



# Emulsión lipídica inyectable de nistatina como alternativa a los tratamientos clásicos de infecciones fúngicas invasivas

Deiry Margot Marín Quintero

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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.

# Emulsi3n lipídica inyectable de Nistatina

como alternativa a los tratamientos  
clásicos de infecciones fúngicas invasivas

Deiry Margot Marín Quintero  
*Noviembre 2013*



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE FARMACIA  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN  
INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y CONTROL DE  
MEDICAMENTOS

**EMULSIÓN LIPÍDICA INYECTABLE DE  
NISTATINA COMO ALTERNATIVA A LOS  
TRATAMIENTOS CLÁSICOS DE INFECCIONES  
FÚNGICAS INVASIVAS.**

DEIRY MARGOT MARÍN QUINTERO

2013



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE FARMACIA  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN,  
DESARROLLO Y CONTROL DE MEDICAMENTOS

**EMULSIÓN LIPÍDICA INYECTABLE DE NISTATINA COMO  
ALTERNATIVA A LOS TRATAMIENTOS CLÁSICOS DE  
INFECCIONES FÚNGICAS INVASIVAS.**

Memoria presentada por Deiry Margot Marín Quintero para  
optar al título de doctor por la Universidad de Barcelona

Directores:

Ana Cristina Calpena Campmany

Alfonso del Pozo Carrascosa

DEIRY MARGOT MARÍN QUINTERO  
2013

A Díos,  
Quien ha sido mi luz en este camino,  
A mis padres Rafael y Faride mi gran inspiración,  
A Maider quien es mi hermana y mi ángel,  
A Martín mi esposo  
Con el que he compartido mis alegrías y tristezas.

# Agradecimientos

---

Después de concluir una empresa de tal envergadura y haciendo una mirada retrospectiva, me vienen a la memoria muchas personas que han contribuido al éxito y feliz término de este trabajo. Trabajo que ha representado mucho tiempo y sacrificios a nivel personal y profesional y que era el motivo principal por el que decidí dejar mi tierra y mi familia para emigrar a España.

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Lyda Halbaut, y a la comisión que me aceptó como alumna cuando me presente al doctorado, allá a principios del año 2002, por darme la oportunidad de venir a estudiar a la Universidad de Barcelona y de vivir en una ciudad tan maravillosa como Barcelona.

Seguidamente, quiero agradecer al Dr. Alfonso del Pozo Carrascosa y a la Dra. Ana Cristina Calpena Company, por aceptar el reto de dirigir esta tesis, la confianza, los consejos, el tiempo y esfuerzo dedicados en cada uno de los pasos que hemos dado hasta su culminación.

Al Dr. Francisco Fernández Campos, por ayudarme a organizar las ideas, el trabajo instrumental y guiarme en los entresijos de los estudios farmacocinéticos, fundamentales para completar esta tesis. Además de su amistad, su buena disposición y sus consejos prácticos y objetivos.

A la Dra Beatriz Clares Naveros, por su experiencia, su constancia y tenacidad a la hora de lidiar con los editores de revistas, lo que nos ha permitido publicar este trabajo.

A la Dra. Nuria Bozal de Febrer, por aportar sus conocimientos y su experiencia adquirida en el campo de la microbiología, siendo una guía eficaz en el estudio de los hongos y levaduras.

Al Dr. Albert Mannich, del CSIC, por sus consejos y enseñanzas en el campo de la estadística y la planificación de experiencias.

Al Dr. Joan Estelrich, por iniciarme en el estudio de espectrometría de correlación fotónica y permitirnos utilizar el único aparato de PCS, que existía en la facultad, en aquel momento.

A Rosa Aparicio, quien siempre nos ayudó en las gestiones de proveedores de las materias primas empleadas en esta investigación, siendo una persona eficiente y colaboradora.

A la licenciada Alice Bertorello, por su ayuda y cooperación en la realización de los cientos de experimentos que permitieron ensayar diferentes co-emulgentes para antifúngicos, en su paso como becaria de la unidad de tecnología farmacéutica. Además de brindarme su amistad, compartir experiencias de vida, y darme ideas y ánimo en los momentos difíciles.

A Ana María Sierra Villar, Mauren Arias Acosta y Paola Delgado Hernández, quienes comenzaron esta aventura conmigo y aunque la vida nos ha llevado por diferentes caminos, siempre agradeceré su cariño, sus consejos y apoyo en los momentos de flaqueza y su gran ánimo y alegría para afrontar los retos de la vida.

A Claudio Díaz, por enseñarme a ser tolerante y a ver la vida desde diferentes ópticas, gracias por ser mi soporte y mi confidente a pesar del tiempo y la distancia.

Al resto de mis amigos, que me han acompañado en este camino, q es la vida... A Bernat, Paz y Zenon (QEPD) quienes fueron mi familia adoptiva en mis primeros años en esta ciudad. A Claudia M, Fernando D, Mauri L, Ivanna, Nico P, Davide P, Adrian S y Alessia B, con los que he compartido grandes experiencias y quienes significan alegría, confianza y cariño.

Por último, quiero agradecer a mi familia, quienes han salvado la barrera del tiempo y los miles de kilómetros que nos separan, para seguir siendo un pilar fundamental en mi vida. Mis padres Rafael y Faride, mi gran ejemplo de vida, siempre han creído que yo puedo llegar tan lejos como me proponga y eso ha sido mi gran fuerza. A Mis hermanos Rafa y Gelmy quienes con su cariño, consejos y bromas me hacen la vida más feliz. A Maider, mi alma gemela, quien nació conmigo, la persona responsable de que nunca me haya sentido sola y con la que estoy unida en espíritu y amor. A Mile, mi hermanita pequeña, la alegría de la huerta! Su energía y amor siempre me han inspirado. A Martin, por el tiempo restado de su compañía en el desarrollo de esta memoria, quien es mi compañero de viaje, gracias por tu amor, tus cuidados y por ser mi gran apoyo en los momentos difíciles y mí fuente de alegría e inspiración.

Y a todos los que de una u otra forma, han contribuido al feliz término de esta monografía, ¡Muchas gracias!

