueden quedar atrapadas dentro del núcleo hidrofóbico (PLGA) y las moléculas de fármacos hidrófilos pueden atraparse cerca de las regiones PEG (173, 174).

c) Hidrogeles con bloques hidrofóbicos de PCL, PHB, o polifosfaceno

PCL es un poliéster semicristalino biodegradable, que produce hidrogeles con gran integridad y perfiles de liberación prolongada de fármacos hidrofóbicos. Unos investigadores prepararon hidrogeles termosensibles PEG-PCL-PEG que tras su inyección subcutánea permanecieron en el sitio de inyección al menos durante 14 días y con una liberación de principio activo menor al 50% durante dos semanas (170).

PHB es un poliéster producido naturalmente por bacterias que presenta una cristalinidad e hidrofobicidad más alta que PLA o PCL. Debido a la gran hidrofobicidad, los copolímeros que llevan PHB muestran una transición solución-gel con cambio de temperatura a concentraciones muy bajas (2-5% p/p). Los mecanismos de gelificación mediante empaquetamiento micelar es similar a los otros poliésteres (170).

Los polifosfazenos son un tipo de hidrogeles termosensibles biodegradables compuestos por un bloque de PEG hidrofílico y aminoácidos hidrofóbicos, como L-isoleucina etil (IleOEt), éster D, L-leucina etil éster (LeuOEt), L-valina etil éster (ValOEt), o di-, tri- y oligo-péptidos en los grupos laterales. Se han realizado diferentes estudios con respecto a estos copolímeros, que exhibían una transición

sol-gel en función del cambio de temperatura (170-175). Las propiedades de gelificación se modificaron cambiando la composición de los sustituyentes y también el peso molecular de PEG.

d) Hidrogeles termosensibles a pH y temperatura

Los copolímeros de bloques que contienen oligómeros de sulfametazina (OSM), poli (b-amino éster) (PAE) y poli (amidoamina) (PAA) son capaces de formar hidrogeles termosensibles y sensibles al pH, proporcionando una mayor sensibilidad de gelificación a los cambios ambientales.

e) Hidrogeles con bloques hidrofóbicos PPO

El trabajo de esta Tesis Doctoral se ha centrado en hidrogeles físicos, termosensibles, a base de polímeros sintéticos poloxamer. Por ello, el siguiente apartado tratará de profundizar en su estudio.

1.7.3.1 Poloxámeros

Los poloxámeros (también conocidos como Pluronic[®]) son compuestos ampliamente utilizados para elaborar hidrogeles. Los poloxámeros se componen de un bloque de PPO intercalado entre dos bloques de poli (óxido de etileno) (PEO). Existen diversos poloxámeros en función de pesos moleculares y relaciones de copolímeros PPO/PEO.

Los geles pluronic aparecieron en la década de los 70 para la elaboración de formulaciones de liberación controlada de agentes farmacéuticos. Los primeros ejemplos incluyen geles Pluronic[®] F-127 (P407) para la liberación controlada de anestésicos y antimicrobianos, más recientemente han aparecido estos geles para uso oftálmico y para empleo con citostáticos y hormonas (176, 177).

Los poloxámeros tienen la capacidad de transformarse en micelas autoensamblables a partir de moléculas de copolímeros tribloque individuales.

Por debajo de la concentración micelar crítica (CMC), los copolímeros unímeros se dispersan en agua. Por encima de la CMC, se produce agregación de los copolímeros causando micelización. Otra de las propiedades características de estos copolímeros tribloque es su temperatura micelar crítica (CMT, *Critical Micelar Temperature*): temperatura específica a la cual se forman micelas. A temperaturas superiores a la CMT, se producen agregaciones de micelas debido a la deshidratación de ambos bloques, PEO y PPO, lo que lleva a una fase de separación (178).

La transición sol-gel se ha correlacionado con cambios internos en las micelas. En general, tanto la micelización como la gelificación dependen de diferentes factores, especialmente temperatura, concentración del polímero y longitud del bloque PEO (179).

Existen diversos tipos de poloxamer (figura 62). Los copolímeros que están situados en la misma columna presentan el mismo porcentaje del bloque de PEO, mientras que los copolímeros que se encuentran en la misma fila presentan un bloque de PPO del mismo peso molecular. La nomenclatura para los derivados de Pluronic[®] comienza con las letras L (para Pluronic[®] en estado líquido), P (para Pluronic[®] en pasta) o F (para Pluronic[®] en estado sólido). Los dos primeros números son indicativos del peso molecular de la cadena hidrófoba de PPO, y van desde el número 3 para el copolímero con el menor peso molecular de PPO hasta el número 12 para el de mayor peso molecular de PPO. El último número se refiere al porcentaje de PEO, y va desde el 1 para el menor porcentaje de PEO hasta 8 para el mayor porcentaje de PEO (eje horizontal en la figura 62). Una de las variedades de Pluronic[®] es el Pluronic[®]F-127. El número 12 hace referencia a que se trata de un copolímero bloque con un peso molecular del bloque de PPO de 4000 g/mol, mientras que el número 7 hace referencia a la presencia de un 70% de PEO en la molécula (180).

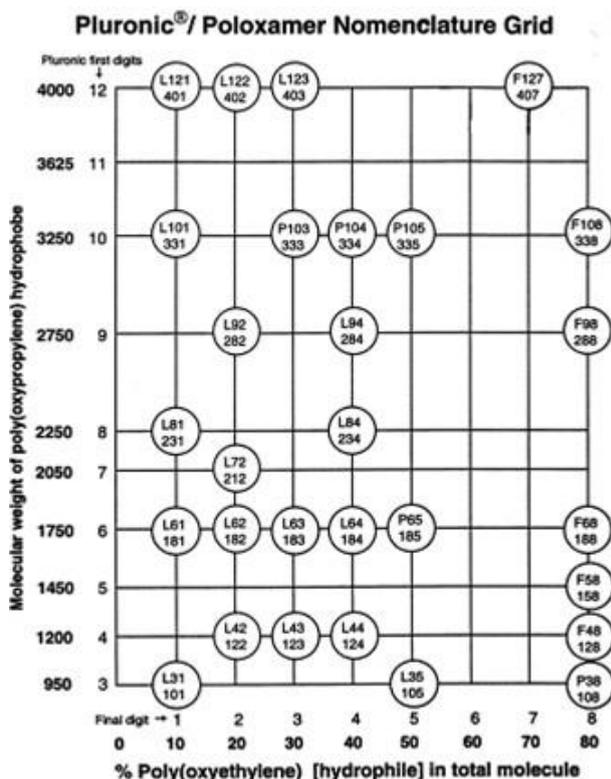


Figura 62. Variedades y nomenclatura de Pluronic® (181).

El mecanismo de la gelificación de Pluronic® sigue siendo un tema que despierta mucha controversia. Se han propuesto distintos mecanismos que tratan de explicar la transición sol-gel de este copolímero bloque, que se comentan a continuación. Así, Rassing (1983) explicó la gelificación del Pluronic® por cambios intrínsecos en las propiedades micelares, como el número de agregación (número de moléculas que forman las micelas) y la simetría micelar (182). Años más tarde, Wanka *et al.* (1990) propusieron la gelificación como una organización tridimensional estructurada. Las moléculas de polímero se autoorganizan en micelas por debajo de la CMT y por encima de la CMC. Al aumentar la temperatura hasta la CMT, se produce el empaquetamiento de micelas en una estructura ordenada formando mesofases liótropas cristal líquido (183).

No obstante, también se ha propuesto que la transición gel-sol puede estar relacionada con el hinchamiento que experimentan las cadenas de PPO en las micelas, al aumentar la solubilidad con el incremento de temperatura (184).

1.7.3.2 Poloxámero 407

El P407 (Pluronic® F127) es un copolímero no iónico de 3 bloques (figura 63), con una cadena central hidrofóbica de polioxipropileno (PPO) y 2 cadenas laterales hidrófilas de polioxietileno (PEO).

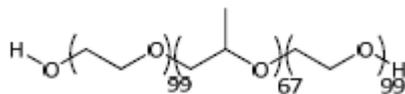


Figura 63. Estructura química del Pluronic® F127.

Este copolímero tiene una buena capacidad de solubilización, baja toxicidad y una alta capacidad de carga de fármaco, por lo que se considera un buen vehículo para la administración de fármacos.

Por encima de la CMC y de la CMT, se reduce la solubilidad del PPO en solución acuosa, dando lugar a la formación de la micela. Al aumentar simultáneamente la concentración y la temperatura da lugar a la formación de agregados multimoleculares que tienen un núcleo central hidrófobo con las cadenas de polioxietileno hidrófilas orientadas hacia el medio externo (figura 64).

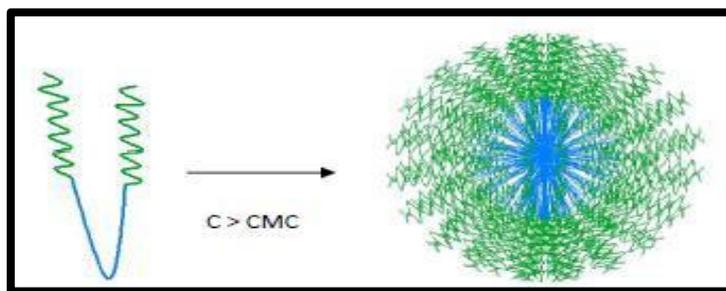


Figura 64. Esquema de la estructura micelar del Pluronic® en agua a concentraciones por encima de la CMC. En color azul se representa el núcleo hidrófobo de PPO y en color verde la corona hidrófila de PEO.

En ensayos de liberación *in vitro*, se ha demostrado que la liberación de fármacos disminuye con el aumento de la concentración de poloxámero, debido posiblemente al aumento del tamaño y número de micelas y una disminución

posterior del tamaño y número de canales acuosos (185). El P407 puede formar nanogeles termorreversibles lo que permite su uso para la mayor parte de vías de administración. Existen una serie de principios activos que se encuentran formulados en hidrogeles de poloxamers (tabla 8); no todos los poloxamer tienen la propiedad de gelificar, es por ello que se encuentran en combinación con el P407 (186).

Tabla 8. Polaxámeros como vehículo de principios activos.

Polaxamer	Principio activo	Vía de administración
407	Mebeverina, metoprolol, doxiciclina y vancomicina	Oral (forma sostenida)
407	Nimesulida	Rectal
407 y 188	Clotrimazol	Vaginal
407 y 127	Ciprofloxacina	Oftálmica
407	chitosan	Bucal
407 y 388	Acido 5 aminolevulinico, lecitina	Tópica
407	Proteínas y péptidos, ibuprofeno	Parenteral

II.- OBJETIVOS, CONTRIBUCIÓN Y PLAN DE TRABAJO

2. OBJETIVOS, CONTRIBUCIÓN Y PLAN DE TRABAJO

La distribución geográfica de las micosis es universal y más de 70 % de ellas son producidas por *Candida albicans*. Los casos registrados de candidiasis muestran que el sexo no influye en la frecuencia, a excepción de la candidosis urogenital que tiene mayor incidencia en el sexo femenino. La edad y raza de las personas son factores que, según la clínica, no influyen en la presentación de la micosis, la cual realmente dependerá del factor de inmunocompromiso asociado; sin embargo, por lo que respecta a la ocupación se considera que algunas actividades de las personas pueden favorecer la infección. En este sentido, existe un incremento de hábitos que facilitan el desarrollo de enfermedades producidas por *Candida spp.*, como son un mayor uso de piscinas comunitarias, gimnasios o instalaciones deportivas, tratamientos farmacológicos prolongados con antibióticos o corticoides, el uso de detergentes muy agresivos que deslipidizan la piel y una mayor incidencia en el número de enfermedades que afectan al sistema inmunológico (sida, cáncer, diabetes). Asimismo, el avance en el uso de medicamentos inmunosupresores, el contacto estrecho entre niños en las guarderías y el aumento en la frecuencia de viajes, han propiciado un aumento en la prevalencia de las micosis, que no sólo afectan a adultos o adolescentes sino que también afectan a niños y neonatos. De aquí que las micosis cutáneas sean algunas de las afecciones que se presentan con mayor frecuencia en las consultas dermatológicas.

En cuanto a la aspergilosis, aunque sólo es probable que cause problemas en personas inmunodeprimidas o con problemas crónicos de pulmones, es muy difícil evitar estar expuesto debido a la prevalencia del moho *Aspergillus spp.* en el medio ambiente. Aunque también puede afectar la piel, especialmente en pacientes que han sufrido quemaduras.

Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima una prevalencia de 12 millones de casos de leishmaniosis con una incidencia de 1,5 millones de nuevos casos de leishmaniosis cutánea. Globalmente, se estima unas 70.000 muertes cada año. Estos aspectos hacen que la leishmaniosis sea considerada por la OMS como una de las enfermedades tropicales de mayor importancia en términos de investigación.

Un tratamiento efectivo, en cualquiera de los casos, reducirá el tiempo de duración de la infección así como la gravedad de la enfermedad.

Si bien es cierto que el arsenal terapéutico actual presenta varias alternativas farmacológicas, la mayoría de ellas presentan limitaciones relativas a su formulación, eficacia, toxicidad, elevado costo y administración.

De hecho la mayoría de formulaciones de AmB comercializadas son de administración endovenosa: Fungizone[®], Abelcet[®], Amphosil[®], Ambisome[®]

La única formulación tópica de AmB comercializada es el Fungizome[®] gel 0,1%, solamente aprobada para ser comercializada en la India, donde existen los casos más graves y recurrentes de leishmaniasis cutánea.

Con el fin de solventar problemas como estos, este trabajo de investigación es consciente de la necesidad de crear nuevas formas de dosificación de AmB con actividad antifúngica y antiparasitaria para mejorar el tratamiento de ambas enfermedades.

Así pues, el diseño de vehículos inocuos, capaces de atravesar la piel gracias a una estructura nanométrica y al mismo tiempo evitar o disminuir la absorción de los fármacos podría constituir un importante logro en la lucha contra estas enfermedades. A este respecto, las nanoemulsiones y nanogeles constituyen sistemas de vehiculización de fármacos con grandes perspectivas de futuro, debido a sus numerosas propiedades y aplicaciones. Cabe esperar, que ambas

formulaciones logren una mayor solubilización del fármaco lo que podría disminuir la toxicidad de poliagregados y reportará una mayor biodisponibilidad. En definitiva se podrán emplear dosis terapéuticas más altas y seguras, con mayor eficacia.

2.1 OBJETIVO GENERAL

Por tanto, el objetivo de la presente Tesis Doctoral ha sido, el desarrollo, optimización, caracterización y evaluación *in vitro-ex vivo* de dos formulaciones con AmB para el tratamiento de micosis y leishmaniasis cutánea. En concreto se pretende desarrollar dos formulaciones, la primera, una nanoemulsión y la segunda, un nanogel basado en poloxamer 407.

2.2 PLAN DE TRABAJO

Para llevar a cabo este objetivo se ha seguido el siguiente plan de trabajo:

- a) Desarrollo y validación de un método sensible y rápido como técnica analítica para la cuantificación de AmB, tanto en formulaciones como en sustratos biológicos.
- b) Selección de la composición cualitativa de las nanoemulsiones en base a los estudios de solubilidad del principio activo en la fase oleosa, así como de su idoneidad para su aplicación sobre piel.
- c) Selección de la relación de los componentes de las nanoemulsiones mediante la construcción de diferentes diagramas ternarios.
- d) Síntesis y normalización de la técnica de elaboración de las distintas formulaciones, nanoemulsión y nanogel.
- e) Caracterización físico-química y estudios de estabilidad a largo plazo de las fórmulas.

- f) Caracterización de la forma y tamaño de los sistemas resultantes mediante Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y *Dynamic Light Scattering* (DLS).
- g) Determinación de la capacidad de incorporación y estabilidad del fármaco objeto de estudio en los vehículos seleccionados.
- h) Evaluación de la cinética de liberación del fármaco desde las formulaciones.
- i) Análisis de la permeación y retención *ex vivo* de la AmB sobre piel humana.
- j) Estudio de la tolerancia dérmica de las formulaciones de AmB desarrolladas.
- k) Estudio *in vitro* de la eficacia fungicida y leishmanicida de las formas de dosificación elaboradas.
- l) Análisis del Comportamiento de las formulaciones frente a los microorganismos mediante microscopia de fuerza atómica (AFM, *Atomic Force Microscopy*) y microscopia de barrido.

Este trabajo de investigación ha contado con la financiación de *L'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR)* número [SGR-2017 1744] y la beca otorgada por el Instituto de Nanociencia y Nanotecnología IN2UB número [2017.3.IN2UB.2].

III. MATERIALES Y METODOS

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

- ✓ Anfotericina B, Acofarma S.A. (Barcelona, España)
- ✓ Tween[®]80, Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
- ✓ Labrasol[®], Gattefossé S.A.S (Paris, Francia)
- ✓ Labrafac[®]Lipophile, Gattefossé S.A.S. (Paris, Francia)
- ✓ Labrafil[®], Gattefossé S.A.S. (Paris, Francia)
- ✓ Plurol[®] oleique, Gattefossé S.A.S. (Paris, Francia)
- ✓ Caprylic/capric triglycerides, Fagron Ibérica S.A.U. (Tarrasa, España)
- ✓ Miglyol[®] 812, Fagron Ibérica S.A.U. (Tarrasa, España)
- ✓ Aceite de ricino, Sigma Aldrich Co. (Darmstadt, Alemania)
- ✓ Transcutol[®] P, Gattefossé S.A.S. (Paris, Francia)
- ✓ Solución de HCL 0.1 N, Acofarma S.A. (Barcelona, España)
- ✓ Solución de NaOH 2 N, Acofarma S.A. (Barcelona, España)
- ✓ Dimetilsulfoxido (DMSO), Sigma-Aldrich Co. (Darmstadt, Alemania) y Panreac Química
- ✓ Dimetilformamida, Panreac Química S.L.U. (Castellar del Vallès, España)
- ✓ Metanol HPLC gradient, para análisis instrumental, Panreac Química S.L.U. (Castellar del Vallès, España)
- ✓ Acetonitrilo HPLC gradient, para análisis instrumental, Panreac Química S.L.U. (Castellar del Vallès, España)
- ✓ Ácido acético glacial gradient, para análisis instrumental, Panreac Química S.L.U. (Castellar del Vallès, España)

- ✓ Agua doblemente desionizada por un sistema de purificación de agua modelo Milli-Q (Millipore Merck, Burlington, Massachusetts, EEUU)
- ✓ Medio de cultivo Shneider, Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
- ✓ Medio de cultivo RPMI 1640, Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
- ✓ Medio de cultivo MEM, Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
- ✓ Línea celular de macrófagos RAW 264,7 de origen tumoral murino RAW 264,7 (Eucelbanc, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona)
- ✓ Línea celular de macrófagos J774 de origen tumoral monocítico de ratón J774 (Eucelbanc, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona)
- ✓ Reactivo WST-1, Roche A.G. (Basilea, Suiza)
- ✓ Medio de cultivo RPMI 1640, Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
- ✓ Medio de cultivo *Schneider's insect médium*, Sigma S – 9895, Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
- ✓ Agar dextrose de Saburoad, Oxoid S.A (Madrid, España)
- ✓ *Candida albicans* ATCC 10231 (Colección, Manassas, VA, EEUU)
- ✓ *Candida glabrata* ATCC 66032 (Colección, Manassas, VA, EEUU)
- ✓ *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (Colección, Manassas, VA, EEUU)
- ✓ *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (Colección, Manassas, VA, EEUU)
- ✓ *Leishmania tropica* MHOM/ES/2010/BCN-809 (Universidad de Barcelona, España)
- ✓ *Leishmania infantum* MHOM/ES/2014/BCN-855 (Universidad de Barcelona, España)
- ✓ *Leishmania major* MHOM/ES/2011/BCN-83 (Universidad de Barcelona, España)
- ✓ *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/88/BCN-25 (Universidad de Barcelona, España)

3.2 INSTRUMENTOS

- ✓ Balanza de precisión monoplato Mettler H-35 AR (Mettler Toledo S.A., L'Hospitalet de Llobregat, España)
- ✓ Balanza granataria Mettler PJ 3000 (Mettler Toledo S.A., L'Hospitalet de Llobregat, España)
- ✓ Vórtex MELB1719 (Merck Eurolab, Lutterworrth, Reino Unido)
- ✓ Baño de ultrasonidos Selecta mod. 514 (JP Selecta S.A, Abrera, España)
- ✓ Espectrofotómetro UV-Visible Ultrospec 1100 Pro UV-Vis spectrophotometer (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EEUU)
- ✓ Espectrofotómetro Titertek-Multiskan®Plus MK II 314, (Bio-Rad Laboratories Inc., Watford, Reino Unido)
- ✓ pHmetro Crison micropH 501 (Crison Instruments S.A., Alella, España)
- ✓ Cromatógrafo Waters 515 con un autoinyector 717 plus y un detector UV-VIS Waters 2487 (Waters, Mildford, MA, USA)
- ✓ Zetasizer (Malvern Instruments Inc., Malvern, Reino Unido)
- ✓ TurbiscanLab®Expert (Formulacion Co., L'Union, Francia)
- ✓ Células de Franz FDC-400 (Crown Glass, Somerville, NJ, EEUU)
- ✓ Consola de agitación para células de Franz FDC-400
- ✓ Baño termostático Tectron S 473.100 (ICT S.L., La Rioja, España)
- ✓ Baño de ultrasonidos Elma Transsonic Digital S T490 DH (ElmaSchmidbauer GmbH, Singen, Alemania)
- ✓ Reómetro Haake RheoStress1 acoplado a un baño termostático Thermo Haake Phoenix II + Haake C25P, equipado de un cono Haake C60/2Ti (diámetro 60 mm, ángulo 2º) o de una placa Haake PP60Ti (diámetro 60 mm) (Thermo Fisher Scientific S.L., Madrid, España)

- ✓ Dermatomo Aesculap GA630 (Aesculap A.G., Tuttlingen, Alemania)
- ✓ Analizadores de propiedades biomecánicas de la piel integrados por un módulo Tewameter® TM 300 con sonda de temperatura ST500 y un módulo CorneometerMPA 580 (Courage-Khazaka electronic GmbH, Cologne, Alemania)
- ✓ Microscopio de Transmisión Electrónica (TEM) JEOL 1010 (JEOL, Akichima, Japon)
- ✓ Microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL J-7100F (JEOL, Peabody, MA, EEUU)
- ✓ Microscopio multimodo de fuerza atómica conectado a un dispositivo Nanoscope V (Bruker, AXS Co., Madison, WI, EEUU) equipado con micropalanca de nitruro de silicio en forma de V MSNL-10 (Bruker AFM Probes, Camarillo, CA, EEUU)
- ✓ Microscopio óptico Olympus CH-2 (Olympus Iberia S.A.U., L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona)
- ✓ Contador de células TC 20™ Automated Cell Counter (Bio-Rad Laboratories Ltd, Watford, Reino Unido)
- ✓ Cabina FLV Telstar AR 30/70 4485 (Telstar S.A., Terrassa; España)
- ✓ Cabina SB Telstar Bio II A/P 14169 (Telstar S.A., Terrassa; España)
- ✓ Cámara de conteo Fuchs-Rosenthal (Brand GMBH + CO KG, Wertheim, Alemania)
- ✓ Congelador Liebherr modelo ICN 3366-21 (Liebherr-Werk Ehingen GmbH, Bulle, Suiza)
- ✓ Centrifuga Millifuge CT10 (Millipore Iberica, Madrid, España)

3.3 MATERIAL AUXILIAR

Se utilizó material usual de laboratorio: pipetas, vasos de precipitado, pipetas pasteur, espátulas, papel Parafilm[®], viales, filtros de membrana PVDF de tamaño de poro 0,45 µm y 0,22 µm, jeringas, papel de aluminio, cubetas.

- ✓ Filtros SMWP01300 Millipore[®] (Millipore Merck, Burlington, Massachusetts, EEUU)
- ✓ Placa de microtitulación estéril (COSTAR[®], Termo Fisher Scientific GmbH, Karlsruhe, Alemania) y Placas LabTech[®] (BMG LabTech GmbH, BMG LABTECH, Ortenberg, Alemania)
- ✓ Unidades Amicon[®] Ultra-15 para filtración por centrifugación con membrana Ultracel-100 (Millipore Co., Billerica, MA, EEUU)
- ✓ Columna Kromasil[®] 100-5C18 (5 µm, 150 x 4,6 mm), para equipo CLAR
- ✓ Jeringa (Sigma Aldrich Co., Barcelona, España)

3.4 METODOLOGÍA

3.4.1 Nanoemulsiones con AmB

A la hora de seleccionar los excipientes para la elaboración de la nanoemulsión se tuvieron en cuenta varios factores. Por un lado la toxicidad de los componentes utilizados y por otro la solubilidad que en ellos presentaba la AmB.

3.4.1.1 Excipientes

A continuación se describen los excipientes utilizados para la formulación de la nanoemulsión con AmB, indicando únicamente su uso en preparaciones de administración tópica.

➤ FASE OLEOSA

- **Triglicéridos de cadena media C8-C10: Labrafac® lipófilo**

- *Descripción y datos fisicoquímicos:*

INCI: Caprylic/Capric triglyceride

USP NF: Medium chain triglycerides

Tricapril-caprato de glicerilo. Líquido oleoso, incoloro. Miscible en aceite e inmisible en agua. Viscosidad a 20°C (mPa·s): 22-33; HLB = 1.

- *Propiedades y usos:*

Como agente solubilizante y potenciador de la penetración cutánea de fármacos, se utiliza en la fase oleosa de preparaciones tópicas tales como emulsiones, microemulsiones, ungüentos y espumas.

- **Aceite de ricino**

- *Descripción y datos fisicoquímicos:*

INCI: Ricinus communis oil

Aceite virgen y de primera presión en frío obtenido de las semillas del *Ricinus communis* L. Líquido límpido, viscoso, casi incoloro o ligeramente amarillo, higroscópico. Poco soluble en petróleo ligero, miscible en etanol 96% y ácido acético glacial.

Densidad (g/mL): aprox. 0,958. Índice de refracción: aprox. 1,4790.

- *Propiedades y usos:*

Este aceite vegetal se utiliza en preparados tópicos por su efecto emoliente, en emulsiones, pomadas y linimentos, en proporciones del 5 a 10%. Además, en barras labiales proporciona brillo y da resistencia al preparado. Destaca también su poder disolvente, en particular de ciertos colorantes.

● **Parafina líquida (vaselina líquida)**

- *Descripción y datos fisicoquímicos:*

INCI / USP NF: Paraffinum liquidum

Aceite mineral, mezcla purificada de hidrocarburos saturados líquidos (C14-C18) e hidrocarburos cíclicos obtenida por destilación del petróleo. Líquido oleoso, incoloro, transparente, desprovisto de fluorescencia a la luz del día. Prácticamente insoluble en agua, poco soluble en etanol al 96% y miscible con hidrocarburos.

Densidad (g/mL): 0,827-0,905. Viscosidad a 20°C (mPa·s): 110-230.

- *Propiedades y usos:*

La parafina líquida es un emoliente y protector dermatológico que posee la propiedad de no enranciarse y por lo tanto no produce mal olor, ni irrita la piel, ni propicia la descomposición de otros componentes de las formulaciones.

Por vía tópica se utiliza en irritaciones de la piel y para eliminar las costras. Posee además cierta acción antiséptica que es útil en las úlceras por decúbito.

Como excipiente, se utiliza a modo de vehículo oleoso o en la fase oleosa de emulsiones, pomadas y ungüentos. En pomadas permite un efecto oclusivo así como un contacto más íntimo con la superficie de la lesión. Puede añadirse lanolina para facilitar la penetración de los principios activos en la piel.

Rango de uso: como lubricante tópico, hasta el 100%; como componente oleoso en proporciones de 1-32% en emulsiones tópicas, 1-20% en lociones tópicas y 0,1-95% en ungüentos tópicos.

- **Triglicéridos de cadena media C8-C10: Migliol® 812:**

- *Descripción y datos fisicoquímicos:*

INCI: Caprylic/Capric triglyceride

USP NF: Medium chain tryglicerides

Aceite neutro compuesto de ésteres de ácidos grasos caprílicos y capricos derivados de aceite de palma y palma saturada y glicerina. Líquido oleoso, inodoro, incoloro o ligeramente amarillento. Prácticamente inmisible en agua, miscible en etanol 96%, cloruro de metileno, éter de petróleo, y aceites grasos.

Densidad (g/mL):0,930-0,960

Solubilidad: agua a 20°C→ insoluble; etanol→ soluble; cloroformo→ soluble

- *Propiedades y usos:*

Presenta una alta estabilidad a la oxidación y es líquido a 0 °C. Es un producto estable pero fácilmente biodegradable y no tóxico (DL50 oral en rata > 2 g/kg), por lo que tiene aplicación en una gran variedad de formas farmacéuticas.

Respecto a la vía tópica, no interfiere en la respiración natural de la piel y cabe destacar sus propiedades emolientes y suavizantes. Además proporciona una buena capacidad de extensión sobre la piel de preparados tales como emulsiones, pomadas y ungüentos. Se utiliza también como

promotor de la penetración de fármacos vehiculizados en estas formas farmacéuticas.

➤ **FASE ACUOSA**

• **Propilenglicol**

- *Descripción y datos fisicoquímicos:*

INCI /USP NF: Propylene glycol

Compuesto orgánico obtenido por hidratación del óxido de propileno. Líquido viscoso, límpido, incoloro, higroscópico. Miscible en agua y etanol 96%.

Densidad a 20 °C (g/mL): 1,038; Índice de refracción a 20 °C: 1,4324.

- *Propiedades y usos:*

Se utiliza como disolvente, cosolvente y humectante, con propiedades bactericidas y fungicidas. Así, a concentraciones elevadas actúa como conservante de efectividad casi similar al etanol, sobretodo conjuntamente con parabenos, por lo que se usa en dermatología para prevenir o tratar infecciones secundarias. Es un buen vehículo para principios activos con insuficiente solubilidad en agua o inestables en soluciones acuosas, como antihistamínicos, barbitúricos, vitaminas A y D, paracetamol, alcaloides, esteroides, fenoles, sulfamidas, anestésicos locales y aceites volátiles. Además, en formulaciones para vía tópica, puede aumentar la penetración y permeación de fármacos.

A concentraciones baja o moderada (< 15%), actúa como humectante (impidiendo la desecación de la epidermis en su capa córnea) y protector de la piel (impidiendo la acción de irritantes). A elevada concentración (> 40 %), tiene acción queratolítica. Es irritante y sensibilizante por vía tópica, sobre todo a concentraciones mayores al 30%. En ese caso, se puede sustituir por glicerina o sorbitol 70%.

Rango de uso: como solvente/cosolvente, en productos tópicos 5-80%, en soluciones orales 10-25%, parenterales 10-60%; como humectante: $\leq 15\%$; como conservante: 15-30%.

- **Dietilenglicol monoetil éter: Transcutol® P**

- *Descripción y datos fisicoquímicos:*

INCI: Ethoxydiglycol

USP NF: Diethylene glycol monoethyl ether

Líquido incoloro, miscible con etanol y agua que se obtiene por etoxilación del etanol. Viscosidad a 20 °C (mPa·s): 4,8; HLB: no aplica.

- *Propiedades y usos:*

Es un solvente y solubilizante de gran pureza para facilitar la incorporación de sustancias poco solubles en agua y mejorar de la penetración cutánea de fármacos a partir de formas de dosificación tales como emulsiones, microemulsiones, cremigeles, geles, ungüentos, espumas y pomadas. Es de uso seguro y baja irritación, respaldado por numerosos estudios toxicológicos procedente del uso de medicamentos aprobados.

- **Agua: Agua ultrapura Milli-Q® gradient A10.**

- *Descripción y datos fisicoquímicos:*

El sistema Milli-Q® es una combinación única de tecnologías optimizadas de control y purificación del agua. Permite la producción de agua purificada (Tipo II) y agua ultrapura (Tipo I) directamente a partir del agua potable.

Especificaciones ASTM para agua ultrapura Tipo I:

~Conductividad a 25°C ($\mu\text{S}/\text{cm}$): 0,056

~Resistividad a 25°C ($\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$): 18

~Sílice, valor máximo total (148): 3

~Carbono, valor máximo total de carbono (148): 100

~Cloruros, valor máximo ($\mu\text{g}/\text{L}$): 1

~Sodio, valor máximo ($\mu\text{g/L}$): 1

➤ **SISTEMA EMULGENTE**

• **Monooleato de sorbitano polioxietilenado: Tween® 80**

- *Descripción:*

INCI /USP NF: Polysorbate 80

Monooleato de polioxietilen-20 sorbitano: tensoactivo no iónico de tipo O/A, derivado de la etoxilación del sorbitano y su posterior monoesterificación con ácido oleico, con un total de 20 óxidos de etileno por molécula. Líquido oleoso límpido, o ligeramente opalescente, incoloro o amarillo pardusco. Miscible en agua, etanol anhidro, acetato de etilo, y metanol. Prácticamente insoluble en aceites grasos y en parafina líquida. Densidad (g/mL): 1,06-1,09. HLB = 15,0.

- *Propiedades y usos:*

Presenta propiedades tensoactivas, detergente, solubilizante y humectante. Para la vía tópica, se utiliza como emulgente en la preparación de emulsiones, microemulsiones, pomadas lavables, geles, etc. para emulsificar vehículos oleosos o la fase oleosa así como solubilizar esencias, vitaminas liposolubles y diversas sustancias poco solubles en agua. También se emplea como humectante en suspensiones.

Rango de uso: como emulsificantes y solubilizantes: 1-15 %; como humectantes: 0,1-3 %.

• **Caprilcaproil macrogol-8 gliceridos: Labrasol®**

- *Descripción y datos fisicoquímicos:*

INCI: PEG-8 Caprylic/Capric glycerides

USP NF: Caprylocaproyl Polyoxyl-8 glycerides

Tensoactivo no iónico de tipo O/A, compuesto por ésteres de polietilenglicol (PEG) bien caracterizados, una pequeña fracción de glicéridos y PEG libre.

Líquido incoloro, dispersable en agua. Viscosidad (mPa·s): 80-110 (20 °C).
HLB = 12.

- *Propiedades y usos:*

Es capaz de autoemulsionar al ponerse en contacto con medios acuosos y formar una dispersión fina.

Para la vía tópica, se emplea para solubilizar principios activos farmacéuticos y aumentar la penetración y permeación de los fármacos a partir de pomadas, microemulsiones, emulsiones y geles tópicos.

Su seguridad está avalada por amplias evaluaciones toxicológicas y por su utilización en productos farmacéuticos aprobados.

● **Oleato de poliglicerilo: Plurol® Oléico**

- *Descripción y datos fisicoquímicos:*

Tensoactivo no iónico (O/A) constituido por éster de ácido oleico y poliglicerol seleccionado, con predominio del diéster. Líquido amarillo, tacto aceitoso, insoluble en agua. Viscosidad a 20°C (mPa·s): 3000. HLB =3.

- *Propiedades y usos:*

Se emplea como coemulgente, solubilizante y promotor de penetración en microemulsiones, emulsiones y espumas de aplicación cutánea

Su seguridad está avalada por amplias evaluaciones toxicológicas y por su utilización en productos farmacéuticos aprobados.

● **Oleoil macrogol-6 glicéridos: Labrafil® M 1944 CS**

- *Descripción y datos fisicoquímicos:*

INCI: Apricot kernel oil PEG-6 esters

USP: Oleoyl polyoxyl-6 glycerides

Agente tensioactivo no iónico, obtenido a partir de la transesterificación del aceite de semilla de *Prunus armeniaca* (albaricoque). Líquido transparente, incoloro, dispersable en agua. Viscosidad a 20 °C (mPa·s): 75-95. HLB = 9.

- *Propiedades y usos*

Se autoemulsiona en medios acuosos formando una dispersión grosera. Se utiliza en formulaciones tópicas (microemulsiones, emulsiones y espumas) como emoliente, tensioactivo emulgente o coemulgente. También tiene interesantes propiedades solventes y solubilizantes para incrementar la solubilidad de sustancias poco solubles y mejorar la penetración de fármacos.

3.4.1.2 Solubilidad del AmB en los excipientes

Se realizó un estudio previo de solubilidad de la AmB en los distintos excipientes anteriormente definidos para proceder a la selección de los más adecuados para formular la nanoemulsión de AmB.

La misma cantidad de cada uno de los 11 excipientes se introdujo por separado en 11 viales de vidrio, añadiendo suficiente cantidad de principio activo (AmB) para asegurar la saturación. Se agitó mediante un vortex MELB1719 (Merck Eurolab), durante 1 min. Cada una de las suspensiones se cubrieron con papel parafilm y se prosiguió la agitación en un baño de agua termostatzado Tectron S 473.100 (ICT), a 32 °C durante 36 h. Posteriormente los viales fueron filtrados y centrifugados mediante tubos Amicon® Ultra-15 con membrana Ultracel-100 membrane (Millipore Co.), a 12.000 rpm durante 30 min, en una centrifuga Millifuge CT10 (Millipore Iberica). El filtrado resultante se diluyó en tres volúmenes específicos de DMSO (10 ml, 100 ml y 1000 ml) para luego analizar la solubilidad de los mismos por HPLC.

3.4.1.3 Elaboración del diagrama pseudoternario de fases

- *Descripción de los diagramas*

Para elaborar el diagrama pseudoternario de fases, se agruparon los excipientes finalmente seleccionados, atendiendo a sus características de polaridad, hidrofilia y/o anfifilia. Inicialmente, se realizó el diagrama base a partir de series de composiciones sin AmB con el propósito de identificar la zona idónea de formación de nanoemulsiones.

Así, en los vértices del triángulo equilátero se situaron los siguientes componentes o composiciones:

- (A): Labrasol® / Plurol® Oléico (5:1)
- (B): Aceite de ricino
- (C): Transcutol®P.

El punto de cada vértice representa el 100% del componente correspondiente. Por otra parte, el espacio del triángulo situado entre un determinado vértice y la arista totalmente opuesta (que une los dos otros vértices) viene dividido por líneas paralelas. Todos los puntos situados en la mencionada arista representan el 0% del componente del vértice opuesto y las distintas composiciones binarias de los otros 2 componentes. Las líneas paralelas a esta arista, considerando 19 líneas paralelas y empezando desde dicha arista, supone un aumento de un 5% del componente del vértice opuesto.

Los puntos interiores en el triángulo corresponden a composiciones pseudoternarias constituidas por los tres componentes A, B y C.

- *Preparación de las distintas mezclas de excipientes*

La preparación de las composiciones puede hacerse por pesada directa de cada uno de los componentes, o por pesada de varias mezclas de los componentes de dos de los vértices en distintas proporciones o añadiendo porciones sucesivas

del tercer componente. En el presente trabajo se optó por la primera opción, por ser más exacta.

Los componentes se pesaron en proporciones que comprendían entre 10 y el 90% de cada componente para obtener las series de mezclas necesarias para cubrir toda el área del triángulo del diagrama ternario de fases. Cada una de las composiciones se mezcló adecuadamente y se sonicó (187) en viales de vidrio. Para ello, cada mezcla se calentó a 45 °C y se sometió a ultrasonidos durante 30 s para facilitar la homogenización. Los sistemas dispersos obtenidos se refrigeraron en nevera (5 ± 3 °C) durante 24 h.

La selección de la región de formación de la nanoemulsión se realizó mediante inspección visual de las mezclas, eligiendo como buenas aquellas que formaron una única fase translúcida y descartándose todas las mezclas bifásicas. Se midió el tamaño de gota y el índice de polidispersión. Se evaluó un total de 52 mezclas para determinar los límites de la región de formación de nanoemulsión.

- Preparación de la nanoemulsión de AmB

Un vez seleccionada la mezcla más adecuada de Labrasol®/Plurol®oleique-Aceite de ricino/Transcutol® P, se preparó la nanoemulsión de AmB (0,5 % p/p). Para ello, se incorporó el fármaco al aceite de ricino y los tensoactivos, previo adición del Transcutol® P, calentando a 45 °C y sometiendo la mezcla a ultrasonidos durante 30 s, para seguidamente dejar la mezcla en reposo durante 12 h en nevera, con el fin de detectar signos de precipitación.

3.4.2 Nanogel de AmB

3.4.2.1 Formulación y elaboración

Sobre la base de los antecedentes comentados en la introducción y la propia experiencia del grupo de investigación en el que se incorporó la Doctorando, se eligió el Poloxamer® F 127 (P407) como excipiente base para la elaboración del nanogel.

Se pueden emplear diferentes técnicas de preparación:

- El método directo o simple
- Disolución-diálisis
- Disolución-evaporación

Por su sencillez y bajo coste se siguió una adaptación del primero de los métodos. En primer lugar, se dispersaron 25 g de P407 en agua ultrapura a 4 °C hasta su completa disolución (Solución 1). Se disolvieron 60 mg de AmB en 10 ml de DMSO, y se añadió 1 ml de esta solución lentamente bajo agitación a 19 ml de la Solución 1 a 4 °C. La solución resultante se ajustó a pH 6,5 con solución de NaOH 2N. Se obtuvo un hidrogel con una concentración final de AmB de 300 µg/mL.

3.4.2.2 Determinación de la temperatura y tiempo de gelificación del hidrogel con AmB.

Se estimó la temperatura de gelificación del hidrogel de AmB mediante el procedimiento que se describe a continuación.

Se colocaron 10 mL del hidrogel en un vaso de precipitado (capacidad de 25 mL) que contenía una barra magnética (2 cm de longitud y 0,5 cm de diámetro), sobre un agitador magnético termostatzado (4 °C). Un termómetro con una precisión de 0,5 °C fue inmerso en el vaso. La solución se agitó a 50 rpm y

calentada a razón constante. Se consideró como temperatura de gelificación, la temperatura a la cual el imán dejó de moverse, siendo en este caso $23,0 \pm 0,5$ °C.

Para calcular el tiempo de gelificación, se tomaron 10 mL de gel en estado sol (4 °C) y se introdujo a un vaso de precipitado con un imán, el cual fue inmediatamente colocado sobre la placa de un agitador magnético (32 °C). Se tomó como tiempo de gelificación los minutos en los que la solución perdió completamente su fluidez y el imán dejó de moverse.

3.4.3 Cuantificación de la AmB

3.4.3.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución

a) Fundamento de la técnica

La cromatografía engloba un conjunto de técnicas de análisis basadas en la separación de componentes de una mezcla y su posterior detección. Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido, o fluido supercrítico) que arrastra a la muestra hasta llegar al punto donde es introducida la muestra (148).

En la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) o *High Performance Liquid Chromatography* (148), el compuesto pasa a través de una columna cromatográfica donde se encuentra la fase estacionaria (sólido o un líquido fijado en un sólido) disuelto en una fase móvil (líquida). La fase móvil es bombeada a alta presión (llegando a alcanzar hasta 400 atmósferas) a través de la columna.

Esta técnica de separación está basada en los diferentes tipos de interacciones químicas que puedan llegar a existir entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. Los componentes de la mezcla interactúan de distinta forma con la fase estacionaria y con la fase móvil. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades.

El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo de retención (que se mide a partir del tiempo en que la muestra es inyectada hasta el punto en que aparece el pico más alto del compuesto a analizar), constituye una característica propia de cada sustancia cuando se analiza en una determinada fase móvil y fase estacionaria.

La Figura 65 muestra de forma esquemática las partes de un dispositivo CLAR.

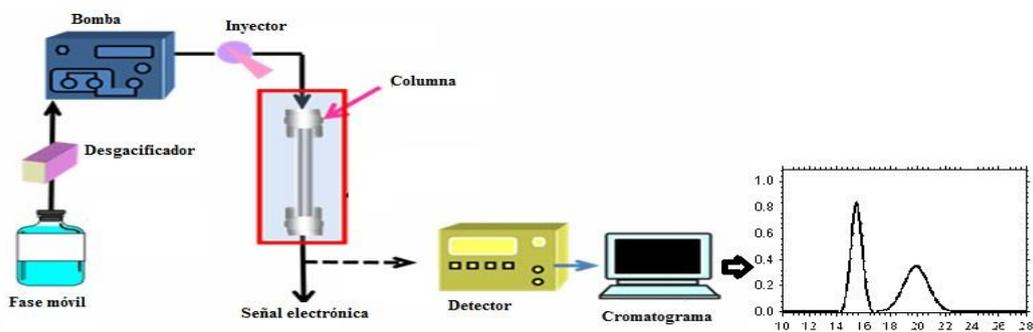


Figura 65. Elementos de un CLAR (148).

El dispositivo CLAR consta principalmente de:

- ① Un contenedor o reservorio de la fase móvil.
- ② Una bomba, encargada del proceso de inyección automática de la muestra impulsando a la fase móvil con presión y flujo constante.
- ③ Un inyector de muestra.
- ④ Una columna cromatográfica donde se realiza la separación de los compuestos presentes en la muestra y se determinan los tiempos de retención de los mismos.
- ⑤ Un detector que es el componente que emite la respuesta de los compuestos presentes en la muestra eluída con sus respectivas señales dando origen a un cromatograma.

- ⑥ Un contenedor para recolectar el solvente y los productos de desechos de la muestra y finalmente un procesador de datos de toda la información recogida por el detector.

La detección en cromatografía se realiza habitualmente en continuo, aunque es posible la utilización de colectores de fracciones para la identificación y cuantificación de pequeñas fracciones del eluyente. Los detectores de uso más extendido son: detector de índice de refracción, detector UV-Visible, detector de IR, detector de fluorescencia, detector de conductividad eléctrica y detector electroquímico. Para la elaboración de esta tesis se ha utilizado como detector el UV-Visible (188).

b) Preparación de la muestra

Se preparó una solución madre (o *stock*), de AmB en DMSO/Metanol (1:1), hasta obtener una concentración final de 0,8 mg/mL (800 µg/mL). Posteriormente, se prepararon 6 rectas de calibrado, y cada una de ellas contenía varios estándares entre 1,56 y 400 µg/mL.