# Resumen

---

La nistatina es un polieno macrólido, antifúngico de amplio espectro, restringido en principio al uso tópico, debido a su toxicidad tras administración sistémica. Los objetivos de este trabajo son el diseño, desarrollo y optimización de una emulsión parenteral de nistatina apta para su administración por vía intravenosa.

Se diseñó y optimizó un sistema de circuito cerrado que permitió la elaboración de las emulsiones lipídicas inyectables (ELI) por sonicación. La formulación resultante se compara con un producto comercial disponible en el mercado (Intralipid® 20%). Las condiciones de fabricación se optimizaron mediante un diseño factorial. Las formulaciones se evaluaron en términos de parámetros físico-químicos, estabilidad, perfil de liberación y actividad antimicrobiana. Los valores de tamaño medio de gota oscilaron entre 192,5 y 143,0 nm, el índice de polidispersidad entre 0,170 y 0,135, el potencial zeta entre -46 y -44 mV, el pH entre 7,11 y 7,53 y el volumen (LD<sub>99</sub>) entre 580 y 670 nm.

La formulación de nistatina seleccionada (NYS- ELI 4), integrada por aceite de soja (30%), lecitina de soja (2%), Solutol® HS 15 (4%) y glicerol (2,25%) es físicamente estable durante al menos 60 días. Los estudios in vitro de liberación de fármaco de esta formulación sugieren un perfil de liberación sostenida, presentando además una actividad antimicrobiana más alta que el fármaco libre, por lo que se presenta como un potencial sistema de administración de fármacos para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas.

# Abstract

---

Nystatin is a polyene macrolide with broad antifungal spectrum restricted to topical use owing to its toxicity upon systemic administration. The aims of this work were the design, development and optimization of Nystatin loaded lipid emulsion for intravenous administration. A closed circuit system was designed to apply ultrasound during the elaboration of the lipid intravenous emulsions. Additionally a comparison with the commercially available Intralipid® 20% was also performed. Manufacturing conditions were optimized by a factorial design. Formulations were evaluated in term of physicochemical parameters, stability, release profile and antimicrobial activity. The average droplet size, polydispersity index, zeta-potential, pH and volume distribution values ranged between 192.5 and 143.0 nm, 0.170 and 0.135, -46 and -44 mV, 7.11 and 7.53, 580 and 670 nm, respectively. The selected nystatin loaded lipid intravenous emulsion (NYS-LIE54) consisted of soybean oil (30%), soybean lecithin (2%), Solutol® HS 15 (4%) and glycerol (2,25%) was stable for at least of 60 days. In vitro drug release studies of this formulation suggested a sustained release profile. Equally, NYS-LIE54 showed the best antimicrobial activity being higher than the free drug. Thus it could be a promising drug delivery system to treat systemic fungal infections.

# ÍNDICE

---

## PARTE TEORICA

|                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| INTRODUCCIÓN .....                                                                       | 1         |
| 1. EMULSIONES LIPÍDICAS INYECTABLES .....                                                | 4         |
| <b>1.1. TIPOS DE EMULSIONES LIPÍDICAS INYECTABLES.....</b>                               | <b>4</b>  |
| 1.1.1. PRIMERA GENERACIÓN .....                                                          | 4         |
| 1.1.1.1. <i>Emulsiones TCL, basadas en aceite de soja o de cártamo.....</i>              | <i>4</i>  |
| 1.1.2. SEGUNDA GENERACIÓN .....                                                          | 5         |
| 1.1.2.1. <i>Emulsiones basadas en mezclas físicas de TCM y TCL. (Lipofundina®) .....</i> | <i>5</i>  |
| 1.1.2.2. <i>Emulsiones TCM/TCL lípidos estructurados (Structolipid®).....</i>            | <i>6</i>  |
| 1.1.2.3. <i>Emulsiones lipídicas basadas en aceite de oliva y soja (Clinoleic®).....</i> | <i>6</i>  |
| 1.1.3. TERCERA GENERACIÓN .....                                                          | 7         |
| 1.1.3.1. <i>Emulsiones lipídicas basadas en TCL, TCM y aceite de pescado .....</i>       | <i>7</i>  |
| <b>1.2. COMPONENTES DE LAS EMULSIONES LIPÍDICAS INYECTABLES .....</b>                    | <b>7</b>  |
| 1.2.1. FASE OLEOSA:.....                                                                 | 7         |
| 1.2.2. FASE ACUOSA .....                                                                 | 9         |
| 1.2.3. EMULGENTES .....                                                                  | 9         |
| 1.2.3.1 <i>De Origen Natural. ....</i>                                                   | <i>10</i> |
| 1.2.3.2. <i>De Origen Sintético.....</i>                                                 | <i>10</i> |
| 1.2.4. COADYUVANTES.....                                                                 | 12        |
| <b>1.3. TÉCNICAS PARA ELABORACIÓN DE EMULSIONES LIPÍDICAS INYECTABLES .....</b>          | <b>13</b> |
| 1.3.1. MÉTODOS DE ALTA ENERGÍA .....                                                     | 13        |
| 1.3.1.1. <i>Homogeneizador de Válvula. ....</i>                                          | <i>13</i> |
| 1.3.1.2. <i>Homogeneizador de alta presión. ....</i>                                     | <i>14</i> |
| 1.3.1.3. <i>Microfluidificador. ....</i>                                                 | <i>14</i> |
| 1.3.1.4. <i>Ultrasonidos. ....</i>                                                       | <i>15</i> |
| 1.3.2. MÉTODOS DE BAJA ENERGÍA .....                                                     | 16        |
| 1.3.2.3. <i>Emulsificación por inversión de fases.....</i>                               | <i>16</i> |
| 1.3.2.1. <i>Inversión Transicional.....</i>                                              | <i>17</i> |
| 1.3.2.2. <i>Inversión Catastrófica .....</i>                                             | <i>17</i> |
| 2. NISTATINA .....                                                                       | 19        |

|                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2.1. ANTECEDENTES Y PANORAMA ACTUAL .....</b>                    | <b>20</b> |
| <b>2.2. MECANISMO DE ACCIÓN .....</b>                               | <b>21</b> |
| <b>2.3. ASPECTOS FARMACOLÓGICOS Y CLÍNICOS.....</b>                 | <b>21</b> |
| 2.3.1. FARMACOCINÉTICA.....                                         | 21        |
| 2.3.1.1. <i>Datos preclínicos de Nistatina intravenosa.....</i>     | 21        |
| 2.3.2 INDICACIONES.....                                             | 22        |
| 2.3.3 POSOLOGÍA Y FORMA DE ADMINISTRACIÓN.....                      | 23        |
| 2.3.3.1. <i>Administración en niños.....</i>                        | 24        |
| 2.3.4. REACCIONES ADVERSAS.....                                     | 25        |
| 2.3.5. PRECAUCIONES.....                                            | 25        |
| 2.3.6. CONTRAINDICACIONES.....                                      | 25        |
| 2.3.7. INTERACCIONES.....                                           | 25        |
| 2.3.8. EMBARAZO Y LACTANCIA.....                                    | 26        |
| 2.3.9 SOBREDOSIS.....                                               | 26        |
| 2.3.10. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO.....                          | 27        |
| <b>2.4. FORMULACIONES DE NISTATINA .....</b>                        | <b>27</b> |
| <b>3. INFECCIONES FÚNGICAS INVASIVAS (IFI) .....</b>                | <b>28</b> |
| <b>3.1. CANDIDIASIS INVASIVA .....</b>                              | <b>28</b> |
| <b>3.2. ASPERGILOSIS INVASIVA.....</b>                              | <b>29</b> |
| <br><b>PARTE EXPERIMENTAL</b>                                       |           |
| <b>4. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....</b>                         | <b>32</b> |
| <b>5. MATERIAS PRIMAS .....</b>                                     | <b>35</b> |
| <b>5.1. EXCIPIENTE: EMULSION LIPIDICA INYECTABLE (ELI).....</b>     | <b>35</b> |
| 5.1.1. FASE OLEOSA.....                                             | 35        |
| 5.1.1.1. <i>Aceite de Soja.....</i>                                 | 35        |
| 5.1.1.2. <i>Agente Emulgente.....</i>                               | 36        |
| 5.1.1.2.1. <i>Lecitinas.....</i>                                    | 36        |
| 5.1.2. FASE ACUOSA.....                                             | 39        |
| 5.1.2.1. <i>Agua para inyección.....</i>                            | 39        |
| 5.1.2.2. <i>Isotonizante.....</i>                                   | 39        |
| <b>5.2. MATERIA PRIMA PARA INCORPORAR LA NISTATINA EN ELI .....</b> | <b>39</b> |

|                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2.1. CO- EMULGENTE .....                                                   | 39        |
| 5.2.1.1. SOLUTOL Hs15.....                                                   | 39        |
| 5.2.2. PRINCIPIO ACTIVO: NISTATINA .....                                     | 41        |
| <b>6. MÉTODOS .....</b>                                                      | <b>44</b> |
| <b>6.1. METODOS PREPARATIVOS.....</b>                                        | <b>44</b> |
| 6.1.1. DISEÑO DEL SISTEMA DE TRABAJO .....                                   | 44        |
| 6.1.1.1. <i>Utillaje</i> .....                                               | 44        |
| 5.1.1.1.1. Equipo de Ultrasonidos. ....                                      | 44        |
| 6.1.1.1.2. Bomba Peristáltica. ....                                          | 45        |
| 6.1.1.1.3. Placa de Calefacción y Agitación. ....                            | 45        |
| 6.1.1.1.4. Autoclave Eléctrico de Vapor: .....                               | 45        |
| 6.1.1.1.5. Sistema de purificación de agua: .....                            | 45        |
| 6.1.1.1.6. Reactor .....                                                     | 45        |
| 6.1.1.1.7. Otros Materiales.....                                             | 45        |
| 6.1.1.2. <i>Formulación del excipiente</i> .....                             | 46        |
| 6.1.1.3. <i>Diseño del sistema de trabajo</i> .....                          | 46        |
| 6.1.1.4. <i>Ensayos preliminares de las condiciones de fabricación</i> ..... | 47        |
| 5.1.1.4.1. Análisis de la temperatura de mezclado de las fases.....          | 47        |
| 6.1.1.4.2. Condiciones preliminares de sonicación .....                      | 48        |
| 6.1.1.4.3. Enfriamiento.....                                                 | 48        |
| 6.1.1.4.4. Aplicación de ultrasonidos durante el enfriamiento.....           | 48        |
| 6.1.1.4.5. Análisis del tiempo de sonicación .....                           | 49        |
| 6.1.2. OPTIMIZACION DEL EXCIPIENTE.....                                      | 49        |
| 6.1.2.1. <i>Utillaje</i> .....                                               | 49        |
| 6.1.2.2. <i>Método De Preparación De Emulsiones</i> .....                    | 49        |
| 6.1.2.3. <i>Análisis de las condiciones de fabricación</i> .....             | 50        |
| 6.1.2.3.1. Potencia de sonicación.....                                       | 50        |
| 6.1.2.3.2. Tiempo de sonicación.....                                         | 51        |
| 6.1.2.3.3. Efecto de la neutralización .....                                 | 51        |
| 6.1.2.3.4. Esterilización por autoclavado .....                              | 51        |
| 6.1.2.3.5. Estabilidad física en función del tiempo .....                    | 51        |
| Muestras .....                                                               | 52        |
| 6.1.3. ESTUDIO DE PREFORMULACIÓN .....                                       | 52        |