Todos los análisis de CLAR fueron llevados a cabo mediante una elución isocrática. El sistema de CLAR estaba compuesto por dos bombas Waters 515 con un autoinyector 717 plus y un detector UV-VIS 2487 (Waters). Como fase estacionaria se utilizó una columna Kromasil®100-5C18 (5 µm, 150 x 4,6 mm) y como fase móvil una mezcla de acetonitrilo, ácido acético y agua en las siguientes proporciones: 260,00 mL; 21,50 mL y 218,50 mL, obteniéndose un pico a un tiempo de retención de 12 min, trabajando con un flujo de 0,5 mL/min y a una longitud de onda de 406 nm. El volumen de inyección fue 50 µL y el tiempo total de cromatografía fue de 12 min.

c) Validación del método analítico

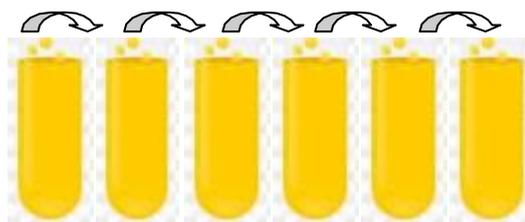
- *Fundamento*

Es imprescindible disponer de un método analítico fiable que permita cuantificar el principio activo de una formulación. Para asegurar su idoneidad, los métodos analíticos se someten a un proceso de validación. En el cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio, la validación es un requisito imprescindible que está establecido por agencias regulatorias, Farmacopeas y Guidelines.

Según la USP la validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (*United States Pharmacopeial USP 31–NF 26, Capítulo General, 1225*). Igualmente, la FDA o Guidelines ICG, lo definen como el proceso por el cual se demuestra que los procedimientos analíticos son aptos para el uso indicado (*FDA Draft Guidance – Analytical Procedures and Methods Validation*) (*ICH Guideline Q2A – Text on Validation of Analytical Procedures*).

- *Preparación de la muestra*

Se elaboraron 8 rectas de calibrado, a partir de la solución madre (800 µg/mL), con un rango de concentraciones de: 800; 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 y 1,56 µg/mL de AmB.



800 µg/mL-----1,56 µg/mL

Figura 66. Diluciones dobles seriadas de AmB partiendo de una solución madre (800 µg/mL) hasta una concentración de 1,56 µg/mL.

Se realizaron diluciones dobles seriadas, utilizando como disolvente una mezcla DMSO/Metanol (1:1).

El método fue validado en términos de linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación y límite de detección.

- *Linealidad*

Representa la proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta en el intervalo de concentraciones del producto utilizado, para las cuales el método es satisfactorio. Una de las metodologías para estudiar la linealidad de las respuestas es comparar los valores medios de las relaciones entre la respuesta y su concentración. Si $p \geq 0,05$ significa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios medidos y los valores teóricos, por tanto la técnica utilizada es lineal en el intervalo de concentraciones estudiadas.

- *Precisión*

Es el grado de dispersión entre los valores obtenidos al determinar un analito en un ensayo realizando varios replicados. Se expresa como desviación estándar (DE) o desviación estándar relativa (CV). Es uno de los criterios más importantes, junto a la exactitud, para determinar la validez de un método analítico. Una de las medidas de precisión es el coeficiente de variación porcentual que se estima a la variabilidad de los valores predecibles:

$$CV (\%) = (DE/C_{exp}) * 100$$

Cálculo del coeficiente de variación (CV) expresado en porcentaje donde (DE) es la desviación estándar, (C_{exp}) el valor interpolado medio encontrado en los diferentes replicados de cada nivel de concentración.

Un método se considera preciso si los valores de CV% se encuentran por debajo del 10%.

- *Exactitud*

La exactitud representa el grado de concordancia entre el valor medio y el valor considerado como verdadero. Indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más parecidos posibles al valor verdadero. Las diferencias entre los valores predcidos (C_{exp}) y los valores teóricos o de referencia (C_{teor}) constituyen una estimación absoluta de la cuantificación en cada concentración y se expresa como valor relativo, es el error relativo en porcentaje:

$$ER (\%) = ((C_{exp} - C_{teor}) / C_{teor}) * 100$$

Cálculo del error relativo (ER) expresado en porcentaje donde (C_{exp}) es la concentración interpolada media encontrada para cada nivel de concentración, (C_{teor}) es la concentración en cada punto de la recta estudiada que corresponde a cada concentración de las rectas patrón.

Un método se considera exacto si el valor del ER (%) es inferior al 10%.

- *Límite de cuantificación*

Es la cantidad mínima de fármaco que puede ser cuantificada mediante el proceso analítico con una precisión y exactitud aceptables. Es el punto más bajo de la recta de calibrado. El límite de cuantificación caracteriza la habilidad de un proceso analítico para cuantificar un analito.

$$LQ (\mu\text{g/mL}) = 10 \cdot \frac{S}{p}$$

Cálculo del límite de cuantificación (ER) expresado en $\mu\text{g/mL}$ donde (S) es la desviación estándar de la ordenada en el origen y p es la pendiente de la recta.

- *Límite de detección*

Es la cantidad mínima de analito que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada a través el método analítico:

$$LDD: (Y_bI + 3S_bI/b) * 1/n^{1/2}$$

Cálculo del límite de detección (LDD) donde (b) es la pendiente de la recta de regresión lineal, (YbI) el valor estimado del blanco, (SbI) el valor estimado de la desviación estándar del blanco, (n) el número de medidas individuales.

3.4.3.2 Espectrofotometría UV/VIS

a) Fundamento de la técnica

La espectrometría ultravioleta-visible o espectrofotometría UV-Vis implica la espectroscopia de fotones en la región de radiación ultravioleta-visible. Utiliza la luz en los rangos visibles y adyacentes.

La presencia del principio activo da una respuesta en forma de absorbancia que es proporcional a la concentración del mismo. Para resultados precisos, la respuesta del instrumento al analito debe compararse con la respuesta a un estándar, lo que es muy similar al uso de curvas de calibración.

La espectrometría UV-Vis se utiliza con mayor frecuencia en forma cuantitativa para determinar las concentraciones de especies absorbentes en solución, usando la Ley de Beer-Lambert:

$$A = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) = \varepsilon \cdot c \cdot L$$

Donde A es la absorbancia medida, I_0 es la intensidad de la luz incidente a una determinada longitud de onda, I es la intensidad de transmisión, L la longitud de ruta a través de la muestra, y c la concentración de las especies absorbentes. Para cada especie y longitud de onda, ε es una constante conocida como absorptividad molar o coeficiente de extinción. Esta constante es una propiedad fundamental molecular en un solvente dado, a una temperatura y presión particular, y tiene como unidades $l/M \cdot cm$ o, a menudo, $U/M \cdot cm$.

Se muestra en la figura 67 un esquema del instrumento utilizado. El espectrofotómetro UV-Vis mide la intensidad de luz (I) que pasa a través de una

muestra, y la compara con la intensidad de luz (I_0) antes de pasar a través de la muestra. La relación I/I_0 se llama transmitancia, y se expresa habitualmente como un porcentaje (%T).

La absorbancia (A) se basa en la transmisión: $A = -\log (\%T)$

Las muestras para espectrofotometría UV-Vis suelen ser líquidas, aunque la absorbancia de los gases e incluso de los sólidos también puede medirse. Las muestras suelen ser colocadas en una célula transparente, conocida como cubeta que suelen ser rectangulares, con una anchura interior de 1 cm. Esta anchura se convierte en la longitud de ruta, L, en la Ley de Beer-Lambert. También se puede emplear tubos de ensayo como cubetas en algunos instrumentos. Las mejores cubetas están hechas con cuarzo de alta calidad, aunque son comunes las de vidrio o plástico. El cristal y la mayoría de los plásticos absorben en el UV, lo que limita su utilidad para longitudes de onda visibles (189).

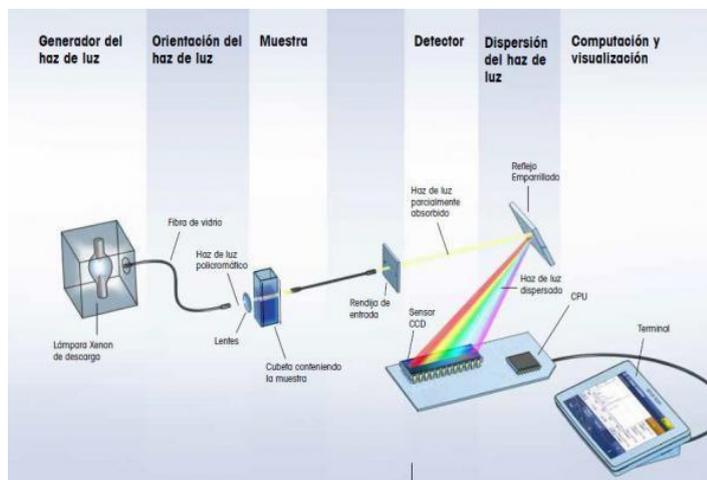


Figura 67. Elementos de un espectrofotómetro UV-Vis (189).

b) Preparación de la muestra

Se preparó una solución de AmB disuelta en N, N dimetil formamida a una concentración de 0,8 mg/mL (800 μ g/mL). La solución resultante se sonicó

durante 1 minuto y posteriormente se tomó una alícuota de 2 mL, la cual se diluyó en 2 mL de N, N dimetil formamida y así sucesivamente hasta obtener concentraciones de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 y 1,56 $\mu\text{g/mL}$. Alicuotas de estas diluciones se transfirieron en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, sobre la que se realizó un barrido espectrofotométrico en un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 200 y 600 nm. La longitud de onda elegida fue de 286 nm en un espectrofotómetro UV-Visible Ultrospec 1100 Pro (Amersham Biosciences).

c) Validación del método analítico

- **Fundamento (ver apartado 3.4.3.1)**

- **Preparación de la muestra**

Se prepararon 5 rectas de calibrado, a partir de la solución madre (800 $\mu\text{g/mL}$), con un rango de concentraciones de: 800; 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 y 1,56 $\mu\text{g/mL}$ de AmB (figura 66). Se realizaron diluciones dobles seriadas, utilizando como disolvente una mezcla N, N dimetil formamida.

El método fue validado en términos de linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación y límite de detección.

3.4.4 Tamaño de gota y micela

El tamaño medio (*Z-average*, *Z-ave*) y el índice de polidispersión o *Polydispersion Index* (PDI), se determinó con un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments).

a) Fundamento de la técnica

La técnica utilizada para la medida del tamaño de gota es la espectrometría de correlación fotónica o *Dynamic Light Scattering* (DLS) también conocida como *Photon Correlation Spectroscopy* (PCS) que permite determinar partículas que se encuentran en un intervalo comprendido entre 0,003 y 3 micras. Esta técnica espectroscópica se basa en la medida de las variaciones de la intensidad de la

luz dispersada, debidas al movimiento browniano de las partículas de la muestra. Es calculada mediante el coeficiente de difusión translacional, representado por la letra D , usando la ecuación de Stokes-Einstein.

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Donde: $d(H)$ corresponde al diámetro hidrodinámico, D es el coeficiente de difusión translacional, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y η es la viscosidad (190). A continuación, se describen algunas teorías en la que se fundamentan la dispersión de luz.

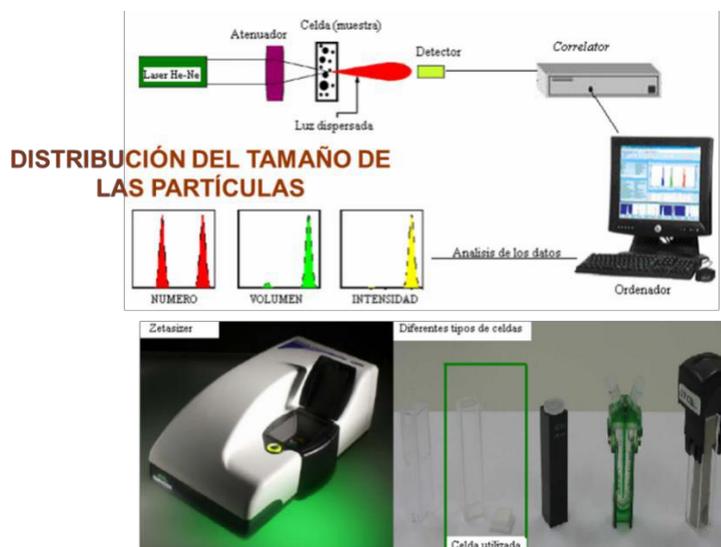


Figura 68. Zetasizer Malvern para la medición del tamaño de gota y polidispersión de los compuestos (191).

El equipo de la espectrometría de correlación fotónica (figura 68) consta de una fuente de radiación láser, una celda termostatazada, un tubo fotomultiplicador que actúa como detector y el correlador o procesador digital que realiza el análisis de las señales detectadas a partir de las fluctuaciones de la radiación dispersada por una gota o una determinada población de éstas. El detector está montado sobre un goniómetro, de tal forma que las señales analíticas se reciban a un ángulo determinado (90° en nuestro caso), respecto a la radiación incidente (192).

b) Preparación de la muestra

Antes de la medición, las muestras con AmB, sin diluir, se colocaron en células de 10 mm. Las lecturas se hicieron a 25°C. Los valores de tamaño de gota y PDI se obtuvieron a partir del promedio de tres mediciones.

3.4.5 Estudio morfológico de la nanoemulsión por Microscopía Electrónica de Transmisión

Para la determinación de la morfología interna de la nanoemulsión se utilizó la microscopía electrónica de transmisión (180) o *Transmission electron microscopy* (TEM). Esta técnica sirvió para corroborar el tamaño y el grado de homogeneidad de la muestra.

El examen morfológico se realizó utilizando un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1010 de JEOL Ltd.

a) Fundamento de la técnica

En el microscopio electrónico de transmisión se irradia una muestra delgada con un haz de electrones de 200 keV. Parte de esos electrones es transmitida, otra parte es dispersada y otra parte da lugar a interacciones que producen distintos fenómenos como emisión de luz, electrones secundarios y Auger, rayos X, etc. Se emplea la transmisión/dispersión de los electrones para formar imágenes, la difracción de los electrones para obtener información acerca de la estructura cristalina y la emisión de rayos X característicos para conocer la composición elemental de la muestra.

Para que se produzca la transmisión de electrones a través de la muestra es necesario que ésta sea delgada, es decir, transparente a los electrones. Es recomendable no utilizar muestras de más de 100 nm de grosor ya que cuanto menor sea el espesor de la muestra mejor calidad de imágenes se puede obtener.

Las aplicaciones de la técnica son muy numerosas tanto en ciencia de materiales, como en ciencia biomédica. Permite la determinación de la morfología de los materiales (forma, dimensiones y posición de microcristales o partículas observadas en la muestra), su cristalografía (posición de los planos cristalinos, estudio de los defectos, etc.) así como su composición química del material (132).



Figura 69. Microscopio electrónico de transmisión (132).

b) Preparación de la muestra:

Las muestras de nanoemulsión se colocaron en una rejilla metálica que actúa como soporte, se sometieron a una tinción negativa con acetato de Uranilo al 1% durante 60 segundos. Transcurrido ese tiempo se eliminó el exceso de colorante, se secó a temperatura ambiente y se observaron al microscopio electrónico de transmisión.

3.4.6 Estudio morfológico del hidrogel por Microscopía Electrónica de Barrido

La estructura interna del hidrogel se examinó mediante microscopía electrónica de barrido o *Scanning Electron Microscope* (SEM), usando el equipo Jeol J-7100F de JEOL Ltd.

a) Fundamento de la técnica

La microscopía electrónica de barrido es una de las técnicas más versátiles en el estudio y análisis de las características microestructurales de objetos sólidos; permite observar la muestra en un estado lo más parecido al natural, sin que sublime ni se modifique. Las imágenes que genera son en tres dimensiones, con una gran profundidad de campo, lo cual permite que se enfoque gran parte de la muestra; y de alta resolución, por lo que las muestras pueden ser examinadas a una alta magnificación.

Esta técnica de microscopía, utiliza electrones en lugar de luz visible para formar la imagen, electroimanes en lugar de lentes y por último, las muestras se hacen conductoras metalizando su superficie con metales como el oro o el platino.

El equipo cuenta con un dispositivo (filamento) que genera un haz de electrones acelerados que viajan a través de un cañón que barren la muestra (figura 70). Un detector mide la intensidad de los electrones generados por la interacción con la superficie de la muestra, siendo capaz de mostrar una imagen que refleja las características superficiales de la misma, pudiendo proporcionar información de las formas, texturas y composición química de sus constituyentes. Los microscopios electrónicos sólo pueden ofrecer imágenes en blanco y negro puesto que no utilizan luz visible (191).

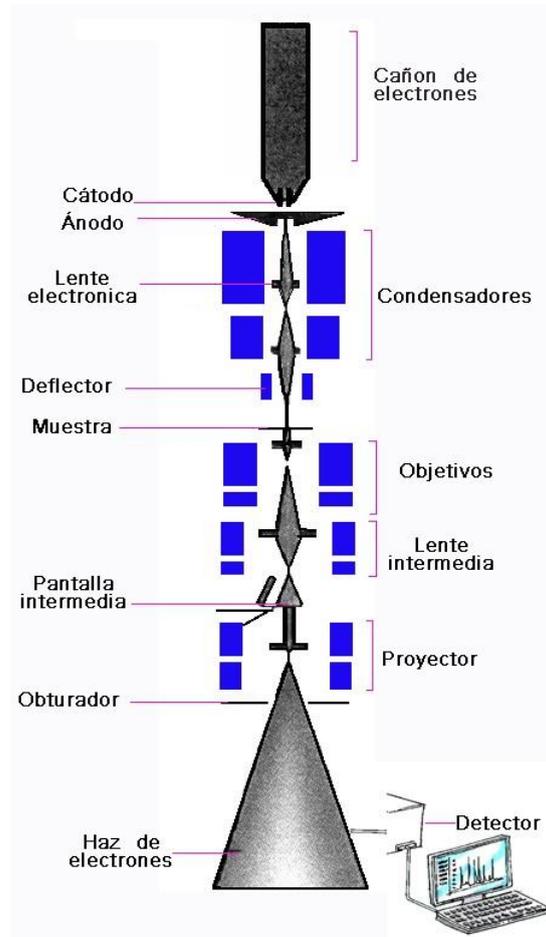


Figura 70. Esquema del Microscopio Electrónico de Barrido (192).

b) Preparación de la muestra

Los geles se secaron en un desecador, aplicando vacío por 30 min cada 4 h durante 48 h. Los geles secos se cubrieron con carbono.

3.4.7 Determinación del pH

Los valores de pH se midieron con un pHmetro digital Crison 501 de Crison Instruments S.A. (figura 71).



Figura 71. Esquema del pHmetro (193).

a) Fundamento de la técnica

El pH es una medida de acidez de una solución y se define convencionalmente como el logaritmo negativo de la actividad del ión hidrógeno: $\text{pH} = -\text{Log}_{10} \text{AH}^+$, donde AH^+ es la concentración del ión hidrógeno.

Esta prueba se basa en la determinación de la actividad de iones hidrógeno, empleando un instrumento potenciométrico, con sensibilidad para reproducir pH de 0,05 o 0,005 unidades usando un electrodo indicador al ión hidrógeno como un electrodo de vidrio y un electrodo de referencia apropiado, detectando el aparato el potencial en milivolts (mV) y en unidades de pH.

Para las pruebas de pH se utiliza ampliamente el electrodo de vidrio ya que da una respuesta inmediata a los cambios rápidos de la actividad del ión hidrógeno, aun en soluciones poco reguladas, mediante el desarrollo de un potencial eléctrico en la interface vidrio/líquido. A temperatura constante, este potencial varía linealmente con el pH de la solución que está siendo medida, además de que este electrodo no lo perturban los agentes de oxidación o de reducción (180).

b) Preparación de la muestra

El pH se determina por lectura directa en los viales de las muestras. Este examen se realiza por triplicado en las muestras recién elaboradas.

3.4.8 Contenido de AmB en las formulaciones

El contenido de fármaco en las formulaciones (nanoemulsión e hidrogel con AmB) se determinó siguiendo el método analítico que se describe a continuación.

Una cantidad predeterminada de formulación se disolvió en una mezcla N, N-dimetilformamida/metanol/agua (55:15:30 v/v/v) bajo agitación durante 5 min en un baño ultrasónico Elma Transsonic Digital S T490 DH (ElmaSchmidbauer GmbH). Las soluciones se filtraron a través de una membrana de nylon Millipore® SMWP01300 (Millipore Merck) de 0,45 µm acoplada a jeringa (Sigma Aldrich Co.).

El fármaco extraído se cuantificó mediante el equipo CLAR descrito en el apartado 3.4.3.1.

3.4.9 Estabilidad

La estabilidad de la nanoemulsión con AmB fue ensayada de acuerdo con las Normas ICH (*International Conference on Harmonization guidelines*) a 4 °C ± 3 °C / 60% ± 5% (RH), 25 °C ± 2 °C / 60% ± 5% (RH) y 40 °C ± 2 °C / 75% ± 5% (RH).

Los estudios de estabilidad de la nanoemulsión con AmB incluyeron las siguientes determinaciones en las muestras guardadas a las diferentes temperaturas y humedad anteriormente mencionadas: contenido de AmB (*drug load*, DL), pH, tamaño e PDI de las gotas, a las 24 h, 15 y 30 días de la elaboración de la nanoemulsión. Paralelamente, se compararon visulamente el aspecto y claridad del preparado al inicio y después de 30 días.

En el caso del hidrogel los estudios de estabilidad abarcaron: contenido de AmB (DL), pH, tamaño e PDI de las gotas, a las 24 h, 30, 90 y 180 días de la elaboración del gel. Paralelamente, a estos mismos intervalos de tiempo, se

evaluaron las características organolépticas (aspecto, color, transparencia y consistencia) de las muestras almacenadas 4 °C y 25 °C.

3.4.10 Predicción de estabilidad de las formulaciones a corto plazo

El análisis de estabilidad y la determinación de la vida útil son criterios clave en los estudios de sistemas dispersos como emulsiones, suspensiones y espumas.

El análisis de la estabilidad física de los dos sistemas coloidales desarrollados, en condiciones aceleradas, se llevó a cabo mediante el analizador óptico TurbiscanLab® Expert de Formulacion Co. (figura 72), basado en el análisis de la dispersión múltiple de la luz de los perfiles de transmisión (T) durante 24 h, con una fuente de luz pulsada cercana al infrarrojo ($\gamma = 880 \text{ nm}$) a 25 °C.

a) Fundamento de la técnica

El Turbiscan Lab® Expert utiliza el análisis de dispersión múltiple de la luz (*Múltiple Light Scattering*) para la predicción de la estabilidad física a largo plazo de las formulaciones elaboradas (194-196). El principio de esta técnica se basa en la medición de la retrodispersión (*Backscattering*, BS) y las señales de transmisión (*Transmission*, T), debidas a las fluctuaciones del tamaño y el volumen de las partículas, o dicho de otro modo, de los fenómenos de migración o de agregación de las partículas, respectivamente.

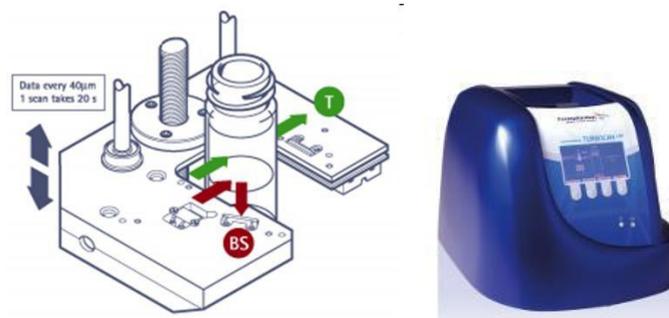


Figura 72. Turbiscan Lab® Expert (197).

La fuente de luz es, una fuente de luz pulsada muy cercana al espectro infrarrojo (longitud de onda = 880 nm _IR). Dos sensores ópticos sincronizados reciben respectivamente la luz transmitida a través de la muestra (0° de la radiación incidente, sensor T), y la luz retrodispersada por la muestra (135° de la radiación incidente, detector BS) (198). Las formulaciones ensayadas en este estudio son translucidas, por lo que solo se evaluaron las señales de transmisión para predecir la estabilidad a largo plazo.

b) Preparación de la muestra

Varias muestras de 15 mL de cada una de las dos formulaciones, sin diluir, se situaron en celdas de vidrio cilíndricas (diámetro de 27,5 mm y altura de 70 mm) y fueron escaneadas en toda su longitud por el cabezal de lectura.

3.4.11 Deteminación de la extensibilidad

El estudio de la capacidad de extensibilidad de un producto proporciona una medida del umbral de deformación del sistema y guarda una estrecha relación con las características reológicas de los fluidos. Un gel no debe ser ni poco extensible (muy viscoso), ni demasiado extensible (muy fluido) ya que complicaría el envasado y la utilización del producto además de proporcionar atributos sensoriales desfavorables para el seguimiento de la terapia por parte del paciente, por lo que se requiere que esté en un término medio y se mantenga estable con el tiempo (199).

a) Fundamento de la técnica

La técnica consiste en determinar el incremento de superficie de una muestra situada entre dos planos paralelos, bajo la acción de una fuerza de aplastamiento progresivamente creciente, mediante la adición de pesas de menor a mayor peso.

Se utilizó un dispositivo denominado extensómetro desarrollado en la Unidad de Tecnología Farmacéutica del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Fisicoquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona (200).

El aparato (figura 73) incluye dos cilindros coaxiales de acero inoxidable y una placa cuadrada de plástico (7,8 cm de lado), transparente y reticulada (2 mm entre líneas) y 15 g de peso. El cilindro externo de 37 mm de alto y 50 mm de diámetro presenta una cavidad central (175,8 mm² de base) en toda su altura a través de la cual encaja perfectamente el cilindro interno.

Dicho cilindro externo se ensancha en su parte superior para formar una placa circular de 90 mm de diámetro (3 mm de grosor). Además está provisto de una palanca destinada a girar este elemento hacia la derecha o hacia la izquierda. Por otra parte en su base presenta una diferencia de nivel de 2 mm entre las dos medias partes.

Este cilindro interior está en posición fija en la parte central de un soporte redondo 40 mm de alto y 100 mm de diámetro. Sobre el soporte, hay un tornillo superior redondo, de 2 mm de altura, destinado a elevar el cilindro exterior de 2 mm cuando la palanca gira 180 °, y así poder definir en el centro del dispositivo una matriz donde se depositará la muestra a analizar.



Figura 73. Extensómetro y modo operatorio.

b) Procedimiento

El aparato se atemperó a diferentes temperaturas: a 4 °C para el hidrogel y a 25 °C tanto para el hidrogel como para la nanoemulsión.

Los pasos básicos del método fueron los siguientes:

- ① Se introdujo el cilindro interior en la cavidad del cilindro exterior. En esta "Posición de espera", las partes superiores de ambos cilindros están en el mismo nivel.
- ② Se giró la palanca 180° para dejar el conjunto en la "Posición de llenado", apareciendo una cavidad (2 mm de profundidad y 175,8 mm² de área) en la parte central del dispositivo. Se llenó la cavidad con la muestra (0,5 g) y se niveló cuidadosamente.
- ③ Se colocó la placa transparente (15 g) en la parte superior del cilindro exterior y se giró la placa 180° en la misma dirección que antes, dejando así el conjunto en "Posición de medición", con la muestra situada entre la placa de plástico y la base metálica, aplastada por el peso de la placa.
- ④ Se dejó transcurrir 2 min y se determinó el área de extensión de la muestra, calculada a partir de las lecturas de dos diámetros (horizontal y vertical del círculo) y mediante la fórmula ($Ext = \pi \cdot \frac{d^2}{4}$), donde d es el valor medio de los dos diámetros medidos.
- ⑤ A continuación, se colocó la pesa más pequeña de la serie seleccionada (7, 12, 14, 17 y 22 g) para la nanoemulsión y el hidrogel a 4 °C. Se empleó una serie diferente de pesos (35, 85, 185 y 285 g) en el caso del hidrogel a 25 °C, al ser el preparado mucho más viscoso a esta temperatura.
- ⑥ Transcurridos 2 min, se retiró la pesa para proceder a la lectura de los diámetros y calcular la nueva área de extensión. Finalmente los datos experimentales se ajustaron a diferentes modelos matemáticos utilizando un software especializado.

3.4.12 Estudio reológico

Fundamento de la técnica

La reología es una disciplina científica que concierne el estudio de la deformación y flujo de los materiales. Los ensayos están encaminados a la determinación de parámetros que permiten la caracterización de los comportamientos reológicos de productos líquidos, sólidos y semisólidos. Éstos pueden proporcionar información importante sobre la estabilidad, características sensoriales, comportamiento de dispersión, formas de dosificación y aplicación (201).

En el caso de los fluidos (líquido y semisólidos), un ensayo habitual consiste en la determinación de la variación del esfuerzo de cizalla o *shear stress* (τ) y de viscosidad (η) en función del incremento del gradiente de velocidad de cizalla o *shear rate* ($\dot{\gamma}$), obteniéndose la curva de flujo $\tau = f(\dot{\gamma})$ y la curva de viscosidad $\eta = f(\dot{\gamma})$, respectivamente (202).

En función de la cizalla impuesta (figura 74), los fluidos se pueden clasificar de la siguiente manera (202).

- *Fluidos newtonianos*: el tipo más simple de comportamiento del flujo, donde la viscosidad es constante, independiente de la velocidad de cizalla aplicada.
- *Fluidos no newtonianos*, cuando la viscosidad varía al incrementar la velocidad de cizalla aplicada, diferenciando los siguientes tipos:
 - Pseudoplásticos: la viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de cizalla pero sin límite de fluidez o esfuerzo umbral.
 - Plásticos: debe aplicarse un esfuerzo umbral (*yield stress*) para el material empiece a fluir, distinguiéndose los plásticos ideales (modelo de Bingham) de los reales (otros modelos).
 - Dilatantes: la viscosidad aumenta al incrementar la velocidad de cizalla.

Por otra parte, en función del tiempo de cizallamiento se pueden diferenciar los siguientes compartimientos:

- Fluidos tixotrópicos.
- Fluidos reopécticos / antitixotrópicos.

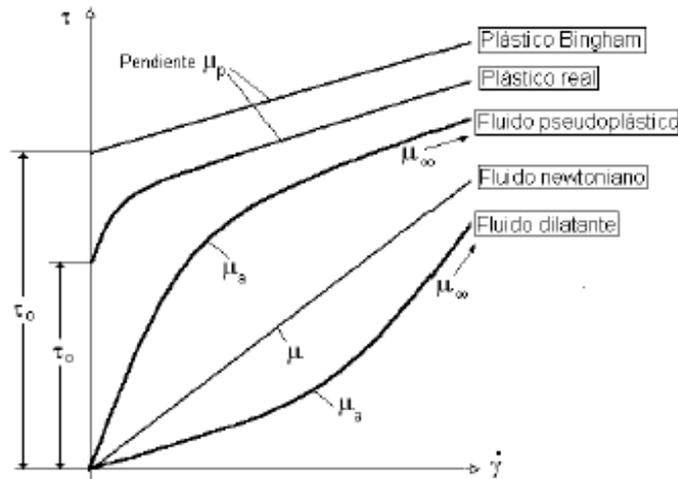


Figura 74. Diferentes tipos de curva de flujo $\tau = f(\dot{\gamma})$.

Se indica a continuación los modelos matemáticos habitualmente utilizados para describir los diferentes tipos de flujos anteriormente citados.

➤ **Newton:** $\tau = \eta \cdot \dot{\gamma}$ (donde τ = esfuerzo de cizalla, η = viscosidad dinámica, $\dot{\gamma}$ = velocidad de cizalla).

➤ **Ostwald de Waele (ley de potencia):** $\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$ (donde τ = esfuerzo de cizalla, K = constante de consistencia, $\dot{\gamma}$ = velocidad de cizalla y n = índice de flujo).

Es el más simple de los modelos. Cuando $n < 1$, el modelo predice un comportamiento pseudoplástico y cuando $n > 1$, da un comportamiento dilatante. Cuando $n = 1$, el modelo se reduce a la ley de Newton de la viscosidad con $\eta = K$.

➤ **Cross:** $\tau = \dot{\gamma} \cdot (\eta_{\infty} + (\eta_0 - \eta_{\infty}) / (1 + (\dot{\gamma} / \dot{\gamma}_b)^n))$.

Donde τ = esfuerzo de cizalla, $\dot{\gamma}$ = velocidad de cizalla, η_0 = viscosidad a esfuerzo de cizalla tendiendo a cero, η_∞ = viscosidad a velocidad de cizalla infinita y n = índice de flujo).

➤ **Bingham:** $\tau = \tau_0 + (\eta_p \cdot \dot{\gamma})$

Donde τ = esfuerzo de cizalla, τ_0 = límite de fluidez, $\dot{\gamma}$ = velocidad de cizalla y η_p = viscosidad plástica).

El límite de fluidez o umbral de fluencia es el valor del esfuerzo de cizalla cuando la velocidad de cizalla tiende a cero (199).

➤ **Casson:** $\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_0} + \sqrt{K} \sqrt{\dot{\gamma}}$ o $\tau = \sqrt{(\tau_0^n + (\eta_p \cdot \dot{\gamma})^n)}$

Donde τ = esfuerzo de cizalla, τ_0 = límite de fluidez, K = constante, $\dot{\gamma}$ = velocidad de cizalla, η_p = viscosidad plástica y n = índice de flujo).

➤ **Herschel-Bulkley:** $\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n$

Donde τ = esfuerzo de cizalla, τ_0 = límite de fluidez, K = constante, $\dot{\gamma}$ = velocidad de cizalla y n = índice de flujo.

a) Procedimiento

Las propiedades reológicas de la nanoemulsión y del hidrogel con AmB se determinaron por duplicado a las 24 h de su elaboración, utilizando el reómetro Haake RheoStress1 (figura 75), en modo rotacional, conectado a un baño termostático Thermo Haake Phoenix II + Haake C25P (Thermo Fisher Scientific S.L., Madrid, España). El reómetro estaba también conectado a un ordenador PC provisto del programa Haake Rheowin® Job Manager v. 4.2 para la toma de datos y del programa Haake Rheowin® Data Manager v. 4.2 para realizar el tratamiento de estos datos.

Para el análisis de la nanoemulsión se utilizó como elemento rotor un cono Haake C60/2Ti (diámetro de 60 mm, ángulo de 2° y 0,105 mm de distancia entre el cono móvil y placa fija) y se ajustó la temperatura de trabajo a 25 °C.

Para el

hidrogel se utilizó una placa-rotor Haake PP60Ti (diámetro de 60 mm y 0,5 mm de distancia entre el placa mobil y placa fija) y, dadas la termorreversibilidad del gel, se establecieron dos temperaturas de trabajo 4 y 32 °C.

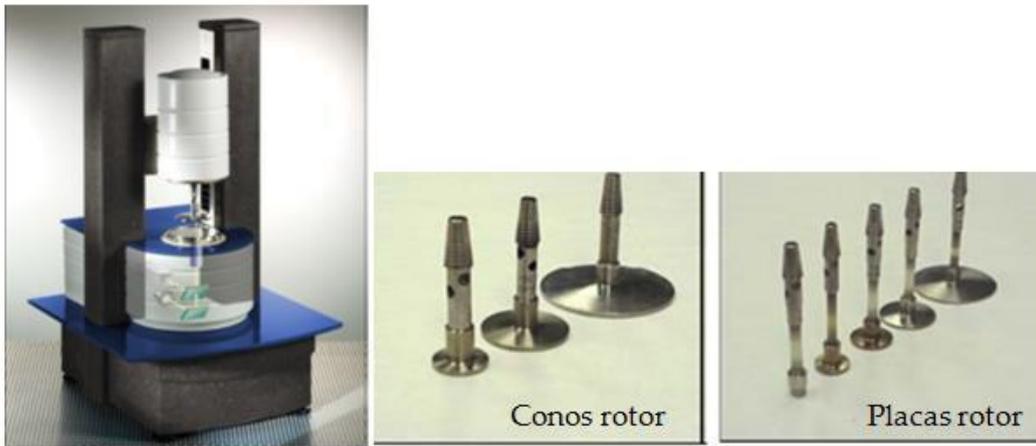


Figura 75. Reómetro Haake RheoStress1 y elementos rotores (203).

Se programó el equipo para realizar un barrido de velocidad de cizalla en tres etapas: ① un tramo ascendente de 3 min con incremento progresivo de $\dot{\gamma}$ de 0 a 100 s^{-1} , ② un tramo a velocidad de cizalla constante a $\dot{\gamma} = 100 \text{ s}^{-1}$ de 1 min y ③ un tramo descendente de 3 min con disminución progresiva de $\dot{\gamma}$ de 100 a 0 s^{-1} .

Aproximadamente 3 mL de muestra se colocaron sobre la placa fija del reómetro, de los que se eliminó el excedente una vez situado el elemento rotor en su posición de medida, para luego someter la muestra a las condiciones de cizalla programadas y a la temperatura establecida. Al final de cada ensayo se obtuvieron las correspondientes curvas de flujo y de viscosidad.

Respecto al tratamiento de datos, se realizó un estudio de regresión a partir de los datos de los tramos ascendente y descendente de cada curva de flujo $\tau = f(\dot{\gamma})$, para determinar cuál de los modelos matemáticos anteriormente descritos se ajustaba mejor a dichos datos experimentales, basándose en el valor del coeficiente de correlación (r). Por otra parte, se determinó el valor medio de viscosidad a partir de los datos del tramo a cizalla constante ($\dot{\gamma} = 100 \text{ s}^{-1}$) de cada curva de viscosidad $\eta = f(\dot{\gamma})$.

3.4.13 Estudio de cesión *in vitro*

El perfil de liberación de la AmB del vehículo nos brinda una importante información que podría utilizarse para predecir el comportamiento de los fármacos a nivel *in vivo* (204).

3.4.13.1 Células de Franz y método operatorio

Para realizar los ensayos de liberación *in-vitro* del fármaco se utilizaron células difusoras verticales de Franz FDC 400 (Crown Glass) con membranas de diálisis de celulosa (MWCO 12 kDa).

a) Fundamento de la técnica

Las celdas de Franz representan uno de los principales métodos utilizados para evaluar la penetración transepitelial y la liberación de fármacos. Cada célula está compuesta por dos cámaras separadas por una membrana de origen animal, humana o sintética que permite evaluar la difusión de moléculas biológicamente activas de una cámara a otra (figuras 76 y 77). En el compartimento superior, se adiciona una solución o dispersión que contiene el compuesto activo y en el inferior se toman las muestras correspondientes, que posteriormente son cuantificadas mediante técnicas analíticas.



Figura 76. Imagen de la celda de Franz (izquierda y en medio) y esquema de los componentes de una celda de Franz (derecha).

El área útil para la difusión entre los dos compartimentos es de 2,54 cm² y el volumen aproximado del compartimento receptor es de aproximadamente 12 mL. El compartimento inferior o receptor se llena con la solución receptora; se coloca la membrana de difusión en la célula y se acaba de completar el volumen con la solución receptora a través del tubo lateral, de manera que durante el ensayo la solución esté siempre en contacto con la cara inferior de la membrana de difusión. Es muy importante evitar la formación de burbujas de aire para mantener constante la superficie de contacto líquido/membrana de difusión durante la experiencia.

La temperatura se mantiene constante en el interior de la celda a $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante todo el tiempo de ensayo. La homogenización del sistema se consigue mediante agitación de la solución receptora con un núcleo de agitación magnético recubierto de teflón y movido por un agitador externo.

En el compartimento superior o donante se sitúa la formulación objeto de estudio, la cual se aísla del medio ambiente para evitar la evaporación y/o contaminación mediante el sellado de este compartimento con una laminatermoplástica (Parafilm[®]).

Deben tenerse en cuenta las condiciones *SINK* en cuanto a la cantidad de fármaco que se siembra, es decir, la concentración de AmB en el medio receptor,

en caso de que se liberara el 100%, debe ser inferior al 20% de la concentración a saturación del fármaco en dicho medio (205, 206).

b) Preparación de la muestra

En el caso de la nanoemulsión se utilizó como medio receptor metanol/N-dimetilformamida/agua (55:15:30 v/v/v), bajo agitación a 600 rpm, asegurando las condiciones *SINK*. Cantidades adecuadas de nanoemulsión de AmB o de solución simple AmB (en DMSO) equivalente a 500 µg de AmB se agregaron al compartimiento donante. Se extrajeron alícuotas de 200 µL de la cámara receptora en tiempos preseleccionados durante 75 horas, reemplazados por el mismo volumen de medio receptor. Las muestras extraídas se analizaron por CLAR.

En el caso del hidrogel se utilizó como medio receptor N,N-Dimetilformamida bajo agitación a 600 rpm, asegurando las condiciones *SINK*. Cantidades adecuadas del hidrogel equivalentes a 400 µg de AmB se agregaron al compartimiento donante. Se extrajeron alícuotas de 300 µl de la cámara receptora en tiempos preseleccionados durante 24 h, reemplazados por el mismo volumen de medio receptor y se analizaron por CLAR.

3.4.13.2 Cinética de liberación

Para determinar la cinética que explica mejor el proceso de liberación en cada formulación, se ajustaron los datos experimentales a modelos matemáticos que intentan describir el curso evolutivo del proceso de difusión. Se ensayaron seis modelos cinéticos diferentes (orden cero, primer orden, Korsmeyer Peppas, Higuchi, Función de Weibull y Boltzmann sigmoidal) (207).

3.4.13.3 Elección del modelo cinético

Se realizó una regresión no lineal por mínimos cuadrados y un análisis de los parámetros del modelo calculados, utilizando el software WinNonLin®

(WinNonlin® Professional Edition Versión 3.3, Pharsight Corporation, CA) y GraphPad Prism versión 3.00. Se determina el Criterio de Información Akaike (AIC) para cada modelo, ya que es un indicador de la idoneidad del modelo para un determinado conjunto de datos.

La ecuación se expresa como sigue: $AIC = n \ln SSQ + 2p$ (180)

Donde:

n: número de parejas de valores experimentales

SSQ: suma de cuadrado de los residuos

p: numero de parámetros de la función de ajustado

Este criterio se basa en el hecho de que los valores residuales han de estar distribuidos aleatoriamente y la suma de los cuadrados (SSQ) ha de ser mínima. Además, tiene en cuenta que cuanto mayor es el número de parámetros de la función de ajustado (p), mayor es la posibilidad de que sea menor el valor de SSQ. La función que presente el menor valor AIC es la que, estadísticamente explica mejor el proceso de difusión estudiado.

3.4.14 Estudios de permeación *ex vivo*

a) Fundamento de la técnica

La técnica más utilizada para evaluar la permeación transdérmica de un fármaco *in vitro* a través de la piel es el método de las células de difusión vertical de Franz, la misma técnica comentada anteriormente.

Tal como se ha indicado, la célula consta de un compartimento donador donde se deposita la forma farmacéutica a ensayar, separado por una membrana de un compartimento receptor que simularía el tejido subyacente vascularizado donde el fármaco en este compartimento sería el susceptible de distribuirse sistémicamente. La membrana más adecuada para la realización de estos estudios es la piel humana, aunque en ausencia de ésta se puede utilizar piel de

cerdo, que presenta propiedades histológicas, bioquímicas y un perfil de permeabilidad similar a la humana (208).

Dos son los puntos críticos para la evaluación de la permeación transdérmica y transmucosa mediante esta técnica. El primero es la integridad y el mantenimiento de las propiedades de barrera de la piel que pueden evaluarse *in vitro* mediante la medición de la pérdida de agua transepitelial o *Transepidermal Water Loss* (TEWL). El otro punto crítico es el mantenimiento de las condiciones *SINK* a lo largo del experimento. Así, el volumen del medio receptor debe ser por lo menos tres veces mayor al necesario para formar una solución saturada de fármaco. De esta manera se asegura que la permeación del fármaco no se vea limitada por la solubilidad del mismo en el medio receptor.

b) Procedimiento

La piel humana se obtuvo de la región abdominal de mujeres (Departamento de Cirugía plástica, Hospital Barcelona-SCIAS, Barcelona, España). El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital Barcelona-SCIAS (referencia número: BEC/001/16) (98). Formularios de consentimiento informado fueron proporcionados a los voluntarios.

La piel humana proporcionada fue cortada con un dermatomo GA630 dermatoma de Aesculap, en piezas de un espesor de 400 μm (179). La integridad de las muestras de piel se evaluó por triplicado midiendo los valores de pérdida transepidérmica de agua (TEWL) con el dispositivo que se describe más adelante. Los tejidos con valores TEWL superiores a 10 $\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$ fueron descartados del experimento.

Para ambas formulaciones, los estudios de permeación en la piel se realizaron en células de difusión de tipo Franz, como se describió previamente, utilizando Transcutol® P como medio receptor que permite condiciones *SINK*. Se tomaron alícuotas de 300 μL mediante una jeringa desde el centro del compartimento

receptor a diferentes intervalos de tiempo por 36 h para la nanoemulsión y 24 h para el hidrogel, reemplazadas con volúmenes iguales del medio receptor.

Se determinó la cantidad de AmB en las alícuotas, por triplicado, mediante CLAR.

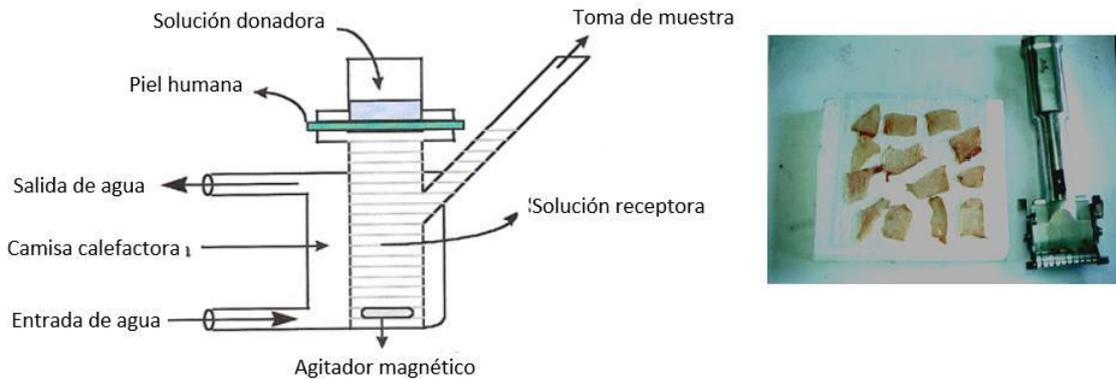


Figura 77. Esquema del montaje de una celda de Franz con piel humana cortada con dermatomo (209).

3.4.15 Estudios de retención en piel

a) Selección de la técnica

La determinación de la cantidad de fármaco retenido en la piel aporta una idea sobre la eficacia de un tratamiento local. Existen diversos métodos que permite esta valoración:

- **Extracción por disolvente:** consiste en la maceración de la piel en un determinado disolvente, que es analizado posteriormente. Éste es el método que se seleccionó al ser rápido, sencillo y apto para prácticamente todos los principios activos. El inconveniente que representa esta técnica es que no da información acerca del fármaco retenido en cada capa de la piel, sino que da una información para la piel completa (210).
- **Cuantificación mediante cortes horizontales:** consiste en cortar la piel en láminas paralelas de espesor variable mediante un criomicrotomo. El

fármaco retenido en cada lamina es extraído con un disolvente y se cuantifica mediante una técnica analítica (211).

- *Tape stripping*: consiste en aplicar tiras adhesivas en el estrato córneo. Se determina la cantidad de fármaco extraído con cada tira (212).
- Autorradiografía: Se realiza con el fármaco marcado radiactivamente. Mediante sistemas informáticos se puede cuantificar el fármaco en cada estrato de la piel, así como en los folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas (212).
- Espectroscopía: Estas técnicas como la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada, son rápidas pero requieren de instrumentación muy costosa (213).

b) Procedimiento

Una vez realizado el ensayo de permeación en las condiciones experimentales indicadas en el apartado anterior, el fármaco retenido en la piel se cuantificó posteriormente. Para ello, se retiró de las células de Franz la piel utilizada como membrana de permeación; se limpió con una gasa empapada con una solución de dodecilsulfato de sodio al 0,05% y se lavó dos veces con agua destilada. Entonces, se cortó y pesó el área donde se había depositado la muestra. Finalmente, la AmB retenida se extrajo con 1,5 mL Transcutol® P, aplicando ultrasonidos durante 20 min. Las soluciones resultantes se midieron por CLAR para la cuantificación de AmB retenida.

3.4.16 Propiedades biomecánicas de la piel humana

Respecto a las medidas fisiológicas de la piel, en este trabajo se consideraron tres parámetros: la temperatura cutánea, la hidratación del estrato córneo (*Statum Corneum Hydration*, SCH) y la pérdida de agua transepitelial

(*Transepidermal Water Loss*, TEWL). Existen muchas variables que pueden afectar a dichos parámetros. En la tabla 9, se muestran aquellos que afectan al SCH y TEWL.

Tabla 9. Factores que influyen en la hidratación del estrato córneo y pérdida transepidérmica de agua. (+ = influye; - = no influye; ± = dato con controversia) (214).

	Hidratación del estrato córneo (SCH)	Pérdida de agua transepitelial (TEWL)
Edad	+	+
Sexo	-	-
Etnia	±	±
Zona anatómica	+	+
Temperatura de la piel	+	+
Sudor	+	+
Temperatura ambiental	+	+
Humedad	+	+
Estación del año	+	+
Ritmo circadiano	+	±

a) Fundamento de la técnica

La determinación de la temperatura, SCH y TEWL de la piel se basa en el uso de sondas específicas. Concretamente en este trabajo se utilizaron dos módulos, el Tewameter® TM 300 con su sonda específica más la de temperatura y el Corneometer MPA 580 con su sonda específica, ambos de Courage-Khazaka electronic GmbH (figura 78).

A continuación se describen las características de cada una de las tres sondas empleadas.

- **Sonda de temperatura:** La sonda ST500 incluida en el dispositivo permite medidas rápidas y fiables de la temperatura cutánea superficial a través de infrarrojos, con una precisión de $\pm 0,5$ °C, como indicador de la termoregulación de la piel. Su punta plana de 2,4 mm de diámetro mejora la

superficie de contacto entre la sonda y la muestra. Además, a través del sensor interno de temperatura, todas las medidas son automáticamente compensadas.

- **Sonda Tewameter:** es el dispositivo más aceptado a nivel científico para determinar la pérdida de agua transepidérmica de la piel. El método de medición de TEWL se basa en un cilindro hueco que mide la evaporación del agua en forma de gradiente de densidad a través de un sensor de temperatura y humedad relativa. Si la barrera epitelial sufre un mínimo daño, la pérdida de agua incrementa y ésta es medida por la sonda. La evaporación se mide en g/h/m², siguiendo la fórmula (215):

$$\frac{dm}{dt} = -D \times A \times \frac{dp}{dx}$$

Donde,

A = superficie (m²)

m = agua transportada (g)

t = tiempo (h)

D (constante de difusión) = 0,0877 (g/h/m²)

p = presión de vapor de la atmosfera (mmHg)

x = distancia des de la superficie de la piel hasta al punto de medida (m)

La cámara de medición de la sonda Tewameter TM 300 (cámara abierta) es de 1 cm de diámetro. La sonda funciona correctamente en un rango de temperatururas entre 10-40°C y 30-70% de humedad relativa con una precisión en la lectura de la evaporación de agua de ± 0,5 g/h/m² para una humedad relativa ≥ 30% y de ± 1,0 g/ h/m² para una humedad relativa ≤ 30%.

- **Sonda corneómetro:** es el método más utilizado para determinar con precisión y de manera reproducible el nivel de hidratación del estrato córneo de la piel. Consiste en medir la capacitancia del medio dieléctrico mediante una sonda que detecta mínimos cambios en la constante dieléctrica como

resultados de variaciones a nivel de hidratación superficial de la piel. La sonda del Corneometer CM 825 proporciona lecturas con una precisión de $\pm 3\%$.

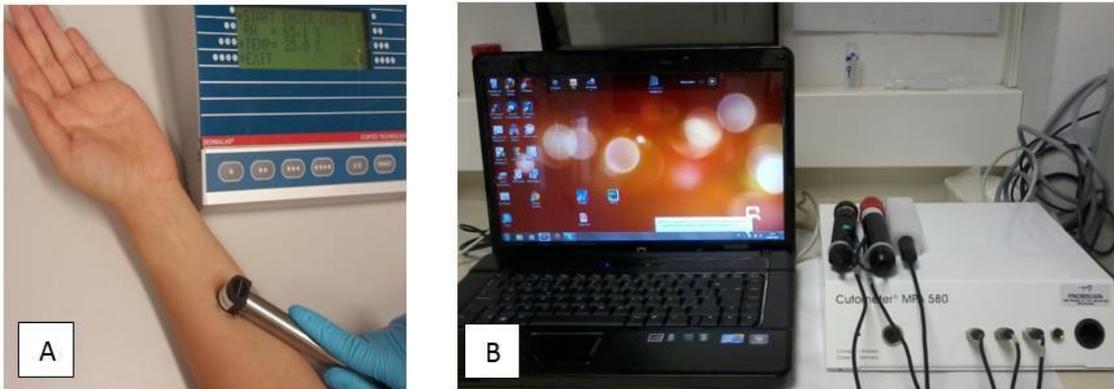


Figura 78. Fotografías del tewametro (A) y del corneómetro (B).

b) Procedimiento

La determinación de propiedades biomecánicas de la piel se realizó para ambas formulaciones objeto de estudio.

Un total de diez mujeres voluntarias entre 25 y 35 años, con piel sana, participaron en el estudio previamente aprobado (referencia IRB00003099) por el Comité de Ética de la Universidad de Barcelona, de acuerdo con las recomendaciones de la Declaración de Helsinki (209). Todas las voluntarias firmaron los formularios de consentimiento informado por escrito.

Se creó un protocolo de estudio definiendo las condiciones, parámetros y variables a tener en cuenta para evaluar los parámetros biomecánicos de la piel en estudios *in vivo*.

Se solicitó a todas las participantes que no utilizaran cosméticos para el cuidado de la piel en las áreas de prueba en los dos días previos al estudio. Se mantuvo a estas voluntarias en la sala de pruebas durante al menos 30 min antes de las mediciones. Se realizaron varias mediciones de los distintos parámetros antes

de aplicar las formulaciones (lecturas basales), inmediatamente después de la aplicación de las formulaciones a razón de 0,5 ml/cm² sobre la superficie de la piel (t_0) y después de 2 h de la aplicación, en el lado flexor del antebrazo izquierdo (216). Los valores de la temperatura de la piel, la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) y la hidratación del estrato córneo (SCH) se registraron con los dispositivos anteriormente descritos. Los resultados de la temperatura se expresan en °C, la SCH en UC (unidad corneométrica) y el TEWL en g/ m²/ h.

3.4.17 Estudios Primarios de Irritación Dérmica (PDI): test de Draize

El estudio de irritación dérmica primaria (*Primary Dermal Irritation*, PDI) se realizó según el método Draize descrito en el Diario Oficial de la República de Francia el 24 de octubre de 1984 (217).

a) Fundamento de la técnica

El test Draize fue desarrollado, hace más de 45 años, por John H. Draize, un toxicólogo que trabajaba para la *Food and Drug Administration* (FDA) de EEUU. Se puso a punto para medir la irritación mediante la observación de los daños que causa una sustancia en los ojos y la piel de los animales. Actualmente está autorizado únicamente para la evaluación de la irritación cutánea.

Se suelen utilizar conejos albinos por distintas razones: son baratos, fáciles de obtener, tranquilos y no agresivos, fáciles de manipular por el personal del laboratorio (figura 79).



Figura 79. Test de Draize en un conejo albino tomado de (218).

En el test Draize de irritación cutánea, se inmoviliza al animal y se aplica la sustancia en la piel afeitada y según el caso escarificada o exfoliada, para lo que en el último caso se aplican varias veces tiras de cintas adhesivas sobre el cuerpo del animal y se retiran rápidamente hasta que se desprenden varias capas de piel (219).

b) Procedimiento

La aprobación ética para el manejo de animales de experimentación se obtuvo del Comité Institucional de Ética Animal (AICE) de la Universidad de Barcelona. Se utilizaron conejos albinos neozelandeses machos adultos que pesaban entre 1,9 y 2,1 kg (Granja San Bernardo, España). El área dorsal del tronco se rasuró con una máquina de afeitar eléctrica 24 h antes del comienzo del ensayo, comprobando que los animales elegidos tuvieran una piel completamente sana. Se realizaron cuatro escarificaciones de 2 cm de longitud con una lanceta, con una separación de 2 cm entre ellas.

Las espaldas de los conejos se dividieron en 4 zonas con la ayuda de una cinta adhesiva. En los conejos número 1, 2 y 3, se aplicaron 0,5 mL de nanoemulsión sin principio activo en el lado superior izquierdo y en el lado inferior izquierdo se aplicaron 0,5 mL de la nanoemulsión con AmB. En la parte superior derecha e inferior derecha, no se aplicó ninguna formulación, tomándola como control negativo.

De la misma forma, en los conejos número 4,5 y 6, se aplicaron 0,5 ml de hidrogel sin AmB en el lado superior izquierdo y se aplicaron 0,5 ml del hidrogel con AmB en el lado inferior izquierdo. En la parte superior derecha e inferior derecha, no se aplicó ninguna formulación, tomándola como control negativo.

Transcurridos 48 h desde la aplicación de las distantes formulaciones, se eliminó las sustancias objeto de estudio para poder puntuar de 0 a 4 (de menor a mayor), en cada zona, tanto la formación de edema como de irritación en la piel expuesta. La puntuación se repitió a los 72 h El valor medio del índice de irritación dérmica primaria individual se determinó para cada conejo sumando las puntuaciones de edema y eritema a las 48 h y 72 h y dividiendo el resultado por 4.

El PDI es el valor promedio de los índices individuales de cada conejo. De acuerdo con el valor obtenido de PDI, los productos se clasifican en: "no irritante" ($PDI < 0.5$), "levemente irritante" ($0.5 < PDI < 2$), "moderadamente irritante" ($2 < PDI < 5$), y "severamente irritante" ($PDI > 5$). Se usaron tres animales para cada formulación.

3.4.18 Estudios microbiológicos

3.4.18.1 Actividad antifúngica *in-vitro* frente a *Candida spp.*

Se utilizó el método de microdilución en caldo para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria o *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC), frente a cepas de *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 66032 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Colección). La CMI se define como la concentración más baja de un agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo.

a) Fundamento de la técnica

Esta técnica consiste en hacer una serie de diluciones del agente antimicrobiano en un medio de cultivo líquido apropiado, que se inocula con un número estandarizado de microorganismos. Esta mezcla se incuba durante un periodo establecido. De este modo se determina la concentración del agente antimicrobiano que ha sido eficaz para inhibir el crecimiento microbiano y obtener la CMI.

b) Procedimiento

➤ Preparación del caldo de cultivo

Se utilizó el medio sintético RPMI 1640 en polvo. Este medio se preparó con glutamina e indicador de pH pero sin bicarbonato. Como el medio sólo contenía 0,2% (p/v) de glucosa, se añadió glucosa hasta un 2%, que es una concentración más adecuada para el crecimiento de las levaduras.

Para la preparación del medio se utilizó tampón MOPS (ácido 3-(N-morfolino)-propanesulfónico) en polvo. El medio de cultivo se preparó al doble de la concentración en agua destilada y se ajustó el pH 7 con NaOH 1M. El medio se filtró (membrana 0,22 µm) y se distribuyó en fracciones de 25 mL en tubos estériles de 50 mL. En el momento del ensayo, para evitar la contaminación bacteriana procedente de las muestras problema no estériles, se añadió cloranfenicol al medio de cultivo a una concentración final de 500 µg/mL. Este antibiótico no interfiere con el crecimiento de hongos y levaduras.

Estas diluciones se realizaron en placas de microdilución con una capacidad nominal de 300 µL/celda. Las más utilizadas son Placas Microtiter® con 96 celdas.

➤ Preparación de la muestra: inóculo

Se preparó un primer cultivo de las cepas de *Candida spp.* a ensayar en Agar Dextrosa de Sabouraud (SDA), incubándolo durante 48 h a 30 °C. De dicho cultivo se realizó una segunda siembra en SDA nuevo, dejando en incubación durante 24 h.

El inóculo se preparó a partir de la segunda siembra, suspendiendo 1-2 colonias en solución Ringer 1/4 hasta una turbidez equivalente a 0,5 en la escala de McFarland. La concentración del inóculo debe estar entre $1-5 \times 10^6$ UFC/mL, donde UFC significa Unidades Formadores de Colonias. A partir de esta suspensión, se realizó una dilución (1:10) en solución de Ringer 1/4, para obtener una suspensión de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL que se utilizó como inóculo final.

➤ Preparación de las placas de microdilución con y sin fármaco

En una placa de microdilución de 96 pocillos (figura 80) se depositó en cada uno 100 μ L de caldo de cultivo (RPMI-1640). En el primer pocillo de la fila 1 se añadió una solución de AmB disuelta en DMSO (300 μ g/mL). En los siguientes pocillos se procedió a la dilución doble seriada de la primera mezcla, para abarcar un rango de diluciones desde 300 a 0,009 μ g/mL de AmB. En la fila 2 de la placa se repitió el proceso para realizar el ensayo por duplicado.



Figura 80. Placa de microdilución Costar® de 96 pocillos.

Este mismo procedimiento se llevó a cabo en las filas 3 y 4 así como en las filas 5 y 6 para conseguir el mismo rango de dilución de principio activo a partir de la nanoemulsión con AmB y del hidrogel con AmB, respectivamente.

En una segunda placa se realizó el procedimiento de dilución seriada y por duplicado con la nanoemulsión (filas 1 y 2) y el hidrogel (filas 3 y 4) sin AmB, a modo de control.

Finalmente, a todos los pocillos se añadieron 100 μ L del inóculo.

Cabe mencionar que además se reservaron 3 pocillos en cada placa para el control positivo (300 μ L del inóculo) y negativo (300 μ L del caldo de cultivo).

Las placas se leyeron a t_0 y luego a las 24h y 48 h después de la incubación a 30 °C, con un dispositivo lector modelo 680 (Bio-Rad, Madrid, España) a $\lambda = 620$ nm.

3.4.18.2 Actividad antifúngica *invitro* para *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

a) Fundamento de la técnica

Es el mismo que el descrito para *Candida spp.*

b) Procedimiento

➤ Preparación del caldo de cultivo

Se utilizó el mismo caldo de cultivo descrito para *Candida spp.*

➤ Preparación de la muestra: inóculo

El procedimiento se basó en el protocolo NCCLS M3 A176 para hongos filamentosos (216). Para ello, se sembró *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (Colección) en una placa con Agar dextrosa de Sabouraud, incubándola durante 5 días a 25 ± 2 ° C.

Posteriormente, las esporas y el micelio se resuspendieron en medio de Ringer 1/4. La suspensión resultante se dejó en reposo durante 5 min para dejar sedimentar las partículas más pesadas y extraer el sobrenadante que se homogenizó mediante vortex durante 15 s.

Las esporas y el micelio sobrenadantes se resuspendieron de nuevo en solución estéril de Ringer 1/4 con unas gotas de Tween 20® con la ayuda de un asa de Digrafsky y se homogenizó la mezcla con un agitador tipo Vortex. A continuación, se dejó sedimentar las partículas pesadas durante 3-5 min y se retiró el micelio de la parte superior, quedando básicamente una suspensión de esporas. Esta suspensión debe de tener una turbidez final de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL

➤ *Preparación de las placas de microdilución con y sin fármaco*

En una placa de microdilución de 96 pocillos se depositó, en cada uno, 100 μ L de caldo de cultivo (RPMI-1640). En el primer pocillo de la fila 1 se añadió una solución de AmB disuelta en DMSO (300 μ g/mL). En los siguientes pocillos se procedió a la dilución doble seriada de la primera mezcla, para abarcar un rango de diluciones desde 150 a 0,0001 μ g/mL de AmB. En la fila 2 de la placa se repitió el proceso para realizar el ensayo por duplicado.

Este mismo procedimiento se llevó a cabo en las filas 3 y 4 así como en las filas 5 y 6 para conseguir el mismo rango de dilución de principio activo a partir de la nanoemulsión con AmB y de la nanoemulsión sin AmB, respectivamente.

Finalmente, a todos los pocillos se añadieron 100 μ L del inóculo. Cabe mencionar que además se reservaron 3 pocillos en cada placa para el control positivo (300 μ L del inóculo) y negativo (300 μ L del caldo de cultivo).

Las placas se leyeron a t_0 y luego a las 24h y 48 h después de la incubación a 30 °C, con un espectrofotómetro Bio-Rad modelo 680 a $\lambda = 620$ nm.

3.4.19 Análisis parasitario

Para el caso de la nanoemulsión con AmB se realizaron pruebas de la actividad leishmanicida en promastigotes de cuatro especies de *Leishmania*: *Leishmania infantum* (MHOM/ ES / 2014/ BCN-855), *Leishmania tropica* (MHOM/ES/2010/ BCN-809), *Leishmania major* (MHOM/ES/2011/BCN-839) y *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/88/BCN-25).

El análisis de la actividad leishmanicida de ambas formulaciones objeto de estudio se realizó en la cepa *Leishmania tropica* (MHOM/ES/2010/BCN-809) en ambos estadios del parásito (promastigotes y amastigotes).

3.4.19.1 Curvas de crecimiento de promastigotes

En teoría los promastigotes se encuentran en su etapa más infectiva a los 6 días, por lo tanto se debe realizar un cultivo de parásito y realizar conteos diarios con el fin de determinar el crecimiento de los promastigotas en su fase exponencial, a modo de control del proceso.

Para ello, en el caso de de las 4 especies de *Leishmania*, el análisis se inició con una suspensión de promastigotes recogidos en fase estacionaria de un cultivo en medio de Schneider. La suspensión se llevó a una concentración inicial de $0,5 \cdot 10^6$ promastigotes/mL y se realizaron recuentos cada 24 h en la cámara de Fuchs-Rosenthal (Brand GMBH + CO KG) para determinar el crecimiento de las cepas en el tiempo (6 días).

3.4.19.2 Determinación de la IC50 en promastigotes

Se utilizó la técnica de fosfatasas ácidas para determinar la concentración inhibitoria del 50% del crecimiento de los promastigotes (*half maximal inhibitory concentration*, IC50) de las cuatro especies de *Leishmania*, correspondiente a la

nanoemulsión con AmB y en la especie de *Leishmania tropica* correspondiente al hidrogel con AmB.

a) Fundamento de la técnica

La fosfatasa ácida son enzimas que cataliza la hidrólisis del enlace éster fosfórico entre un grupo orgánico y un grupo fosforilo a pH alcalino, lo que libera fosfato al medio.

Aprovechando esta reacción enzimática, existe un ensayo que mide la actividad de dicha enzima producida por los promastigotes, empleando como sustrato un éster de fosfato artificial, el *p*-nitrofenilfosfato, cuya hidrólisis da lugar a fosfato y a *p*-nitrofenol (figura 81). Éste último adquiere color amarillo a pH alcalino por lo que se puede cuantificar colorimétricamente a 405 nm.

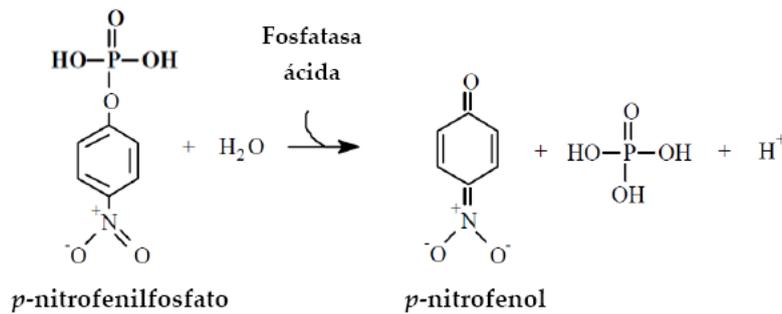


Figura 81. Reacción enzimática de la fosfatasa alcalina producida por los promastigotes (220).

b) Procedimiento del ensayo

➤ Preparación del medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo Schneider Sigma S – 9895, preparando la solución a pH 7 con adición de un 20% de suero bovino fetal inactivado, un 1% de orina humana estéril y un 25 µg/mL de gentamicina. El preparado se envasó en un frasco previamente esterilizado y se almacenó en nevera.

➤ **Preparación de la muestra: inóculo**

En primer lugar se realizó un conteo de promastigotes en una cámara Fuchs-Rosenthal para la preparación de una suspensión final que debe estar a una concentración de $1 \cdot 10^6$ promastigotes/mL. Se procedió de la manera que se describe a continuación.

Se tomaron 100 μ L del medio de cultivo con promastigotes a una concentración desconocida que se depositaron en un tubo Eppendorf[®] de capacidad de 1 mL y se añadieron 900 μ L de formol al 2%. Se tomaron 50 μ L de esta mezcla para depositarla en la cámara Fuchs-Rosenthal[®] (figura 82), para seguidamente proceder al conteo de promastigotes con ayuda de un microscopio óptico Olympus CH-2.

El campo de observación bajo el microscopio estaba formado por 4 x 4 cuadros, como se puede observar en la figura 83. Así, se procedió al conteo visual de los promastigotes presentes en cada uno de los 16 cuadros, lo cual representó el total de promastigotes en el campo de observación. Este conteo se realizó por triplicado.

El número de promastigotes en el medio de cultivo se determinó a partir de siguiente fórmula: Número medio de promastigotes x 80.000 x 10.

Finalmente, se realizó la dilución apropiada para ajustar la concentración final de promastigotes en la solución a $1 \cdot 10^6$ promastigotes/mL.

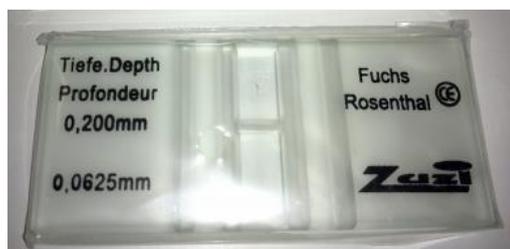


Figura 82. Cámara de conteo Fuchs-Rosenthal[®].

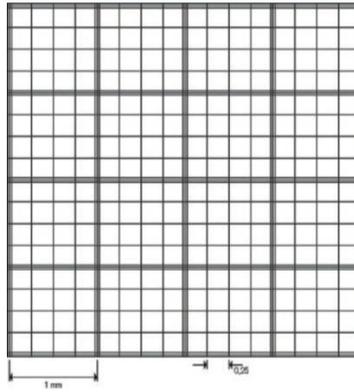


Figura 83. Placa de Fuchs-Rosenthal[®] vista bajo el microscopio utilizada para el conteo de parásitos.

➤ *Preparación de las placas para microdiluciones*

Se utilizó una placa estéril de microtitulación de 96 pocillos (COSTAR[®]) donde se colocaron 100 μ l de medio de cultivo estéril en cada uno de los pozos.

En el primer pocillo de la fila 1 se añadió una solución de AmB disuelta en DMSO (300 μ g/mL). En los siguientes pocillos se procedió a la dilución doble seriada de la primera mezcla, para abarcar un rango de diluciones desde 300 a 0,07 μ g/mL de AmB. En la fila 2 de la placa se repitió el proceso para realizar el ensayo por duplicado.

Este mismo procedimiento se llevó a cabo en las filas 3 y 4 así como en las filas 5 y 6 para conseguir el mismo rango de dilución de principio activo a partir de la nanoemulsión con AmB y del hidrogel con AmB, respectivamente.

En una segunda placa se realizó el procedimiento de dilución seriada y por duplicado con la nanoemulsión (filas 1 y 2) y el hidrogel (filas 3 y 4) sin AmB, a modo de control.

Finalmente, a todos los pocillos se añadieron 100 μ L del inóculo. Cabe mencionar que además se reservaron 3 pocillos en cada placa para el control positivo (300 μ L del inóculo) y negativo (300 μ L del caldo de cultivo).

Las placas se incubaron a 26 °C durante 48 h y se tomaron alicuotas de 40 µL de cada pocillo para traspasarlas a otra placa colocándolas en los pocillos correspondientes, en la misma posición. Se agregaron 100 µL de solución de lisis a cada uno de los pocillos de la nueva placa que se dejó en incubación a 37 °C en Baño María durante 15 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 100 µL de solución de p-nitrofenil fosfato a cada uno de los pocillos para dejar la placa otra vez en incubación a 37 °C durante 2 h. Finalmente, se añadieron a cada pocillo 60 µL de NaOH 0,1 N y se realizó la lectura de absorbancia a $\lambda = 405$ nm con un espectrofotómetro Titertek-Multiskan® Plus MK II 314.

La IC₅₀ se determinó por el método de regresión lineal de los mínimos cuadrados a partir de los datos del crecimiento de promastigotes, frente al logaritmo de la concentración del fármaco.

3.4.19.3 Determinación de la IC₅₀ en amastigotes

a) Fundamento de la técnica

Los amastigotes son el estadio de la leishmaniasis donde los promastigotes han infectado las células humanas, especialmente los macrófagos. Para determinar la IC₅₀ producida por las formulaciones objeto de estudio se debe proceder en primer lugar a una infección *in-vitro* de los promastigotes de *Leishmania trópica* en una línea celular específica, para posteriormente evaluar la actividad leishmanicida frente a amastigotes mediante una técnica de contaje bajo microscopio óptico.

b) Procedimiento del ensayo

➤ Preparación del medio de cultivo

Se utiliza y prepara el medio de cultivo descrito anteriormente para la determinación de IC₅₀ en promastigotes.

➤ *Obtención de los macrófagos*

Se obtuvieron células de macrófago peritoneal de ratón después de la estimulación de ratones Swiss femeninos con 3 ml de tioglicolato sódico al 3%. Después de 48 h, se inyectaron intraperitonealmente 4 mL de suero fisiológico a 4 °C, y después de 15 minutos se recogió el líquido peritoneal y se centrifugó.

➤ *Preparación de las placas para microdiluciones*

Se sembraron un total de 0,3 mL de cultivo de células a una concentración de 500.000 células/mL en 5 placas de portaobjetos LabTek® de 8 pocillos cada una, incubándose a 37°C durante 24 h en una atmósfera de CO₂ al 5%. A continuación, se añadieron 0,3 mL de un cultivo de promastigotes en medio de Schneider, pH 7,0) a una concentración final de 1,0·10⁶ promastigotes/mL, cuyo modo de preparación se ha descrito anteriormente para el ensayo con promastigotes. El cultivo resultante se incubó a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 h y luego se realizaron tres lavados con PBS con el fin de eliminar los promastigotes libres.

En los primeros 6 pocillos de la primera placa se añadieron 0,3 mL de medio RPMI y en el primer de estos se agregó 0,3 mL de una dilución de nanoemulsión con AmB para proceder a una serie de diluciones doble seriadas para abarcar concentraciones de 9,375 a 0,292 µg/mL de AmB. En los pocillos 7 y 8 se añadieron células sanas y células infectadas como medio de control negativo y positivo, respectivamente.

En la placa n° 2 y n° 3, se procedió de la misma manera con una solución de AmB disuelta en DMSO y una solución de hidrogel con AmB, respectivamente. Las placas n° 4 y 5 contenían diluciones correspondientes de nanoemulsión sin AmB y de hidrogel sin AmB, junto con los controles negativos y positivos.

Las 5 placas se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 48 h. Los amastigotes resultantes de estos procesos se lavaron y los portaobjetos se tiñeron con colorante Giemsa al 10%. La actividad leishmanicida de las formulaciones se evaluó contando el número de amastigotes intracelulares (IA) y el número de células infectadas mediante el examen de 300 macrófagos en tres lugares diferentes del área de reacción (100 macrófagos en cada campo de observación). Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Cabe mencionar que las disoluciones de las formulaciones ensayadas fueron previamente filtradas estérilmente para evitar su contaminación (222).

La IC₅₀ se determinó por el método de regresión lineal de los mínimos cuadrados a partir de los datos del crecimiento de amastigotes, frente al logaritmo de la concentración del fármaco.

3.4.20 Ensayos de citotoxicidad

El ensayo de citotoxicidad de las formulaciones estudiadas se realizó mediante una técnica colorimétrica que valora la actividad mitocondrial para determinar el porcentaje de viabilidad celular y de aquí la concentración citotóxica 50 (CC₅₀), la que mata al 50% de las células.

a) Fundamento de la técnica

La citotoxicidad sobre células fue valorada a través del reactivo WST-1 (*cell proliferation reagent* WST-1 de Roche), compuesto por sales de tetrazolium/formazam, que permite medir de forma directa la viabilidad celular después de 24 h del cultivo en presencia de diferentes concentraciones de fármaco y sus formulaciones. También permite, pero de forma indirecta, medir la proliferación celular.

Se trata de un ensayo colorimétrico, no radioactivo, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la degradación de las sales de tetrazolium a sales de formazan mediante la acción de las deshidrogenasas mitocondriales, reacción que se produce de forma natural cuando las células son viables. El color obtenido es directamente proporcional a las células viables.

Valores elevados indican una buena actividad metabólica de la célula mientras que valores bajos son indicativos de daños citotóxicos. Los resultados se expresan en porcentajes de viabilidad celular para luego determinar la IC50.

b) Procedimiento del ensayo

➤ *Líneas celulares utilizadas*

Se seleccionaron dos líneas celulares: línea celular de macrófagos RAW 264,7 de origen tumoral murino, y línea celular de macrófagos J774 de origen tumoral monocítico de ratón. Ambas líneas celulares fueron proporcionadas por Eucelbanc (Facultad de Biología, UB).

Las células RAW 264,7 se cultivaron en medio de cultivo RPMI y las células J774 en medio de cultivo MEM. En ambos casos los medios se suplementaron con Suero Bovino Fetal (SBF) al 10% y penicilina/estreptomicina (respectivamente 100 IU y 100 µg/mL), incubándose a 37 °C y 5% de CO₂.

Tras la incubación, para determinar la concentración de células viables se realizó un conteo previo con azul de tripan. Las líneas celulares se ajustaron a una concentración final de 500.000 células/mL. A continuación, se tomaron cuatro placas de microdilución de 96 pocillos. En cada pocillo de estas placas se depositaron 100 µL de las células a la concentración de 500.000 células/mL, incubándose a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 h. Seguidamente, se realizaron dos lavados con PBS a pH 7,4 para eliminar las células muertas. En la primera y segunda placa se depositaron 100 µL de medio de cultivo RPMI para RAW

264,7 y en una tercera y cuarta placa 100 μL de medio de cultivo MEM para J774). En el primer pocillo de la fila 1 de la placa n^o 1 y n^o 3 se añadió una solución de AmB disuelta en DMSO (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En los siguientes pocillos de la fila se procedió a la dilución doble seriada de la primera mezcla, para abarcar un rango de diluciones desde 300 a 0,009 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AmB. En la fila 2 de estas placas se repitió el proceso para realizar el ensayo por duplicado.

Este mismo procedimiento se llevó a cabo en las filas 3 y 4 así como en las filas 5 y 6 de cada placa para conseguir el mismo rango de dilución de principio activo a partir de la nanoemulsión con AmB y del hidrogel con AmB, respectivamente.

En las placas n^o 2 y n^o 4 se realizó del mismo modo el procedimiento de dilución seriada y por duplicado con la nanoemulsión (filas 1 y 2) y el hidrogel (filas 3 y 4) sin AmB, a modo de control.

Cabe mencionar que además se reservaron 3 pocillos en cada placa para el control positivo (300 μL de las células vivas) y negativo (300 μL del medio de cultivo).

Todas las placas se incuban a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5% de CO_2 durante 24 h. A continuación, se agregaron 10 μL del reactivo WST-1 para volver a incubarse durante 4 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5% de CO_2 . Finalmente, las placas se leyeron a $\lambda = 450 \text{ nm}$ con un espectrofotómetro Titertek-Multiskan® Plus MK II 314.

Para cada muestra ensayada, el porcentaje de viabilidad celular se calcula a partir de la densidad óptica (DO) del control positivo (células viables) y de la DO de la dilución ensayada, puesta en contacto con las células (220), según la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \left(\frac{\text{DO de cada dilución ensayada}}{\text{DO células vivas}} \right) \cdot 100$$

3.4.21 Análisis microscópico de hongos y parásitos

3.4.21.1 Comportamiento de *Candida spp.* frente a las formulaciones mediante Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

La AFM es una técnica extremadamente útil para analizar la estructura tridimensional de la forma y superficie de los hongos y para la investigación de la eficacia y los mecanismos de acción de medicamentos antifúngicos (223).

a) Fundamento de la técnica

El microscopio de fuerza atómica o *Atomic Force Microscope* (AFM) es un instrumento mecánico-óptico que forma imágenes de las superficies utilizando una sonda o micropalanca que recorre la muestra haciendo una exploración línea por línea, es decir escanea la muestra en función de la posición generando una imagen. Esta técnica permite obtener imágenes topográficas en 3D, hacer mediciones del orden de los nm, detectar fuerzas de nN, hacer mediciones de visco-elasticidad y dureza de la muestra, entre otras. La punta del AFM se encuentra montada en una micropalanca, a la cual se le hace incidir un láser (figura 84). Así, cada vez que la punta sube o baja debido a la interacción con la superficie que se encuentra analizando, la micropalanca refleja la desviación del láser a un fotodetector y es interpretada por el software generando una imagen.

Esta técnica es ampliamente utilizada en el análisis de nano-materiales, ya que, a diferencia de un microscopio electrónico no requiere trabajar en condiciones de vacío. Además, la muestra no requiere una preparación sofisticada y tampoco es necesario que la muestra a analizar sea conductora o se encuentre recubierta como en el caso del SEM, por lo que se amplía el rango de muestras que puedan ser analizadas por AFM.

Se pueden llevar a cabo análisis sobre muestras sólidas, polvos, películas delgadas, muestras biológicas, etc, sin embargo la muestra debe ser lo más plana y homogénea posible. No es posible hacer análisis de gases (224).

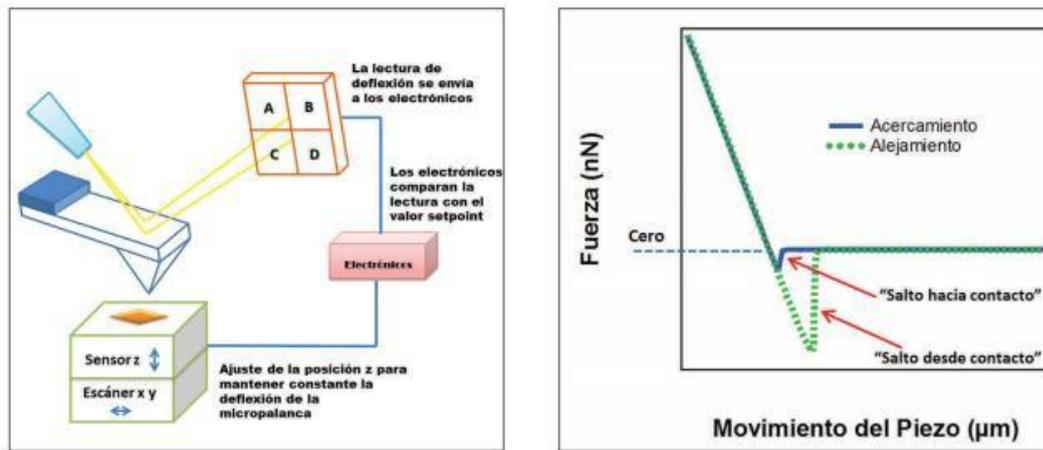


Figura 84. Principios de la microscopía de fuerza atómica (AFM) (224).

b) Procedimiento

➤ Preparación del inóculo

Se preparó una suspensión de *Candida albicans* (Cepa ATCC 10231), tomando una colonia directamente del cultivo y suspendiéndola en una solución de Ringer 1/4 hasta llevarla a una concentración de 0,5 de la escala de McFarland. La suspensión se filtró a través de filtros Millipore® SMWP01300 con un tamaño de poro similar al tamaño de la levadura seguido de un enjuague con PBS para limpiar el filtro de las células no atrapadas. Este filtro se cortó cuidadosamente y se unió a un disco de acero con una pequeña pieza de doble cara adhesiva. Este procedimiento se repitió para el estudio del comportamiento de la levadura frente a las formulaciones objeto de estudio que son: naneemulsión y hidrogel, con y sin AmB.

➤ *Análisis de la muestra por AFM*

Para cada una de las formulaciones estudiadas, la cepa de *Candida albicans* atrapada en el poro del filtro se transfirió a la celda líquida del AFM, evitándose la deshumectación. Se utilizaron micropalancas de nitruro de silicio en forma de V MSNL-10. Con una constante de resorte nominal de 0,03 N/m.

Las células de *Candida albicans* se expusieron en contacto con cada una de las formulaciones objeto de estudio durante un período de 4 h.

Antes de medir la nanomecánica, las constantes de resorte de las micropalancas se determinaron mediante el método del ruido térmico. Las imágenes de AFM se adquirieron en modo de contacto minimizando la fuerza durante el escaneo ajustando continuamente el punto de ajuste, con un ángulo de escaneo de 0° a una velocidad de escaneo de 1,5 Hz. Las imágenes se procesaron usando el software de análisis NanoScope de Bruker.

Las propiedades mecánicas se midieron registrando matrices de curvas de fuerza 32x32, usando una fuerza máxima de 0,5-1 nN para evitar el daño de la muestra, un tiempo de contacto de 100 ms y velocidades de aproximación y retracción de 1,0 $\mu\text{m/s}$. El módulo de Young de levadura se determinó, como primera aproximación, usando el modelo de Hertz.

3.4.21.2 Comportamiento de promastigotes frente a las formulaciones de AmB mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

a) Fundamento de la técnica

Se utilizó la técnica anteriormente descrita en el apartado dedicado al estudio morfológico del hidrogel.

Cabe recordar que las muestras destinadas al SEM han de cumplir dos condiciones: deben estar secas y ser conductoras. El proceso de secado debe

llevarse a cabo preservando al máximo la estructura original de la muestra. Para ello, existen dos alternativas: usar el método clásico de fijación y deshidratación química que el usuario realiza en su laboratorio y finaliza con el secado por punto crítico en las instalaciones donde se realiza la microscopía, o utilizar el moderno método de fijación física por criofijación que ya está acoplado a uno de los microscopios. En ambos casos la muestra necesita recubrirse después con un material que la haga conductora y permita su observación al microscopio. Tal es el caso de las muestras biológicas, requieren fijarse y secarse para poderse observar en el microscopio de barrido. Es importante utilizar todos los materiales estériles para evitar contaminación y por ende falsos positivos.

b) Procedimiento

Se utilizaron dos placas estériles de microtitulación de 96 pocillos (COSTAR®), una para la nanoemulsión y el hidrogel con AmB y la otra para las mismas formulaciones pero sin AmB.

En cada pocillo se colocaron 100 μ L de medio de cultivo Schneider estéril. En el primer pocillo de la fila 1 de la primera placa se añadió la nanoemulsión con AmB. En los siguientes pocillos de esta fila se procedió a la dilución doble seriada para abarcar un rango de diluciones desde 300 a 0,07 μ g/mL de AmB. En la fila 2 de la placa se repitió el proceso para realizar el ensayo por duplicado.

Este mismo procedimiento se llevó a cabo en las filas 3 y 4 para conseguir el mismo rango de dilución de principio activo a partir de la del hidrogel con AmB.

En una segunda placa se realizó el procedimiento de dilución seriada y por duplicado con la nanoemulsión (filas 1 y 2) y el hidrogel (filas 3 y 4) sin AmB, a modo de control.

Finalmente, en todos los pocillos se añadieron 100 μ L del inóculo, preparado según el método indicado en el apartado anterior dedicado a la determinación de la IC50 en promastigotes.

Cabe mencionar que además se reservaron 3 pocillos en cada placa para el control positivo (300 μ L del inóculo) y negativo (300 μ L del caldo de cultivo).

Todas las placas se incubaron a 26 °C durante 48 h. Seguidamente, se seleccionaron para cada formulación los pocillos donde las suspensiones originaban la IC50, previamente determinada. Estos promastigotes se recolectaron en tubos Eppendorff® de capacidad de 1 mL y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. Se procedió a eliminar el sobrenadante, dejando únicamente el precipitado o *pellet* que quedó al fondo del Eppendorff®.

Los pellets se lavaron tres veces durante 10 min con una solución reguladora de fosfato 0,1 M y pH 7,2. En el último lavado los *pellets* se resuspendieron en la misma solución.

Esta suspensión de promastigotes se depositó en un cubreobjetos de vidrio recubierto con poli-L-lisina para fijar los parásitos con una solución de glutaraldehído al 2,5% (v/v) durante 2 h. Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron tres veces durante 10 minutos nuevamente con la solución de fosfato 0,1 M y pH 7,2.

Seguidamente, los promastigotes se lavaron dos veces y durante 10 min con etanol a diferentes concentraciones: 30, 70, 75, 90, 95 y 100%. Cada una de las muestras se almacenó en etanol al 100%, a 5°C durante 24 h para finalmente encontrar el punto crítico.

Las muestras resultantes se cubrieron con carbono. Las imágenes se observaron mediante el dispositivo Jeol J-7100F (JEOL Peabody).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS

4.1 SOLUBILIDAD DE LA AmB

La AmB demostró ser soluble en diversos excipientes ensayados (sustancias oleosas, hidrófilas, sistema emulgente: tensoactivos/cotensoactivos). Se indica en la tabla 10 la cantidad de AmB total disuelta, expresada en mg/mL, en cada uno de los compuestos.

Tabla 10. Solubilidad de la AmB en las diversas sustancias ensayadas.

Tipos de sustancias	Sustancias ensayadas	Cantidad de AmB disuelta (mg/mL)
Sustancias oleosas	Labrafac® Lipofilo	0,25 ± 0,03
	Aceite de ricino	0,92 ± 0,07
	Parafina líquida	0,10 ± 0,02
	Migliol®812	0,19 ± 0,02
Sustancias hidrófilas	Propilenglicol	1,07 ± 0,04
	Transcutol®P	1,13 ± 0,05
	Agua	0,03 ± 0,01
Sistema emulgente	Labrasol®	2,18 ± 0,08
	Twen® 80	2,05 ± 0,06
	Labrafil®M 1944 CS	0,08 ± 0,01
	Plurol®Oleique	0,83 ± 0,03

La AmB mostró mayor solubilidad en el aceite de ricino para el grupo de sustancias oleosas, en el Labrasol® entre los tensoactivos y en el Plurol®Oleique entre los cotensoactivos y finalmente en el Transcutol®P entre las sustancias hidrófilas. Debido a la baja solubilidad de la AmB en agua se decidió prescindir de esta sustancia como posible componente de la nanoemulsión, optando así por una formulación de nanoemulsión anhidra.

Además, para la elección de la mezcla de agentes tensoactivos/cotensoactivos hemos basado en los estudios realizados por Fernández Campos cuya nanoemulsión propuesta llevaba una mezcla de Labrasol®/ Plurol® Oleique en una proporción de 5:1 (225). Además, se describió que el Labrasol® posee poca

irritabilidad cuando se utiliza en sistemas tópicos que incluyen en su formulación fármacos antifúngicos (225) y la eficacia de la mezcla Labrasol®/ Plurol® Oleique se probó como componente en sistemas de administración de fármacos de características anfifílicas (226), y fue seleccionada debido a sus propiedades emulgentes (227).

Por otra parte, se ha indicado en la bibliografía que el Transcutol®P presenta una buena biocompatibilidad con la piel y buena capacidad de solubilización con respecto a la AmB. Además es capaz de retener fármacos, proporcionando un efecto de depósito que, según se cree, se debe a la inflamación de los lípidos intercelulares del estrato córneo sin alteración de su matriz lipídica. Estos lípidos inflamados retienen los compuestos lipofílicos para formar el depósito y aumentar la acumulación del fármaco en la piel, disminuyendo simultáneamente la penetración transdérmica (228, 229). Por estas razones y teniendo en cuenta la buena solubilidad de la AmB en el Transcutol®P, éste último se seleccionó como excipiente para la formulación de la nanoemulsión con AmB.

La elección final de la proporción de cada componente de la formulación integrada por Labrasol®/ Plurol® Oleique (5:1) + Labrasol® + Transcutol®P se realizó a partir del diagrama ternario tal como se indica en el siguiente apartado.