|                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.1.3.1. Incorporación de NYS durante el proceso de formación del vehículo emulsión ..... | 52        |
| 6.1.3.2. Incorporación en frío de NYS sobre el vehículo previamente preparado .....       | 53        |
| 6.1.4. ELABORACION DE FORMULACIONES NYS-ELI .....                                         | 53        |
| 6.1.4.1. Formulación.....                                                                 | 53        |
| 6.1.4.1.1. Concentración de principio activo .....                                        | 53        |
| 6.1.4.1.2. Concentración de co-emulgente.....                                             | 53        |
| 6.1.4.1.3. Concentración de fase oleosa .....                                             | 54        |
| 6.1.4.2. Proceso de elaboración de las formulaciones NYS-ELI .....                        | 54        |
| 6.1.4.2.1. Utillaje .....                                                                 | 54        |
| 6.1.4.2.2. Protocolo de trabajo .....                                                     | 54        |
| <b>6.2. MÉTODOS ANALÍTICOS .....</b>                                                      | <b>56</b> |
| 6.2.1. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE ELI.....                                          | 56        |
| 6.2.1.1. Muestras.....                                                                    | 56        |
| 6.2.1.2. Examen Visual .....                                                              | 56        |
| 6.2.1.3. Medida del pH .....                                                              | 56        |
| 6.2.1.3.1. Utillaje .....                                                                 | 56        |
| 6.2.1.3.2. Método.....                                                                    | 57        |
| 6.2.1.4. Análisis de la distribución del tamaño de partícula .....                        | 57        |
| 6.2.1.4.1. Utillaje .....                                                                 | 57        |
| 6.2.1.4.2. Métodos de análisis de tamaño de partícula .....                               | 58        |
| 6.2.1.4.3.1. Espectrometría de Correlación Fotónica (PCS) .....                           | 58        |
| 6.2.1.4.3.2. Difracción Laser (LDA) .....                                                 | 59        |
| 6.2.1.5. Determinación del potencial Z (PZ) .....                                         | 62        |
| 6.2.1.5.1. Utillaje .....                                                                 | 63        |
| 6.2.1.5.2. Muestras .....                                                                 | 63        |
| 6.2.1.5.3. Método.....                                                                    | 63        |
| 6.2.2. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LAS FORMULACIONES NYS-ELI .....                   | 63        |
| 6.2.2.1. Ensayo de estabilidad acelerada NYS-ELI.....                                     | 64        |
| 6.2.2.1.1. Utillaje .....                                                                 | 64        |
| 6.2.2.1.2. Muestras .....                                                                 | 65        |
| 6.2.2.1.3. Método.....                                                                    | 65        |
| 6.2.2.2. Método para cuantificar Nistatina en ELI: análisis por HPLC.....                 | 65        |
| 6.2.2.2.1. Utillaje .....                                                                 | 67        |

|                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.2.2.2.2. Muestras .....                                                                | 67        |
| 6.2.2.2.3. Método.....                                                                   | 67        |
| 6.2.2.3. <i>Análisis por Microscopia Electrónica de Barrido</i> .....                    | 68        |
| 6.2.2.3.1. Preparación de la muestra .....                                               | 69        |
| 6.2.2.3.2. Método.....                                                                   | 69        |
| <b>6.3. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....</b>                                                    | <b>70</b> |
| 6.3.1. MÉTODOS ESTADÍSTICOS PARA OPTIMIZAR EL EXCIPIENTE (ELI).....                      | 70        |
| 6.3.1.1. <i>Planteo del diseño experimental</i> .....                                    | 70        |
| 6.3.1.2. <i>Comparación entre ELI e Intralipid®</i> .....                                | 71        |
| 6.3.2. MÉTODOS ESTADÍSTICOS EMPLEADOS PARA EL ESTUDIO DE LAS FORMULACIONES NYS-ELI ..... | 71        |
| 6.3.2.1. <i>Planteo del diseño experimental</i> .....                                    | 72        |
| 6.3.3. MÉTODO ESTADÍSTICO EMPLEADO EN EL ESTUDIO DE LIBERACIÓN. ....                     | 72        |
| <b>6.4 CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE NYS-ELI .....</b>                                       | <b>73</b> |
| 6.4.1. UTILLAJE .....                                                                    | 73        |
| 6.4.2. DESCRIPCIÓN DE LA CELDA DE DIFUSIÓN .....                                         | 73        |
| 6.4.3. MEMBRANA DE DIFUSIÓN .....                                                        | 74        |
| 6.4.4. PROTOCOLO DE TRABAJO .....                                                        | 75        |
| 6.4.5. CINÉTICA DE LIBERACIÓN.....                                                       | 76        |
| 6.4.6. TRATAMIENTO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES .....                                     | 76        |
| 6.4.7. ELECCIÓN DEL MODELO DE LIBERACIÓN .....                                           | 77        |
| <b>6.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO .....</b>                                                | <b>78</b> |
| 6.5.1. TEST DE SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO PARA <i>CANDIDA ALBICANS</i> ATCC 10231 .....    | 78        |
| 6.5.1.1. <i>UTILLAJE</i> .....                                                           | 78        |
| 6.5.1.2. <i>MEDIO DE CULTIVO</i> .....                                                   | 79        |
| 6.5.1.3. <i>Muestras</i> .....                                                           | 79        |
| 6.5.1.3.1. Nistatina Patrón .....                                                        | 79        |
| 6.5.1.3.2. Muestras problema: Nistatina-ELI .....                                        | 80        |
| 6.5.1.4. <i>Inóculo</i> .....                                                            | 80        |
| 6.5.1.5. <i>Distribución de las muestras</i> .....                                       | 80        |
| 6.5.1.5.1. Distribución de las diluciones en las placas de Microtiter.....               | 81        |
| 6.5.1.6. <i>Lectura</i> .....                                                            | 82        |
| 6.5.2. TEST DE SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO PARA <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> ATCC 9197..... | 82        |

|                                                                                                                                         |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.5.2.1. <i>Utillaje</i> .....                                                                                                          | 82        |
| 6.5.2.2. <i>MEDIO DE CULTIVO</i> .....                                                                                                  | 82        |
| 6.5.2.3. <i>Muestras</i> .....                                                                                                          | 82        |
| 6.5.2.3.1. <i>Muestras problema: Nistatina-ELI</i> .....                                                                                | 83        |
| 6.5.2.4. <i>Inoculo</i> .....                                                                                                           | 83        |
| 6.5.2.5. <i>Distribución de las muestras</i> .....                                                                                      | 83        |
| 6.5.2.5.1. <i>Distribución de las diluciones de las muestras en las placas Microtitter.</i> .....                                       | 84        |
| 6.5.2.6. <i>Lectura</i> .....                                                                                                           | 84        |
| 6.5.3. <b>ENSAYO DE EFICACIA DE LAS FORMULACIONES NYS-ELI</b> .....                                                                     | 84        |
| 6.5.3.1. <i>Utillaje</i> .....                                                                                                          | 85        |
| 6.5.3.2. <i>Muestras</i> .....                                                                                                          | 85        |
| 6.5.3.3. <i>Ensayo para Candida Albicans ATCC 10231</i> .....                                                                           | 85        |
| 6.5.3.3.1. <i>Preparación del inoculo</i> .....                                                                                         | 85        |
| 6.5.3.3.2. <i>Procedimiento</i> .....                                                                                                   | 86        |
| 6.5.3.3.3. <i>Lectura</i> .....                                                                                                         | 87        |
| 6.5.3.4. <i>Ensayo para Aspergillus Fumigatus ATCC 9197</i> .....                                                                       | 87        |
| 6.5.3.4.1. <i>Preparación del inoculo</i> .....                                                                                         | 87        |
| 6.5.3.4.2. <i>Procedimiento</i> .....                                                                                                   | 87        |
| 6.5.3.2.3. <i>Lectura</i> .....                                                                                                         | 87        |
| <b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....                                                                                                  | <b>89</b> |
| <b>7.1 DISEÑO DEL CIRCUITO CERRADO PARA EMULSIFICACIÓN</b> .....                                                                        | <b>90</b> |
| <b>7.2. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE FABRICACIÓN: RESULTADOS PRELIMINARES</b> .....                                            | <b>93</b> |
| 7.2.1. <b>ANÁLISIS DE LA TEMPERATURA DE MEZCLADO DE LAS FASES</b> .....                                                                 | 93        |
| 7.2.2. <b>ANÁLISIS DE LA CINÉTICA DE ENFRIAMIENTO</b> .....                                                                             | 94        |
| 7.2.2.1. <i>Enfriamiento a temperatura ambiente</i> .....                                                                               | 94        |
| 7.2.2.2. <i>Enfriamiento en Baño de María (BM).</i> .....                                                                               | 94        |
| 7.2.3. <b>ESTUDIO PRELIMINAR: EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS Y FARMACOTÉCNICAS DE LAS ELIS RECIÉN ELABORADAS</b> ..... | 97        |
| 7.2.3.1. <i>Fracción A: muestras no esterilizadas a t=24h.</i> .....                                                                    | 98        |
| 7.2.3.2. <i>Fracción B: muestras de emulsiones esterilizadas a t=24h.</i> .....                                                         | 100       |
| 7.2.4. <b>ESTUDIO PRELIMINAR: EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD FÍSICA DE LAS ELIS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.</b> .....                          | 101       |

|                                                                                                                       |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 7.2.4.1. Fracción A: muestras de emulsiones no esterilizadas .....                                                    | 101        |
| 7.2.4.1.1. Resultados de estabilidad física de la Fracción A, a t= 1 semana .....                                     | 101        |
| 7.2.4.1.2. Resultados de estabilidad física de la Fracción A, a t= 2 semana .....                                     | 103        |
| 7.2.4.1.3. Resultados de estabilidad física de la Fracción A, a t= 3 semana .....                                     | 104        |
| 7.2.4.1.4. Resultados finales del estudio de estabilidad física de la Fracción A. ....                                | 105        |
| 7.2.4.2. Fracción B: emulsiones esterilizadas. ....                                                                   | 106        |
| 7.2.5. RESUMEN FINAL DEL ESTUDIO PRELIMINAR.....                                                                      | 107        |
| <b>7.3. RESULTADOS DE LA OPTIMIZACIÓN DEL EXCIPIENTE .....</b>                                                        | <b>107</b> |
| 7.3.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD EN FUNCIÓN DEL TIEMPO .....                                              | 109        |
| 7.3.1.1. Resultados de la evaluación de las emulsiones recién elaboradas .....                                        | 109        |
| 7.3.1.1.1. Fracción A: muestras no esterilizadas a $t_0$ .....                                                        | 110        |
| 7.3.1.1.2. Fracción B: muestras de emulsiones esterilizadas a $t_0$ .....                                             | 112        |
| 7.3.1.2. Evaluación de Las emulsiones A t = 3 meses .....                                                             | 115        |
| 7.3.2.2. Evaluación de las emulsiones a T = 6 meses.....                                                              | 118        |
| 7.3.2.3. Evaluación de las emulsiones a t = 9 meses .....                                                             | 121        |
| <b>7.4. DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>                                                                                 | <b>125</b> |
| 7.4.1. PLANTEO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL .....                                                                          | 125        |
| 7.4.2. ANÁLISIS DE LA VARIANZA PARA TAMAÑO MEDIO DE GOTA (ZAVE).....                                                  | 125        |
| 7.4.3. ANÁLISIS DE LA VARIANZA PARA POLIDISPERSIDAD (PI) .....                                                        | 126        |
| 7.4.4. ANÁLISIS DE LA VARIANZA PARA LD <sub>99</sub> .....                                                            | 128        |
| 7.4.5. ELECCIÓN DE ELI ÓPTIMA.....                                                                                    | 130        |
| <b>7.5. COMPARACIÓN ENTRE ELI (OPTIMIZADA) OBTENIDA POR SONICACIÓN E<br/>INTRALIPID® 20%. ....</b>                    | <b>134</b> |
| <b>7.6. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE PREFORMULACIÓN .....</b>                                                            | <b>136</b> |
| 7.6.1. Incorporación de NYS durante el proceso de formación del vehículo emulsión .....                               | 136        |
| 7.6.2. Incorporación en frío de NYS sobre el vehículo previamente preparado.....                                      | 136        |
| <b>7.7. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE FORMULACIÓN .....</b>                                                               | <b>140</b> |
| 7.7.1. RESULTADOS DE LA ESTABILIDAD FÍSICA DE NYS-ELI.....                                                            | 142        |
| 7.7.1.1. Análisis de varianza (M-ANOVA) del tamaño medio de gota (Zave) para las<br>formulaciones NYS-ELI y ELI ..... | 144        |
| 7.7.1.2 Análisis de varianza para polidispersidad (PI) de formulaciones NYS-ELI y ELI.....                            | 146        |
| 7.7.2. ENSAYO DE ESTABILIDAD ÓPTICA PARA NYS-ELI .....                                                                | 148        |
| 7.7.3. CUANTIFICACIÓN DE NYS EN ELI .....                                                                             | 150        |