4.2 ELABORACIÓN DEL DIAGRAMA TERNARIO

Se representó en un diagrama ternario cada mezcla de los componentes de los sistemas dispersos elaborados para luego delimitar la zona monofásica del sistema pseudoternario constituida por los puntos correspondientes a las formulaciones con un tamaño de gota en un rango de 20-200 nm. Para ello, transcurridas 24 h de la elaboración de las dispersiones de AmB se procedió a

descartar las formulaciones no homogéneas, es decir las que presentaban ruptura de fases (figura 85). De un total de 52 formulaciones, solamente 12 resultaron ser homogéneas, las 40 restantes se eliminaron del estudio.



Figura 85. Ejemplos de dispersiones no homogéneas descartadas del estudio.

Para la optimización y caracterización de las formulaciones homogéneas se procedió a la determinación del tamaño de gota e índice depolidispersión. En la tabla 11 se exponen los resultados obtenidos.

Tabla 11. Proporciones de los componentes de las mezclas ensayadas para la elaboración de la nanoemulsión de AmB y características de los sistemas dispersos obtenidos. En **negrita** composición finalmente elegida.

MEZCLAS L/P*(5:1) / AC**/ T***	Tamaño de gota	Índice de polidispersión
45:05:50	410,56 ± 02,20	0,89 ± 0,21
45:20:35	152,37 ± 23,27	0,86 ± 0,00
50:05:45	212,67 ± 20,31	0,63 ± 0,23
50:15:35	198,90 ± 34,98	0,45 ± 0,06
45:15:40	126,90 ± 09,83	0,21 ± 0,01
55:05:40	112,90 ± 10,15	0,22 ± 0,02
55:20:25	137,86 ± 20,25	0,73 ± 0,05
60:15:25	174,53 ± 15,52	0,64 ± 0,02
60:20:20	200,90 ± 31,20	0,34 ± 0,23
60:10:30	200,78 ± 12,90	0,23 ± 0,02
65:05:30	154,70 ± 13,04	0,60 ± 0,14
65:25:10	157,90 ± 30,52	0,59 ± 0,23

* L/P: labrasol®/Plurol®oOleique **AC: Aceite de ricino *** T: Trancutol®P

Las dispersiones que presentaron el menor tamaño de gota correspondieron a las siguientes composiciones (indicadas en partes) de Labrasol®/Plurol®Oleique (5:1) / Aceite de ricino /Transcutol®P: 45:15:40, 45:20:35, 50:15:35, 55:05:40, 55:20:25, 60:15:25, 65:05:30 y 65:25:10, respectivamente (figura 86). Por otra parte, las composiciones que presentaron menor índice de polidispersión fueron: 45:15:40, 55:05:40 y 60:10:30.

Para la elaboración de la nanoemulsión de AmB, se eligió finalmente la composición 55:05:40 con un 55% de Labrasol®/Plurol®Oleique (5:1), 5% de aceite de ricino y un 40% de Transcutol®P que presentó un tamaño de gota de $112,90 \pm 10,15$ y un índice de polidispersión de $0,22 \pm 0,02$.

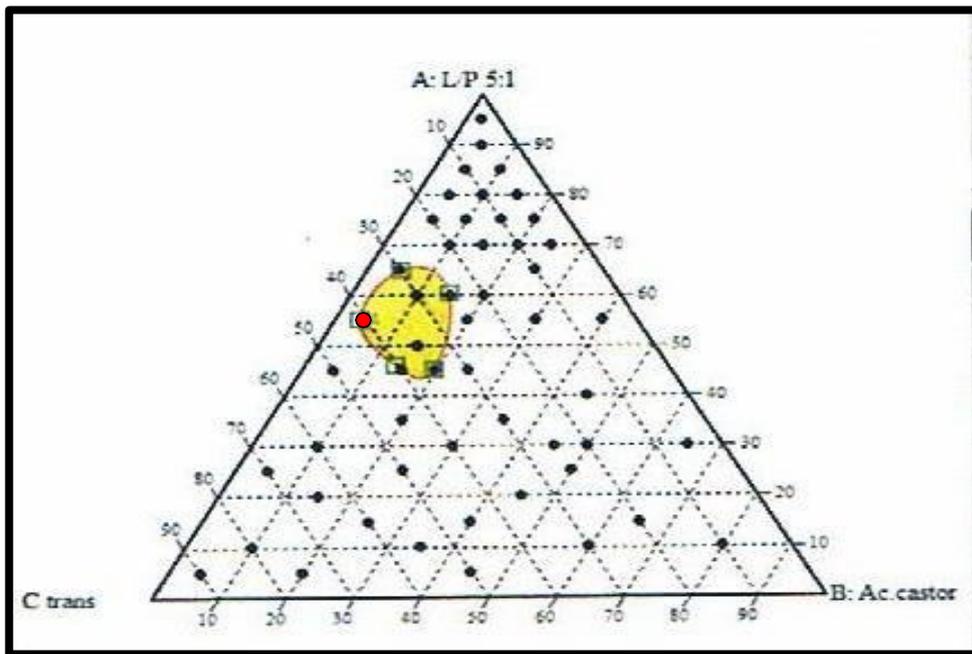


Figura 86. Diagrama ternario de fases donde los puntos son las mezclas ensayadas, en amarillo las zonas de las nanoemulsiones. El punto rojo señala la composición seleccionada para la elaboración de la nanoemulsión de AmB.

4.3 FORMULACIÓN DEL HIDROGEL CON AmB

Tal como se ha comentado anteriormente, los hidrogeles basados en poloxámero están a la vanguardia del desarrollo de sistemas de vehiculización de fármacos para su aplicación tópica debido a la mejora de la eficacia terapéutica y la adherencia del paciente a los tratamientos (230). Se realizó un estudio preliminar ensayando diferentes proporciones de poloxámero P407 (16 - 25%) y de DMSO (2-5%) y finalmente se seleccionó la siguiente composición para elaborar el hidrogel de AmB:

- Poloxámero 407..... 25,00 g
- AmB..... 0,03 g
- DMSO..... 4,54 g
- Agua c.s.p.....100,00 g

Los tiempos de gelificación de las muestras almacenadas a 4 y 25 °C fueron de 3 y 1,5 min, respectivamente. No se evidenciaron diferencias en los tiempos de gelificación entre muestras con y sin AMB. Los tiempos de gelificación fueron incluso más cortos en muestras almacenadas durante 6 meses, menos de 1,5 y 1 minuto para muestras almacenadas a 4 °C y 25 °C, respectivamente.

4.4 VALIDACIÓN ANALÍTICA MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

En la tabla 12 se muestran los resultados de los ensayos de la validación inter día. El tratamiento de datos indicados en las tablas 13, 14, 15 y 16 confirmó que la metodología analítica por el método de espectrofotometría ultravioleta/visible fue lineal, exacta en un 96,52% y con una precisión del 92,03%. El límite de cuantificación fue de $5,96 \pm 4,07 \mu\text{g/mL}$ y el límite de detección fue de $1,97 \pm 1,34 \mu\text{g/mL}$.

Tabla 12. Concentraciones expresadas en µg/mL y absorbancias correspondientes para cinco replicados de las rectas de calibración de la AmB, para la validación interdía por la metódica de espectrofotometría UV/VIS.

Concentración (µg/mL)	Absorbancias				
	r1	r2	r3	r4	r5
6,25	0,050	0,050	0,038	0,050	0,044
12,5	0,103	0,096	0,104	0,100	0,102
25	0,205	0,193	0,204	0,200	0,197
50	0,405	0,393	0,405	0,399	0,399
100	0,804	0,798	0,808	0,802	0,803
200	1,574	1,600	1,705	1,587	1,660

Tabla 13. Parámetros de la regresión lineal de los cinco replicados de las rectas de calibración de AmB, para la validación interdía por la metódica de espectrofotometría UV/VIS.

Rectas (replicados)	r1	r2	r3	r4	r5
VARIABLES					
Pendiente	0,007862 ± 0,00004401	0,008020 ± 0,00001927	0,008533 ± 0,0001096	0,007940 ± 0,00002150	0,008311 ± 0,00006695
Ordenada en el origen	0,007567 ± 0,004149	-0,004617 ± 0,001817	-0,01597 ± 0,01033	0,001823 ± 0,002027	-0,01126 ± 0,006311
Abscisa en el origen	-0,9625	0,5757	1,872	-0,2296	1,355
1/pendiente	127,2	124,7	117,2	125,9	120,3
95% Intervalos de confianza					
Pendiente	0,007740 a 0,007984	<i>Perfect line</i>	0,008229 a 0,008837	<i>Perfect line</i>	0,008125 a 0,008497
Ordenada en el origen	-0,003950 a 0,01908	<i>Perfect line</i>	-0,04465 a 0,01271	<i>Perfect line</i>	-0,02878 a 0,006262
Bondad de ajustado					
r²	0,9999	1	0,9993	1	0,9997
Sy.x	0,007296	0,003195	0,01817	0,003564	0,0111
¿Es la pendiente distinta de cero?					
F	31910		6060		15410
DFn, DFd	1.000, 4.000	1.000, 4.000	1.000, 4.000	1.000, 4.000	1.000, 4.000
Valor de P	< 0,0001		< 0,0001		< 0,0001
¿Desviación de cero?	<i>Significant</i>	<i>Perfect line</i>	<i>Significant</i>	<i>Perfect line</i>	<i>Significant</i>
Datos					
Número de valores de X	6	6	6	6	6

Máximo número replicados de Y	1	1	1	1	1
Total número de valores	6	6	6	6	6
Número de valores eliminados	0	0	0	0	0

Tabla 14. Parámetros estadísticos evaluados en el análisis de la linealidad de la metodología analítica mediante espectrofotometría UV/VIS para la AmB, tras la validación interdiá.

Parámetros	Valor		
Tabla de análisis Linealidad			
Análisis de la varianza de una vía			
Valor de P	0,0942		
Resumen valor de P	ns		
¿Son las medias diferentes? (P < 0,05)	No		
Número de grupos	6		
F	2,147		
R cuadrado	0,3091		
Test de Bartlett de igualdad de varianzas			
Estadístico de Bartlett (corregido)	32,39		
Valor de P	P<0,0001		
Resumen valor de P	***		
¿Son las medias diferentes? (P < 0,05)	Si		
Tabla ANOVA	SS	Grados libertad	MS
Tratamiento (entre columnas)	0,000001666	5	3,332E-07
Residual (en las columnas)	0,000003724	24	1,552E-07
Total	0,00000539	29	
Test de Comparación Múltiple Newman-Keuls	Def. Media	q	Valor de p
6,25 vs 200	-0,000702	3,985	P > 0,05
6,25 vs 12,5	-0,000648	---	P > 0,05
6,25 vs 100	-0,000606	---	P > 0,05
6,25 vs 50	-0,00058	---	P > 0,05
6,25 vs 25	-0,000568	---	P > 0,05
25 vs 200	-0,000134	---	P > 0,05
25 vs 12,5	-0,00008	---	P > 0,05
25 vs 100	-0,000038	---	P > 0,05

Tabla 15. Exactitud y precisión evaluadas a partir de los valores de concentración teórica y extrapolada de las cinco rectas de calibración estudiadas, para la validación de la metodología analítica por espectrofotometría UV/VIS de la AmB, expresados como porcentajes de sus errores relativos y coeficientes de variación medios.

C. Teórica (µg/mL)	Concentración extrapolada (µg/mL)							Exactitud	Precisión
	r1	r2	r3	r4	r5	Media	Desv. Estándar	Error relativo (%)	Coef. Variación (%)
6,25	5,40	6,81	6,32	6,07	6,65	6,25	0,50	0,00	7,97
12,5	12,14	12,55	14,06	12,30	13,63	12,93	0,79	-3,48	6,08
25	25,11	24,64	25,78	24,96	25,06	25,11	0,37	-0,44	1,49
50	50,55	49,58	49,34	50,02	49,36	49,77	0,47	0,46	0,95
100	101,30	100,08	96,56	100,77	97,97	99,34	1,81	0,66	1,82
200	199,25	200,09	201,69	199,63	201,08	200,35	0,92	-0,17	0,46

Tabla 16. Concentraciones límites de AmB (en µg/mL) detectadas y cuantificadas, expresadas como media y desviación estándar, de la metodología analítica validada inter día mediante la técnica de espectrofotometría UV/VIS.

Concentración (µg/mL)	r1	r2	r3	r4	r5	Media	Desv. Est
Límite detección	1,74	0,75	3,99	0,84	2,51	1,97	1,34
Límite cuantificación	5,28	2,27	12,11	2,55	7,59	5,96	4,07

4.5 VALIDACIÓN ANALÍTICA MEDIANTE CLAR

En la tabla 17 se muestran los resultados de los ensayos de la validación inter día. El tratamiento de datos indicados en las tablas 18, 19, 20 y 21 confirmó que la metodología analítica por el método de CLAR fue lineal, exacta en un 96,54 % y con una precisión del 91,21%. El límite de cuantificación presentó un valor de $1,97 \pm 1,93 \mu\text{g/mL}$ y el límite de detección fue de $0,65 \pm 0,64 \mu\text{g/mL}$.

Tabla 17. Concentraciones expresadas en µg/mL y áreas correspondientes para los cinco replicados de las rectas de calibración de la AmB, en la validación interdía de la metódica por cromatografía de alta resolución.

Concentración (µg/mL)	Áreas cromatográficas				
	r1	r2	r3	r4	r5
800	2287608	2239246	2232506	2263752	2213442
400	1143813	1119433	1116243	1131896	1106722
200	575902	559882	554132	565938	553461
100	285967	279906	279063	282979	276680
50	142976	139153	139532	151485	138840
25	72498	69971	69866	70742	69170
12,5	35644	34988	34883	35371	34587
6,25	17872	17594	17481	17636	17293
3,125	8937	8757	8721	8843	8758

Tabla 18. Parámetros de la regresión lineal de los cinco replicados de las rectas de calibración de AmB, para la validación interdía realizada con la metódica de cromatografía de alta resolución.

Rectas (replicados)	r1	r2	r3	r4	r5
VARIABLES					
Pendiente	2859 ± 1,894	2799 ± 0,3923	2790 ± 1,892	2827 ± 4,647	2767 ± 0,2262
Ordenada en el origen	563,1 ± 583,3	-104,0 ± 120,8	-393,7 ± 582,6	1502 ± 1431	104,7 ± 69,64
Abscisa en el origen	-0,1969	0,03716	0,1411	-0,5312	-0,03785
1/pendiente	0,0003497	0,0003573	0,0003584	0,0003537	0,0003614
95% Intervalos de confianza					
Pendiente	<i>Perfect line</i>				
Ordenada en el origen	<i>Perfect line</i>				
Bondad de ajustado					
r²	1	1	1	1	1
Sy.x	1430	296,1	1429	3508	170,8
¿Es la pendiente distinta de cero?					
F					
DFn, DFd	1.000, 7.000	1.000, 7.000	1.000, 7.000	1.000, 7.000	1.000, 7.000
Valor de P					
¿Desviación de cero?	<i>Perfect line</i>				
Datos					
Número de valores de X	9	9	9	9	9
Máximo número replicados de Y	1	1	1	1	1
Total número de valores	9	9	9	9	9
Número de valores eliminados	0	0	0	0	0

Tabla 19. Parámetros estadísticos evaluados en el análisis de la linealidad, de la metódica analítica de cromatografía de alta resolución, para la AmB tras la validación interdiá.

Parámetro	Valor			
Tabla de análisis Linealidad				
Análisis de la varianza de una vía				
Valor de P	0,9553			
Resumen valor de P	ns			
¿Son las medias diferentes? (P < 0,05)	No			
Número de grupos	9			
F	0,3149			
R cuadrado	0,06539			
Test de Bartlett de igualdad de varianzas				
Estadístico de Bartlett (corregido)	12,99			
Valor de P	0,1123			
Resumen valor de P	ns			
¿Son las medias diferentes? (P < 0,05)	No			
Tabla ANOVA	SS	df	MS	
Tratamiento (entre columnas)	6478	8	809,8	
Residual (en las columnas)	92590	36	2572	
Total	99070	44		
Test de Comparación Múltiple Newman-Keuls	<i>Mean Diff.</i>	<i>q</i>	<i>P value</i>	<i>95% CI of diff</i>
800 vs 400	0,1001	0,004414	P > 0,05	-105,8 a 106,0
800 vs 200	-0,1797	0,007923	P > 0,05	-106,1 a 105,7
800 vs 100	-0,05981	0,002637	P > 0,05	-106,0 a 105,8
800 vs 50	-38,8	1,711	P > 0,05	-144,7 a 67,09
800 vs 25	-8,84	0,3898	P > 0,05	-114,7 a 97,05
800 vs 12,5	1,56	0,06879	P > 0,05	-104,3 a 107,5
800 vs 6,25	-2,88	0,127	P > 0,05	-108,8 a 103,0
800 vs 3,125	-7,86	0,3466	P > 0,05	-113,8 a 98,03
400 vs 200	-0,2798	0,01234	P > 0,05	-106,2 a 105,6
400 vs 100	-0,1599	0,007051	P > 0,05	-106,1 a 105,7
400 vs 50	-38,9	1,715	P > 0,05	-144,8 a 66,99
400 vs 25	-8,94	0,3942	P > 0,05	-114,8 a 96,95
400 vs 12,5	1,46	0,06437	P > 0,05	-104,4 a 107,4
400 vs 6,25	-2,98	0,1314	P > 0,05	-108,9 a 102,9
400 vs 3,125	-7,96	0,351	P > 0,05	-113,9 a 97,93
200 vs 100	0,1199	0,005285	P > 0,05	-105,8 a 106,0
200 vs 50	-38,62	1,703	P > 0,05	-144,5 a 67,27
200 vs 25	-8,66	0,3818	P > 0,05	-114,6 a 97,23
200 vs 12,5	1,74	0,07671	P > 0,05	-104,2 a 107,6
200 vs 6,25	-2,7	0,1191	P > 0,05	-108,6 a 103,2
200 vs 3,125	-7,68	0,3386	P > 0,05	-113,6 a 98,21

100 vs 50	-38,74	1,708	P > 0,05	-144,6 a 67,15
100 vs 25	-8,78	0,3871	P > 0,05	-114,7 a 97,11
100 vs 12,5	1,62	0,07142	P > 0,05	-104,3 a 107,5
100 vs 6,25	-2,82	0,1243	P > 0,05	-108,7 a 103,1
100 vs 3,125	-7,8	0,3439	P > 0,05	-113,7 a 98,09
50 vs 25	29,96	1,321	P > 0,05	-75,93 a 135,9
50 vs 12,5	40,36	1,78	P > 0,05	-65,53 a 146,3
50 vs 6,25	35,92	1,584	P > 0,05	-69,97 a 141,8
50 vs 3,125	30,94	1,364	P > 0,05	-74,95 a 136,8
25 vs 12,5	10,4	0,4586	P > 0,05	-95,49 a 116,3
25 vs 6,25	5,96	0,2628	P > 0,05	-99,93 a 111,9
25 vs 3,125	0,98	0,04321	P > 0,05	-104,9 a 106,9
12,5 vs 6,25	-4,44	0,1958	P > 0,05	-110,3 a 101,5
12,5 vs 3,125	-9,42	0,4153	P > 0,05	-115,3 a 96,47
6,25 vs 3,125	-4,98	0,2196	P > 0,05	-110,9 a 100,9

Tabla 20. Exactitud y precisión evaluadas a partir de los valores de concentración teórica y extrapolada de las cinco rectas de calibración estudiadas, en la validación de la metodica analítica por cromatografía de alta resolución de la AmB, expresadas como porcentajes de sus errores relativos y coeficientes de variación medios.

C. Teórica (µg/mL)	Concentración extrapolada (µg/mL)							Exactitud Error relativo (%)	Precisión Coef.Variación (%)
	r1	r2	r3	r4	r5	Media	Desv. Estándar		
800	799,83	800,02	800,20	800,10	800,00	800,03	0,14	0,00	0,02
400	399,82	399,96	400,17	399,79	399,98	399,94	0,15	0,01	0,04
200	201,21	200,06	198,72	199,63	200,01	199,92	0,89	0,04	0,45
100	99,81	100,03	100,15	99,55	99,97	99,90	0,23	0,10	0,23
50	49,80	49,75	50,14	53,04	50,15	50,58	1,39	-1,16	2,75
25	25,16	25,03	25,18	24,49	24,96	24,96	0,28	0,14	1,12
12,5	12,27	12,54	12,64	11,98	12,46	12,38	0,26	0,98	2,11
6,25	6,05	6,32	6,41	5,71	6,21	6,14	0,28	1,76	4,50
3,125	2,93	3,17	3,27	2,60	3,13	3,02	0,27	3,46	8,79

Tabla 21. Concentraciones límites de AmB en (µg/mL) detectadas y cuantificadas, a la vez que expresadas como media y desviación estándar, de la metodica analítica validada interdiaria, mediante la técnica de cromatografía de alta resolución.

Concentración (µg/mL)	r1	r2	r3	r4	r5	Media	Desv.Est
Limite detección	1,74	0,75	3,99	0,84	2,51	1,97	1,34
Limite cuantificación	5,28	2,27	12,11	2,55	7,59	5,96	4,07

4.6 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LA NANOEMULSIÓN DE AmB

Muestras de 15 mL de la nanoemulsión recién elaborada fueron almacenadas en viales de vidrio herméticamente cerrados, a tres diferentes temperaturas: 4, 25 y 40 °C. Se midieron el tamaño de gota e índice de polidispersión de la nanoemulsión de AmB a diferentes tiempos (día 1, 15 y 30). Paralelamente, se evaluó el valor de pH y contenido del fármaco. En las tablas 22, 23 y 24 se exponen los resultados de la caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión de AmB.

La nanoemulsión recién elaborada presentó un tamaño medio de gota de $112,90 \pm 15,28$ nm y un índice de polidispersión de $0,22 \pm 0,02$ a las 24 h y 25 °C (tabla 22 y figura 87). Estos valores se mantuvieron sin cambios relevantes tras su almacenamiento a temperatura de 4 °C, mostrando a ambas temperaturas y tras 30 días de almacenamiento una dispersión monomodal. Sin embargo, se detectaron variaciones en los valores de estos parámetros para las muestras mantenidas a 40 °C probablemente a consecuencia de la inestabilidad de la AmB a elevadas temperaturas. A pesar de estas variaciones, los tamaños de gota siempre se mantuvieron en el rango nanométrico. Por otra parte, en la literatura científica se indicó que la formación de agregados de AmB suponía una disminución de la toxicidad de este fármaco, lo que resulta beneficioso. Además, los tamaños de gota de la nanoemulsión propuesta presentaron un tamaño de gota menor a los encontrados por otros autores en la elaboración de nanoemulsiones de AmB (231).

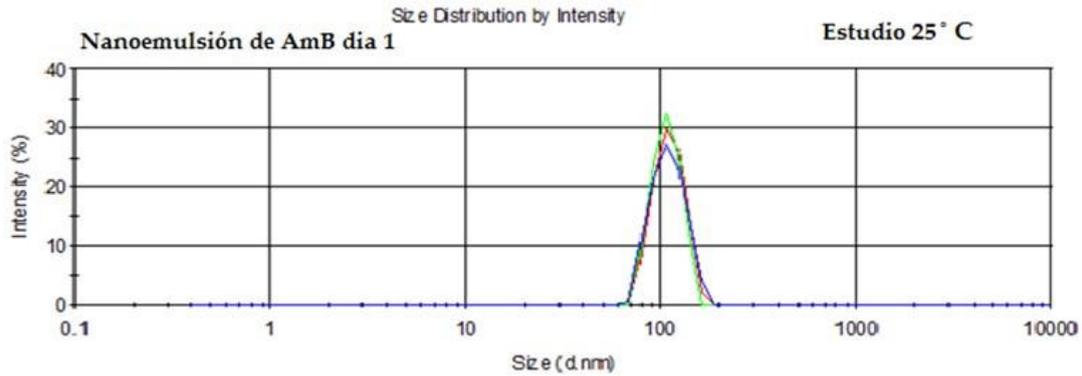


Figura 87. Características de la dispersión de la nanoemulsión con AmB a las 24 h del estudio a 25 °C.

En cuanto a los valores de pH es sabido que es un factor importante para evitar la irritación de la piel o infecciones bacterianas (126, 232). El pH de la nanoemulsión fue del orden de 7,4, permaneciendo estable a 25 °C. Aunque se trata de un valor fuera del rango fisiológico (4,7-5,8), trabajos sobre el impacto del pH en la susceptibilidad antifúngica de *Candida albicans* demuestran que la Mínima Concentración Inhibitoria de un amplio abanico de antifúngicos fue significativamente mayor a pH 4 que a pH 7 (233). En cambio, a las temperaturas de 4°C y 40 °C se observaron valores ligeramente superiores e inferiores, respectivamente (tabla 23).

Respecto al contenido de AmB en la nanoemulsión conservada a 4 y 25 °C no se observaron cambios significativos, aunque fue disminuyendo progresivamente con el paso de los días a la temperatura más alta de conservación. Así, a 40 °C el fármaco se degradó por completo a los 15 días (tabla 24), situación bastante previsible dado que la AmB es una molécula fotosensible y termolábil. Además el aceite de ricino es fácilmente oxidable y se sabe que los aceites oxidados pueden a su vez facilitar la oxidación de otros componentes de la fórmula por lo que debe añadirse un antioxidante. Por tanto, cualquier formulación de este tipo con AmB debe almacenarse en sitios refrigerados lo que es un punto crítico

puesto que la temperatura ambiente es muy elevada en los países tropicales donde la leishmaniosis cutánea es endémica.

Tabla 22. Evolución del tamaño de gota (TG en nm) e índice de polidispersión (PDI) de la nanoemulsión con AmB, a lo largo del tiempo y a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)		Día 1	Día 15	Día 30
4	TG*	-	168,60 ± 0,88	158,10 ± 0,59
	PDI**	-	0,25 ± 0,08	0,27 ± 0,05
25	TG*	112,90 ± 15,28	125,12 ± 0,66	135,50 ± 1,00
	PDI**	0,22 ± 0,02	0,32 ± 0,05	0,40 ± 0,01
40	TG*	-	294,04 ± 0,59	248,27 ± 1,00
	PDI**	-	0,45 ± 0,09	0,78 ± 0,12

*TG: Tamaño de gota, ** PDI: índice de polidispersión

Tabla 23. Variación del pH de la nanoemulsión con AmB a lo largo del tiempo y a diferentes temperaturas.

Nanoemulsión con AmB	4 °C	25 °C	40 °C
Día 1	-----	7,42 ± 0,53	-----
Día 15	7,58 ± 0,50	7,47 ± 0,57	6,98 ± 0,23
Día 30	7,96 ± 0,20	7,38 ± 0,49	6,95 ± 0,27

Tabla 24. Variación del contenido de AmB (µg/mL) en la nanoemulsión a lo largo del tiempo y a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Día 1	Día 15	Día 30
4	-	2,28 ± 0,31	2,04 ± 0,30
25	2,50 ± 0,20	2,20 ± 0,92	2,13 ± 0,78
40	-	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

4.7 ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA NANOEMULSIÓN CON AMB

En la figura 88 se muestra la imagen obtenida mediante TEM en la que pueden visualizarse pequeñas gotas circulares y lenticulares (fase interna de la

nanoemulsión). La difusión del agente de tinción destacó la presencia de áreas densas de electrones (áreas polares) que aparecen oscuras, esto denota la fase acuosa externa y confirma un sistema aceite/agua. Se puede observar que la nanoemulsión presentó un tamaño de gota de aproximadamente 100 nm lo cual es comparable con los datos proporcionados mediante DLS.

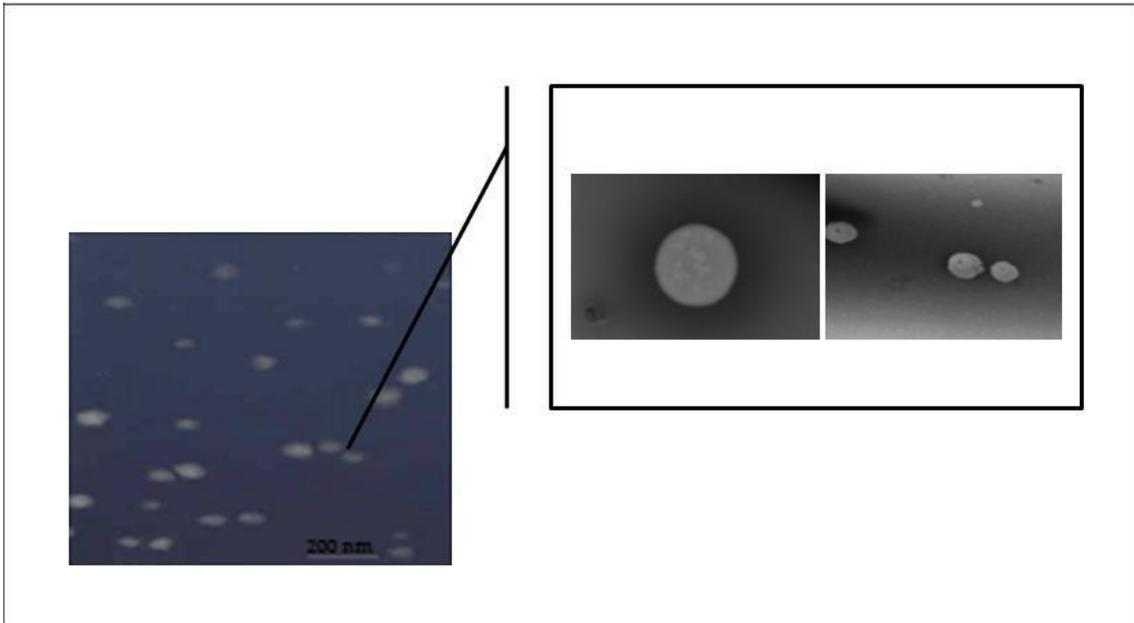


Figura 88. Caracterización morfológica de la nanoemulsión de AmB mediante TEM (200 nm).

4.8 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DEL HIDROGEL CON AmB

Muestras de 15 mL del hidrogel con AmB recién elaborado, fueron almacenadas en viales de vidrio herméticamente cerrados, a dos temperaturas: 4 y 25 °C. Se midieron el tamaño de gota e índice de polidispersión de este hidrogel a diferentes tiempos (1, 30, 90 y 180 días). Paralelamente, se evaluaron los valores de pH y de contenido del fármaco. En las tablas 22, 23 y 24 se exponen los resultados de la caracterización fisicoquímica.

A las 24 h de la elaboración del hidrogel de AmB se procedió a leer el tamaño de gota e índice de polidispersión. Para los estudios de estabilidad se tomaron

muestras de 15 mL del hidrogel de AmB para acondicionarlas en viales de vidrio transparentes herméticamente cerradas y se guardaron a 4 °C en nevera y a temperatura ambiente (23 ± 2 °C).

El hidrogel con AmB recién elaborado presentó a las 24 h y a 4 °C una dispersión de tipo monomodal con un tamaño medio de gota de $67,79 \pm 0,10$ y un índice de polidispersión de $0,25 \pm 0,10$ mientras que a 25 °C los valores fueron de $90,87 \pm 0,78$ y $0,37 \pm 0,23$, respectivamente. Tras su almacenamiento a las temperaturas de 4 y 25 °C, los valores de estos parámetros se mantuvieron aproximadamente constantes hasta los 90 días. A los 180 días, se observó tanto a 4 °C como a 25 °C un incremento del tamaño de gota, situándose en torno a 1150 – 1190 nm. Además el índice de polidispersión aumentó hasta un valor de 1,00 (figuras 89-90 y tabla 25). Esto podría deberse al cambio de estructura que se origina en el gel de poloxámero que es termosensible. En estado líquido (SOL) se forman micelas esféricas de tamaños nanométricos que se agregan en el estado GEL. No obstante, con el paso del tiempo estos geles frecuentemente pierden la termorreversibilidad, manteniéndose en estado de GEL independientemente de la temperatura, donde se originan micelas cúbicas y hexagonales de mucho mayor tamaño (230).

Respecto al pH del hidrogel, éste permaneció estable a 4 y 25 °C (entre 6,3-6,7), durante los 180 días del estudio, manteniéndose dentro de un rango de pH eudérmico (tabla 26).

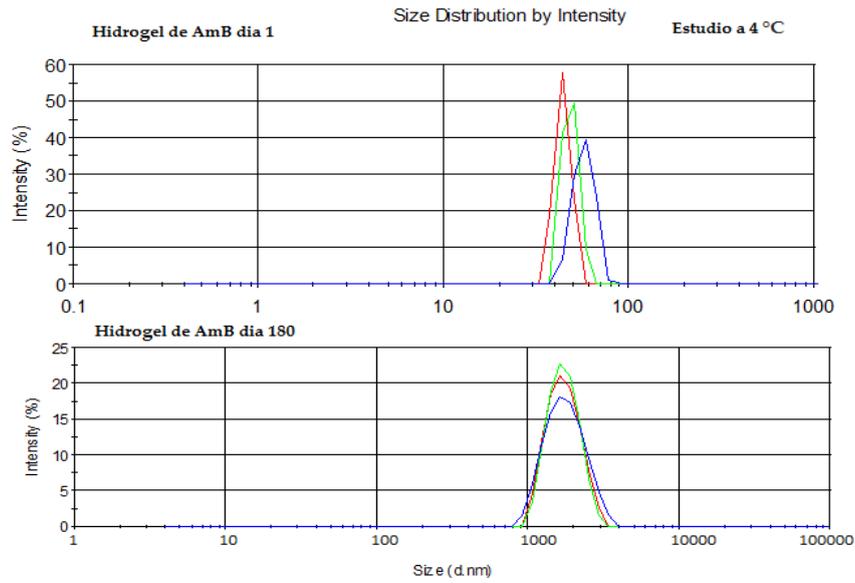


Figura 89. Características de la dispersión del hidrogel con AmB a las 24 h y 180 días del estudio a 4 °C.

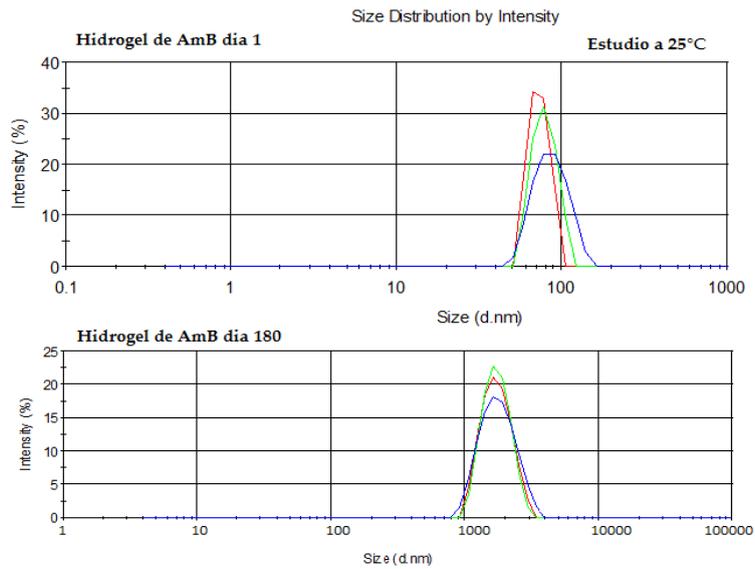


Figura 90. Características de la dispersión del hidrogel con AmB a las 24 h y 180 días del estudio a 25 °C.

Tabla 25. Evolución del tamaño de gota e índice de polidispersión (PDI) del hidrogel con AmB, a lo largo del tiempo y a diferentes temperaturas.

T (°C)	Día 1		Día 30		Día 90		Día 180	
	Tamaño de gota	PDI						
4	67,79±0,10	0,25±0,10	67,00±0,87	0,12±0,01	80,12±0,12	0,21±0,09	1190±0,07	1,00±2,90
25	90,87±0,78	0,37±0,23	89,90±0,02	0,20±0,10	95,82±0,22	0,30±0,14	1159±0,09	1,00±3,98

Tabla 26. Variación del pH del hidrogel de AmB a lo largo del tiempo y a diferentes temperaturas.

Tiempo (días)	4 °C	25 °C
1	6,30 ± 0,05	6,50 ± 0,13
30	6,55 ± 0,11	6,60 ± 0,10
90	6,60 ± 0,23	6,62 ± 0,31
180	6,70 ± 0,13	6,67 ± 0,24

Respecto al contenido de AmB del hidrogel, la cantidad de fármaco fue disminuyendo progresivamente con el paso de los días tanto a 4 como a 25 °C de una forma análoga, pasando de aproximadamente 119 a 71-88 µg/mL (tabla 27). Si comparamos estos valores con los de la tabla 24 relativa a la variación de contenido en AmB en la nanoemulsión, se desprende que la degradación del fármaco es mucho menor en el hidrogel. Ello podría estar relacionado con la ausencia en la fórmula de excipientes fácilmente oxidables como los aceites vegetales (aceite de ricino) y el posible efecto protector frente a la degradación que pueden ofrecer las micelas a la AmB disuelto en sus núcleos.

Tabla 27. Variación del contenido de AmB ($\mu\text{g/mL}$) en el hidrogel a lo largo del tiempo y a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Día 1	Día 30	Día 90	Día 180
4	118,9 \pm 0,45	115,86 \pm 0,41	91,90 \pm 0,64	71,00 \pm 0,06
25	-	110,80 \pm 0,56	90,64 \pm 0,34	87,90 \pm 0,15

4.9 ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL HIDROGEL DE AmB

La técnica SEM evidenció la estructura interna porosa del hidrogel (figura 91). Se ha indicado en la literatura científica que los geles de poloxámero presentan hasta un 75% de poros en su estructura que es por donde se realiza la liberación del fármaco (234). Por otra parte, se observó que el grosor de las fibras de la red del gel era de un tamaño nanométrico.

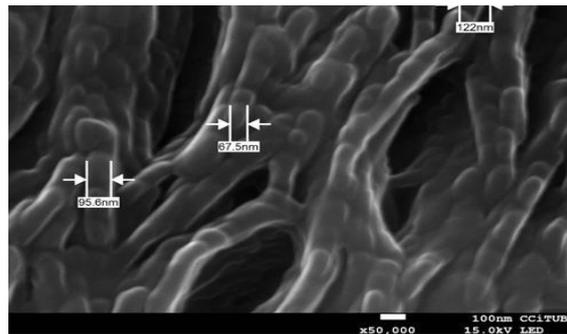


Figura 91. Caracterización morfológica del hidrogel de AmB por SEM (50000X).

4.10 ESTUDIO DE ESTABILIDAD A CORTO PLAZO

Mediante el Turbiscan[®] LabExpert se detectan a partir de las curvas registradas procesos de cremado, sedimentación, aglomeración, agregación y coalescencia en una etapa muy temprana, incluso en sistemas dispersos altamente concentrados.

En los registros de transmisión en función del tiempo, el lado izquierdo de la curva corresponde a la parte inferior del vial, mientras que el lado derecho

corresponde al comportamiento de la muestra en la parte superior. Los picos en la parte inferior y en la parte superior del vial corresponden al menisco de la muestra en contacto con el vidrio.

Si se produjera sedimentación, se observaría una disminución de la transmisión en la parte inferior de la muestra mientras que si la muestra sufriera un proceso de cremado, se produciría una disminución de la transmisión en la parte superior del vial. Si se originara el fenómeno de desestabilización debido a la agregación de gotas, se podría observar en toda la altura de la muestra una disminución de la transmisión en función del tiempo. Variaciones $\leq \pm 10\%$ indican formulaciones estables (194-196).

Se analizaron muestras de nanoemulsión e hidrogeles con AmB, sin diluirlas ni someter a estrés térmicos previos. Las figuras 92 y 93 muestran el perfil T de la nanoemulsión y del hidrogel de AmB a 25 °C durante 24 h, respectivamente. En ambas formulaciones no se observaron fenómenos de sedimentación, floculación o coalescencia. Los trazados se mantuvieron superpuestos a lo largo del tiempo, lo que presupuso que tanto la nanoemulsión como el hidrogel de AmB podrían mantenerse estables físicamente al menos en el período de 3 meses.

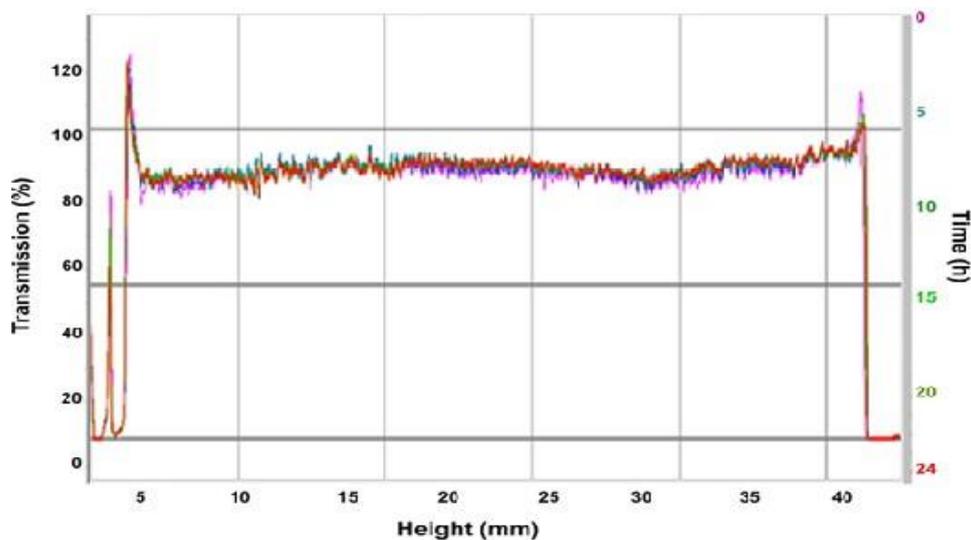


Figura 92. Perfil de transmisión de la nanoemulsión de AmB obtenido por Turbiscan®Lab.

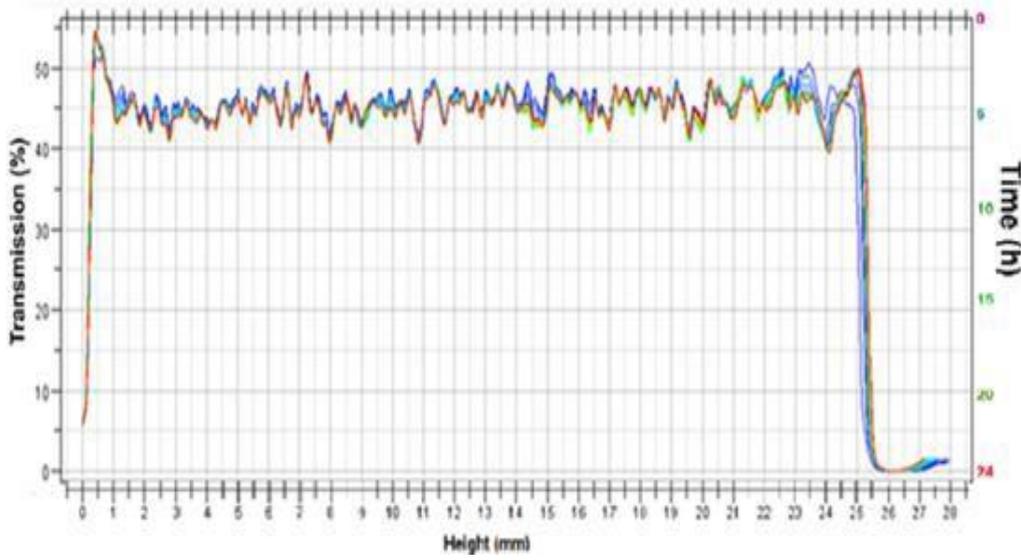


Figura 93. Perfil de transmisión del hidrogel de AmB obtenido por Turbiscan®Lab.

4.11 EXTENSIBILIDAD

La tabla 28 y las figuras 94 y 95 muestran los resultados del ensayo de extensibilidad aplicado a la nanoemulsión a 25 °C y al hidrogel con AmB, realizado a 4 °C y 32 °C.

Tabla 28. Resultados de la determinación de la extensibilidad de las formulaciones ensayadas.

PESOS (g)	EXTENSIBILIDAD (cm ²)		
	Nanoemulsión con AmBa 25 °C	Hidrogel con AmB a 4 °C	Hidrogel con AmB a 32 °C
15	1,15	1,25	---
22	4,10	3,90	---
27	9,62	6,60	---
29	10,80	9,34	---
32	11,45	9,89	---
37	11,56	11,34	---
50	---	---	3,27
100	---	---	4,55
200	---	---	5,20
300	---	---	5,95

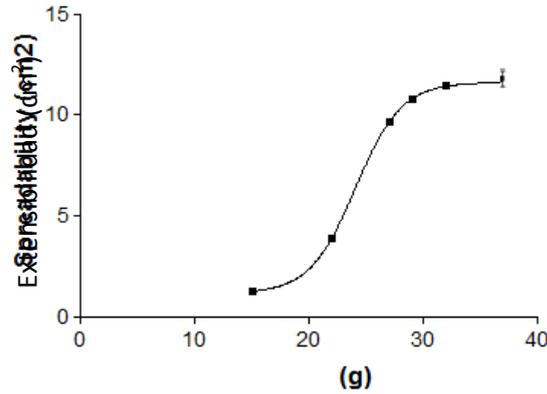


Figura 94. Extensibilidad versus peso aplicado para la nanoemulsión con AmB a 25°C.