|                                                                                                                 |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 7.7.3.1. Análisis del precipitado presente en emulsiones NYS-ELI.....                                           | 151        |
| 7.7.4. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) .....                                              | 153        |
| <b>7.8. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE LAS FORMULACIONES NYS-ELI.....</b>                                            | <b>154</b> |
| <b>7.9. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.....</b>                                                                         | <b>161</b> |
| 7.9.1. RESULTADOS DEL TEST DE SUSCEPTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> PARA <i>CANDIDA ALBICANS</i> ATCC 10231 .....     | 161        |
| 7.9.1.1. Resultados a tiempo cero .....                                                                         | 162        |
| 7.9.1.2. Resultados a las 24h de incubación.....                                                                | 162        |
| 7.9.2. RESULTADOS DEL TEST DE SUSCEPTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> PARA <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> ATCC 9197 ..... | 164        |
| 7.9.2.1. Resultados a tiempo cero.....                                                                          | 165        |
| 7.9.2.2. Resultados a las 24h de incubación.....                                                                | 165        |
| 7.9.2.3. Resultados a las 48h de incubación.....                                                                | 166        |
| 7.9.3. RESULTADOS DEL ENSAYO DE EFICACIA DE LAS FORMULACIONES NYS-ELI.....                                      | 167        |
| 7.9.3.1. Resultados del ensayo de eficacia para <i>Candida Albicans</i> ATCC 10231.....                         | 167        |
| 7.9.3.1.1. Resultados de la formulación NYS-ELI 1 contra <i>C. Albicans</i> .....                               | 168        |
| 7.9.3.1.2. Resultados de la formulación NYS-ELI 2 contra <i>C. Albicans</i> .....                               | 168        |
| 7.9.3.1.3. Resultados de la formulación NYS-ELI 3 contra <i>C. Albicans</i> .....                               | 168        |
| 7.9.3.1.4. Resultados de la formulación NYS-ELI 4 contra <i>C. Albicans</i> .....                               | 169        |
| 7.9.3.2. Resultados del ensayo de eficacia para <i>Aspergillus Fumigatus</i> ATCC 9197.....                     | 170        |
| 7.9.3.2.1. Resultados de la formulación NYS-ELI 1 contra <i>A. Fumigatus</i> . .....                            | 170        |
| 7.9.3.2.2. Resultados de la formulación NYS-ELI 2 contra <i>A. Fumigatus</i> . .....                            | 170        |
| 7.9.3.2.3. Resultados de la formulación NYS-ELI 3 contra <i>A. Fumigatus</i> . .....                            | 170        |
| 7.9.3.2.4. Resultados de la formulación NYS-ELI 4 contra <i>A. Fumigatus</i> . .....                            | 170        |
| 7.9.3.2.5. Resultados de la Nistatina Patrón contra <i>A. Fumigatus</i> .....                                   | 171        |
| <b>8. CONCLUSIONES .....</b>                                                                                    | <b>174</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>                                                                                        | <b>177</b> |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>                                                                                   | <b>196</b> |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>                                                                                  | <b>201</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>                                                                                              | <b>205</b> |

# INTRODUCCIÓN

---

# INTRODUCCIÓN

---

Las emulsiones lipídicas inyectables (ELI) inicialmente se utilizaron en nutrición parenteral. Pero, de manera significativa, sus ventajas en términos de evitar la adsorción de fármacos por parte de los dispositivos de perfusión<sup>1</sup>, estabilizar compuestos hidrolíticamente inestables<sup>2</sup>, reducir la irritación o toxicidad del fármaco incorporado<sup>3,4</sup>, mejorar la actividad y biodisponibilidad del fármaco incorporado<sup>5</sup>, alta capacidad de carga de fármaco con la posibilidad de una liberación sostenida, como terapia para intoxicaciones severas con medicamentos<sup>6,7</sup> y algunos pesticidas<sup>8,9</sup>, la administración dirigida del fármaco a diversos órganos, además de la productividad industrial hacen de ellos portadores apropiados para fármacos poco solubles en agua<sup>10</sup>, que ya han demostrado su utilidad como sistemas de suministro de fármacos como el propofol<sup>11</sup>, lorazepam<sup>12</sup>, cinaricina<sup>10</sup> o algún antitumoral como la camptotecina<sup>13</sup>.

Las ventajas anteriormente citadas pueden contribuir a la investigación de formulaciones intravenosas de Nistatina (NYS) y hacer que ELI sea un vehículo apropiado para este principio activo; lo que constituye uno de los objetivos de la presente memoria. Desafortunadamente, las emulsiones son formulaciones intrínsecamente inestables que suelen dar lugar a cambios en el tamaño y distribución de partículas, generando posibles efectos no deseados<sup>14,15</sup>.

Para ello, es fundamental utilizar un método de elaboración y unos parámetros de emulsificación apropiados para obtener ELIs con una estabilidad física adecuada. En el presente proyecto se utilizan técnicas de sonicación que permiten la completa dispersión del principio activo en la emulsión, la homogeneización y estabilización del sistema, por acción de ultrasonidos como única fuente de energía<sup>12</sup>. El método propuesto podría utilizarse en una farmacia de hospital, porque es fácil de realizar, rápido, económico, y no requiere una gran inversión en equipo o espacio.

La formulación de principios activos poco solubles en medio acuoso, para su administración por vía intravenosa, supone un estudio cuidadoso de cada uno de sus componentes con objeto de garantizar su esterilidad e inocuidad, y evitar la aparición de efectos adversos tales como irritación, dolor, flebitis, tromboembolismo, sin afectar a la acción farmacológica del principio activo<sup>16</sup>.

Este trabajo se enfoca en obtener lotes de emulsión lipídica inyectable para su utilización como vehículo parenteral de fármacos poco solubles. Se realiza la caracterización fisicoquímica y farmacotécnica de los diferentes prototipos hasta obtener una emulsión óptima, que cumpla con los requisitos esperados para este tipo de preparados y luego se escoge un trazador, en este caso Nistatina; fármaco potencialmente útil para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas, pero que por sus características de autoagregación y toxicidad no se ha podido utilizar para este fin.

Hasta este momento, sólo Semis et al<sup>17</sup> han reportado una formulación en la que se ha incorporado NYS en una ELI comercial, a una concentración final de 0,8 mg/ml utilizando Dimetil sulfóxido (DMSO) como disolvente orgánico. En este trabajo se desarrolla y optimiza una nueva formulación NYS-ELI con una concentración de (1mg/ml), evitando el uso de DMSO debido a su bien conocida toxicidad tras administración intravenosa. Se evalúan las propiedades fisicoquímicas, la estabilidad de la nueva formulación y se analiza su mecanismo de liberación. Finalmente se realiza un estudio in vitro de la actividad de la formulación contra *C. albicans*, y *Aspergillus fumigatum*, dos de los principales microorganismos responsables de las infecciones fúngicas invasivas.

Los estudios realizados en la presente memoria han sido aceptados para su publicación en la revista: Journal of Pharmaceutical Sciences (JPharmSci®)(ver anexo 1). En los capítulos 1 al 3 se hace una revisión exhaustiva del estado actual de las emulsiones lipídicas inyectables, la Nistatina y las infecciones fúngicas invasivas, ejes centrales de esta memoria.

# PARTE TEÓRICA

---

# 1. Emulsiones lipídicas inyectables

---

Las emulsiones lipídicas inyectables para uso intravenoso son siempre de tipo O/W e incluyen un agente emulgente que permita la obtención de emulsiones estables y que sea bien tolerado por el organismo. También incluyen coadyuvantes con objeto de corregir la hipotonía, tales como glicerol, glucosa o sorbitol, e hidróxido de sodio para obtener un pH cercano al fisiológico.

Estas emulsiones deben cumplir con los requerimientos de la farmacopea, deben ser: estériles, isotónicas, no pirogénicas, no tóxicas, biodegradables y estables, tanto física como químicamente. Para verificar la estabilidad de las emulsiones lipídicas inyectables, la Farmacopea de Estados Unidos (capítulo <729>) propone dos criterios: el tamaño medio de las gotitas (Método I), y la cola de la distribución de tamaño de partículas no debe superar 5  $\mu\text{m}$  (Método II)<sup>18</sup>.

## 1.1. TIPOS DE EMULSIONES LIPÍDICAS INYECTABLES.

Hasta hoy se han sucedido tres generaciones de emulsiones lipídicas inyectables. Las formulaciones han ido evolucionando en función de los conocimientos acerca del metabolismo de los ácidos grasos, así como su importancia y participación en los procesos de inflamación y de inmunidad.<sup>19,20,21</sup>

Se clasifican en función del tipo de fase oleosa utilizada:

### 1.1.1. PRIMERA GENERACIÓN

#### 1.1.1.1. Emulsiones TCL, basadas en aceite de soja o de cártamo

Son las primeras emulsiones lipídicas que se comercializaron. Su finalidad era el aporte de ácidos grasos esenciales como fuente concentrada de energía.<sup>22,23</sup>

La fase oleosa solía estar integrada por alguna de las siguientes combinaciones de aceites:

100% de aceite de soja

50% de aceite de soja + 50% aceite de girasol

80% de aceite de oliva + 20% de aceite de soja

Lo que representa del orden de un 50 a 60% de triglicéridos de cadena larga  $\omega$ -6 (TCL) de 14 a 20 átomos de carbono, con un 52% linoleico, 8% linolénico; relación  $\omega$ -6: $\omega$ -3 de 7:1. Este porcentaje tan alto de  $\omega$ -6 se ha asociado a alteraciones del sistema inmunológico y en el metabolismo de los ácidos grasos.<sup>14,15,23,24</sup>

Estas emulsiones no eran bien toleradas por los pacientes a los que se les administraba como nutrición parenteral (NP) ya que los TCL no se oxidan completamente y una gran parte son reesterificados en el hígado, por lo que fácilmente producían hipertrigliceridemia e hígado graso.<sup>19</sup> Estos y otros efectos adversos hicieron necesario el desarrollo de emulsiones lipídicas con porcentajes menores de  $\omega$ -6.

## 1.1.2. SEGUNDA GENERACIÓN

### 1.1.2.1. Emulsiones basadas en mezclas físicas de TCM y TCL. (Lipofundina®)

Son emulsiones que contienen un 50% de aceite de coco o palma con una elevada proporción de triglicéridos de cadena media (TCM) con 8 a 10 átomos de carbono. Aportan componentes energéticos y nutricionales en pacientes con absorción deficiente, pero no aportan ácidos grasos esenciales. Por lo general la fase oleosa de este tipo de emulsiones está compuesta por 50% TCM + 50% de aceite de soja, con un relación  $\omega$ -6: $\omega$ -3 de 7:1.

La solubilidad acuosa de los TCM es 100 veces mayor que la de los TCL, lo que permite una velocidad de hidrólisis homogénea e intermedia entre los LCT y los MCT y un transporte celular parcialmente independiente de proteínas transportadoras.<sup>25</sup> Al ser ácidos grasos saturados son resistentes a la peroxidación lipídica, mejoran el balance nitrogenado<sup>26</sup> y la tolerancia hepática<sup>25</sup>, así como no participan en la síntesis de eicosanoides mejorando el perfil inmunológico<sup>20</sup> y no se almacenan como triglicéridos, evitando así la acumulación de cuerpos cetónicos.<sup>27,28</sup> Sin embargo, se han relacionado con los efectos secundarios de las emulsiones de TCL a nivel hepático y no ha demostrado mejores resultados clínicos.<sup>20,25</sup>

### 1.1.2.2. Emulsiones TCM/TCL lípidos estructurados (Structolipid®)

Son emulsiones cuya fase oleosa está constituida por lípidos estructurados obtenidos de la hidrólisis de una mezcla constituida por un 64% (p/p) de aceite de soja y un 36% de aceite de coco.