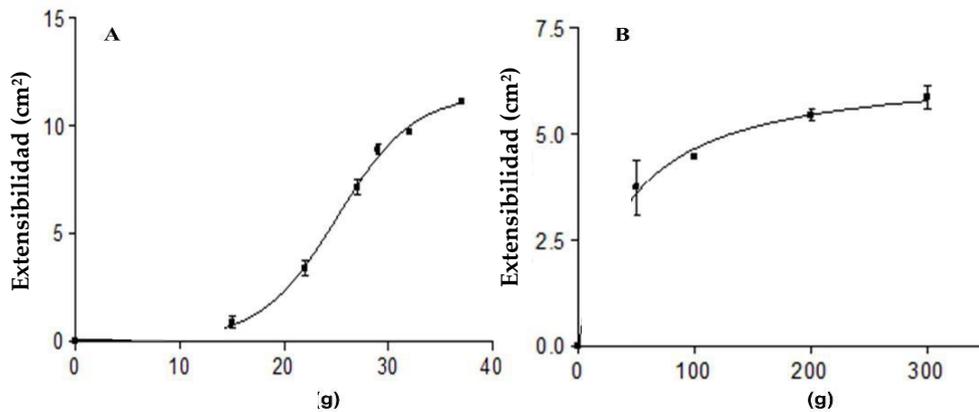


Figura 95. Extensibilidad versus peso aplicado para el hidrogel con AmB a diferentes temperaturas: (A) a 4 °C; (B) a 32 °C.

Al ser el hidrogel termodependiente, a 4 °C, el producto era muy fluido y se requirió la aplicación de pesas entre 15 y 37 g para originar la extensión de la muestra por aplastamiento entre los dos planos paralelos del dispositivo. En cambio, a 32 °C, al haber gelificado por completo, su consistencia era mucho más alta y la serie de pesas utilizadas fue de mayor peso, entre 50 y 300 g y, sin embargo, la capacidad de extensión de hidrogel fue menor, prácticamente la mitad (tabla 28). Por lo tanto, el preparado a bajas temperaturas (4 °C) resulta suficientemente fluido como para facilitar su proceso de envasado y su aplicación en forma de pulverización.

Por otra parte, el modelo que mejor se ajustó a los datos experimentales fue el Boltzmann sigmoidal tanto para la nanoemulsión a 25 °C como el hidrogel a 4 °C. En cambio, en el caso del hidrogel a 32 °C fue el modelo de la hipérbola.

4.12 PROPIEDADES REOLÓGICAS

Tras el análisis reológico de los productos analizados en las condiciones experimentales definidas en el capítulo correspondiente, se obtuvieron para cada muestra su curva de cizalla ($\eta = f(\dot{\gamma})$) y su curva de viscosidad ($\tau = f(\dot{\gamma})$), donde el esfuerzo de cizalladura (τ) viene expresado en Pa, la viscosidad (η) en Pa·s y el gradiente de velocidad de cizalladura ($\dot{\gamma}$) en 1/s. A partir de los reogramas obtenidos, se determinó el comportamiento reológico así como el valor de la viscosidad para la nanoemulsión a 25 °C y del hidrogel a 4 °C y 32 °C, ambos con AmB.

La nanoemulsión analizada a $t_0 = 24$ h y temperatura de 25 °C mostró un comportamiento newtoniano al presentar una viscosidad constante baja en el aumento progresivo de velocidad de cizalladura de 0 a 100 s^{-1} , tal como se puede apreciar en la figura 96. Además, un perfecto ajustado ($r = 1$) de la curva de flujo se obtuvo con el modelo de Newton (tabla 29).

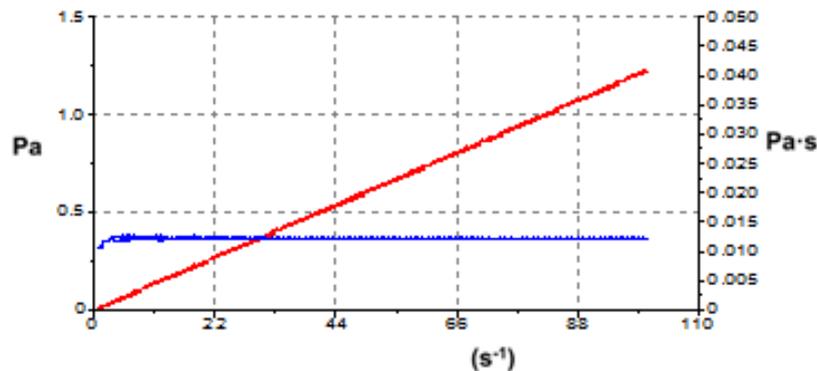


Figura 96. Curva de flujo (en rojo) y curva de viscosidad (en azul) correspondientes a la nanoemulsión con AmB, a $t_0 = 24$ h y 25 °C.

Tabla 29. Resultados de la caracterización reológica de la nanoemulsión y del hidrogel de AmB.

TEST ROTACIONAL		Nanoemulsión con AmB Test a 25 °C	Hidrogel con AmB Test a 4 °C	Hidrogel con AmB Test a 32 °C
Mejor modelo matemático para el ajustado	Tramo ascendente	Newton r = 1	Newton r = 1	Cross 0,981
	Tramo descendente	Newton r = 1	Newton r = 1	No procede
Comportamiento reológico		Newtoniano	Newtoniano	Pseudoplástico
Viscosidad media a 50 s ⁻¹ (mPa·s)		12,20 ± 0,028	90,62 ± 0,071	9800 (estimado)
Viscosidad puntual a 10 s ⁻¹ en el tramo ascendente(mPa·s)		12,46	91,52	3845,50

El valor de la viscosidad determinada en el tramo a cizalla constante de los reogramas fue bajo, de 12,20 ± 0,028 mPa·s (tabla 29).

Dichas características hacen de la nanoemulsión un producto adecuado para su aplicación tópica en forma de spray o roll-on. Estas propiedades son cruciales para el tratamiento de infecciones por hongos y leishmania que suelen afectar grandes áreas de la piel, teniendo en cuenta que un aerosol puede ser aplicado en toda la superficie, sin frotar, lo que evita la propagación de la infección a otras áreas del cuerpo (204).

La figura 97 reproduce las curvas de flujo y las curvas de viscosidad obtenidas a $t_0 = 24$ h, respectivamente a 4 °C (A) y 32 °C (B), tras la caracterización reológica del hidrogel con AmB.

A 4 °C el hidrogel era líquido y bajo las variaciones programadas de velocidad de cizalla mostró un comportamiento newtoniano, ajustado por el modelo de Newton (r = 1). Por otra parte, a esta temperatura su viscosidad fue de 90,62 ± 0,071 mPa·s.

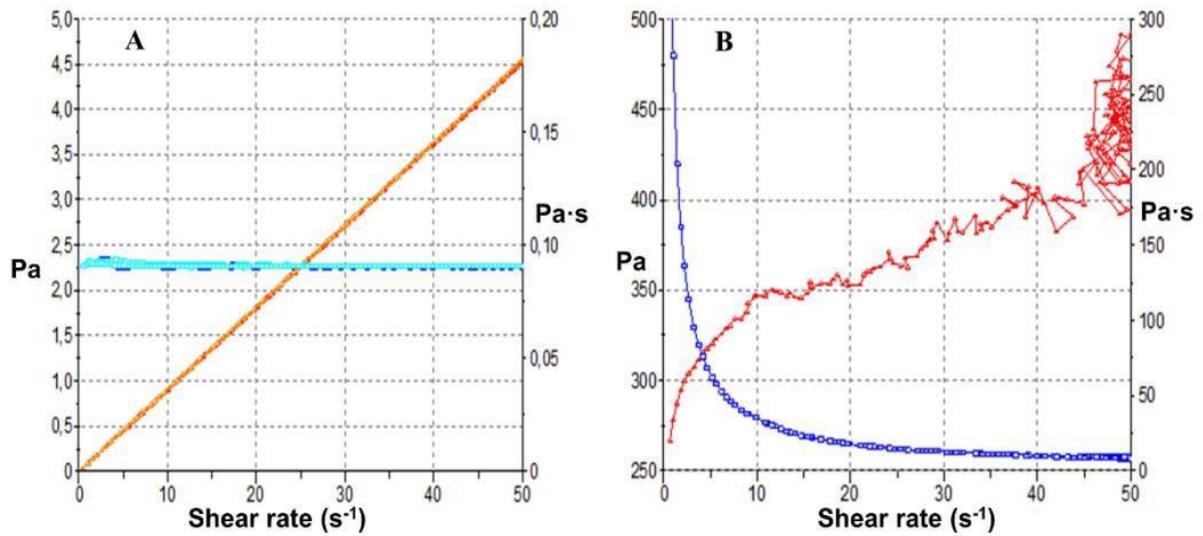


Figura 97. Curvas de flujo y curvas de viscosidad obtenidas para del hidrogel con AmB, a $t_0 = 24$ h: (A) análisis a 4 °C; (B) análisis a 32 °C.

En este tipo de hidrogel, la transición sol-gel se lleva a cabo a medida que aumenta la temperatura y se determinó que la gelificación era en torno a los 23 °C. Por lo tanto a 32 °C la gelificación era completa y el producto muy viscoso, lo que dificultaba la generación de un flujo adecuado dentro del espacio entre el cono y placa del sistema de medida del reómetro. Por ello, en la curva de flujo de la figura 97 B se pudo definir una velocidad de cizalladura crítica, alrededor de 10 s^{-1} , a partir de la cual aparecieron irregularidades en el trazado al no poder fluir libremente la muestra en las condiciones experimentales, dando lugar a la imposibilidad de aportar resultados concluyentes por encima de 10 s^{-1} . Sin embargo, la parte válida de la curva (situada entre 0 y 10 s^{-1}) permitió establecer que el hidrogel con AmB presentaba un comportamiento no newtoniano, con propiedades fluidificantes bajo el aumento de la velocidad de cizalladura (comportamiento pseudoplástico), que se ajustó con el modelo Cross ($r = 0,981$). Así a 32 °C, el valor de la viscosidad de este hidrogel, determinado puntualmente a 10 s^{-1} , resultó ser de 3800 mPa·s. Por otra parte, una estimación de la viscosidad a 50 s^{-1} dio como valor 9800 mPa·s,

aproximadamente 100 veces más alto que a 4 °C, confirmando los resultados de extensibilidad.

Como se esperaba, las características reológicas del hidrogel con AmB al estar formulada con un vehículo termoreversible dependen de la temperatura del estudio. Por esta razón, la caracterización reológica de este tipo de formulaciones es un aspecto fundamental ya que los parámetros reológicos pueden modular las propiedades biofarmacéuticas tales como la cinética de liberación del fármaco (123).

Por otra parte, si el hidrogel se conserva en nevera, se podría aplicar por vía cutánea en forma de spray o roll-on. Una vez en contacto con la piel afectada, a 32 °C la solubilidad de las cadenas de PPO disminuye, se forman micelas, asumiendo estructuras hexagonales y/o cúbicas, aumentando drásticamente la viscosidad. Esta gelificación térmica producida por el P407 es capaz de formar y mantener un depósito en el área cutánea tratada, aumentando el tiempo de contacto, lo que produce características deseables en la liberación del fármaco (235). Todos los resultados sugirieron que después de la aplicación en la piel se alcanzaría el estado GEL del hidrogel en un corto tiempo, ganando viscosidad instantáneamente para mantenerse en la zona aplicada (126).

4.13 PROPIEDADES BIOFARMACÉUTICAS

4.13.1 Cinética de liberación *in vitro*

La figura 98 muestra el perfil de liberación de la AmB a 32 °C en función del tiempo (trucado a 75 h), a partir de muestras alícuotas (n = 6) de la solución simple del fármaco en DMSO y de la nanoemulsión.

La solución simple de AmB no propició una buena liberación del principio activo a través de la membrana, siendo tan solo de un 10% al finalizar el ensayo. Se esperaba que la liberación fuera de mayor magnitud, sin embargo los

resultados obtenidos demostraron lo contrario. Una explicación podría encontrarse en una mayor afinidad de la AmB hacia el medio de disolución (DMSO) que para el medio receptor formado por metanol/N-dimetilformamida/agua (55:15:30 v/v/v). Por otra parte, la liberación de la AmB de la solución siguió una cinética de primer orden.

En el caso de la nanoemulsión con AmB, se observó una liberación prolongada del fármaco, alcanzando prácticamente el 100% a las 75 h. Los valores obtenidos del ensayo de liberación de AmB de la nanoemulsión se ajustaron al modelo matemático que tuviera el menor valor de AIC, siendo la ecuación de

Korsmeyer-Peppas:
$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K \cdot t^n$$

Donde Q_t/Q_∞ y multiplicado por 100, es el porcentaje del fármaco liberado en el momento t , k y n son dos constantes características del medio de disolución y del mecanismo de transporte, respectivamente.

En este caso se obtuvieron los siguientes valores: $k = 5,74 \pm 0,92$ y $n = 0,67 \pm 0,04$, denotando que el proceso siguió un comportamiento no Fickiano o anómalo. Esta difusión anómala está relacionada con una combinación de difusión y erosión en matrices sólidas (236). Sin embargo, este mecanismo, en el caso de los sistemas de emulsión, sigue siendo poco conocido (237), aunque el modelo matemático está destinado a ayudar a la comprensión de los procesos de liberación complejos. Es por esto que la descripción completa del mecanismo de liberación es especialmente difícil debido a la enorme cantidad de variables que deben tenerse en cuenta (238).

Tiempo		Cantidad liberada de AmB (%)		
Horas	Media	Desv. Est.	n	
6	15,94	1,53	6	
8	22,48	2,17	6	
10	25,83	1,81	6	
20	40,57	4,31	6	
25	50,99	4,10	6	
30	58,51	6,75	6	
45	70,66	7,07	6	
50	71,32	2,64	6	
55	75,96	5,67	6	
70	100,53	10,09	6	
75	98,75	5,88	6	

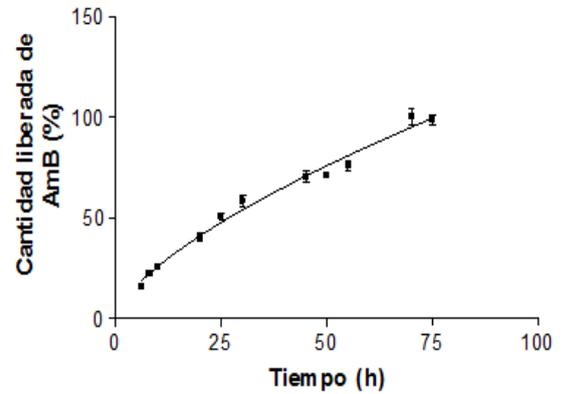


Figura 98. Liberación *in vitro* de AmB (media \pm SD, n = 6), en función del tiempo, a partir de la nanoemulsión.

Los datos obtenidos para el hidrogel demostraron que el vehículo proporcionó una liberación de AmB durante aproximadamente 24 h, con más de un 90% del fármaco cedido (figura 99). El modelo matemático que mejor se ajustaba a los datos experimentales fue el Boltzmann sigmoidal:

$$y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + \exp\left(\frac{V_{50} - X}{Slope}\right)}$$

Donde, y multiplicado por 100 es el porcentaje del fármaco liberado, $Bottom$ es la cantidad de fármaco más baja liberada, Top es la cantidad de fármaco más alta liberada, V_{50} el tiempo en el que la cantidad liberada es la mitad de la máxima y $Slope$ describe la pendiente de la curva.

En este caso se obtuvieron los siguientes valores:

$$Bottom = 46,23 \mu\text{g}, Top = 383,5 \mu\text{g}, V_{50} = 7,991 \text{ h y } Slope = 2,978 \text{ h.}$$

En general, este modelo se utiliza para simular el transporte de fluidos en medios porosos. En el hidrogel donde se evidenció la presencia de poros

mediante análisis mediante SEM (figura 91), el copolímero (poloxámero 407) probablemente realizó una función similar a las matrices porosas. También en otros estudios sobre geles termorreversibles inteligentes se seleccionó dicho modelo matemático para explicar la cinética de liberación del fármaco (239, 240).

Tiempo horas	Cantidad liberada AmB (%)		
	Media	Desv. Est.	n
1	20,27	0,18	6
4	27,90	3,76	6
7	49,46	1,01	6
11	74,64	2,28	6
21	96,67	3,08	6
24	98,63	3,67	6

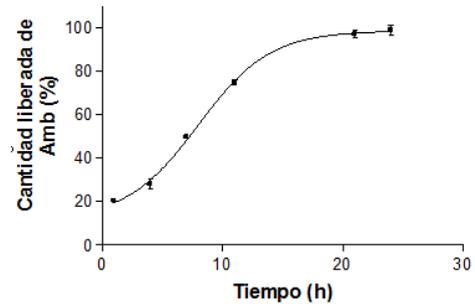


Figura 99. Liberación *in vitro* de AmB (media \pm SD, n = 6), en función del tiempo, a partir del hidrogel.

La liberación de la AmB de su vehículo fue comparativamente mucho más rápida en el hidrogel que en la nanoemulsión. Esto podría deberse a que la alta solubilidad del fármaco en los componentes de la emulsión hace que estos retengan más el fármaco y se libere más lentamente de su matriz. Además, quedó evidenciado que la presencia de poros presentes en los geles poloxámeros, con su alto grado de porosidad (75%), facilitaría la difusión del principio activo a través de su entramado (234).

4.13.2 Estudios de permeación *ex-vivo* y retención de AmB en la piel

En los estudios de permeación *ex-vivo* no se detectaron cantidades cuantificables de AmB en los medios receptores, ni a partir de la nanoemulsión ni del hidrogel. Es por esto que no se procedió al cálculo de los parámetros de flujo ni de permeación.

Al finalizar los ensayos se procedió igualmente a determinar la cantidad de AmB retenida en la piel (figura 100), hallándose valores promedio ($n = 3$) de $17,76 \mu\text{g}/\text{g}/\text{cm}^2$ para la nanoemulsión y de $960,0 \mu\text{g}/\text{g}/\text{cm}^2$ para el hidrogel.

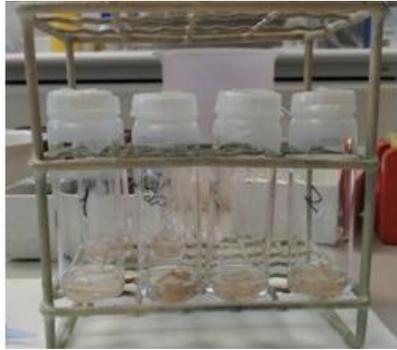


Figura 100. Extracción de AmB en piel humana.

4.14 IMPACTO SOBRE LAS PROPIEDADES BIOMECÁNICAS

Se determinaron la temperatura, los valores de TEWL y de SCH antes y después de la aplicación cutánea de las formulaciones objeto de estudio. Los resultados obtenidos se exponen en la figura 101.

En cuanto a la temperatura de la piel, se observó una ligera disminución, estadísticamente significativa, tras la aplicación de la nanoemulsión con AmB respecto al valor de referencia (figura 101 A). Este comportamiento se suele atribuir más al ritmo circadiano en relación con la temperatura central del cuerpo que a la formulación en sí (241). Además las participantes no notaron que la nanoemulsión provocara un efecto de enfriamiento sobre la piel.

Por otra parte, el TEWL es un indicador importante de la integridad de la piel y, por lo tanto, juega un rol importante en la función biológica de la misma. Cualquier aumento en los valores estaría estrechamente relacionado con alteraciones en la función de barrera de la piel (242). Tras la aplicación de la nanoemulsión con AmB, todas las participantes mostraron a las 2 h un

incremento del TEWL volviéndose a situarse en un rango normal a partir de las 4 h (figura 101 B), probablemente debido a la acción de desorganización del estrato córneo provocado por el Transcutol® P (243).

Finalmente, los valores de SCH a partir de las 2 h de la aplicación de la nanoemulsión con AmB fueron significativamente mayores que los valores a t_0 , tendiendo a regresar a los valores basales al cabo de aproximadamente 8 h (figura 101 C), probablemente a causa del efecto semioclusivo de los componentes oleosos de la formulación.

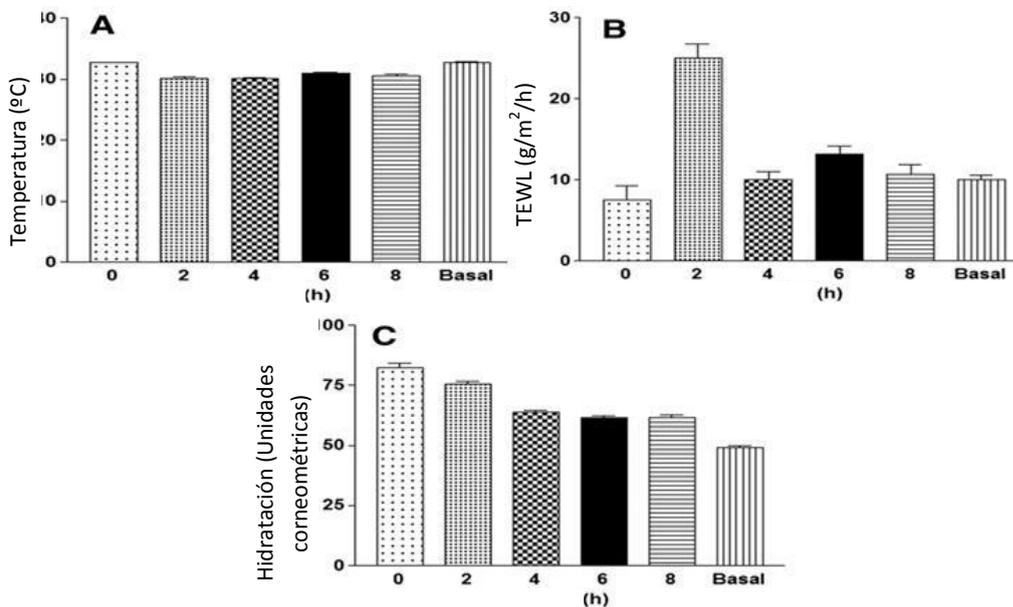


Figura 101. Variaciones de los valores de los parámetros biomecánicos antes y después de aplicación de la nanoemulsión con AmB:

(A) Temperatura, (B) TEWL y (C) SCH.

A partir de los resultados anteriormente comentados se deduce que la aplicación de la nanoemulsión con AmB en la piel de las participantes no alteró las propiedades biomecánicas de la piel, siendo adecuada y segura desde este punto de vista para la aplicación tópica.

En la figura 102 se representan los resultados de los parámetros biomecánicos de la piel, evaluados tras la aplicación del hidrogel con AmB. No se observaron

cambios estadísticamente significativos en los valores de temperatura ni de TEWL de la piel de las participantes ($p \geq 0,05$ en ambos casos).

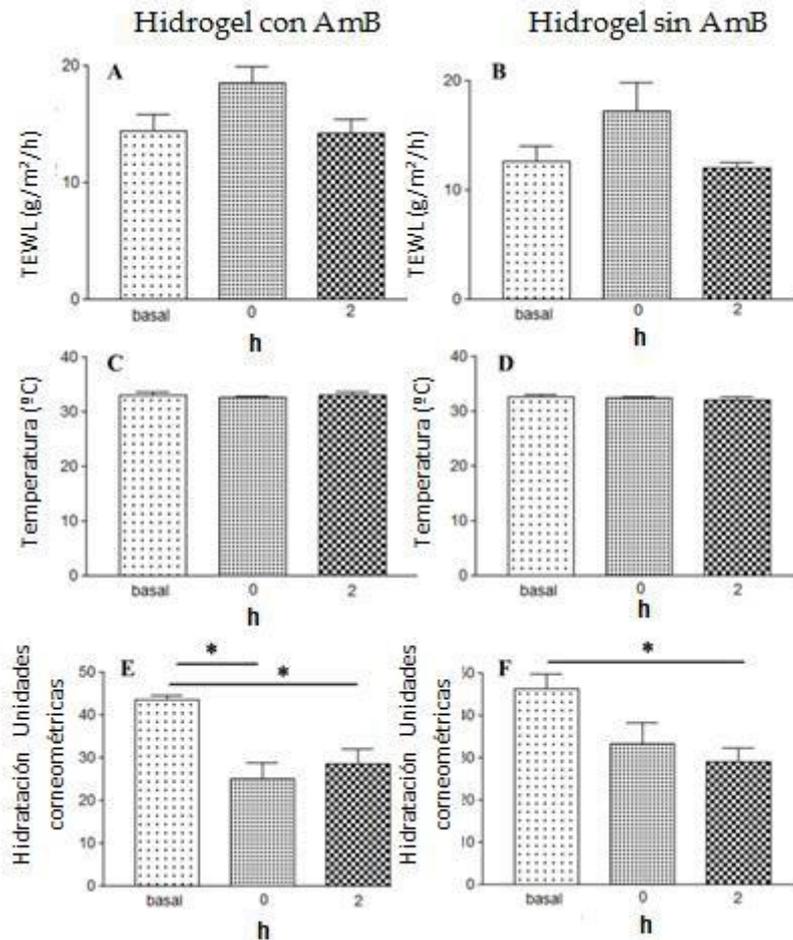


Figura 102. Variaciones de los valores de los parámetros biomecánicas antes y después de aplicación del hidrogel con y sin AmB: TEWL, temperatura y SCH.

En cambio, la aplicación del gel medicamentoso originó una reducción significativa del SCH. Esta disminución de la humedad en la zona de aplicación del producto podría estar relacionada con la capacidad que tiene el hidrogel de absorber la excreción de agua producida por las glándulas sudoríparas. El gel de poloxámero es ávido de agua y cuando se seca en la superficie de la piel forma una película blanca (figura 103) que capta su humedad, todo ello dentro de un estado de equilibrio con la humedad ambiental. Este efecto resultaría adecuado sobre todo en procesos de leishmaniosis cutánea donde la piel se

encuentra ulcerada y en ocasiones húmeda, por lo que la formulación podría evitar la proliferación de microorganismos en la zona afectada (216, 244, 245).

Por otra parte, al comparar los valores de los tres parámetros biomecánicos evaluados para el hidrogel con y sin AmB (figura 102), se deduce que la incorporación del fármaco no modifica significativamente las propiedades del gel desde este punto de vista.



Figura 103. Capa blanquecina formada sobre la piel después de la aplicación del hidrogel con AmB.

Después de unas horas de la aplicación de ambas formulaciones con AmB, las participantes no manifestaron picor, escozor, irritación, ni otras reacciones adversas. Como resultado general, se podría considerar que el hidrogel con AmB no alteró las propiedades biomecánicas de la piel ni provocó reacciones indeseables. Otros estudios han informado del uso seguro del poloxámero 407 como agente vehículo de fármacos para la aplicación cutánea (126).

4.15 ESTUDIOS DE TOLERANCIA: TEST DE DRAIZE

Los conejos fueron lacerados con un estilete para simular las heridas causadas en los procesos leishmaniasis cutánea (LC). Las formulaciones se aplicaron frotando suavemente durante aproximadamente 2 min. En las figuras 104 y 105

se muestran los resultados del ensayo, para la nanoemulsión y el hidrogel, respectivamente.

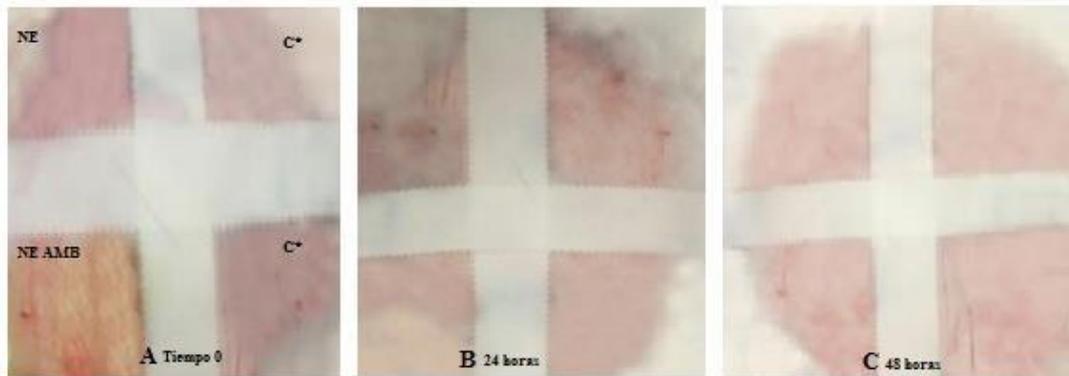


Figura 104. Test de Draize con sistemas emulsionados a t_0 , 24 h y 48 h.
NE = nanoemulsión sin AmB, NE AMB = nanoemulsión con AmB, C° = control (sin nada).



Figura 105. Test de Draize con el hidrogel de poloxámero a t_0 , 24 h y 48 h.
Gel = hidrogel sin AmB, AMB gel = hidrogel con AmB, C° = control (sin nada).

Los conejos no mostraron ningún tipo de incomodidad a lo largo del ensayo. No se detectaron cambios aparentes (a simple vista) en la piel de los conejos ni se observaron fenómenos de edema, eritema o alergia después de 48 h de la aplicación de las formulaciones (figuras 104 y 105).

4.16 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

Se evaluó la actividad antifúngica de la nanoemulsión con AmB después de 48 h en contacto con tres cepas de *Candida spp.*: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* (figura 106), así como *Aspergillus brasiliensis* (figura 107).

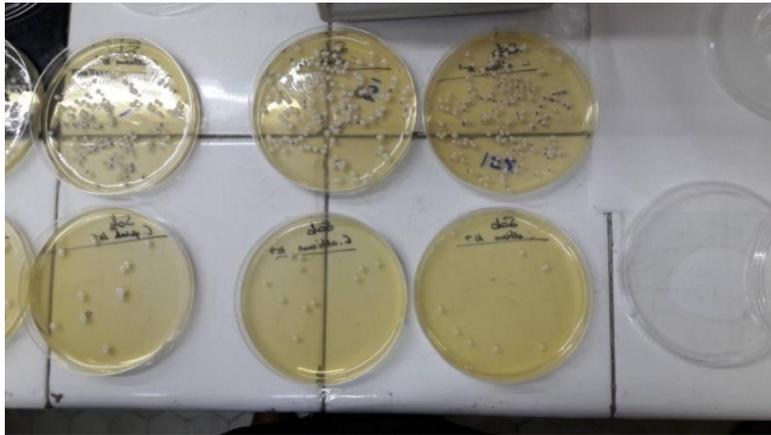


Figura 106. Cepas de *Candida spp.* utilizadas en el ensayo de determinación de la CMI de la nanoemulsión e hidrogel con AmB.



Figura 107. Cepa de *Aspergillus brasiliensis* utilizada para la detección de la CMI de la nanoemulsión con AmB.

En la tabla 30 se resumen los resultados obtenidos en el ensayo de actividad antimicótica de la nanoemulsión con y sin AmB y de la solución simple de AmB en DMSO. Para *Candida spp.*, la nanoemulsión con AmB dio un valor de CMI por debajo de los indicados en estudios llevados a cabo con otras formulaciones de AmB (246). Asimismo, la CMI para la prueba de sensibilidad para *Aspergillus brasiliensis* es $\leq 1 \mu\text{g/mL}$, sin embargo con la nanoemulsión medicamentosa se

obtuvo una CMI de 0,13 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que también estaba por debajo de otros valores indicados en la literatura científica (247, 248). La solución de AmB en DMSO comparada con la nanoemulsión con dicho fármaco presentó valores de CMI inferiores frente a *Candida spp.*, mientras que son idénticos frente a *Aspergillus brasiliensis*. Por otra parte, en todos los casos la nanoemulsión sin AmB (nanoemulsión blanco) no exhibió ningún efecto inhibitor sobre el crecimiento microbiano.

Ahora bien, cuando se hizo el estudio de permeación *ex vivo* del AmB a partir de la nanoemulsión, no se detectaron cantidades de AmB en la cámara receptora de las celdas de Franz. Sin embargo, la cantidad de AmB retenida después de 36 h de la aplicación fue de 17,76 $\mu\text{g}/\text{g}/\text{cm}^2$. Considerando la cantidad de fármaco retenido en la piel, los valores de CMI y la densidad de la piel hidratada (0,964 g/mL) (249), podríamos establecer que la nanoemulsión con AmB proporcionaría suficientes cantidades locales de fármaco y, por lo tanto, ejercería una acción antifúngica eficaz sobre la piel en enfermedades micóticas tópicas. De esta forma, la infección fúngica sería tratada eficazmente.

En caso de infecciones tópicas, la barrera cutánea podría ser dañada y, por lo tanto, su permeabilidad aumentada. En estas circunstancias, el efecto de depósito del Transcutol®P proporcionaría ventajas adicionales al aumentar su concentración en las capas más profundas de la piel (242).

Tabla 30. Resultados de la determinación de la CMI para la nanoemulsión con y sin AmB y la solución de AmB en DMSO frente a las diferentes cepas ensayadas, transcurridas 48 h del inicio del ensayo.

Cepa	Formulaciones	Pocillos con crecimiento del inóculo	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	AmB en solución	A partir del nº 10	$0,10 \pm 0,01$
	Nanoemulsión con AmB	A partir del nº 8	$0,78 \pm 0,01$
	Nanoemulsión sin AmB	Todos	-
<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	AmB en solución	A partir del nº 10	$0,10 \pm 0,06$
	Nanoemulsión con AmB	A partir del nº 9	$0,39 \pm 0,02$
	Nanoemulsión sin AmB	Todos	-
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	AmB en solución	A partir del nº 10	$0,10 \pm 0,02$
	Nanoemulsión con AmB	A partir del nº 12	$0,19 \pm 0,05$
	Nanoemulsión sin AmB	Todos	-
<i>Aspergillus brasiliensis</i> 10404 ATCC	AmB en solución	A partir del nº 11	$0,13 \pm 0,03$
	Nanoemulsión con AmB	A partir del nº 11	$0,13 \pm 0,09$
	Nanoemulsión sin AmB	Todos	-

Para el hidrogel con AmB la actividad antimicótica se determinó únicamente con las cepas de *Candida spp.* No fue posible llevarla a cabo con *Aspergillus brasiliensis* por problema de inoculación. En la tabla 31 se resumen los resultados obtenidos con esta formulación así como el hidrogel sin AmB y la solución de AmB en DMSO.

En comparación con la nanoemulsión con AmB, el hidrogel con AmB exhibió los valores más bajos de CMI: 0,09; 0,37 y 0,19 $\mu\text{g/mL}$ frente a *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, respectivamente, sugiriendo una mayor eficacia antifúngica *in vitro*. Este comportamiento ha sido descrito en la

literatura donde formulaciones con poloxámeros y agentes antifúngicos presentaron efectos sinérgicos frente a las levaduras (250).

La solución de AmB en DMSO comparada con el hidrogel con dicho fármaco presentó valores de CMI superiores frente a *Candida spp.* Por otra parte, en todos los casos el hidrogel sin AmB (blanco) no exhibió ningún efecto inhibitor sobre el crecimiento microbiano.

Al igual que en los estudios de permeación con la nanoemulsión, se observó que la AmB vehiculado en el hidrogel de poloxámero no pasó a través de la piel humana, lo que indicó que el fármaco solamente quedó retenido en la misma a razón de 960,0 $\mu\text{g}/\text{g}/\text{cm}^2$. Por tanto, de acuerdo con los valores de CMI obtenidos en los ensayos *in vitro*, el hidrogel con AmB ejercería un efecto antimicótico adecuado sobre la piel infectada.

Tabla 31. Resultados de la determinación de la CMI para el hidrogel con y sin AmB y la solución de AmB en DMSO frente a las diferentes cepas ensayadas, transcurridas 48 h del inicio del ensayo.

Cepa	Formulaciones	Pocillos con crecimiento del inóculo	CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	AmB en solución	A partir del nº 10	0,15 \pm 0,02
	Hidrogel con AmB	A partir del nº 11	0,09 \pm 0,001
	Hidrogel sin AmB	Todos	-
<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	AmB en solución	A partir del nº 8	0,60 \pm 0,05
	Hidrogel con AmB	A partir del nº 9	0,37 \pm 0,01
	Hidrogel sin AmB	Todos	-
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	AmB en solución	A partir del nº 9	0,30 \pm 0,17
	Hidrogel con AmB	A partir del nº 10	0,19 \pm 0,001
	Hidrogel sin AmB	Todos	-

4.17 MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA DE LAS FORMULACIONES DE AmB APLICADA A *CANDIDA ALBICANS*

La figura 108 A muestra una célula de levadura de *Candida albicans* atrapada en un poro. En la figura 108 B puede observarse claramente la superficie rugosa de la célula de levadura y señales de deterioro tras las 24 h del tratamiento con la nanoemulsión de AmB.

La figura 109 A y D muestra las imágenes de deflexión de alta resolución de las levaduras celulares para cuantificar los cambios en las propiedades nanomecánicas de la pared celular. Los mapas de elasticidad se obtuvieron a lo largo de la superficie de la pared celular (figura 109, B y E). A partir de los histogramas correspondientes se ve claramente el efecto de la nanoemulsión con AmB (figura 109, C y F). Mientras en el caso de la pared celular no tratada, el valor del módulo de Young era $18,4 \pm 0,4$ MPa, en la levadura tratada la pared celular exhibió un valor del módulo de Young es de 162 ± 2 kPa, es decir 100 veces menos rígido que el no tratado.

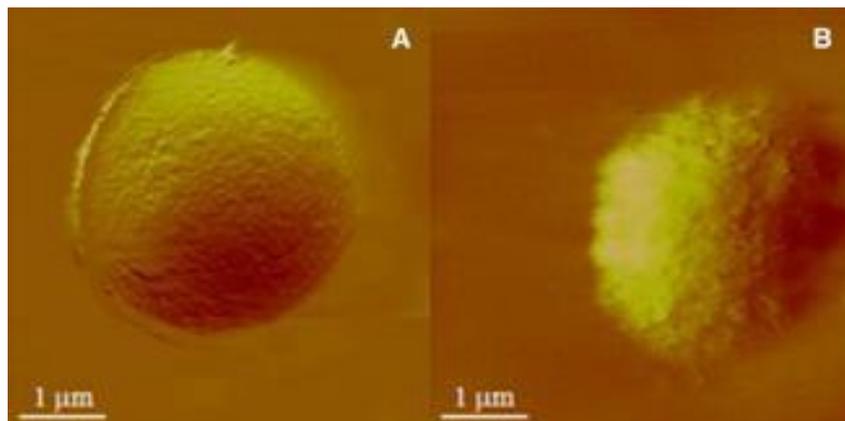


Figura 108. Imágenes de célula de levadura única de *Candida albicans*: (A) Imagen de deflexión de *Candida albicans* sin tratar; (B) imagen de deflexión de *Candida albicans* a las 24 h del tratamiento con la nanoemulsión de AmB.

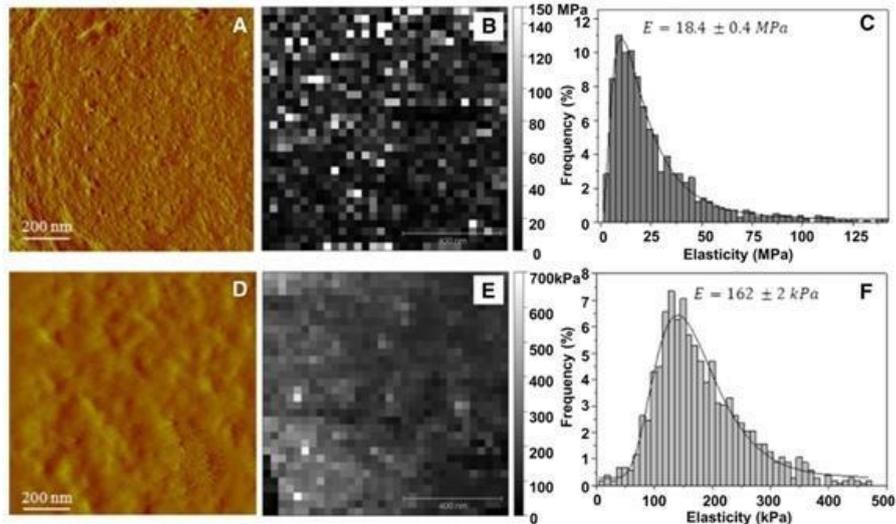


Figura 109. Mapeo de la elasticidad de la superficie celular.

(A y D) Imágenes de deflexión de alta resolución de *Candida albicans* (A) sin tratamiento y (D) tratados con nanoemulsión de AmB; (B y E) mapas de elasticidad; (C y F) distribución de los valores de elasticidad correspondientes a los mapas de elasticidad.

La figura 110 muestra el efecto de una solución de P407 (hidrogel base) sobre la célula de *Candida albicans*. La figura 110 A muestra la imagen de deflexión de una sola célula de levadura atrapada en un poro. A partir de la imagen, se ve claramente el poro en la parte superior izquierda de la imagen en color rojizo, mientras que la superficie de la célula muestra una región extendida cubierta por estructuras filamentosas. En las figuras 110 B y C se representan las imágenes de zoom de mapa topográfico y de elasticidad de esta región antes de la adición de solución de P407 a una concentración final de 6,5% (p/v), y las figuras 110 D y E, después de la adición. Antes de la adición de la solución de P407, la superficie es bastante lisa y se pueden observar algunas estructuras filamentosas (figura 110 B) y se diferencian por sus diferentes valores de módulo de Young con respecto a la estructura de volumen celular. Después de la adición de la solución P407, la superficie de la célula de levadura es más rugosa y ya no se pueden observar estructuras filamentosas (figura 110 D). El mapa de elasticidad de la región (figura 110 E) evidenció que se vuelve más homogéneo con la incorporación del copolímero.

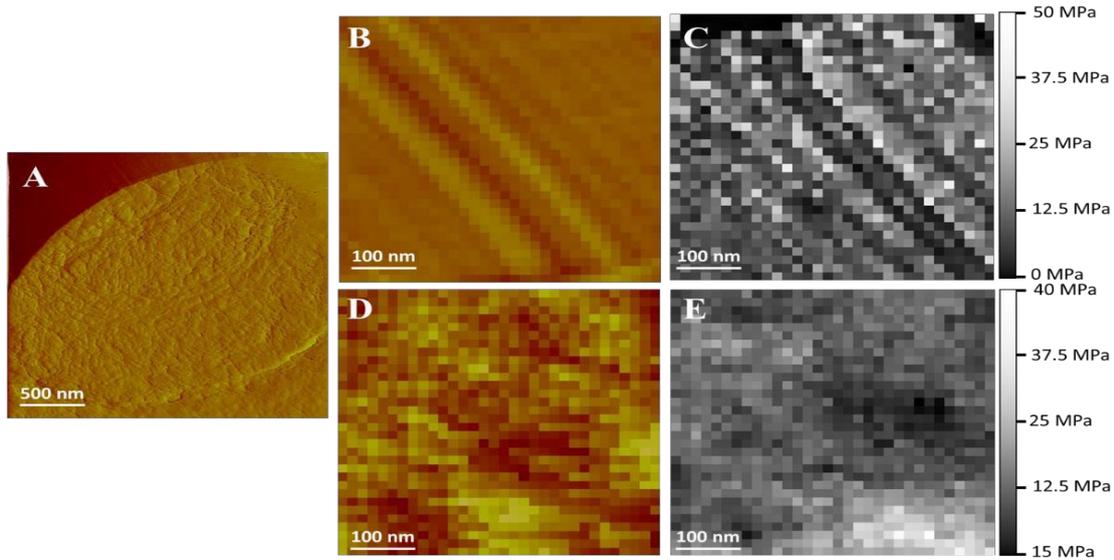


Figura 110. Efecto de la solución P407 en células de *C. albicans*:

(A) Imagen de deflexión de una sola célula de levadura atrapada en un poro; (B) imagen topográfica de la superficie de la levadura antes de la aplicación de la solución P407; (C) mapa de elasticidad de la imagen (B) antes de la aplicación de la solución P407; (D) imagen topográfica de la levadura después de la aplicación de la solución P407; (E) Mapa de elasticidad de la Imagen (D) después de la aplicación de la solución P407.

La figura 111 muestra el efecto del hidrogel con AmB sobre las células de *Candida albicans*. Las imágenes de deflexión, topográficas y de elasticidad (figuras 111 A, B y C) respectivamente, de una sola célula de levadura de *Candida albicans* atrapada en un poro son bastante similares a las mostradas en la figura 111 A, aunque las estructuras filamentosas son menos evidentes en este caso. La adición de AmB en el hidrogel aparentemente alteró la célula de *Candida albicans*, tal y como se muestra en la figura 111 D. En la imagen se ve claramente dos regiones diferentes en la superficie celular: i) una región rojiza (región baja) que cubre casi el 80% de la superficie celular, y ii) una banda arqueada amarillenta (región alta) que cruza la superficie desde la parte superior - Izquierda a centro derecha de la superficie de la célula y que sobresale 40-80 nm sobre la superficie rojiza. Una inspección minuciosa de esta banda amarillenta evidenció una estructura que recuerda una hoja arrugada.

observadas, aunque las diferencias en los valores del módulo de Young entre los filamentos y la estructura extensa no son tan distintivas. En las figuras 111 G y H se muestra el mapa topográfico y de elasticidad, respectivamente, de la región alta de la figura 111 D. A partir de las imágenes, es posible observar dos regiones diferenciadas: i) una en la diagonal desde la esquina superior izquierda hasta la esquina inferior derecha de la figura 111 H (región más oscura) y ii) una segunda región formada por los valores más altos de Young (región más clara) en la figura 111 H que ocupa las esquinas inferior izquierda y superior derecha de la imagen con valores de módulo de Young más altos que la región baja.

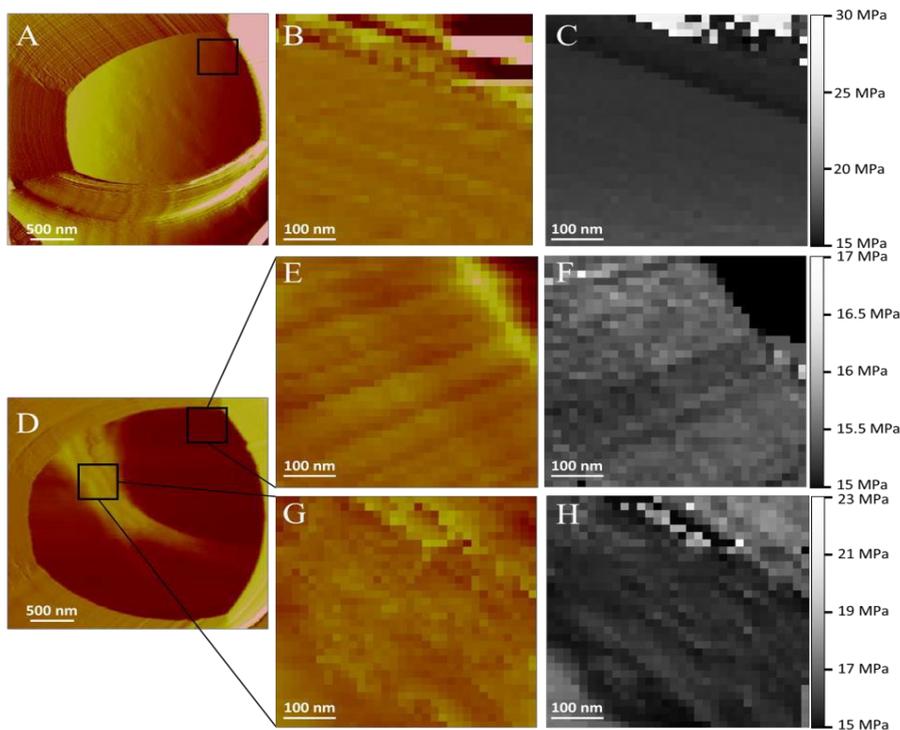


Figura 111. Efecto del hidrogel con AMB sobre células de *Candida albicans*: (A) imagen de deflexión de una sola célula de levadura atrapada en un poro; (B) imagen topográfica de la zona recuadrada en la imagen A; (C) mapa de elasticidad de la región mostrada en la imagen B; (D) superficie de una sola célula de levadura después de estar expuesta al hidrogel con AmB. Se observa una región rojiza (región baja) que cubre casi el 80% de la superficie de la célula y una banda arqueada amarillenta (región alta) que cruza la superficie desde la parte superior izquierda a la centro derecha de la superficie de la célula; (E) imagen topográfica de la región baja; (F) mapa de elasticidad de la región baja mostrada en E); (G) imagen topográfica de la región alta; (H) mapa de elasticidad de la región alta mostrada en (G).

Teniendo en cuenta que la región más oscura en la figura 111 H es la región más alta en la imagen topográfica (figura 111 G), es posible identificar las láminas arrugadas como regiones con bajo módulo de elasticidad, sugiriendo que el material en estas estructuras no está tan empaquetado como en el caso del control (ausencia de AmB).

Por otro lado, en la figura 112 se muestran los perfiles de los valores de elasticidad en función de su frecuencia. En la figura 112 se representa los valores individuales del módulo de Young en función de su frecuencia antes y después de la adición de la solución P407. Antes de la adición de la solución P407 (figura 112 A), la célula de levadura mostró una amplia distribución de los valores del módulo de Young con un valor central de $21,0 \pm 0,4$ MPa. Después de la adición del copolímero, la distribución de los valores es más estrecha y se centra en un valor más alto de $26,29 \pm 0,08$ MPa.

La figura 112 B, antes de la adición del hidrogel, muestra un pico central alrededor de 18,48 MPa y una amplia función de distribución. Después de la adición del hidrogel con AmB, la región baja representada en la figura 112 D corresponde a un pico más estrecho con un valor medio del módulo de Young que se desplaza hacia valores más pequeños (15,63 MPa). Por el contrario, la estructura que sobresale como láminas arrugadas en la figura 111 D muestra una distribución bimodal, una cercana a los valores de la célula de *Candida albicans* antes de la adición del hidrogel, con un valor medio del módulo de Young de 18,10 MPa, y otra desplazada hacia valores más pequeños, 16,62 MPa.

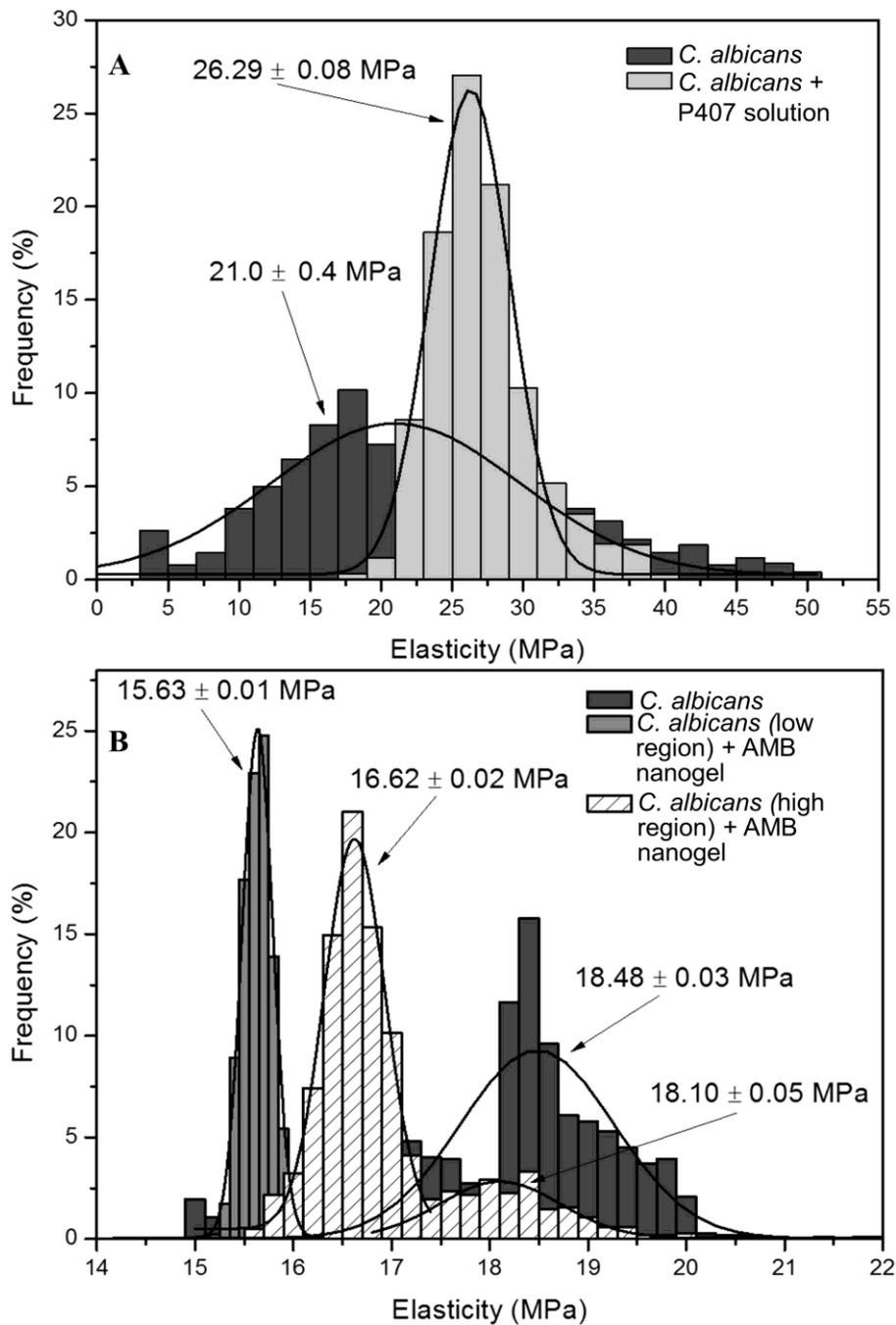


Figura 112. Los valores individuales del módulo de Young en función de su frecuencia en las células de *C.albicans*:

- (A) Los valores individuales del módulo de Young antes y después de la adición de la solución P407. (B) Los valores individuales del módulo de Young antes y después de la adición del hidrogel con AmB.

4.18 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD LEISHMANICIDA

4.18.1 Evaluación de la citotoxicidad de los excipientes y las formulaciones sobre macrófagos no parasitados

Se determinó la toxicidad celular de las formulaciones objeto de estudio (solución, nanoemulsión e hidrogel con AmB y excipientes) sobre células no parasitadas por leishmania. Cada línea celular posee diferentes características y comportamientos frente a las sustancias. Como se demostró en los resultados del apartado de permeación transdérmica, la AmB no se absorbió, no obstante en procesos de micosis y leishmaniasis cutáneas, la piel se podría encontrar lacerada por lo que es más probable que ciertas cantidades de fármaco se liberen al torrente sanguíneo, es por esto que los datos obtenidos nos pueden brindar información valiosa en un supuesto que la AmB pueda absorberse.

Con el fin de determinar la citotoxicidad de cada compuesto y sus excipientes estos se testaron sobre células no infectadas. En las figuras 113-117 se muestran los porcentajes de viabilidad obtenidos a las diferentes concentraciones. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron tras la incubación durante 24 horas de las dos formulaciones objeto de estudio y sus excipientes en dos líneas celulares RAW 264,7 y J774.

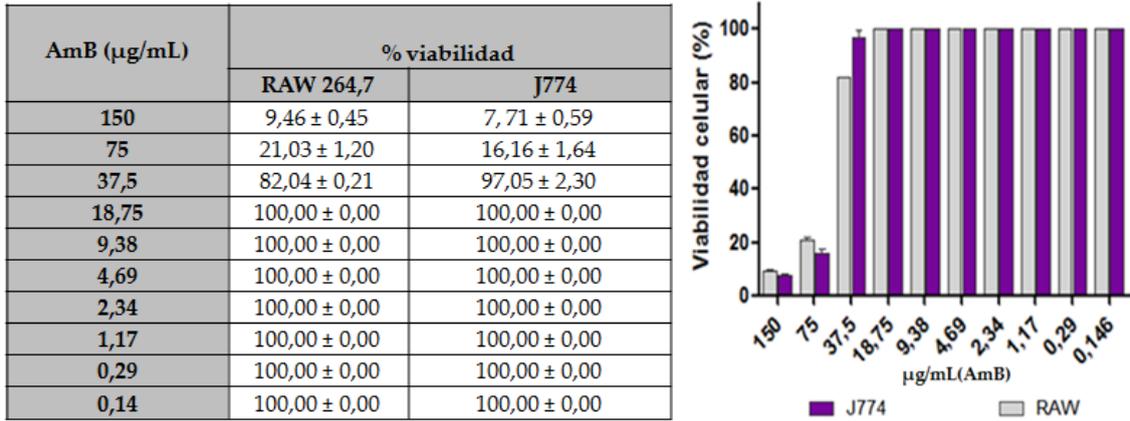


Figura 113. Acción citotóxica de la solución de AmB expresada en % de viabilidad en células RAW 264,7 y J774.

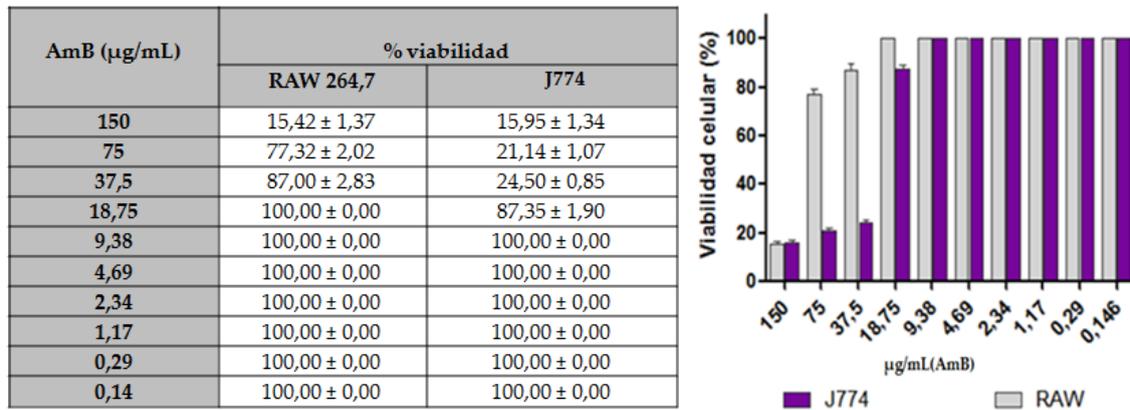


Figura 114. Acción citotóxica del hidrogel con AmB expresada en % de viabilidad en célula RAW 264,7 y J774.

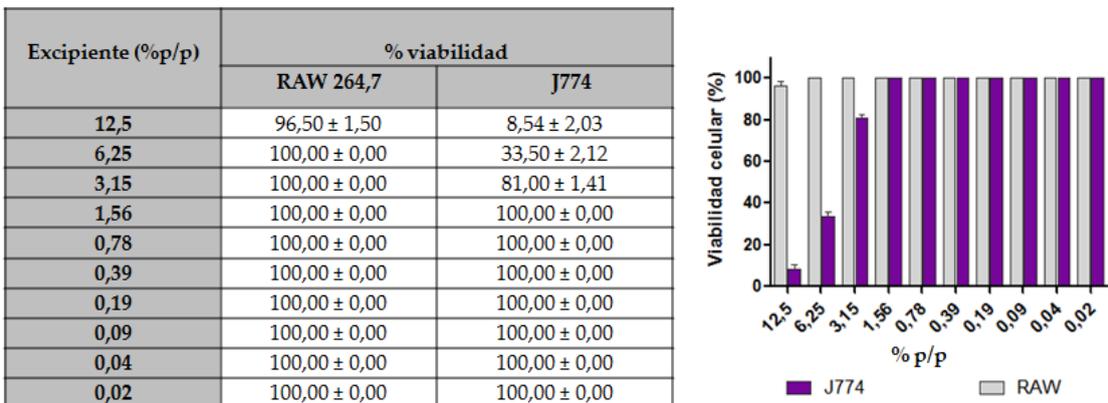


Figura 115. Acción citotóxica del poloxámero 407 expresada en % de viabilidad en célula RAW 264,7 y J774.

AmB (µg/mL)	% viabilidad	
	RAW 264,7	J774
150	81,56 ± 1,88	67,40 ± 4,94
75	84,89 ± 1,42	73,82 ± 2,30
37,5	88,14 ± 3,03	81,05 ± 1,48
18,75	99,00 ± 1,41	100,00 ± 0,00
9,38	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
4,69	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
2,34	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
1,17	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
0,29	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
0,14	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00

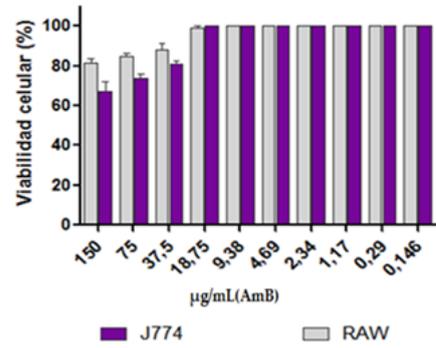


Figura 116. Acción citotóxica de la nanoemulsión con AmB expresada en % de viabilidad en célula RAW 264,7 y J774.

Excipiente (%p/p)	% viabilidad	
	RAW 264,7	J774
12,5	87,50 ± 3,38	71,56 ± 1,89
6,25	100,00 ± 0,00	73,95 ± 1,97
3,15	100,00 ± 0,00	81,14 ± 1,35
1,56	100,00 ± 0,00	98,13 ± 2,65
0,78	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
0,39	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
0,19	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
0,09	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
0,04	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
0,02	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00

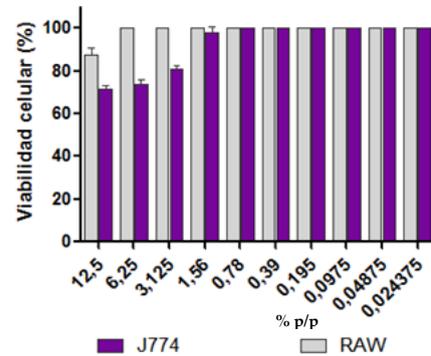


Figura 117. Acción citotóxica de la nanoemulsión sin AmB expresada en % de viabilidad en célula RAW 264,7 y J774.

La determinación de la concentración citotóxica 50 (CC50) de las dos formulaciones y sus excipientes se señalan a continuación (tabla 32) donde a mayor concentración provocada por la formulación menor capacidad citotóxica se produce, siendo la nanoemulsión con y sin AmB las mezclas menos tóxicas tanto en células RAW 264,7 como en J774.

Tabla 32. Concentración Citotóxica 50 de las formulaciones y sus excipientes.

Compuestos	CC50 $\mu\text{g/mL}$	
	RAW	J774
AmB solución (150-0,14($\mu\text{g/mL}$))	56,34 \pm 0,29	57,80 \pm 0,24
NE AmB 150-0,14($\mu\text{g/mL}$)	95,76 \pm 0,28	342,13 \pm 0,23
Hidrogel AmB 150-0,14($\mu\text{g/mL}$)	81,61 \pm 0,37	37,30 \pm 0,31
Formulación	CC50 % p/p	
NE 12,5-0,02 %	> 12,50	38,94 \pm 0,20
Poloxamer 407 12,5-0,02 %	> 12,50	2,59 \pm 0,15

La solución de AmB presentó la misma toxicidad en ambas líneas celulares, en cambio como se indica en la figura 114 y 115, el excipiente del hidrogel (poloxámero 407) y el hidrogel con AmB han sido más tóxicos sobre las células J774 que en las células RAW 264,7. Este mismo comportamiento también ha sido observado con otras líneas celulares (línea celular Vero, datos no publicados), situación que podría deberse a la resistencia a fármacos causada por la presencia de la glicoproteína-P en la estructura de estas células. Por otra parte, la citotoxicidad provocada por el poloxámero también ha sido observada por otros autores ya que este polímero revierte esta resistencia aumentando la susceptibilidad a la AmB, considerándose uno de los nanotransportadores poliméricos más estudiados para ensayos *in vivo*, demostrando ser biocompatibles y biodegradables (126 , 251).

La nanoemulsión con y sin AmB disminuyó la toxicidad celular para ambas líneas celulares. De acuerdo con la literatura científica, los componentes de esta

formulación son utilizados ampliamente para su aplicación en piel. En general los excipientes resultaron inocuos para las células RAW excepto para las J774.

Teniendo en cuenta las diferencias en la capacidad citotóxica de los compuestos sobre las diferentes líneas celulares creemos importante probar los compuestos sobre diferentes líneas.

4.19 CURVAS DE CRECIMIENTO DE *LEISHMANIA SPP.*

Según muestran los resultados, todas las cepas presentaron su fase de crecimiento exponencial después de 6 días, lo que supone que esta es la etapa adecuada para llevar a cabo las pruebas de actividad *in vitro* con las formulaciones.

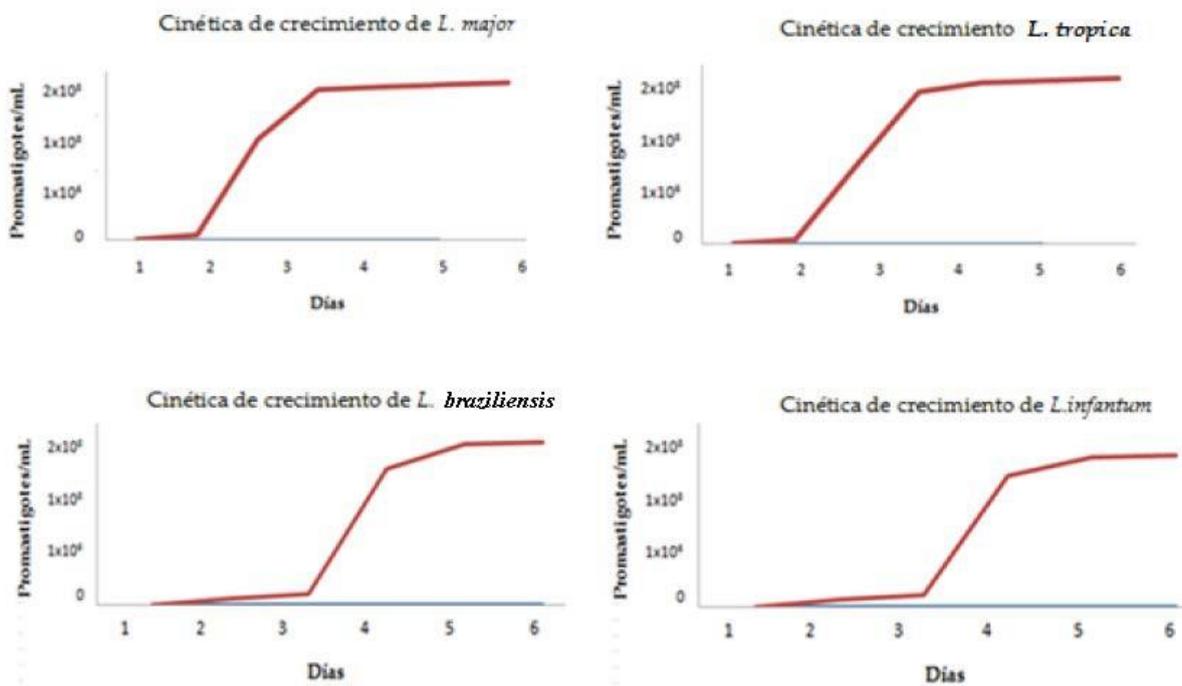


Figura 118. Curvas de crecimiento de las cuatro especies de Leishmania.

4.18 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD *IN VITRO* DE LA NANOEMULSIÓN DE AmB SOBRE PROMASTIGOTES DE 4 ESPECIES DE LEISHMANIA.

El estudio de la actividad leishmanicida *in vitro* de la nanoemulsión con y sin fármaco y de la AmB en solución se realizó frente a promastigotes de las cuatro especies de Leishmania. En la tabla 33 se pueden observar los valores de IC50 expresados en porcentaje de excipiente. En la tabla 34 se señalan los resultados de la capacidad leishmanicida (IC50) de la nanoemulsión con AmB respecto a la solución de AmB frente a las 4 especies de Leishmania

Tabla 33. Determinación de la IC50 de la nanoemulsión sin fármaco frente a promastigotes de las cuatro especies de Leishmania.

Compuesto(%p/p)	IC50 %p/p			
	<i>L. infantum</i>	<i>L.tropica</i>	<i>L. major</i>	<i>L. braziliensis</i>
Nanoemulsión (3-0.093%)	0,12 ± 0,30	0,16 ± 0,03	0,42 ± 0,08	0,66 ± 0,00

La acción leishmanicida de la nanoemulsión sin fármaco mostró un mayor efecto para *L. infantum* y *L. tropica* (0,12 ± 0,30% y 0,16 ± 0,03%, respectivamente). Esta mayor actividad leishmanicida también se observó en *Leishmania tropica* al ensayar la nanoemulsión con el fármaco (tabla 34).

Tabla 34. Determinación de la IC50 de la nanoemulsión con AmB respecto a la solución de AmB frente a promastigotes de las cuatro especies de *Leishmania*.

Compuestos ensayados (µg/mL)	IC 50 (µg/mL)			
	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>	<i>L. major</i>	<i>L. braziliensis</i>
Solución de AmB (150-0,14µg/mL)	0,93 ± 0,22	0,63 ± 0,24	0,20 ± 0,01	0,48 ± 0,01
Nanoemulsión con AmB (150-0,14 µg/mL)	0,63 ± 0,09	0,26 ± 0,09	0,33 ± 0,23	0,64 ± 0,61

Los estudios de la actividad leishmanicida *in vitro* de las formulaciones con y sin AmB se llevó a cabo en promastigotes y amastigotes de *Leishmania tropica* (tabla 35). Los valores de IC50 obtenidos en ambas etapas del parásito, mostraron que ambas formulaciones mejoran significativamente la actividad *in vitro* en comparación con la solución de AmB disminuyendo los valores de IC50.

Tabla 35. Valores de IC50, CC50 e IS de las formulaciones con AmB ensayadas en promastigotes y amastigotes de *Leishmania tropica*.

Compuesto	IC50 µg/mL		CC50 µg/mL	IS
	Promastigotes	Amastigotes	RAW 264,7	(Amastigotes)
AmB solución	0,73 ± 0,02	1,79 ± 0,02	56,34 ± 0,29	31,47
NE AmB	0,26 ± 0,26	0,73 ± 0,02	95,76 ± 0,28	130,95
Hidrogel AmB	0,37 ± 0,05	1,29 ± 0,01	81,61 ± 0,37	63,26
Formulación	IC50 %p/p		CC50 % p/p	
NE sin AmB	0,16 ± 0,03	0,39 ± 0,02	> 50,00	-
Hidrogel sin AmB	>12,5	>0,78	> 25,00	-

Los valores de Índice de selectividad (IS) nos indican la capacidad que tienen las formulaciones de generar un efecto antiparasitario frente a los amastigotes de *Leishmania tropica*, donde a mayor IS mayor efecto se produce.

Los valores de IC₅₀ y el IS de la NE-AMB tanto para promastigotes como para amastigotes indicaron una mayor actividad leishmanicida y a la vez una menor citotoxicidad, siendo esta formulación más efectiva, probablemente debido al efecto provocado por la nanoemulsión sin AmB a concentraciones de la mezcla por encima del $0,16 \pm 0,03\%$ y $0,39 \pm 0,02$ respectivamente, lo cual se podría atribuir a la presencia de Labrasol® en la formulación ya que en estudios previos (datos no publicados) se ha demostrado el efecto provocado de este componente frente a ciertas líneas celulares.

A pesar de que los valores de IC₅₀ del hidrogel con AmB fueron ligeramente más altos que los obtenidos por la nanoemulsión con fármaco, esta formulación basada en poloxámero 407 mejoró la efectividad frente a *Leishmania* en comparación con la solución de AmB. Este excipiente ofrece medios atractivos para su uso como la fácil elaboración, su estabilidad a bajas temperaturas y bajo costo de producción, condiciones favorables para los países del tercer mundo donde la leishmaniosis es endémica y no todas las personas que padecen esta enfermedad tienen acceso al tratamiento convencional (252). Además, queda evidenciado en la literatura científica, el efecto *in-vivo* provocado por los geles micelares basados en poloxámero 407 con AmB en el tratamiento de la leishmaniasis tegumentaria (Leishmaniasis cutánea y mucocutánea).

Los valores de IC₅₀ encontrados en este estudio estarían en consonancia con los encontrados por otros autores ($0,2-3,7 \mu\text{g/mL}$) (253-257).

Teniendo en cuenta los valores de IC₅₀ y la cantidad de AmB retenida en la piel ($17,7 \mu\text{g/g/cm}^2$ y $960,0 \mu\text{g/g/cm}^2$) además de la baja toxicidad encontrada para las formulaciones objeto de estudio, podríamos deducir que la nanoemulsión y

el hidrogel con AmB son candidatos promisorios a un futuro tratamiento para la leishmaniosis cutánea.

4.21 COMPORTAMIENTO DE LOS PROMASTIGOTES FRENTE A LAS FORMULACIÓN DE AmB MEDIANTE SEM

En las imágenes de microscopía, se puede observar el efecto de las formulaciones sobre los promastigotes en oposición al control negativo (figura 119 A). Asimismo, se puede observar que los excipientes del hidrogel sin fármaco (figura 119 B) no presentan ningún efecto aparentemente frente a estas células.

La degradación de la célula normal se observa con el valor IC₅₀ previamente obtenido en las pruebas *in vitro*.

En la figura 119 C se puede observar cómo la nanoemulsión genera una ligera acción frente a la célula, en comparación con las imágenes A y B, donde se observan las células intactas. En la figura 119 D se observa el efecto de la formulación al deformar la membrana del promastigote y en la imagen E se observa el efecto de la formulación sobre la membrana y el flagelo, respectivamente. Las concentraciones de AmB encontradas como IC₅₀ en los ensayos *in vitro* fueron: $0,26 \pm 0,09$ para la nanoemulsión-AmB y $0,37 \pm 0,05$ µg/mL para el hidrogel-AmB. Se observó la existencia de un número considerable de poros en las células tratadas por las formulaciones que contenían AmB. Ello explicaría el efecto de la molécula en la membrana celular presente en los promastigotes, lo que provocaría la muerte de este estadio del parásito. Estos resultados son similares a los obtenidos por Peter Easton y colaboradores (2017) donde ponen en evidencia la formación de estos poros al poner en contacto los promastigotes con un péptido llamado DRS01 el cual ha demostrado tener un buen efecto sobre las membranas del parásito (258). No obstante, nuestro

producto ensayado no incluye el péptido DRS01 sino AmB cuyos mismos efectos han sido ya indicados en la bibliografía.

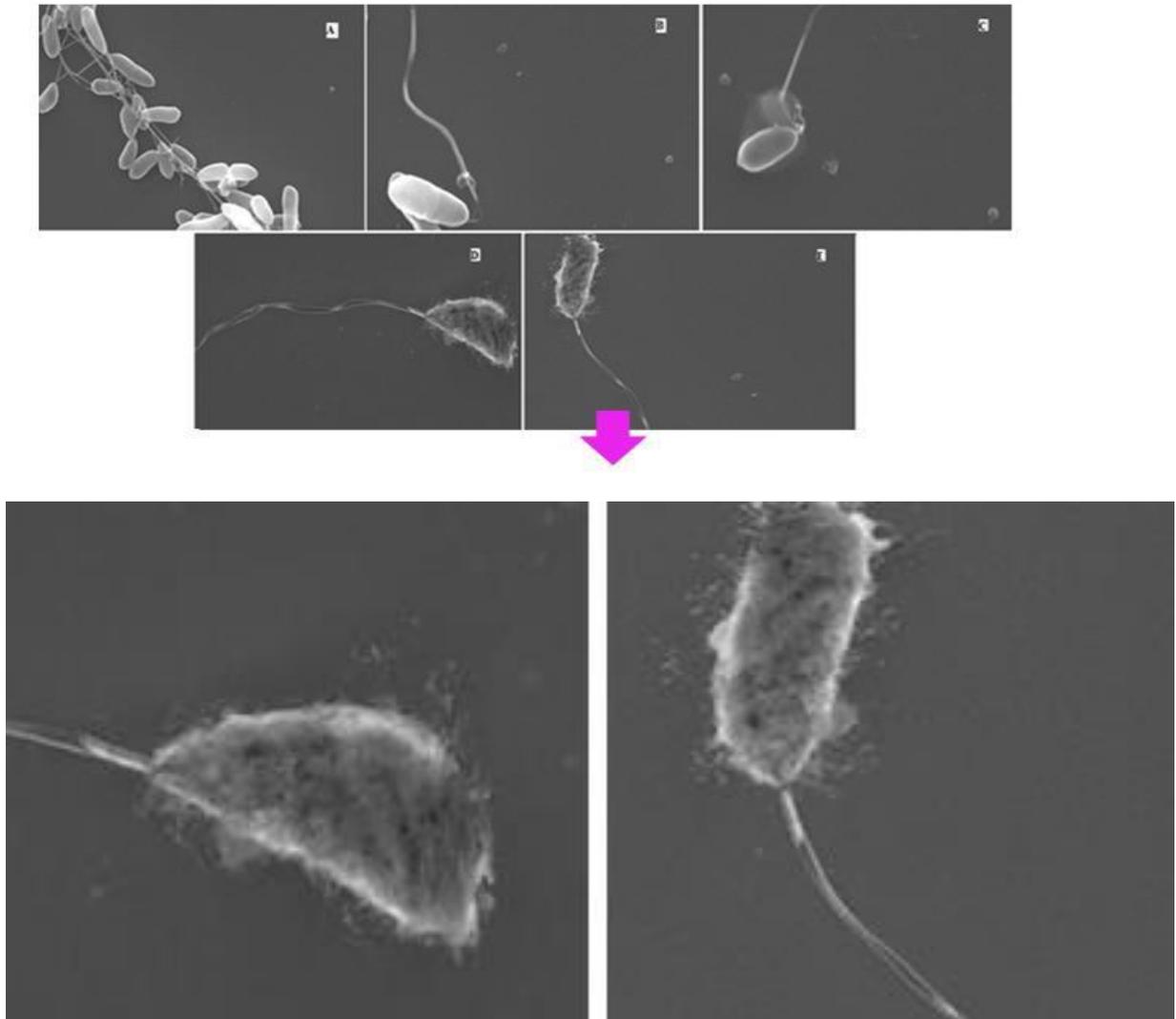


Figura 119. Comportamiento de los promastigotes frente a las formulaciones.

(A) Células control negativo. (B) Promastigote con hidrogel. (C) Promastigote con nanoemulsión.

(D) Promastigote con nanoemulsión de AmB.

(E) Promastigote con hidrogel AmB.

V. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

- ✓ La validación por la técnica de espectrofotometría UV-VIS y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) resultó ser lineal, precisa y exacta para la cuantificación de AmB en el rango de concentraciones de: 200-6,25 $\mu\text{g/mL}$ y 800-3,125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.
- ✓ Se prepararon dos formulaciones nanoestructuradas de AmB para aplicación tópica. Por un lado, una nanoemulsión a una concentración de 3 mg/mL (0,3%) y por otro, un hidrogel termorreversible a una concentración de 0,3 mg/mL (0,03%). La elección de los componentes de la nanoemulsión se realizó, utilizando solamente aquellos compuestos donde la AmB fue más soluble, eligiéndose—como fase oleosa el aceite de ricino (5%), como mezcla surfactante/co-surfactante: Labrasol®/Plurol® Oleique a una proporción 5:1 (55%) y como fase hidrófila, el Transcutol® P (40%). Asimismo para la elaboración del hidrogel se eligió el poloxámero 407 (25%) por su elevada capacidad para formar micelas e incorporar principios activos hidrófobos.
- ✓ La nanoemulsión presentó un tamaño de gota de $112,90 \pm 10,15$ nm y un índice de polidispersidad de $0,22 \pm 0,02$. Estos resultados fueron avalados mediante Microscopia de Transmisión Electrónica (TEM). En el caso de hidrogel los tamaños hidrodinámicos estuvieron por debajo de los 100 nm e índices de polidispersidad por debajo de 0,25. La estructura interna del hidrogel fue avalada mediante Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) mostrando una estructura porosa conformada por nanofibrillas.
- ✓ Los estudios de estabilidad acelerada mediante Turbiscan Lab® demostraron que ambas formulaciones presentaron variaciones por debajo del 10%, lo que indicó que el producto se mantuvo físicamente estable durante al menos 3

meses. No se observaron fenómenos de cremado, sedimentación ni coalescencia.

- ✓ Los valores de pH fueron adecuados para la aplicación dérmica y se mantuvieron estables entre 6,5-7,5.
- ✓ El contenido de AmB de las formulaciones permaneció en un rango de 90-110% en 1 mes para la nanoemulsión y 3 meses para el hidrogel. El fármaco se degradó más rápidamente en la nanoemulsión. Los estudios reológicos demostraron un comportamiento newtoniano para la nanoemulsión a 25 °C y el hidrogel a 4 °C, y un comportamiento pseudoplástico para el hidrogel a 32 °C. La baja viscosidad del hidrogel a 4 °C y de la nanoemulsión los hacen óptimos para su aplicación mediante *spray* evitando el contacto con la piel infectada.
- ✓ Los estudios de liberación *in vitro* realizados sobre hidrogeles demostraron un perfil de liberación rápido para AmB desde el hidrogel, 90% en 24 horas a diferencia de la nanoemulsión, en esta última formulación el fármaco presentó una liberación sostenida, 100% en 75 horas. El modelo matemático obtenido para la liberación de la AmB desde la nanoemulsión fue Korsmeyer-Peppas y para el hidrogel Boltzmann Sigmoidal.
- ✓ Ambas formulaciones no mostraron permeación cutánea de AmB lo que indica que no habrán efectos tóxicos sistémicos. La AmB se retuvo exclusivamente en la piel. Las cantidades retenidas en piel fueron más altas para el hidrogel que para la nanoemulsión (960,0 $\mu\text{g}/\text{g}/\text{cm}^2$ y 17,76 $\mu\text{g}/\text{g}/\text{cm}^2$).
- ✓ En los estudios de las propiedades biomecánicas de la piel no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la función barrera de la piel, ni en la temperatura ni en el TEWL. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los valores de SCH, sin embargo las formulaciones no

causaron ningún efecto irritante y fueron bien toleradas. Estos datos sugieren que la asociación de AmB en los vehículos elegidos puede ser adecuada para la medicación tópica cutánea en el caso de la terapia antimicótica y antiparasitaria.

- ✓ Se analizó el efecto antimicótico de ambas formulaciones y sus excipientes frente a 3 especies de *Candida*: *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis*. Los valores de CMI de la nanoemulsión y el hidrogel fueron más bajos en comparación con los valores de CMI de la solución de AmB disuelta en DMSO mejorando considerablemente el efecto sobre *Candidas* en comparación con el fármaco libre. El hidrogel mostró valores de CMI más bajos que la nanoemulsión. Los excipientes de ambas formulaciones no mostraron efecto sobre las especies de *Candida*. Estos resultados se corroboraron mediante imágenes de microscopia de fuerza atómica (AFM). Los módulos de Young revelaron el efecto de las nanoformulaciones frente a la levadura. Las imágenes demuestran los cambios en la membrana celular de la *Candida spp.*
- ✓ La nanoemulsión de AmB también presentó efecto sobre *Aspergillus brasiliensis*, aunque los valores de CMI de la formulación en comparación con la solución de AmB no mostró ninguna diferencia.
- ✓ Los ensayos de toxicidad celular demostraron que ambas formulaciones son inocuas y no se observaron valores de citotoxicidad por parte del poloxámero 407. Se observó un bajo porcentaje de citotoxicidad por parte de la nanoemulsión. Los valores de IC50 revelan que ambas formulaciones son adecuadas para su aplicación en piel.
- ✓ Se analizó el efecto leishmanicida de ambas formulaciones. La nanoemulsión y el hidrogel de AmB se ensayaron frente a dos estadios del parásito. Se obtuvieron valores de IC50 más bajos para las formulaciones en comparación con la AmB en solución. Los Índices de Selectividad (IS) demostraron la alta

afinidad de las formulaciones frente a promastigotes ejerciendo un excelente efecto leishmanicida el cual fue observado en el cuerpo de los promastigotes de *Leishmania tropica* mediante SEM. En estas imágenes se pudo apreciar el efecto de la AmB mediante la formación de poros en la membrana celular del promastigote. La nanoemulsión base por sí misma también mostró un efecto frente a promastigotes y amastigotes. No fue así para el hidrogel base.

- ✓ Ambas formulaciones constituyen una prometedora estrategia para el tratamiento de micosis y leishmaniasis cutáneas. Futuras pruebas en animales o humanos serán necesarias para mostrar un efecto *in vivo*.

VI. REFERENCIAS

6. REFERENCIAS

1. Ritschel WA y Hussain AS. The principles of permeation of substances across the skin. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*. 1988;10:39-56.
2. Murray HW, Berman JD, Davies CR. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366:1561-77.
3. Walters KA y Brain KR. *Dermatological and Transdermal Formulations*, primera ed. Marcel Dekker Inc. New York, EEUU, 2002.
4. EUCERIN. (Internet). n.d. Comprendiendo la piel. [citado el 15-06-2018]. Disponible en: <https://Www.Eucerin.Es/Acerca-De-La-Piel/Conocimientos-Basicos-Sobre-La-Piel/Estructura-Y-Funcion-De-La-Piel>.
5. Torralba A. "Histología y fisiología de la piel y sus anejos. Aspectos básicos e implicaciones cosméticas". "Cosmetología teórico-práctica", segunda edición. Publicaciones del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Madrid, España, 1978: 13-28.
6. Line Pharma (Internet). n.d. La piel y sus funciones [citado el 28-3-2018]. Disponible en: <http://pharmalinegroup.com/la-piel/>.
7. Fore J. A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy Wound Manage*. 2006;52:24-35.
8. Noriega Borge MJ y Merino Pérez J. Fisiología general. Departamento de Fisiología y Farmacología. Aula virtual. Universidad de Cantabria. 2011.
9. Parra JL y Pons L. Ciencia cosmética. Bases fisiológicas y criterios prácticos. Publicaciones del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Madrid, España, 1995.
10. Doménech J, Martínez J, Plá JM. Biofarmacia y Farmacocinética. Biofarmacia, Volumen II, primera ed. Síntesis, SA. Madrid, España, 1998.
11. Baron JM y Merk HF. Drug metabolism in the skin. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2001; 1:287-91.
12. Schaefer H y Filaquier C. Skin metabolism. *Pathologie-Biologie (Paris)* 1992;40:196-204.

13. Nastiti C, Ponto T, Abd E, Grice J, Benson H, Roberts M. Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. *Pharmaceutics*. 2017; 9:2-25
14. Mireia Mallandrich. Estudio de Formulaciones de Ketorolaco de Trometamina para aplicación sobre mucosas y piel. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona, España. 2017.
15. Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *Journal of Investigative Dermatology*. 1983;80:44-9.
16. Bonina FP, Montenegro L, Micali G, West DP, Palicharla P, Koch RL. *In vitro* percutaneous absorption evaluation of phenobarbital through hairless mouse, adult and premature human skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 1993;98:93-9.
17. Scheuplein RJ y Blank IH. Permeability of the skin. *Physiology*. 1971;51:702-47.
18. Idson B. Percutaneous absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1975;64:901-24.
19. Barry BW. Methods for studying percutaneous absorption. In: *Dermatological Formulations. Percutaneous absorption*. Marcel Decker, New York, EEUU, 1983:234-95
20. Schaefer H y Filaquier C. Skin metabolism. *Pathologie-Biologie (Paris)*. 1992;40 196-204.
21. Baron JM, Höller D, Schiffer R, Frankenberg S, Neis M, Merk HF, Jugert FK. Expression of multiple cytochrome P450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2001;116:541-8.
22. Yalkowsky SH, Flynn GL, Amidon GL. Solubility of nonelectrolytes in polar solvents. *Journal Pharmaceutical Science*. 1972;61:983-4.
23. Marzulli F, Brown D, Maibach H. Techniques for studying skin penetration. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1969;14: 76-83.
24. Scheuplein R y Blank IH. Mechanism of percutaneous absorption. IV. Penetration of nonelectrolytes (alcohols) from aqueous solutions and from pure liquids. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1973 60:286-96.

25. Beetge E, du Plessis J, Gerbrandt D, Goosen C, Janse F. The influence of the physicochemical characteristics and pharmacokinetic properties of selected NSAIDs on their transdermal absorption. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000;193:261-4.
26. Thomas B y Finnin BC. The transdermal revolution. *Drug Discovery Today*. 2004 15:697-703.
27. Grouthamel W, Tan GH, Ditter LW, Doluisio JT. Drug absorption IV. Influence of pH on absorption kinetics of weakly acidic drug. *Journal of Pharmaceutical Science and Research*. 1971;60:1160-3.
28. Tsai T y Maibach HI. How irritant is water? An overview. *Contact Dermatitis*. 1999;41:311-4.
29. Taylor L, Lee RS, Long M, Rawlings AV, Whitehead, Moss GP. Effect of occlusion on the percutaneous penetration of linoleic acid and glycerol. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002;249:157-64.
30. Tanner T y Marks R. Delivering drugs by the transdermal route: review and comment. *Skin research and technology: Official Journal of International Society for Bioengineering and the Skin*. 2008; 14:249-60.
31. Al-Khamis K, Davis SS, Hadgraft J. Microviscosity and drug release from topical gel formulation. *Pharmaceutical Research*. 1986;4:214-7.
32. Lu Gw y Gao P. Emulsion and Microemulsions for topical and transdermal drug delivery. Kulkarni V (editor), *Handbook of non invasive drug delivery systems*, quinta edición. Elsevier Limited, Oxford, UK. 2010:59-94.
33. Ribera Pibernat M y Casanova Seuma JM. Actualización sobre corticoterapia en dermatología. *Formación médica continuada*. 1998;5:258.
34. Herraes Dominguez M, Diez Sales O, Martinez Villadre A. Formas de administración sobre la piel. En: *Monografías Galénicas*. 1993. 1-48.
35. Mallol Miron J. Formulación tópica en dermatología (II): Principios activos. *Piel*. 1999;4:450-7.
36. Schmolka RI. Artificial Skin I. Preparation and properties of Pluronic F-127 Gels for Treatment of Burns. *Journal of Biomedical Materials Research banner*. 1972:571-82.

37. Crespo-Erchiga V, Delgado F. Micosis cutáneas. *Medicina Clínica*. 2005;125(12):467-74.
38. McCarty TP y Pappas PG. Invasive Candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2016;30(1):103-24.
39. Rodríguez-Tudela JL y Cuenca-Estrella M. *Candidiasis sistémicas o profundas*. S.A MH, editor, 2000.
40. Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clinical Infectious Disease*. 1997;24:1122-8.
41. Lim Cs-Y, Rosli R, Seow HF, Chong PP. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *European Journal Clinical Microbiology Infectious Disease* 2012;31:21-31.
42. Zhu W Y Filler SG. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell Microbiology*. 2010;12:273-82.
43. Calderone R Y Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiology*. 2001;9:327-35.
44. Larriba G, Rubio Coque JJ, Ciudad A, Andaluz E. *Candida albicans* molecular biology reaches its maturity. *International Microbiology*. 2000;3:247-52.
45. Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. Expert review of Anti-infective therapy. 2012;10:85-93.
46. Pukkila-Worley R, Peleg AY, Tampakakis E, Mylonakis E. *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Eukaryotic Cell* 2009;8:1750-8.
47. Segal E y Elad D. Fungal vaccines and immunotherapy. *Journal Medical Mycology*. 2006;16:134-51.
48. Candidiasis. (Internet). n.d. candidiasis web. [citado el 29-4-2018] Disponible en: <https://Candidiasisweb.Com/Tipos/Cutaneas/Intertrigo-Candidiasico.Php>.

49. Castañon Olivares L. (Internet). n.d. Candidosis: infección por hongos muy frecuente. Ciencia y salud. El Universal: Información para público en general. [citado el 29-4-2018]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>.
50. Center for Disease Control and Prevention (CDC). n.d. Diagnóstico microbiológico de micosis y Leishmania. [citado el 2-7-2018] . Disponible en: <https://www.cdc.gov/>.
51. Linares M y Solís Cuesta SF. Identificación de levaduras. Asociación Española de Micología. Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico. Revista Iberoamericana de Micología. 2007.
52. Pitt J. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. Journal of Medical Veterinary Mycology. 1994;32:17-32.
53. Heitman J. Microbial pathogens in the fungal kingdom. Fungal Biology Review. 2011;25:48-60.
54. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clinical Microbiology Review. 1999;12:310-50.
55. Clancy C y Nguyen MH. Acute community-acquired pneumonia due to *Aspergillus* in presumably immunocompetent hosts: clues for recognition of a rare but fatal disease. American College of Chest Physicians. 1998; 114: 629-34.
56. Fortún J, Carratalá J, Gavaldá J, Lizasoain M, Salavert M, de la Cámara R, et al. Grupo de Estudio de Micología Médica de la SEIMC (GEMICOMED). Guidelines for the treatment of invasive fungal disease by *Aspergillus spp.* and other fungi issued by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2011;29:435-54.
57. García-Vidal C, Upton A, Kirby KA, Marr KA. Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem-cell transplant recipients: biological risk factors for infection according to time after transplantation. Clinical Infectious Disease. 2008;47:1041-50.
58. Bustamante W, Rodríguez J, Marín MA. Un caso de otomicosis causada por *Aspergillus niger*, *Aspergillus spp.* y *Candida albicans*. Revista Médica Hospital Nacional de Niños (Costa Rica). 1998;33:43-7.

59. Redmedichile. Laboratorio Clínico, Centro de Diagnóstico. (Internet). n.d. Medichile. [citado el 3-7-2018]. Disponible en: Http://www.Doctorkriman.Cl/Orl_Otit_Ext.AspX.
60. Kano R, Shibahashi A, Fujino Y, Sakai H, Mori T, Tsujimoto H, Yanai T, Hasegawa A. Isolation of *Aspergillus udagawae* from a fatal case of feline orbital aspergillosis. *Mycoses*. 2008; 51:360-1.
61. Sansom J, Featherstone H, Barnett KC. Keratomycosis in six horses in the United Kingdom. *Veterinary Records*. 2005;156:13-7.
62. Fedde M. Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. *Poultry Science*. 1998;77:1130-8.
63. Bennett JW y Klich M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review*. 2003;16:497-516.
64. Magnoli C, Dalcerro AM, Chiacchiera SM, Miazzo R, Saenz MA. Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. *Mycopathologia*. 1998; 142(1):27-32.
65. Amitani R, Taylor G, Elezis EN. Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infections Immunology*. 1995;63:3266-71.
66. Tomee JF y Kauffman HF. Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Clinical and experimental allergy*. 2000;30:476-84.
67. García Martos P, García Agudo R, Domínguez I, Noval JA. Otomicosis: aspectos clínicos y microbiológicos. *Revista de Diagnóstico Biológico*. 2001;50.
68. Mendez Tobar J. Diagnóstico microbiológico de aspergilosis. Laboratorio de Investigación Médica, Hospital de Especialidades C.M.N Siglo XXI. 2018.
69. Gregory Valdes B. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*. 2005;39(2).
70. Diomedi A. Nuevos antifúngicos: las equinocandinas. *Revista Chilena de Infectología*. 2004;21:89-101.
71. Azanza J, García-Quetglas E, Sádaba B. Farmacología de los azoles. *Revista Iberoamericana de Micología* 2007;24:223-7.

72. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, Kern WV, Marr KA, Ribaud P, Lortholary O, Sylvester R, Rubin RH, Wingard JR, Stark P, Durand C, Caillot D, Thiel E, Chandrasekar PH, Hodges MR, Schlamm HT, Troke PF, de Pauw B; Invasive Fungal Infections Group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer and the Global Aspergillus Study Group. Voriconazole versus amphotericin B for primary treatment of invasive aspergillosis. *New England Journal of Medicine*. 2002; 347:408-15.
73. Thompson L. Nuevas alternativas en el armamento antiinfeccioso que el clínico debe conocer. Antifúngicos. *Revista Chilena de Infectología*. 2002;19:Supl1.
74. Gregori Valdez S. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*. 2005;39.
75. Torres Rodríguez J. Conferencia Magistral. Fármacos antifúngicos que contribuyen a mejorar el diagnóstico de las micosis. *Gaceta de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)*. 2006;549.
76. Ginarte M y Paredes C. Empleo de antiinfecciosos en patología cutánea. Tratamiento sistémico y tópico. Contraindicaciones. Criterios de respuesta. Efectos secundarios. *Medicine*. 2002;8:4768-73.
77. Bank Drug. (Internet). Update on November 18,2018 13:31. Amphotericin B. [cited 21-07-2018]. Disponible en: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00681>.
78. Baginski M y Czub J. Amphotericin B and its new derivatives-mode of action. *Current Drug Metabolism*. 2009;10:459-69.
79. Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP. Amphotericin B formulations and drug targeting. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97:2405- 25.
80. Klaus F. *Analytical Profiles of Drug Substances*. Volume 13. Academic Press London INC., UK, 1984.
81. Tapia C. Mechanisms of action, adverse reactions and new antifungal agents. *Medwave* 2005;5.

82. Palacios D, Dailey I, Siebert DM, Wilcock BC, Burke MD. Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108:6733-8.
83. Cohen B. Amphotericin B membrane action: role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects. *The Journal of Membrane Biology*. 2010;238:1-20.
84. Liu Tt, Lee RE, Barker KS, Wei L, Homayouni R, Rogers PD. Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49:2226-36.
85. Catalán M, Montejo JC. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2006;23:39-49.
86. Dolores Remedios Serrano López. Nuevas formulaciones orales, tópicas y parenterales de anfotericina B con acción antifúngica y antiparasitaria, Tesis doctora. Universidad Complutec de Madrid. Madrid, España. 2013.
87. Espada R, Valdespina S, Alfonso C, Rivas G, Ballesteros MP, Torrado JJ Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;361: 64-9.
88. Hillaireau H y Couvreur P. Nanocarriers entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and Molecular Life Science*. 2009;66: 2873-96.
89. Owens De Peppas NA Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;307: 93-102.
90. Espada R, Valdespina S, Dea MA, Molero G, Ballesteros MP, Bolás F, Torrado JJ. In vivo distribution and therapeutic efficacy of a novel amphotericin B poly-aggregated formulation. *Journal Antimicrobial Chemother*. 2008;61:1125-31.
91. Sánchez-Brunete J, Dea MA, Rama S, Bolás F, Alunda JM, Raposo R, Méndez MT, Torrado-Santiago S, Torrado JJ. Treatment of experimental visceral leishmaniasis with amphotericin B in stable albumin microspheres. *Journal Antimicrobial Chemother*. 2004;48:3246-52.

92. Calvo Barbado D. (Internet). n.d. Infomed, Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas. Formulario Nacional de Medicamentos [citado el 9-7-2018].

Disponibile en : <http://fnmedicamentos.sld.cu/index.php?P=FullRecord&ID=76>.

93. Sanglard D. Clinical Relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeast. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2002;462-70.

94. Vazquez J, Arganoza MT, Boikov D, Yoon S, Sobel JD, Akins RA. Stable phenotypic resistance of *Candida* species to amphotericin B conferred by preexposure to subinhibitory levels of azoles. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36:2690-5.

95. Johnson E, Oakley KL, Radford SA, Moore CB, Warn P, Warnock DW, Denning DW. Lack of correlation of *in vitro* amphotericin B susceptibility testing with outcome in a murine model of *Aspergillus* infection. *Journal Antimicrobial Chemother* 2000;45:8 5-9 3.

96. Dupont B. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002;499:31-6.

97. Atiyeh B, Gunn SW, Hayek SN. State of the art in burn treatment. *World Journal of Surgery*. 2005;29:131-48.

98. Sosa L, Clares B, Alvarado HL, Bozal N, Domenech O, Calpena AC. Amphotericin B releasing topical nanoemulsion for the treatment of candidiasis and aspergillosis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2017;13:2303-12.

99. Lifecare. (Internet). n.d. Fungisome TM gel. [Citado el 01/06/2018]. Disponible en: http://www.lifecareinnovations.com/fungi_gel.html.

100. Dal Lago V, de Oliveira LF, de Almeida Gonçalves K, Kobarg J, Cardoso MB. Size-selective silver nanoparticles: future of biomedical devices with enhanced bactericidal properties. *Journal of Materials Chemistry*. 2011;21:12267-73.

101. Sanchez D, Schairer D, Tuckman-Vernon C, Chouake J, Kutner A, Makdisi J, Friedman JM, Nosanchuk JD, Friedman AJ Amphotericin B releasing nanoparticle topical treatment of *Candida* spp. in the setting of a burn wound. *Nanomedicine (Lond)*. 2014;10:269-77.

102. Salerno C, Chiappetta DA, Arechavala A, Gorzalczany S, Scioscia SL, Bregni C. Lipid-based microtubes for topical delivery of amphotericin B. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*. 2013;107:160-6.
103. Perez A, Altube MJ, Schilrreff P, Apezteguia G, Celes FS, Zacchino S, de Oliveira CI, Romero EL, Morilla MJ. Topical amphotericin B in ultradeformable liposomes: Formulation, skin penetration study, antifungal and antileishmanial activity *in vitro*. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*. 2016;139:190-8.
104. Moraes Santos C, Barbosa de Oliveira R, Arantes V, Caldeira L, Cristina de Oliveira M, Egito S, Ferreira L. Amphotericin B-Loaded Nanocarriers for Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: Development, Characterization, and *In Vitro Skin* Permeation Studies. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2012;8:322-9.
105. Qasim M, Baipaywad P, Udomluck N, Na D, Park H. Enhanced therapeutic efficacy of lipophilic amphotericin B against *Candida albicans* with amphiphilic poly(N-isopropylacrylamide) nanogels. *Macromolecules Research*. 2014;22:1125-31.
106. Chang P. The ultrastructure of *Leishmania donovani*. *Journal of Parasitology*. 1956;42:126-36.
107. González González G, Rodríguez González C, Simón Merchán A. Morfología de la *Leishmania trópica* en su estado intracelular en la dermis humana. *Actas dermo-sifiliográficas*. 1976;67:527-34.
108. Dedet J, Pratlon F, Lanotte G. The parasite. *Clinical Dermatology Journal*. 1999;17:261-8.
109. Sch K y Petersen C. Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *Clinical microbiology reviews*. 2013;26:58-85.
110. Blog de parasitología. (Internet). n.d. [Citado el 01/06/2018]. Disponible en: <https://Blog-De-Parasitologia.Webnode.Mx/Ejercicios/Leishmanisis-3/>
111. Centro para el control de enfermedades (CDC). (Internet). n.d. Distribución mundial de la Leishmaniasis. [Citado el 08/06/2018]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

112. Pintado V y López-Vélez R. Leishmaniasis visceral asociada a la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2001;19:353-7.
113. Sánchez J, Serrano SB, Mañas SM. Leishmaniasis cutánea. *Formación Médica Continuada en Atención Primaria*. 2012;19:117-28.
114. Rubeiz SM y Kibbi AG. Cutaneous leishmaniasis: Clinical features and diagnosis. *Clinics Dermatology*. 1999;17:291-6.
115. Weigle K y Saravia NG. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. *Clinics Dermatology*. 1996;14:433-50.
116. Selpúveda M, Julián A, García JF. Leishmaniasis laríngea en un paciente inmunocompetente. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 1998;16:344.
117. Van Damme P, Keuter M, Van Asse SA. Rare case of oral leishmaniasis. *Lancet Infectious Disease*. 2004;4:53.
118. Grevelink S y Lerner EA. Leishmaniosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1996;34:257-72.
119. Zijlstra E, Khalil EG, Kager PA. Post-kala-azar dermal leishmaniosis in the Sudan: clinical presentation and differential diagnosis. *British Journal of Dermatology*. 2000;143:136-43.
120. infraVec2. (Internet). n.d. European Commission [Citado el 08/06/2018]. Disponible en: <https://infravec2.eu/product/phlebotomus-perniciosus-preserved-or-extracts/>
121. World Health Organization (WHO). Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases. 2004.
122. Richard J y Werbovetz KA. New antileishmanial candidates and lead compound. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2010;14:447-55.
123. Khaw M y Panosian CB. Human antiprotozoal therapy: Past, present, and future. *Clinical Microbiology Review*. 1995; 8: 427-39.

124. Berman J. Chemotherapy for leishmaniasis: Biochemical mechanism, clinical efficacy and future strategies. *Reviews of Infectious Disease*. 1988;10:560-86.
125. El-on J, Livshin R, Even-Paz Z, Hamburger D, Weinrauch L. Topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 1986, 87:284-8.
126. Pujol Brugués A, Clares Naveros B, Calpena Campmany AC, Hernández Pastor P, Fisa Saladrigas R and Riera Lizandra C. Developing cutaneous applications of paromomycin entrapped in stimuli-sensitive block copolymer nanogel dispersions. *Nanomedicine*. 2015;10(2):227-40.
127. Robledo S, Puerta JA, Muñoz DL, Guardo M, Vélez ID. Efficacy and tolerance of pentamidine for treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *L. panamensis* in Colombia. *Biomedica*. 2006:188-93.
128. Davidson R. Practical Guide for the Treatment of Leishmaniasis. *Drugs*. 1998;56:1009-18.
129. Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D, Opperdoes FD. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2000; 111:1-14.
130. Berman J. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical of Infectious Diseases*. 1997;24:684-703.
131. De Vries H, Reedijk SH, Schallig H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2015;16:99-109.
132. Míriam Tomás Pérez. Genotipado de las especies de *Leishmania* y variabilidad intraespecífica de *L. infantum*. Aportaciones al diagnóstico molecular y a la epidemiología de la leishmaniasis. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, Barcelona, España. 2014.
133. Miranda H, Alfaro A, Lora C, Rodríguez L. Estudio comparado de métodos de diagnóstico de la leishmaniasis y caracterización molecular de los agentes etiológicos en la libertad. *Folia Dermatológica Peruana*. 2003;14:18-23.

134. Stevenson L, Fedorko D, Zelazny A. An Enhanced Method for the Identification of *Leishmania spp.* using Real-Time PCR and Sequence Analysis of the 7SL RNA Gene Region. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2010; 66: 432–435.
135. Gupta A, Burak E, Hattona A and Doyle P. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*. Royal Society of Chemistry. 2016;12:2826.
136. Guglielmini G. Nanostructured novel carrier for topical application. *Clinical Dermatology*. 2008;26:341-6.
137. Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Nano-emulsions. *Current opinion in colloid and interface science*. 2005;10:102-10.
138. Walstra P. Emulsion stability. *Encyclopedia of emulsion technology, Volumen 4*. Marcel Dekker, New York. 1996:1 - 62.
139. Landfester K, Eisenblatter J, Rothe R. Preparation of polymerizable miniemulsions by ultrasonication. *Journal of Coatings Technology and Research*. 2004; 1: 65 - 8.
140. Rao J y McClements DJ. Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: influence of composition and preparation method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59:5026-35.
141. Ravi T y Padma T. Nanoemulsions for drug delivery through different routes. *Reserach in Biotechnology*. 2011;2:1-13.
142. Sole I, Pey CM, Maestro A, Gonzales C, Porrás M, Solans C et al. Nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method: preparation variables and scale up. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010;344:417-23.
143. Izquierdo P, Feng J, Esquema J. The influence of surfactant mixing ratio on nanoemulsion formation by the PIT method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2005;285:388-94.
144. Cubero N, Monferrer A, Villalta J. *Aditivos alimentarios*. Mundi-Prensa Libros S.A. Madrid, España. 2002.

145. Fang Jy, Leu YI, Chang CC. Lipid nano/submicron emulsions as vehicles for topical flurbiprofen delivery. *Drug Delivery*. 2004;11:97 - 105
146. Salager J, Antón R, Anderez J, Aubry JM. Formulation des microémulsions par la méthode du HLD. *Techniques de l'Ingénieur*. 2001;157:1-20.
147. Silva H, Cerqueira MA , Vicente A. Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization. *Food Bioprocess Technology*. 2012;5:854-67.
148. Babu S, Adinarayana T, Santhosh S, Sankar S, Rehana SK. Analytical method development and validation for the estimation of quinapril and tolcapone using RP-HPLC. *Intercontinental Journal of Pharmaceutical Investigations and Research*. 2017;4:207-229.
149. Kreilgaard M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002;54:77-98.
150. Grigoriev Do y Miller R. Mono- and multilayer covered drops as carriers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2009; 14:48-59.
151. Djordjevic L, Primorac M, Stupar M, Krajisnik D. Characterization of caprylocaproyl macrogolglyverides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004;271:11-9.
152. Zhu W Yu A, Wang W, Dong R, Wu J, Zhai G. Formulation design of microemulsion for dermal delivery of penciclovir. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;360:184-90.
153. Devarajan V , Ravichandran V. Nanoemulsions: As Modified Drug Delivery Tool. *Pharmacie Globale : International Journal of Comprehensive Pharmacy*. 2011;2.
154. Llera-Rojas VG, Del Real A., Mendoza-Muñoz N, Melgoza-Contreras LM, Quintanar-Guerrero D. Feasibility of obtaining in situ nanocapsules through modified self-microemulsifying drug delivery systems. A new manufacturing approach for oral route administration. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2017;43:925-31.

155. Fernandez-Campos F, Clares Naveros B, Lopez Serrano O, Alonso Merino C, Calpena Campmany AC. Evaluation of novel nystatin nanoemulsion for skin candidosis infections. *Mycoses*. 2013;56(1):70-81.
156. Gupta P, Vermani K, Garg S. Hydrogels: From controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discovery Today*. 2002;7:569-79.
157. Kopecek J. Hydrogels from soft contact lenses and implants to self-assembled nanomaterials. *Journal of Polymer Science A: Polymer Chemistry* 2009;47:5929-46.
158. Singh N y Lee DS. In situ gelling pH and temperature-sensitive biodegradable block copolymer hydrogels for drug delivery. *Journal Control Release*. 2014(193):214-27.
159. Simoes S, Figueiras A, Francisco V. Modular hydrogels for drug delivery. *Journal Biomaterials Nanobiotechnology*. 2012;3:185-99.
160. Sakai S, Ueda K, Taya M. Peritoneal adhesion prevention by a biodegradable hyaluronic acid-based hydrogel formed in situ through a cascade enzyme reaction initiated by contact with body fluid on tissue surfaces. *Acta Biomaterialia*. 2015;24:152-8.
161. Hoffman A. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002;51:3-12.
162. Chauhan S, Harikumar SL, Kanupriya. Hydrogels: A Smart Drug Delivery System. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*. 2012(2):603-614.
163. Escalona Rayo O y Quintanar Guerrero D. Polymeric nanogels: a new alternative for drug delivery. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2014;45:3.
164. Klouda L, Hacker MC, Kretlow JD, Mikos AG. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *Biomaterials*. 2009;30:4558-66.
165. Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008; 60:1638-49.
166. Saunders B y Vincent B. Microgel particles as model colloids: theory, properties and applications. *Advance in Colloid and Interface Science*. 1999;80 1-25.

167. Chandna P, Saad M, Wang Y, Ber E, Khandare J, Vetcher AA, Soldatenkov VA, Minko T. Targeted proapoptotic anticancer drug delivery system. *Molecular Pharmaceutics*. 2007;4: 668-78.
168. Jeong B, Kim SW, Bae YH. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002;54:37-51.
169. McKenzie M, Betts D, Suh A, Bui K, London Doyoung Kim, Hyunah C. Hydrogel-Based Drug Delivery Systems for Poorly Water-Soluble Drugs. *Molecules*. 2015;20:20397-408.
170. Nguyen M y Lee DS. Injectable biodegradable hydrogels. *Macromolecular Bioscience*. 2010;10:563-79.
171. Lee W, Li YC, Chu IM. Amphiphilic poly (D,L-lactic acid)/poly(ethylene glycol)/poly(D,L-lactic acid) nanogels for controlled release of hydrophobic drugs. *Macromolecular Bioscience*. 2006;6:846-54.
172. Jun Du Y, Lemstra PJ, Nijenhuis AJ, Van Aert H, and Bastiaansen C. ABA Type Copolymers of Lactide with Poly(ethylene glycol). Kinetic, Mechanistic, and Model Studies. *Macromolecules*. 1995, 28, 7, 2124-2132.
173. Qiao M, Chen D, Ma X, Liu Y. Injectable biodegradable temperature-responsive PLGA-PEG-PLGA copolymers: Synthesis and effect of copolymer composition on the drug release from the copolymer-based hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005;294:103-12.
174. Cho H, Lai TC, Tomoda K, Kwon GS. Polymeric micelles for multi-drug delivery in cancer. *American Association of Pharmaceutical Scientists, Pharmaceutical Science Technology*. 2015;16:10-20.
175. Lee B, Lee YM, Sohn YS, Song SC. A thermosensitive poly(organophosphazene) gel. *Macromolecules*. 2002;35:3876-9.
176. Antunes F, Gentile L, Rossi CO, Tavano L, Ranieri GA. Gels of Pluronic F127 and nonionic surfactants from rheological characterization to controlled drug permeation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2011;87:42-8.
177. Naskar B, Ghosh S, Moulik SP. Solution Behavior of Normal and Reverse Triblock Copolymers (Pluronic L44 and 10R5) Individually and in Binary Mixture. *Langmuir*. 2012;28:7134-46.

178. Raymond E. On the theory of lower critical solution points in hydrogen-bonded mixtures. *Journal of Chemical Physics*. 1984;80:5340-1.
179. Wanka G, Hoffman H, Ulbricht W. Phase-diagrams and aggregation behaviour of poly (oxyethylene)-poly (oxypropylene)-poly oxyethylene triblock copolymers in aqueous solutions. *Macromolecules*. 1994; 427:4145-4159
180. A guide to pH measurement. (Internet). n.d. the theory and practice of laboratory pH applications. [citado el 2-7-2018]. Disponible: https://www.mt.com/mt_ext_files/Editorial/Generic/1/Guides_to_Electrochemical_Analysis_0x000248ff00025c9a00093c4a_files/guideph.pdf
181. Alexandridis P y Hatton TA. Physicochemical and Engineering Aspects. *Colloids and Surfaces*. 1995;96:1-46.
182. Rassing D y Attwood D. Ultrasound. *International Journal of Pharmaceutics*. 1983;13:47-55.
183. Wanka G, Hoffman H, Ulbricht W. The aggregation behavior of poly-(oxyethylene)-poly-(oxypropylene)-poly-(oxyethylene)-block-copolymers in aqueous solution. *Journal Colloid Interface Science*. 1990;268:101-17.
184. Klouda L y Mikos AG. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007;68:34-45.
185. Gilbert JC, Hadgraft A, Brookes LG. Drug release from Pluronic F-127 gels. *International Journal of Pharmaceutics*. 1986; 32:223-8.
186. Ramya Devi D, Sandhya BN, Vedha Hari Poloxamer: A Novel Functional Molecule For Drug Delivery And Gene Therapy. *Journal of Pharmaceutical Science & Research*. 2013;5: 159 - 65.
187. Abismail L, Canselier JP, Wilhelm AW, Delmas H, Gourdon C. Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry*. 1999;6 75-83.
188. All about circuits. (Internet). n.d. pH measurement. [citado el 19-7-2018]. Disponible en : http://hiq.lindegas.com/international/web/lg/spg/like35lgspg.nsf/docbyalias/image_hplc.

189. Royal Society of Chemistry. (Internet). n.d. UV-Visible Spectroscopy. [citado el 19-09-2018]. Disponible en: <http://www.rsc.org/learn-chemistry/resource/res00000941/spectroscopy-in-a-suitcase-uv-vis-teacher-resources?cmpid=CMP00001304>.
190. Birdi K. Handbook of Surface and Colloid Chemistry, cuarta edición, CRC, Press Taylor & Francis Group. London, New York. 2009.
191. Malvern Panalytical Ltd. (Internet). n.d. Z-sizer. [citado el 20-09-2018]. Disponible en: <https://www.Malvernpanalytical.com/es/>.
192. Valls O, Castillo B, Garcia B. Técnicas instrumentales en farmacia y ciencias de la salud. Tercera edición. Barcelona Piroso D.L. Barcelona, España. 2009.
193. Ford B, Bradbury S, Joy D. (Internet). n.d. Scanning Electron Microscope. [Citado el 20-09-2018]. Disponible en: <https://www.Britannica.Com/Technology/Scanning-Electron-Microscope>.
194. Wen Y, Cheng H, Lu LJ, Liu J, Feng Y, Guan W, Zhou Q, Huang XF. Analysis of biological demulsification process of water-in-oil emulsion by *Alcaligenes* sp. S-XJ-1. *Bioresour Technology*. 2010; 101:8315-22
195. Zhang Q, Chen Y, Fu W-J, Sun S-Y. Study on the stability of pesticide WDG suspension by TURBISCAN LAB]. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi Guang Pu*. 2008;28:843-6.
196. Mengual O, Meunier G, Cayré I, Puech K, Snabre P. TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*. 1999;50:445-56.
197. Formulation. Smart Scientific Analysis. (Internet). n.d. Turbiscan Lab. [citado el 20-09-2018]. Disponible: <http://www.Formulation.Com/Stability-Turbiscan-Lab.Html>.
198. Liu J, Huang X, Lu L, Li M, Xu J, Deng H. Turbiscan Lab® Expert analysis of the biological demulsification of a water-in-oil emulsion by two biodemulsifiers. *Journal of Hazardous Materials*. 2011;190:214-21.
199. Pérez-Bueno T, Rodríguez-Perdomo Y, Morales-Lacarrere I, Soler Roger DM, de la Paz Martín-Viaña N. Rheological behavior and extensibility of a

semi-solid formulation of the aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. Tecnología y Ciencia Ed. (IMIQ). 2011;26(2):75-9

200. Barbé C, Halbaut L, Prats L, Del Pozo A, Faulí C. Influencia del método de elaboración (orden de mezclado de los componentes) en el tamaño de gotícula y la estabilidad de las emulsiones O/A. Industria farmacéutica: Equipos, procesos y tecnología Nº 1. 1991: 73-81.

201. Ciurlizza C, Fernández F, Calpena AC, Lázaro R, Parra A, Clares B. Semisolid formulations containing cetirizine: human skin permeation and topical antihistaminic evaluation in a rabbit model. Archives of Dermatology. 2014;306:711-7.

202. Schramm G. Practical Approach to Rheology and Rheometry. Gebrueder HAAKE GmbH. Segunda edición. Versión 1. Karlsruhe, Alemania. 2004.

203. Schramm G. Practical Approach to Rheology and Rheometry. Gebrueder HAAKE GmbH. Versión 2. Karlsruhe, Alemania. 2004.

204. Martín-Villena M, Fernández-Campos F, Calpena-Campmany AC, Bozal-de Febrer N, Ruiz-Martínez MA, Clares-Naveros B. Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: development and characterization. Carbohydrate polymers. 2013;94:1-11.

205. Franz T. Percutaneous absorption on the relevance of *in vitro* data. Journal of Investigative Dermatology. 1975;64:190-5.

206. Costa P y Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences 2001;13:123-33.

207. Abrego G, Alvarado HL, Egea MA, Gonzalez-Mira E, Calpena AC, Garcia ML. Design of nanosuspensions and freeze-dried PLGA nanoparticles as a novel approach for ophthalmic delivery of pranoprofen. Journal of pharmaceutical sciences. 2014;103:3153-64.

208. María Aracely Calatayud Pascual. Estudio de la absorción transdérmica de fármacos para la migraña. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. Valencia, España. 2013.

209. Esther Torres Farres. Estudios de sistemas dispersos de aplicación cutánea con vehículos para protección solar. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona, España. 2007.

210. Touitou E y Abed L. Effect of propylene glycol, Azone and n-decylmethyl sulphoxide on skin permeation kinetics of 5-fluorouracil. *International Journal of Pharmaceutics*. 1985;27:89-98.
211. Jadoul A, Hanchard C, Thysman S, Preat V. Quantification and localization of fentanyl and TRH delivered by iontophoresis in the skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 1995;120:221-8.
212. Kammerau B, Zesch A, Schaefer H. Absolute concentrations of dithranol and triacetyl-dithranol in the skin layers after local treatment: *in vivo* investigations with four different types of pharmaceutical vehicles. *Journal of Investigative Dermatology*. 1975;64:145-9.
213. Mak V, Potts RO, Guy RH. Percutaneous penetration enhancement *in vivo* measured by attenuated total reflectance infrared spectroscopy. *Pharmaceutical research*. 1990;7:835-41.
214. Wester R y Maibach HI . Regional Variation in Percutaneous Absorption In: Bronaugh RL, Maibach HI, editors. *Percutaneous Absorption Drugs, Cosmetics, Mechanisms, Methods*. 4th edition. Marcel Dekker Inc, New York, EEUU, 1999:219.
215. Clarys P, Clijsen R, Taeymans J, Barel AO. Hydration measurements of the stratum corneum: comparison between the capacitance method (digital version of the Corneometer CM 825(R)) and the impedance method (Skicon-200EX(R)). *Skin research and technology: official journal of International Society for Bioengineering and the Skin*. 2012; 18:316-23.
216. Du Plessis J, Stefaniak A, Eloff F, John S, Agner T, Chou TC, Nixon R, Steiner M, Franken A, Kudla I, Holness L. International guidelines for the *in vivo* assessment of skin properties in non-clinical settings: Part 2. transepidermal water loss and skin hydration. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin*. 2013;19(3):265-78.
217. Kant V , Gopal A , Kumar D, Gopalkrishnan A, Pathaka N, Kurade NP , Tandana SD, Kumar D. Topical pluronic F-127 gel application enhances cutaneous wound healing in rats. *Acta Histochemica*. 2013;116 5-13.

218. Ariza J, Franco L, García C. (Internet). 22 de enero 2010. Experimentación con animales. [citado el 20-09-2018]. Disponible en: [Http://Losconsumimos.Blogspot.Com/2010/01/La-Gente-No-Es-Consciente-De-Que-Cuando.Html](http://Losconsumimos.Blogspot.Com/2010/01/La-Gente-No-Es-Consciente-De-Que-Cuando.Html).
219. Draize J, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1944;82:377-90.
220. Montalvo A, Sifontes S, Montano, Espino AM. Necesidad del uso de cromógenos para cuantificar promastigotes de *Leishmania* en placas de 96 pozos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2000;52:95-100.
221. Clinical Lab Zaehlkammern. (Internet). n.d. Cámaras de recuento. [citado el 20-09-2018]. Disponible en: [Https://Www.Brand.De/Fileadmin/User/Pdf/Gk900/Zaehlkammern/Gk900_05_Clinical_Lab_Zaehlkammern_S.Pdf](https://Www.Brand.De/Fileadmin/User/Pdf/Gk900/Zaehlkammern/Gk900_05_Clinical_Lab_Zaehlkammern_S.Pdf).
222. Carrio J, Riera C, Gallego M, Portus M. *In vitro* activity of pentavalent antimony derivatives on promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum* strains from humans and dogs in Spain. *Acta Tropica*. 2001;79: 179-83.
223. Braga P y Ricci D. Imaging Bacterial Shape, Surface, and Appendages before and after Treatment with Antibiotics. In: Braga PC, Ricci D, editors. *Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications*. Totowa: Humana Press Inc. 2004:179-88.
224. Jalili N y Laxminarayana K. A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences. *Mechatronics*. 2004;14:907-45.
225. Fernández Campos F, Calpena Campmany AC, Rodríguez Delgado G, López Serrano O, Clares Naveros B. Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: ultra-structural effects and release studies. *Journal Pharmaceutical Science*. 2012;101:3739-52.
226. Djordjevic L, Primorac M, Stupar M, Krajisnik D. Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004;27:11-9.

227. Domínguez-Villegas V, Clares-Naveros B, García-López ML, Calpena-Campmany AC, Bustos-Zagal P, Garduño-Ramírez ML. Development and characterization of two nano-structured systems for topical application of flavanones isolated from *Eysenhardtia Platycarpa*. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*. 2014;116:183-92.
228. Godwin Da, Kim NH, Felton LA. Influence of transcutol CG on the skin accumulation and transdermal permeation of ultraviolet absorbers. *European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2002;23:114-23.
229. Panchagnula R y Ritschel WA. Development and evaluation of an intracutaneous depot formulation of corticosteroids using Transcutol as a cosolvent: *in-vitro*, *ex-vivo* and *in-vivo* rat studies. *Journal Pharmaceutics and Pharmacology*. 1991;43:609-14.
230. Almeida H, Amaral MH, Lobão P. Temperature and pH stimulative responsive polymers and their applications in controlled and self-regulated drug delivery. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2012;2:1-10.
231. Santos C, de Oliveira RB, Arantes VT, Caldeira LR, de Oliveira MC, Egito ES, Ferreira LA. Amphotericin B-Loaded Nanocarriers for Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: Development, Characterization, and *in vitro* Skin Permeation Studies. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2012;8(2):322-9.
232. Sierra A, Ramirez ML, Campmany AC, Martinez AR, Naveros BC. *In vivo* and *in vitro* evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation. *Journal Dermatology Science*. 2013;69:202-14.
233. Wei Liu, Xu Zhang, Zhaohui Liu, Xin Luo. Impact of pH on the antifungal susceptibility of vaginal *Candida albicans*. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2011; 114: 278–280).
234. Mallandrich M, Fernández Campos F, Clares B, Halbaut L, Alonso C, Coderch L, Garduño-Ramírez ML, Andrade B, Del Pozo A, Lane M, Calpena AC. Developing Transdermal Applications of Ketorolac Tromethamine Entrapped in Stimuli Sensitive Block Copolymer Hydrogels. *Pharmaceutical Research*. 2017;34:1728-40.
235. Lenaerts V, Triqueneux C, Quarton M, Rieg-Falson F, Couvreur P. Temperature-dependent rheological behavior of Pluronic F-127. *International Journal of Pharmaceutics*. 1987;39:121-7.

236. Lao LI, Peppas NA, Boey FY, Venkatraman SS Modeling of drug release from bulk-degrading polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;418:28-41.
237. International Conference on Harmonization. (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use. Stability Testing of new Drug Substances and Products, Q1A (R2). Geneva: ICH 2003.
238. Den Boer M y Davidson RN. Treatment options for visceral leishmaniasis. *Expert review of Anti-infective therapy*. 2006;4:187-97.
239. Bernal N, Calpena AC, Mallandrich M, Ruiz A, Clares B. Development, Physical-Chemical Stability, and Release Studies of Four Alcohol-Free Spironolactone Suspensions for Use in Pediatrics. *Dissolution Technologies*. 2014;21:19-30.
240. Navarro-Verdugo A, Goycoolea F, Romero-Melendez G, Higuera-Ciaparad I and Arguelles-Monal W. A modified Boltzmann sigmoidal model for the phase transition of smart gels. *Soft Matter*. 2011;7:5847.
241. Kruchi K. How is the circadian rhythm of core body temperature regulated? *Clinical Autonomic Research*. 2001;12:147-9.
242. Mohammed D, Hirata K, Hadgraft J, Lane ME. Influence of skin penetration enhancers on skin barrier function and skin protease activity. *European Journal Pharmaceutical Science*. 2014:118-22.
243. Hirata K, Mohammed D, Hadgraft J, Lane ME. Influence of lidocaine hydrochloride and penetration enhancers on the barrier function of human skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;477:416-20.
244. Gilbert J, Richardson J, Pallin KJ, and Hadgraft JT. The effect of solutes and polymers on the gelation properties of Pluronic F-127 solution for controlled drug delivery. *Journal Control Release*. 1987:113-18.
245. Grove GL, Allenby K, Houser T. DFD-01 Reduces Transepidermal Water Loss and improves skin hydration and flexibility. *Dermatology Therapy*. 2017;7:507-14.
246. Martínez J y Albrecht C. Susceptibility to fluconazole and amphotericin B in clinical *Candida* isolates. *Revista Iberoamericana de Micología*. 1998;15:298-9.

247. Mosquera J, Warm PA, Morrissey J, Moore CB, Gil-Lamaignere C, Denning DW. Susceptibility testing of *aspergillus flavus*: inoculum dependence with itraconazole and lack of correlation between susceptibility to amphotericin B *in vitro* and outcome *in vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45:1456-62.
248. Charvalos E, Tzatzarakis MN, Van Bambeke F, Tulkens PM, Tsatsakis AM, Tzanakakis GN. Water-soluble amphotericin B polyvinylpyrrolidone complexes with maintained antifungal activity against *Candida spp.* and *aspergillus spp.* and reduced haemolytic and cytotoxic effects. *Journal Antimicrobial Chemother.* 2006;57:236-44.
249. Rins M, Diez I, Calpena AC, Obach R Skin density in the hairless rat. Evidence of regional differences. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 1991;3:456-7.
250. Banov D. Synergistic Effect of Poloxamer-based Composition and Itraconazole on Fungus and Yeast. Patent 9,763,934B2. 2017.
251. Shaik N, Giri N, Elmquist WF. Investigation of the micellar effect of pluronic P85 on P-glycoprotein inhibition: cell accumulation and equilibrium dialysis studies. *Journal Pharmaceutical Science & Research*. 2009;98:4170-90.
252. Jain Sk Chourasia MK, Sabitha M, Jain R, Jain AK, Ashawat M, Jha AK. Development and characterization of transdermal drug delivery systems for diltiazem hydrochloride. *Drug Delivery*. 2003;10:169-77.
253. Salamanca Capusiri E, Ruiz Pinell G, Ticona Huallpara J, Giménez Turba A. Método colorimétrico - XTT: como evaluación de alto rendimiento de sustancias con actividad leishmanicida. *BIOFARBO*. 2008; 16:21-7.
254. Vermeersch M, Da Luz RI, Toté K, Timmermans JP, Cos P, Maes L. *In vitro* susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2009; 53:3855-9.
255. García Hernández A, Bilbao Ramos P. Comparación de la susceptibilidad farmacológica *in-vitro* de amastigotes de *Leishmania amazonensis* en distintos tipos celulares. *Reduca*. 2012; 10.

256. Rodrigues Caldeira L, Ribeiro Fernandes F, Ferreira Costa D, Frézard F, Crocco Afonso LC, Miranda Ferreira LA. Nanoemulsions loaded with amphotericin B: A new approach for the treatment of leishmaniasis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015; 70:125-31.
257. Mendonça D, Lage L, Lage D, Chavez-Fumagalli MA, Ludolf F, Menezes-Souza D, Faraco A, Castilho R, Tavares C, Barichello JM, Duarte M, Coelho E. Poloxamer 407 (Pluronic® F127)-based polymeric micelles for amphotericin B: In vitro biological activity, toxicity and in vivo therapeutic efficacy against murine tegumentary leishmaniasis. *Experimental Parasitology*. 2016; 169:34-42.
258. Eaton P, Bittencourt C, Costa Silva V, Vêras L, Costa C, Leite JR. Anti-leishmanial activity of the antimicrobial peptide DRS 01 observed in *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) cells *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2014; 10:483-90.

VII. ANEXOS

Amphotericin B releasing topical nanoemulsion for the treatment of candidiasis and aspergillosis

Lilian Sosa^a, Beatriz Clares^{b, c,*}, Helen L. Alvarado^{a, c}, Nuria Bozal^d,
Oscar Domenech^{a, c}, Ana C. Calpena^{a, c}

^aDepartment of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, School of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^bDepartment of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain

^cInstitute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona, Barcelona, Spain

^dDepartment of Biology, Healthcare and the Environment, School of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Received 26 February 2017; accepted 28 June 2017

Abstract

The present study was designed to develop a nanoemulsion formulation of Amphotericin B (AmB) for the treatment of skin candidiasis and aspergillosis. Several ingredients were selected on the basis of AmB solubility and compatibility with skin. The formulation that exhibited the best properties was selected from the pseudo-ternary phase diagram. After physicochemical characterization its stability was assessed. Drug release and skin permeation studies were also accomplished. The antifungal efficacy and skin tolerability of developed AmB nanoemulsion was demonstrated. Finally, our results showed that the developed AmB formulation could provide an effective local antifungal effect without theoretical systemic absorption, based on its skin retention capacity, which might avoid related side effect. These results suggested that the nanoemulsion may be an optimal therapeutic alternative for the treatment of skin fungal infections with AmB.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Key words: Amphotericin B; Nanoemulsion; Skin; Candidiasis; Aspergillosis

Currently, fungal infections are one of the most important public health problems. In fact, superficial mycoses caused by *Candida spp.* have increased in the last 30 years, especially among immunocompromised population such as AIDS patients and those receiving immunosuppressive chemotherapy or transplantation.

Amphotericin B (AmB) is a potent polyene macrolide antibiotic with high molecular weight (924 Da) and broad-spectrum coverage.¹ It is used in the treatment of most frequent systemic and cutaneous fungal infections caused by *Candida spp.* and *Aspergillus spp.*² AmB exerts its toxic action by forming complexes with the membrane sterols, which leads to

the formation of transmembrane channels through which a loss of ions and molecules takes place and involves the progressive destruction of the fungal cell.³

The amphoteric and amphiphilic nature of the AmB molecule with a macrolactone ring, as well as, carboxyl and amino groups, confer distinctive physicochemical characteristics as poor solubility in aqueous media at physiological pH⁴. On the other hand, its high molecular weight also restricts the potential permeation through the lipid barrier that stratum corneum constitutes. All these inherent aspects unable AmB to permeate through the skin⁵ and reveal great challenges for the development of topical pharmaceutical systems as in the case of other polyene macrolide antibiotics *e.g.* nystatin.⁶ To overcome these drawbacks multiple strategies have been designed since the rate at which the drug permeates across the skin constrains the effectiveness of the topical treatment. Thus, topical drug delivery systems as liposomes,⁷ nanoparticles,⁸ microtubes,⁴ ethosomes,⁹ *etc.* have been developed. Nevertheless, at present there are not topical formulations of AmB available in the market.¹⁰

Financial Disclosure: The authors have no financial, personal, or other relationships with other people or organizations within 5 years of the beginning of the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. The authors declare that no competing interests exist.

*Corresponding author at: Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Granada, 18071 Granada, Spain.

E-mail address: beatrizclares@ugr.es (B. Clares).

A great deal of attention is being focused on the use of nanoemulsions as colloidal drug carrier systems. Nanoemulsions are emulsified systems with small drop size (20–200 nm), and high uniformity that provide advantages such as easy elaboration, solubilization and stability properties.¹¹

Previous works have reported the elaboration of AmB loaded nanoemulsions for topical treatment. In some cases aimed for cutaneous leishmaniasis with low dermal penetration results,¹² or with no antifungal studies in other cases.¹³ However, only very few have been focused specifically for skin candidiasis or aspergillosis.^{14,15}

We report an approach to deliver AmB formulated in nanoemulsion specifically developed for the skin treatment against *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. Therefore, the main goals of this work are: (i) the design, development, optimization and characterization of nanoemulsion containing AmB for topical administration; (ii) the study of AmB release kinetic mechanism, permeation and skin tolerance; (iii) the analysis of the anti-fungal activity against *Candida* spp. and *A. brasiliensis* strains; and finally, (iv) the evaluation of its effect on yeast cells by atomic force microscopy.

Methods

Chemicals

Amphotericin B was obtained from Acofarma® (Barcelona, Spain). Castor oil and polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween®80) was purchased from Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Caprylocaproyl macrogol-8 glycerides EP (Labrasol®), highly purified diethylene glycol monoethyl ether EP/NF (Transcutol® P), medium-chain triglycerides EP (Labrafac® Lipophile), lauroyl macrogol-6glycerides EP (Labrafil®) and polyglyceryl-3 dioleate (Plurol® oleique) were kind gifts from Gattefossé (Saint-Priest Cedex, France). Caprylic/capric triglycerides (Miglyol® 812) were supplied by Roig Farma-Fagron (Tarrasa, Spain). Water utilized in all experiments was obtained from a Milli-Q® Plus System. The rest of chemicals and reagents were of analytical grade.

Pseudo-ternary phase diagram

The solubility of AmB in different oils, surfactants and co-surfactants (Table 1) was estimated by dissolving an excess of AmB in 2 mL of each of the selected components. Vials were vortexed and then kept at room temperature in a shaking water bath for 36 h. Once these samples were equilibrated, they were filtrated and centrifuged (12,000 rpm, 30 min) using an Amicon® Ultra-15 centrifugal filter with Ultracel-100 membrane (Millipore Co., Billerica, MA, USA), and subsequently diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO). AmB solubility was subsequently quantified by a validated high performance liquid chromatography (HPLC) technique (provided as supporting information).

Pseudo-ternary phase diagram of surfactant-co-surfactant mixture, oil phase and aqueous phase was performed. For this task, several combinations of oil and surfactant-co-surfactant mixture at different weight ratios (from 10:90 to 90:10) were

Table 1

Solubility (mg/mL) of AmB in different oils, surfactants and cosurfactants at 25 °C (n = 3).

Components	Solubility
Castor oil	0.92 ± 0.07
Miglyol® 812	0.19 ± 0.02
Labrafac® Lipophile	0.25 ± 0.03
Labrafil®	0.08 ± 0.01
Labrasol®	2.18 ± 0.08
Tween®80	2.05 ± 0.06
Transcutol® P	1.13 ± 0.05
Plurol® oleique	0.83 ± 0.03
Propylene glycol	1.07 ± 0.04
Water	0.03 ± 0.01

mixed to define the boundaries of emulsification using the aqueous titration method.

Once the appropriate formulation was selected based on optimized physical parameters (smaller droplet size and polydispersity index), the AmB loaded nanoemulsion was elaborated by mixing the selected quantities of oily phase and surfactant-co-surfactant mixture. Subsequently, the aqueous phase was added under magnetic stirring at room temperature. AmB was then dissolved into the nanoemulsion at a concentration ratio of 0.50% (w/w) and equilibrated for 12 h to check any sign of precipitation before their use in subsequent studies.

Physicochemical characterization

Droplet size analysis of nanoemulsions was determined in triplicate by dynamic light scattering (DLS) in a zetaser nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK), through which the polydispersity index, as a measure of size distribution, was also obtained. Results are reported as the mean ± standard deviation (SD).

Morphological examination of developed nanoemulsion was performed by transmission electron microscopy (TEM) using a Zeiss electron microscope (ZEISS International, Oberkochen, Germany).

The pH values of samples were recorded with a digital pH-meter (Crison Instruments S.A., Barcelona, Spain) by direct immersion of the electrode into the samples.

Drug content

The AmB content in the nanoemulsion was determined by HPLC. For this task 200 µL of nanoemulsion were added to a 1.5 mL Eppendorf tube containing 1 mL of methanol:N-dimethylformamide: water (55:15:30, v/v/v). After vortexing for 10 s the amount of AmB was measured.

Rheological studies

Rheological tests were accomplished in triplicate with a rotational rheometer HAAKE Rheostress 1 (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) with cone rotor C60/2-Ti (60 mm diameter, 2° angle) at 25 ± 0.2 °C, 24 h after preparation. Viscosity and flow curves were plotted during the ramp-up, constant and ramp-down periods (3 min from 0 to 100 s⁻¹, 1 min at 100 s⁻¹ and 3 min from 100 to 0 s⁻¹, respectively).

Stability studies

Destabilization phenomena (coalescence, flocculation, sedimentation, creaming, etc.) of nanoemulsion were tested by multiple light scattering analysis of backscattering and transmission profiles using the TurbiScanLab® (Formulation Co., L'Union, France) with a pulsed near-infrared light source ($\lambda = 880$ nm) at 25 °C, 24 h after elaboration.

The storage stability of developed nanoemulsion was assayed according to International Conference on Harmonization guidelines¹⁶ at 4 °C \pm 3 °C, 25 °C \pm 2 °C/60% \pm 5% relative humidity (RH) and 40 °C \pm 2 °C/75% \pm 5% RH. Droplet size, polydispersity index and drug content were measured after 1, 15 and 30 days. Appearance and clarity (by visual inspection) was also compared initially and after 30 days.

In vitro release studies

Vertical Franz diffusion cells (FDC 400; Crown Glass, Somerville, NJ) with cellulose membranes (MWCO 12 kDa) were used to address the AmB release test. Methanol-*N*-dimethylformamide-water (55:15:30, v/v/v) was used as receptor medium under stirring at 600 rpm assuring sink conditions. The experiment was carried out at 32 \pm 0.5 °C. Adequate quantities of AmB nanoemulsion or AmB plain solution (in DMSO) equivalent to 500 μ g of AmB were added to the donor compartment. 200 μ L aliquots were extracted from the receptor chamber at pre-selected times for 75 h and replaced with similar volume of fresh medium. Samples were analyzed by HPLC. Results are reported as the mean \pm SD of six replicates.

Experimental data were fitted to five kinetic models (zero order, first order, Peppas-Korsmeyer, Higuchi and Weibull functions) by nonlinear least-squares regression using specialized software (WinNonLin® version 3.3, Pharsight Corporation, Sunnyvale, CA, USA). The appropriateness of model fitting was determined by calculation of the Akaike's information criterion (AIC).

Antifungal efficacy

Broth microdilution method was used to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) as previously described,¹⁷ against *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 66032 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 strains (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). The procedure followed the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines.¹⁸

The yeast strains were grown aerobically in Sabouraud Dextrose medium at 30 °C for 48 h. The inoculums were prepared by suspending colonies in 1/4-strength Ringer's solution up to 0.5 McFarland standard and counted in a Neubauer Chamber (1–5 \times 10⁶ colony forming unit (CFU)/mL). The standardized suspension was diluted in 1/4-strength Ringer's solution (1:10) up to 1–5 \times 10⁵ CFU/mL. Serial dilutions from 25 to 0.0122 μ g/mL of AmB nanoemulsion and plain solution (as reference) were prepared in a 96-well microdilution plate using RPMI-1640 double strength. Blank nanoemulsion (without AmB) was also assayed (final volume = 100 μ L). Then, the inoculum suspension (100 μ L) was poured to each well. Additionally, two drug-free controls were

assayed, one with free medium (sterile control) and the other with 100 μ L of medium plus 100 μ L of inoculum suspension (growth control). Plates were read after incubation at 30 °C for 48 h, by a reader device model 680 (Bio-Rad, Madrid, Spain) at $\lambda = 620$ nm after 0, 24, and 48 h.

Antimicrobiological activity against *Aspergillus* was also assayed with strains of *A. brasiliensis* ATCC 16404 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). The procedure was based on the NCCLS M3 A176 protocol for filamentous fungi.¹⁹ Equally, the microdilution method was utilized for determination of MIC. This fungus was grown on Sabouraud's agar plate at 25 \pm 2 °C for 5 days. Subsequently, spores and mycelium were re-suspended in Ringer's and tween medium. The resulting suspension was extracted and left in repose for 5 min until heavy particles settled. The upper homogeneous suspension was then mixed by vortexing for 15 s.

A suspension containing 2 \times 10⁵ CFU/mL was obtained according to the established turbidity, being also confirmed by plate count obtaining a final concentration of 2 \times 10⁵ CFU/mL. Serial dilutions from 65 to 0.0317 mg/mL of AmB nanoemulsion and plain solution (as reference) were prepared in RPMI-1640 double strength in a 96-well microdilution plate (final volume = 100 μ L). Growth and sterile controls were also assayed. 100 μ L of inoculum suspension was added to each well (except in sterile control). After incubation at 30 °C for 48 h, plates were read in the same device at $\lambda = 620$ nm after 0, 24, and 48 h.

Ex vivo permeation studies

Human skin was obtained from the abdominal region of healthy women (plastic surgery department, Barcelona-SCIAS Hospital, Barcelona, Spain). The experimental protocol was approved by the Bioethics Committee of the Barcelona-SCIAS Hospital (reference number: BEC/001/16). Equally written informed consent forms were provided by volunteer. Human skin was dermatomed (GA630 dermatome, Aesculap, Tuttlingen, Germany) into 400 μ m thick pieces.²⁰

Integrity of skin samples were assessed in triplicate by measuring the transepidermal water loss (TEWL) values by a DermaLab® module (Cortex Technology, Hadsund, Denmark).²¹ Tissues with TEWL values higher than 10 g/m²/h were ruled out from the experiment.

The skin permeation studies were performed in amber glass Franz type diffusion cells as described previously (see *in vitro* release studies) using human skin membranes and Transcutol® P as receptor medium allowing sink conditions. Amount of AmB nanoemulsion equivalent to 750 μ g of AmB was placed in the donor compartment. 300 μ L aliquots were collected *via* syringe from the center of the receptor compartment at pre-selected intervals for 36 h and replaced with equal volumes of tempered fresh solution immediately. The quantity of AmB was then determined in triplicate by HPLC.

The drug retained in the skin was subsequently quantified as follows; the skin membranes were detached from the Franz cells, cleaned with gauze soaked in 0.05% sodium dodecylsulphate solution and washed in distilled water. Then, the area of permeation was cut and weighed. Finally the AmB retained was extracted in an ultrasound bath with Transcutol® P mixture

Table 2

Composition, droplet size, polydispersity index (PI) of the developed nanoemulsion formulations that showed smaller globule size (mean \pm SD, n = 3).

Castor oil (%)	Labrasol®:Plurol® oleique (5:1) (%)	Transcutol® P (%)	Droplet size (nm)	PI
15	45	40	126.90 \pm 09.83	0.21 \pm 0.01
20	45	35	152.37 \pm 23.27	0.86 \pm 0.06
05	55	40	112.90 \pm 10.15	0.22 \pm 0.01
20	55	25	137.86 \pm 18.69	0.73 \pm 0.05
15	60	25	174.53 \pm 15.52	0.64 \pm 0.02
05	65	30	154.70 \pm 13.04	0.52 \pm 0.03

during 20 min. The resulting solutions were measured by HPLC for AmB quantification.

In vivo tolerance study

Ten female volunteers with healthy skin between 25 and 35 years old participated in the study. The study was approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona according to the recommendations of the Declaration of Helsinki,²² all volunteers signed written informed consent forms. Participants were warned that they should not use skin-care cosmetics on the test areas for two days before the study. Volunteers were allowed to stay in the test room for at least 30 min prior to the measurements.

Several measurements were performed before applying the nanoemulsion (baseline readings), immediately after application (0.5 mL/cm²) and then at several time intervals: 2, 4 and 6 h, on the flexor side of the left forearm.

Skin temperature was recorded using a Skin Thermometer® ST500 (Courage-Khazaka electronic GmbH, Cologne, Germany).

Trans epidermal water loss (TEWL), referring to the total amount of water vapor lost through the skin was measured by a Tewameter® TM 300 (Courage-Khazaka electronic GmbH, Cologne, Germany).

The stratum corneum hydration (SCH) was determined by using a Corneometer® CM 825 (Courage-Khazaka electronic GmbH, Cologne, Germany). All measures were carried out according to published guidelines.²³

Atomic force microscopy (AFM)

The morphology of treated and untreated *C. albicans* cells was examined by a multimode microscope controlled with Nanoscope V device (Bruker, AXS Inc., Madison, WI, USA) under liquid environment at 25 \pm 2 °C. Mechanical properties were also measured as previously reported²⁴ (provided as supporting information).

Statistical analysis

Obtained experimental data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). Comparisons of findings were done by multiple comparison test. *P* < 0.05 was set for considering statistically significant differences.



Figure 1. Transmission microscopy image of developed nanoemulsion. Bar length 200 nm.

Results

Pseudo-ternary phase diagram

Results of the AmB solubility test in the selected oils, surfactants and co-surfactants are shown in Table 1. On the basis of these findings, castor oil (oil phase), Labrasol®/Plurol® oleique (5:1) (surfactant/co-surfactant mixture), and Transcutol® P (as aqueous phase) were chosen as components of the nanoemulsion.

In this way, the vertexes of the equilateral triangle represented the following components: castor oil, Labrasol®:Plurol® oleique (5:1) and Transcutol® P as shown in Supplementary Material.

Table 2 summarizes the compositions, droplet sizes and polydispersity indexes of nanoemulsions that showed smaller droplet sizes. From these formulations, the nanoemulsion composed of 5% castor oil, 55% Labrasol®:Plurol® oleique mixture (ratio 5:1) and 40% Transcutol® P was selected for further studies based on its small droplet size and polydispersity index. AmB was then incorporated to this selected vehicle at 0.5% (w/w) and characterized.

Characterization of nanoemulsion

The selected nanoemulsion was optically transparent with monophasic appearance and slightly yellowish without any precipitates. The nanoemulsion showed a droplet size of 128.40 \pm 12.71 nm and polydispersity index of 0.27 \pm 0.05. All this was indicative of the presence of nanoemulsion droplets and not a bi-continuous system. The droplet size did not change significantly after AmB loading.

As shown in Figure 1, TEM confirmed the adequacy of the preparation method. The TEM image of AmB nanoemulsion revealed the presence of monodispersed oil droplets with sizes b150 nm. The morphology ascertained almost spherical shaped

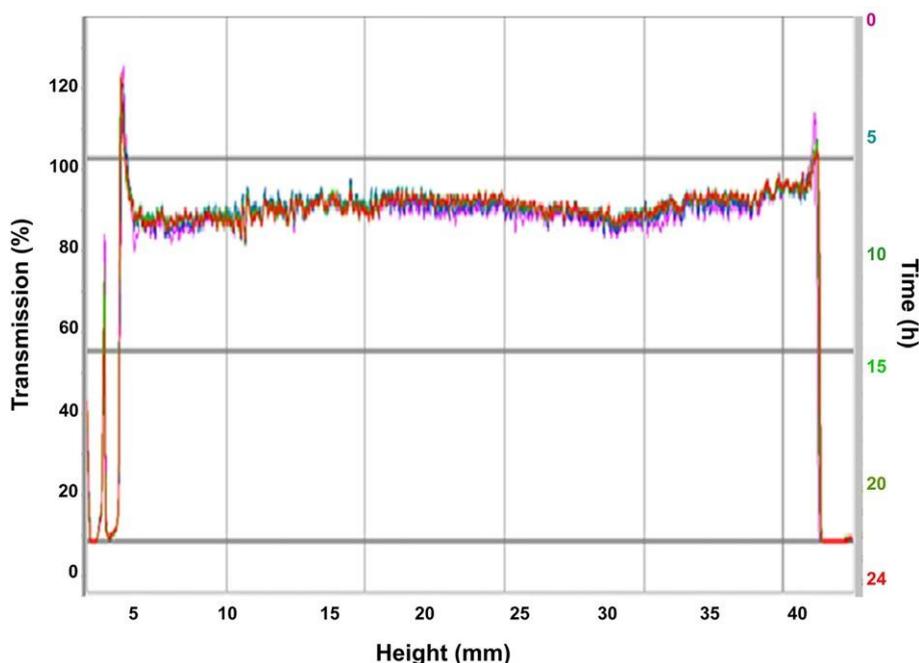


Figure 2. Transmission profiles of AmB nanoemulsion obtained by the TurbiscanLab®. The left side of the curve corresponds to the bottom of the vial, whereas the right side corresponds to the sample behavior on the top.

droplets, which confirmed the previously mentioned reports of DLS measurements.

The pH of the developed nanoemulsion was 7.42 ± 0.53 , and the drug content determinations confirmed the efficiency of the method revealing an AmB entrapped value in the nanoemulsion system of $95 \pm 2\%$.

Rheological studies

The flow and viscosity curves of AmB nanoemulsion are provided in the Supplementary Material. The nanoemulsion exhibited a Newtonian behavior with constant viscosity when the shear rate increased. Viscosity at 100 s^{-1} was $12.20 \pm 0.28 \text{ mPa}\cdot\text{s}$.

Stability

Figure 2 shows transmission profile at 25°C of AmB nanoemulsion corresponding to measurements for 24 h. The bottom of the vial is represented on the left side of the graphic and the top on the right one. Peaks at the bottom and the top of the vial correspond to the meniscus made by the sample in contact with the glass (regions below 3 mm and above 43 mm height, respectively).

The drug content, droplet size, and polydispersity index were found to be maintained without significant changes after storage period of 30 days at 4 and 25°C . The physical appearance to the naked eye was translucent, transparent with light yellowish color, but not in the case of storage at 40°C , in which the system was broken and the phase separation was evident within 15 days.

Drug release study

The AmB release from the nanoemulsion was evaluated under sink conditions. Figure 3 shows the profile of AmB

percentage released from nanoemulsion over time. After 75 h 100% of AmB was released from the system showing one-step sustained release pattern. On the other hand, AmB plain solution did not reach optimal release rate. It could hardly reach $\sim 10\%$.

Antifungal activity

Antifungal activity of AmB nanoemulsion was assessed against different strains of *Candida*, as well as *A. brasiliensis*. MICs values from the *in vitro* susceptibility test after 48 h are reported in Table 3. MIC value for AmB nanoemulsion was slightly greater than AmB solution except for *A. brasiliensis*, in which MIC values of the nanoemulsion and solution were identical.

In vivo tolerance study

The results of temperature values before (baseline) and after application at different time intervals are shown in Figure 4, A. Furthermore, Figure 4, B shows the results of TEWL measurements. As can be observed the nanoemulsion application led to an increase of the TEWL values after 2 h. Finally, the effect of nanoemulsion application on skin hydration of volunteers is clearly exhibited in Figure 4, C. As the graphic shows, significant differences on SCH values were found when compared with baseline values.

Atomic force microscopy (AFM)

Figure 5, A shows a *C. albicans* yeast cell trapped in a pore. It could be clearly observed the rough surface of the yeast cell. Figure 5, B shows the yeast cell with marked signs of deterioration, 24 h after treating with AmB nanoemulsion. Figure 6, A and D show the high resolution deflection images of

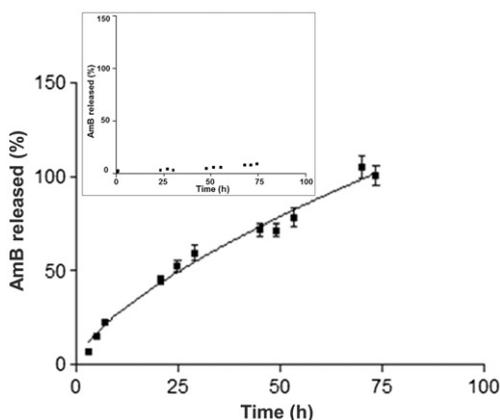


Figure 3. *In vitro* AmB release from nanoemulsions and plain solution (insert). The cumulative amount released was plotted against time. Data represent mean \pm SD, $n = 6$.

the cell yeasts. In order to quantify the changes in the nanomechanical properties of the cell wall the elasticity maps were obtained along the cell wall surface (Figure 6, B and E). It could be observed as no special structures were formed in the cell wall. From the corresponding histograms it is clearly seen the effect of AmB nanoemulsion (Figure 6, C and F). While in the case of untreated cell wall, the Young's modulus value was 18.4 ± 0.4 MPa, in the treated yeast the cell wall exhibited a Young's modulus value of 162 ± 2 kPa, that is 100 times less rigid than the untreated one.

Discussion

The drug solubilization capacity of the nanoemulsion constrains the drug concentration gradient towards the skin.²⁵ Bearing this in mind, along with their suitability for skin delivery, the ingredients of the nanoemulsion system were chosen.²⁶ Concretely, Labrasol[®] possesses low irritability when is used in topical systems loading other antifungal drugs,²⁷ and the efficacy of the mixture Labrasol[®]/Plurol[®] Oleique has been proven as components in drug delivery systems for amphiphilic drugs.²⁸ The ratio 5:1 was selected because of its demonstrated emulsification properties.²¹ Finally, Transcutol[®] P was selected as the hydrophilic phase based on its skin biocompatibility and solubilization capacities. Furthermore, the expanded lipid domain of Transcutol[®] P is able to retain drugs providing a depot effect.^{29,30} This depot effect is believed to be due to the swelling of intercellular lipids at the stratum corneum without disruption of the multiple bilayer structure. The selected formulation was chosen from the diagram depicting the larger nanoemulsion region and with the best properties in an attempt to optimize the formulation. Figure 1 shows the TEM image of the obtained nanosystem. The diffusion of the staining agent highlighted the presence of electron-dense areas (polar areas) which appear dark to us, denoting the external aqueous phase and confirming an O/W system. The morphology images ascertained almost spherical shaped droplets which were in accordance with previously mentioned DLS results.

Table 3

Minimal inhibitory concentration (MIC) against different cultures of AmB solution (free AmB), AmB nanoemulsion (AmB NE) and blank nanoemulsion (blank NE) after incubation at 30 °C for 48 h ($n = 3$).

Species	Origin	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
		free AmB	AmB NE	blank NE
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	0.10	0.78	–
<i>C. glabrata</i>	ATCC 66032	0.10	0.39	–
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	0.05	0.19	–
<i>A. brasiliensis</i>	ATCC 16404	0.13	0.13	–

The pH is an important factor to avoid skin irritation or bacterial infection.³¹ The pH of nanoemulsion was 7.42 ± 0.53 , which is a biocompatible value for skin application.³²

The determination of flow properties of formulations can provide important information about stability, sensorial characteristics, spreadness and dosing behavior. All these properties are related with the application characteristics.³³ The constant viscosity when the shear rate increased was indicative of Newtonian behavior exhibiting low values of viscosity. This Newtonian behavior makes it suitable for its application as spray or roll-on. This property is crucial for the treatment of fungal infections affecting large areas of skin, because a spray can be applied on the entire surface without rubbing, which avoids the spreading of the infection to other areas of the body.³⁴

Only transmission profiles were used for the evaluation of physical stability of formulation since the nanoemulsion was translucent. Variations in the transmission signal above 10% are indicative of instability. As shown in Figure 2, the optical profile of the nanoemulsion showed constant transmission lines near 90% throughout the study, confirming the stability of the system. This stability was also confirmed by the results of stability under storage at 4 and 25 °C. The drug content, globule size and polydispersity index were found to be maintained without significant changes during storage period of 30 days at 4 and 25 °C. It could be observed to the naked eye that the formulation had a translucent appearance; it was also transparent and yellowish in color. However, in the case of storage at 40 °C the system was broken and the phase separation was evident within 15 days.

The release profile of the drug from the vehicle is important information that can be used to predict *in vivo* behavior.³⁴ As can be observed in Figure 3, the nanoemulsion vehicle provided higher and prolonged drug release when compared with the drug plain solution. After model fitting, the Korsmeyer-Peppas equation was the model that had the smallest AIC value for our nanoemulsion. Thus, the release mechanism could be explained mathematically according to the following equation:

$$Q_t/Q_\infty = K \times t^n$$

Where Q_t/Q_∞ is the percentage of the drug released at time t , k is the release constant, t is the release time and n is the diffusion release exponent. According to the value of the n parameter, the drug release mechanism in spherical matrices could be estimated. In this case $k = 5.74 \pm 0.92$, and $n = 0.67 \pm 0.04$, which denoted that the process followed a non-Fickian or anomalous

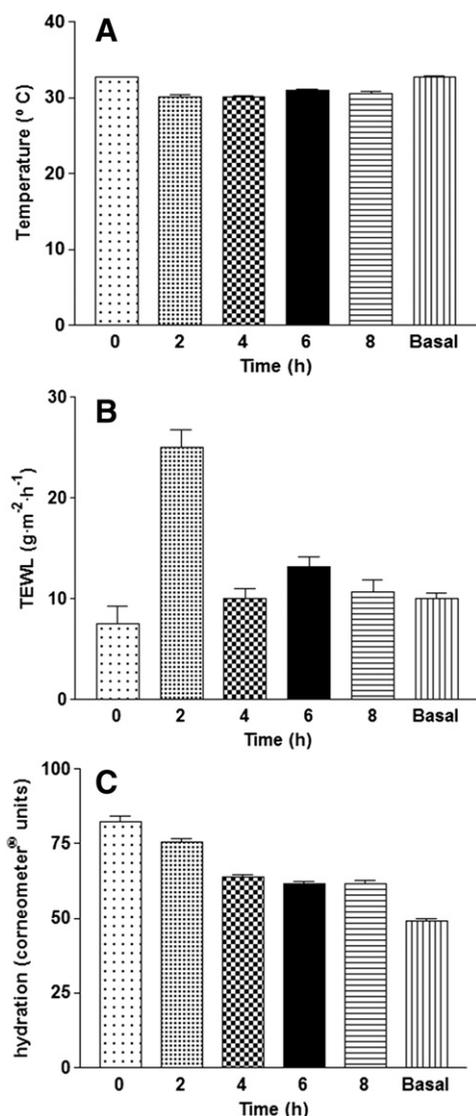


Figure 4. (A) Change in temperature value before and after application of AmB nanoemulsion to the left forearm of 10 healthy volunteers. (B) Change in TEWL value before and after application of AmB nanoemulsion to the left forearm of 10 healthy volunteers. (C) Change in SCH value before and after application of AmB nanoemulsion to the left forearm of 10 healthy volunteers.

diffusion.³⁵ This anomalous diffusion was related to a combination of diffusion and erosion in solid matrixes.³⁶ However, this mechanism in the case of emulsion systems is poorly known.¹⁶ Although the mathematical modeling is intended to help the understanding of complex release processes the entire description of the release mechanism is especially difficult because of the enormous number of variables that should be taken into account.²¹

Antifungal efficacy results in *Candida* spp. were in line and even below that those reported by other studies.³⁷ MIC reported by EUCAST for susceptibility test for *A. niger* is ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$.³⁸

Our AmB nanoemulsion showed a MIC of 0.13 $\mu\text{g/mL}$ which was also below other reported values.^{39,40} In all cases, the nanoemulsion formulation without AmB (blank nanoemulsion) did not exhibited inhibitory effect on the microbial growth.

No theoretical systemic absorption was expected to occur because no AmB was detected in the receptor chamber from the *ex vivo* permeation study. Nevertheless, the amount of AmB retained after 36 h application was 17.76 $\mu\text{g/cm}^2$. According to this skin retention value, MIC results (Table 3) and considering the density of hydrated skin (0.964 g/mL),⁴¹ we can establish that this nanoemulsion would provide high local amounts of AmB and, therefore, exerts an efficient antifungal action on skin fungal diseases, as well as, against fungus present in deep layers. In this way, the fungal infection would be treated more effectively. In case of topical infections, the skin barrier could be damaged, and therefore its permeability augmented. In these circumstances, the depot effect of Transcutol P[®] provides additional advantages by increasing their concentration in the skin layer,⁴² avoiding potential systemic levels of AmB. It could be hypostatized that the AmB nanoemulsion might provide an antifungal effect more than enough to ensure its efficacy avoiding systemic concentrations of AmB, which is associated with side effects.^{43,44}

As a general result it could be considered that the formulation did not alter the biophysical properties of skin and thus was suitable and safe for topical application. Differences were small but statistically significant between temperature baseline values and those obtained after 8 h (Figure 4, A). However, these differences could be due to the circadian rhythm of core body temperature.⁴⁵ TEWL is an important indicator of skin integrity, and thus, an indicator of its biological function. Any increase in the value of TEWL is closely related to alterations in the skin barrier function.⁴² All participants showed TEWL values situated in the normal range except after 2 h, probably due to the Transcutol[®] P action on skin.⁴⁶ The SCH value was significantly higher than baseline probably due to the application of the nanoemulsion, because of the water binding capacity of Transcutol[®] P. The decreasing behavior with time might be due to the evaporation on the skin surface.

AFM is a technique extremely useful for analyzing the three-dimensional structure of the shape and surface of fungi and for the investigation of the efficacy and mechanisms of action of antifungal drugs.⁴⁷ Important cell morphology changes were exhibited. After the treatment the size of treated cells was similar to the size of the untreated cells. However, the structure of the mannoprotein outer layer was completely affected. From the image presented in Figure 5, it is easy to observe a degradation of the outer layer forming a less cohesive structure. On the one hand, the cell wall of the untreated yeast cell was a uniform flat structure with some individual round structures on it. Additionally, the cell wall of the treated yeast cell denoted a ripple effect. Probably, it may be due to the rupture of the mannoprotein 2D structure during the permeation of the nanoemulsion towards dipper regions inside the yeast cell.

While for the untreated cell wall, the Young's modulus value was 18.4 ± 0.4 MPa, for the treated yeast the cell wall this value was 162 ± 2 kPa, namely 100 times less rigid than the untreated one. These values corroborated the destructuring effect on the outer membrane when nanoemulsion crossed through it towards the cell membrane of the yeast cell.

Previous interesting works reporting AmB loaded nanoemulsions^{14,15} have developed nanosystems using lipids

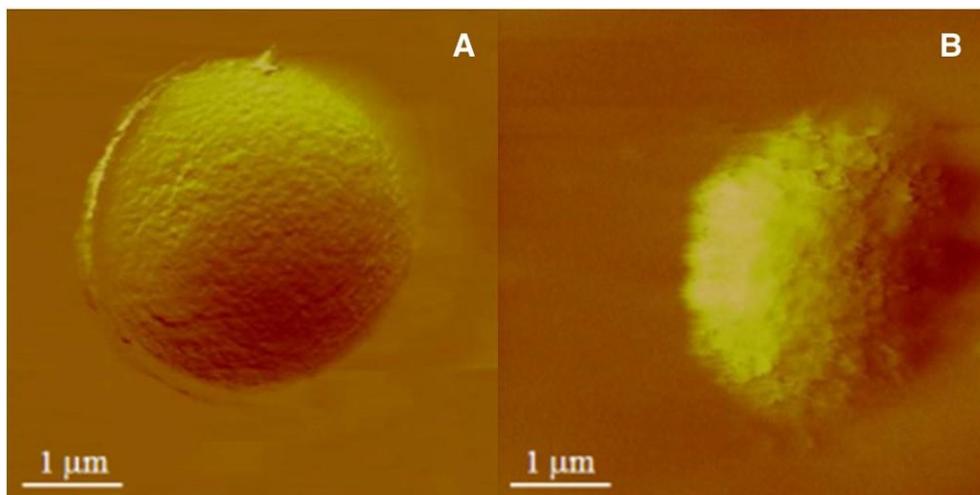


Figure 5. Imaging of single *Candida albicans* yeast cell. (A) Deflection image of untreated *C. albicans*. (B) Deflection image of *C. albicans* treated 24 h with AmB nanoemulsion.

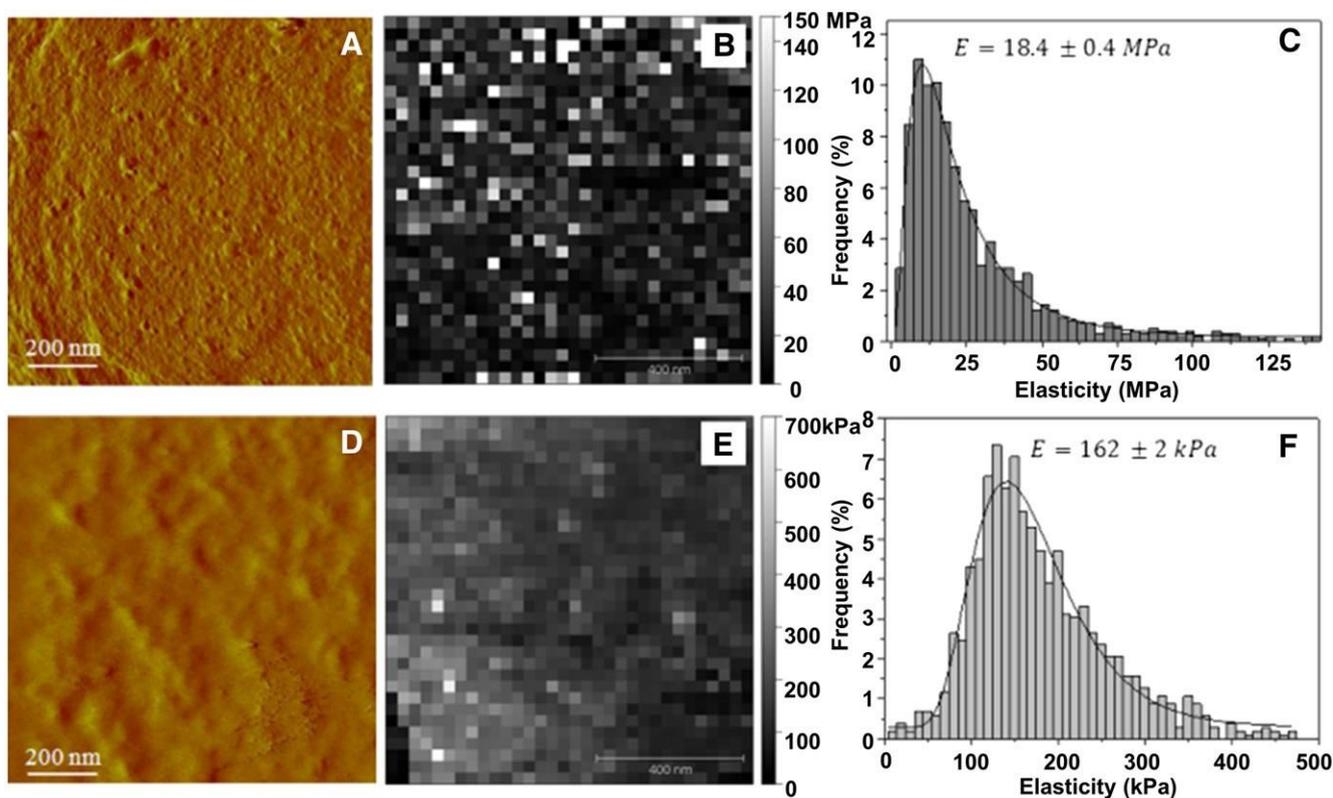


Figure 6. Mapping of cell surface elasticity. (A and D) High-resolution deflection images from (A) untreated and (D) treated *C. albicans*. (B and E) Elasticity maps. (C and F) Distribution of elasticity values corresponding to the elasticity maps.

and surfactants with innate antifungal activity as peceol (19.4% w/w) as oily phase, Labrasol[®]:propilen glycol (1:3/14.9% w/w) as surfactant mixture and water as aqueous phase (65.7% w/w) in the first case, and Capmul[®] PG8 (15% w/w) as oily phase, Labrasol[®]:polyethylene glycol-400 (1:2/24% w/w) as surfactant mixture and water (61% w/w) as aqueous phase in the second case. In our case the oily phase was castor oil (5% w/w), Labrasol[®]:Plurol[®] oleique mixture (5:1, 55% w/w) as surfactant

mixture and Transcutol[®] P (40% w/w) as aqueous phase, obtaining a droplet size of 128.40 ± 12.71 nm with polydispersity index of 0.27. The other two reported AmB nanoemulsion systems showed globular sizes of 74.8 ± 4.1 and 49.5 ± 1.5 nm, and similar polydispersity indexes of 0.21 and 0.3, respectively.^{14,15} These two systems provided sustained release (zero-order kinetics) without burst effect. Similarly, our nanoemulsion showed a sustained release over time fitting to

Korsmeyer-Peppas model without burst effect. Regarding the MIC of those AmB nanoemulsions,^{14,15} they revealed values of 0.02 µg/mL and 0.01 mg/mL against *C. albicans*, and 0.01 µg/mL and 0.04 mg/mL against *A. niger* and *A. fumigatus*, respectively. However, the methods utilized for MIC calculation in those reported AmB nanoemulsions,^{14,15} could be not comparable to the method followed in our research. In fact, the *Aspergillus spp.* utilized in one of them (*A. fumigatus*)¹⁴ was not the same. On the other hand, permeation studies showed AmB permeation fluxes through rat skin, concretely 21.62 ± 1.6 and 22.88 ± 1.7 mg/cm²/h, respectively, which might lead to systemic concentrations of AmB and thus to the undesired side effect. With Our AmB nanoemulsion, no theoretical systemic absorption was expected to occur by using human skin.

The main new findings or innovations of our nanoemulsion were that no theoretical systemic absorption was expected to occur and thus could assure a safe local action. The antifungal efficiency of our AmB nanoemulsion against *A. niger* has even been improved compared with other authors^{39,40} with the additional advantages provided by the vehiculization in an emulsified system with Transcutol P®, since it could produce a depot effect increasing the amount of antifungal drug in skin layers.

Furthermore, the determination of flow properties in our work provides additional information about stability, sensorial characteristics and spreadness properties of the formulation which helps the effectiveness of the treatment. Unlike other researchers, we also report an *in vivo* tolerance study in humans, from which it could be demonstrated that the application of the AmB nanoemulsion did not alter the biophysical properties of skin. Finally, we were able to clearly report significant insight and information about the exhibited cell morphology changes by the action of the reported nanoemulsion by using an appropriate technique, the AFM. This study could be of important relevance for other authors.

In conclusion, our data report a nanoemulsion system for AmB skin delivery. According to our results this AmB nanosystem could provide an antifungal effect more than enough to ensure its efficacy against *Candida* and *Aspergillus* avoiding systemic concentration of AmB, and thus related side effects, and with optimal skin tolerance. The obtained results showed that AmB nanoemulsion might offer a viable therapeutic alternative which can be expected to gain considerable attention for the clinical treatment of local skin candidiasis and aspergillosis.

Topical administration of antifungal agents to treat these skin fungal infections caused by *Candida spp.* and *Aspergillus spp.* is an efficient method to target the drugs to the different layers of skin. Ours results encourage further investigation for exploiting the potential of nanoemulsions in cutaneous infections. The present approach nurtures further study for the future application of this antifungal nanosystem to clinical status, and concretely *in vivo* efficacy investigation as a first stage.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2017.06.021>.

References

- Gray KC, Palacios DS, Dailey I, Endo MM, Uno BE, Wilcock BC, et al. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci U SA* 2012;109:2234-9. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1117280109>.
- Ruiz HK, Serrano DR, Dea-Ayuela MA, Bilbao-Ramos PE, Bolás-Fernández F, Torrado JJ, et al. New amphotericin B-gamma cyclodextrin formulation for topical use with synergistic activity against diverse fungal species and Leishmania spp. *Int J Pharm* 2014;473(1-2):148-57.
- Kleinberg M. What is the current and future status of conventional Amphotericin B? *Int J Antimicrob Agents* 2006;27(Suppl 1):12-6.
- Salerno C, Chiappetta DA, Arechavala A, Gorzalczy S, Scioscia SL, Bregni C. Lipid-based microtubes for topical delivery of amphotericin B. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013;107:160-6.
- Yamaguchi K, Mitsui T, Aso Y, Sugibayashi K. Structure-permeability relationship analysis of the permeation barrier properties of the stratum corneum and viable epidermis/dermis of rat skin. *J Pharm Sci* 2008;97:4391-403.
- Martin MJ, Calpena AC, Fernández F, Mallandrich M, Gálvez P, Clares B. Development of alginate microspheres as nystatin carriers for oral mucosa drug delivery. *Carbohydr Polym* 2015;117:140-9.
- Perez AP, Altube MJ, Schillreff P, Apezteguia G, Celes FS, Zacchino S, et al. Topical amphotericin B in ultradefensible liposomes: formulation, skin penetration study, antifungal and antileishmanial activity in vitro. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016;139:190-8.
- Sanchez DA, Schairer D, Tuckman-Vernon C, Chouake J, Kutner A, Makdisi J, et al. Amphotericin B releasing nanoparticle topical treatment of *Candida spp.* in the setting of a burn wound. *Nanomedicine* 2014;10(1):269-77.
- Kaur L, Jain SK, Manhas RK, Sharma D. Nanoethosomal formulation for skin targeting of amphotericin B: an in vitro and in vivo assessment. *J Liposome Res* 2015;25(4):294-307.
- Morand K, Bartoletti AC, Bochot A, Barratt G, Brandely ML, Chast F. Liposomal amphotericin B eye drops to treat fungal keratitis: physicochemical and formulation stability. *Int J Pharm* 2007;344:150-3.
- Fernández-Campos F, Clares Naveros B, López Serrano O, Alonso Merino C, Calpena Campmany AC. Evaluation of novel nystatin nanoemulsion for skin candidosis infections. *Mycoses* 2013;56(1):70-81.
- Santos CM, de Oliveira RB, Arantes VT, Caldeira LR, de Oliveira MC, Egito EST, et al. Amphotericin B-loaded nanocarriers for topical treatment of cutaneous leishmaniasis: development, characterization, and in vitro skin permeation studies. *J Biomed Nanotechnol* 2012;8:322-9.
- Hussain A, Samad A, Singh SK, Ahsan MN, Faruk A, Ahmed FJ. Enhanced stability and permeation potential of nanoemulsion containing sefsol-218 oil for topical delivery of amphotericin B. *Drug Dev Ind Pharm* 2015;41(5):780-90.
- Hussain A, Singh S, Webster TJ, Ahmad FJ. New perspectives in the topical delivery of optimized amphotericin B loaded nanoemulsions using excipients with innate anti-fungal activities: a mechanistic and histopathological investigation. *Nanomedicine* 2017;13(3):1117-26.
- Hussain A, Singh VK, Singh OP, Shafaat K, Kumar S, Ahmad FJ. Formulation and optimization of nanoemulsion using antifungal lipid and surfactant for accentuated topical delivery of amphotericin B. *Drug Deliv* 2016;23(8):3101-10.
- International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use. *Stability Testing of new Drug Substances and Products, Q1A (R2)*. Geneva: ICH; 2003.
- Marín-Quintero D, Fernández-Campos F, Calpena-Campmany AC, Montes-López MJ, Clares-Naveros B, Del Pozo-Carrascosa A. Formulation design and optimization for the improvement of nystatin-loaded lipid intravenous emulsion. *J Pharm Sci* 2013;102:4015-23.

18. Subcommittee on antifungal susceptibility testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) EUCAST definitive document EDef 71: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:398–405.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous Fungi: Approved Standard—Second Edition. CLSI Document M38 A2*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
20. Council regulation (EC) no 440/2008 Test guideline for skin absorption: in vitro method (B45). *J Eur Union* 2008;L142:438–43.
21. Domínguez-Villegas V, Clares-Naveros B, García-López ML, Calpena-Campmany AC, Bustos-Zagal P, Garduño-Ramírez ML. Development and characterization of two nano-structured systems for topical application of flavanones isolated from *Eysenhardtia Platycarpa*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014;116:183–92.
22. World Medical Association. World medical association declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 2013;310(20):2191–4.
23. du Plessis J, Stefaniak A, Eloff F, John S, Agner T, Chou TC, et al. International guidelines for the in vivo assessment of skin properties in non-clinical settings: part 2. Transepidermal water loss and skin hydration. *Skin Res Technol* 2013;19(3):265–78.
24. Suárez-Germà C, Doménech O, Montero MT, Hernández-Borrell J. Effect of lactose permease presence on the structure and nanomechanics of two-component supported lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 2014;1838(3):842–52.
25. Kreilgaard M, Pedersen EJ, Jaroszewski JW. NMR characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems. *J Control Release* 2000;69:421–33.
26. Alvarado HL, Abrego G, Souto EB, Garduño-Ramírez ML, Clares B, García ML, et al. Nanoemulsions for dermal controlled release of oleanolic and ursolic acids: in vitro, ex vivo and in vivo characterization. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015;130:40–7.
27. Fernandez Campos F, Calpena Campmany AC, Rodriguez Delgado G, Lopez Serrano O, Clares Naveros B. Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: ultra-structural effects and release studies. *J Pharm Sci* 2012;101:3739–52.
28. Djordjevic L, Primorac M, Stupar M, Krajcinski D. Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. *Int J Pharm* 2004;27:11–9.
29. Godwin DA, Kim NH, Felton LA. Influence of transcutol CG on the skin accumulation and transdermal permeation of ultraviolet absorbers. *Eur J Pharm Biopharm* 2002;23(1):114–23.
30. Panchagnula R, Ritschel WA. Development and evaluation of an intracutaneous depot formulation of corticosteroids using Transcutol as a cosolvent: in-vitro, ex-vivo and in-vivo rat studies. *J Pharm Pharmacol* 1991;43(9):609–14.
31. Brugués AP, Naveros BC, Calpena Campmany AC, Pastor PH, Saladrigas RF, Lizandra CR. Developing cutaneous applications of paromomycin entrapped in stimuli-sensitive block copolymer nanogel dispersions. *Nanomedicine (Lond)* 2015;10(2):227–40.
32. Sierra AF, Ramirez ML, Campmany AC, Martinez AR, Naveros BC. In vivo and in vitro evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation. *J Dermatol Sci* 2013;69(3):202–14.
33. Ciurlizza C, Fernández F, Calpena AC, Lázaro R, Parra A, Clares B. Semisolid formulations containing cetirizine: human skin permeation and topical antihistaminic evaluation in a rabbit model. *Arch Dermatol Res* 2014;306(8):711–7.
34. Martin-Villena MJ, Fernández-Campos F, Calpena-Campmany AC, Bozal-de Febrer N, Ruiz-Martínez MA, Clares-Naveros B. Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: development and characterization. *Carbohydr Polym* 2013;94(1):1–11.
35. Peppas NA. Mathematical Modeling of Diffusion Processes in Drug Delivery Polymeric Systems. In: Smolen VF, Ball LA, editors. *Drug Product Design and Performance. Controlled Drug Bioavailability*. New York: John Wiley; 1984. p. 203–37.
36. Lao LL, Peppas NA, Boey FY, Venkatraman SS. Modeling of drug release from bulk-degrading polymers. *Int J Pharm* 2011;418:28–41.
37. Martínez J, Albrecht C. Susceptibility to fluconazole and amphotericin B in clinical *Candida* isolates. *Rev Iberoam Micol* 1998;15:298–9.
38. European Committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). *Antifungal Agents, Breakpoint Tables for Interpretation of MICs, Version 8.0*. Copenhagen: EUCAST-AFST; 2015. p. 1–4.
39. Mosquera J, Warm PA, Morrissey J, Moore CB, Gil-Lamagnere C, Denning DW. Susceptibility testing of *Aspergillus flavus*: inoculum dependence with itraconazole and lack of correlation between susceptibility to amphotericin B in vitro and outcome in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1456–62.
40. Charvalos E, Tzatzarakis MN, Van Bambeke F, Tulkens PM, Tsatsakis AM, Tzanakakis GN, et al. Water-soluble amphotericin B-polyvinylpyrrolidone complexes with maintained antifungal activity against *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. and reduced haemolytic and cytotoxic effects. *J Antimicrob Chemother* 2006;57(2):236–44.
41. Rins M, Diez I, Calpena AC, Obach R. Skin density in the hairless rat. Evidence of regional differences. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1991;3:456–7.
42. Mohammed D, Hirata K, Hadgraft J, Lane ME. Influence of skin penetration enhancers on skin barrier function and skin protease activity. *Eur J Pharm Sci* 2014;51:118–22.
43. Naik S, Chougule M, Padhi BK, Misra A. Development of novel lyophilized mixed micelle amphotericin B formulation for treatment of systemic fungal infection. *Curr Drug Deliv* 2005;2:177–84.
44. Bose PP, Kumar P, Dwivedi MK. Hemoglobin guided nanocarrier for specific delivery of amphotericin B to *Leishmania* infected macrophage. *Acta Trop* 2016;158:148–59.
45. Kruchi K. How is the circadian rhythm of core body temperature regulated? *Clin Auton Res* 2002;12(3):147–9.
46. Hirata K, Mohammed D, Hadgraft J, Lane ME. Influence of lidocaine hydrochloride and penetration enhancers on the barrier function of human skin. *Int J Pharm* 2014;477(1–2):416–20.
47. Braga PC, Ricci D. Imaging Bacterial Shape, Surface, and Appendages before and after Treatment with Antibiotics. In: Braga PC, Ricci D, editors. *Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications*. Totowa: Humana Press Inc; 2004. p. 179–88.

Participación en congresos

1. Skin forum Congress, 13 annual meeting, London, 2013. ***In vitro* permeation study a nanostructured emulsion of Amphotericin B.**
2. Skin forum 14, annual meeting, Prague, Czech Republic, 2014. **Study of a new formulation for dermal use of a macrolide antibiotic with antifungal action.**
3. XLVII congreso nacional de ciencias farmacéuticas, Puerto Vallarta, México, 2014. **Cinética de liberación de una emulsión nanoestructurada de Anfotericina B**
4. XII congreso de la sociedad española de farmacia industrial y galénica, Barcelona, España, 2015. **Desarrollo y caracterización de la cinética de liberación de una emulsión nanoestructurada de Anfotericina B.**
5. XIX Congreso de la Sociedad Española de Parasitología, País Vasco, España, 2015. **Actividad leishmanicida de una emulsión nanoestructurada de Anfotericina B.**
6. 4 simposio de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, UNAH, Tegucigalpa, Honduras, 2016. **Elaboración de formulaciones nanoestructuradas de AmB para el tratamiento de micosis superficiales.**
7. Congreso PBP, marzo 2018, Granada, España ***Ex vivo* vaginal permeation study and antifungal activity of nanoemulsion loaded Amphotericin B.**
8. Congreso del instituto de Nanociencia y Nanotecnología IN2UB, Barcelona, España, 2018 **Activity Leishmanicide of a nanostructured gel of Amphotericin B (AMB).**
9. XVI Congress de Skin Forum, Tallinn, Estonia, 2018. **Study of a new nanostructured formulation for dermal use of Amphotericin B with antifungal and antileishmanial action.**