Estos lípidos (glicéridos) estructurados están integrados por dos ácidos grasos de cadena media y uno de cadena larga o por dos ácidos grasos de cadena larga y uno de cadena media esterificados con glicerina.<sup>29</sup> La fase oleosa de este tipo de emulsiones está compuesta por 50% TCM + 50% aceite de soja en forma de lípidos estructurados. Estas emulsiones se metabolizan más rápido debido a un aumento de los ácidos grasos libres, además de un gran aumento del gasto energético en reposo.<sup>21</sup> Presentan así mismo un aclaramiento plasmático más rápido y una mejora del balance nitrogenado en relación al que presentan las emulsiones formuladas a partir de mezclas físicas TCM/TCL.<sup>25,26,29</sup> Las alteraciones hepáticas y sobre el sistema inmunitario<sup>30</sup> producidas por este tipo de emulsiones son menos importantes que las obtenidas por emulsiones de mezclas físicas TCM/TCL o de TCL. Sin embargo, en un metanálisis reciente no se encontraron diferencias a este respecto por el tamaño limitado de la muestra.<sup>31</sup>

### 1.1.2.3. Emulsiones lipídicas basadas en aceite de oliva y soja (Clinoleic®)

Estas emulsiones contienen en su fase oleosa un 80% de aceite de oliva (mayormente compuesto de ácido oleico, monoinsaturado (MUFA)  $\omega$ -9) y un 20% de aceite de soja (TCL). El aceite de oliva también se ha evaluado para la sustitución del aceite de soja con el fin de reducir  $\omega$ -6 PUFA.<sup>25</sup> La literatura sugiere que ClinOleic® tiene un efecto inmunológico neutral y es muy adecuado para los pacientes que están en riesgo de supresión inmune o están inmuno-comprometidos<sup>32</sup> y demuestra una mejor tolerancia hepática en comparación con las emulsiones TCM/TCL.<sup>33</sup> Sin embargo, en un estudio clínico reciente, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros estudiados, entre los pacientes que recibieron nutrición parenteral (NP) cuya fase oleosa estaba compuesta por aceite de oliva y los que recibieron NP cuya fase oleosa constaba de TCM/TCL.<sup>34</sup>

### 1.1.3. TERCERA GENERACIÓN

#### 1.1.3.1. Emulsiones lipídicas basadas en TCL, TCM y aceite de pescado

La fase oleosa de estas emulsiones incluye suplementos nutricionales tales como ácidos grasos  $\omega$ -3 presentes en el aceite de pescado. Estas emulsiones están orientadas a modular la respuesta inflamatoria y a buscar un efecto fármaco-nutriente.<sup>35</sup> La incorporación de mayor cantidad de ácidos grasos  $\omega$ -3 en las emulsiones lipídicas puede modular positivamente la inflamación y la inmunosupresión que suele ponerse de manifiesto tras su administración.<sup>36,37</sup>

Estudios recientes<sup>20,38,39</sup> hacen referencia a que el empleo de este tipo de emulsiones lipídicas en pacientes postquirúrgicos redujeron las complicaciones infecciosas, por lo que se usaron menos antibióticos y los días de hospitalización y de estancia en UCI. También disminuyeron las concentraciones de mediadores proinflamatorios, se pudo apreciar un impacto neutro en variables inflamatorias e inmunitarias, y mejoraron o revirtieron la toxicidad hepática de este tipo de productos.<sup>40,41</sup> A pesar de todo ello faltan más estudios que confirmen estos resultados.

A modo de ejemplos de emulsiones de este tipo comercializadas destacan:

Las emulsiones lipídicas MSF<sup>42-44</sup> (siglas de MCT, Soja, Fish) compuestas por: 40% aceite de soja + 50% TCM + 10% aceite de pescado. (Lipoplus®)

Emulsiones lipídicas SMOF<sup>41,45</sup> (siglas de Soya, MCT, Olive, Fish) compuestas por: 30% Aceite de soja + 30% TCM + 25% aceite de oliva + 15% aceite de pescado (SMOFlipid®)

## 1.2. COMPONENTES DE LAS EMULSIONES LIPÍDICAS INYECTABLES

### 1.2.1. Fase Oleosa:

La fase oleosa de una ELI se utiliza con fines nutricionales, cuando se requiere administrar nutrición parenteral, y/o como vehículo de principios activos no hidrosolubles. Está compuesta por aceites que en su mayoría son de origen vegetal, y recientemente se ha introducido el uso de aceite de pescado como parte de la nutrición parenteral.

Según USP 36<sup>46</sup> todo aceite utilizado como vehículo para inyectables no acuosos debe ser de origen vegetal, inodoro o casi sin olor y no presentar ningún signo de enranciamiento. Además deben ser esterilizables, y tener un índice de saponificación entre 185 y 200 y un índice de yodo entre 79 y 141.

Los aceites más utilizados para nutrición parenteral y/o como vehículo para administración parenteral son:

*Aceite de soja:* se obtiene a partir del grano de la leguminosa *Soja hispida*. Su grano contiene de un 18 a 20% de aceite. Es destacable su riqueza en ácidos grasos esenciales, en especial ácido linoléico y  $\alpha$ -linoléico. Es el aceite más estudiado y utilizado en preparados parenterales. Contiene entre un 50 a 60% de triglicéridos de cadena larga  $\omega$ -6 (TCL) de 14 a 20 átomos de carbono, con un 52% linoleico, 8% linolénico.<sup>47</sup>

*Aceite de oliva:* es un aceite obtenido por refinado del aceite de oliva crudo obtenido mediante presión en frío u otro procedimiento adecuado a partir de pulpa madura de *olea europea* L. Se caracteriza por su alto contenido de ácido oleico y por el reducido aporte de ácido grasos poliinsaturados. Es utilizado para la producción de formas farmacéuticas de administración parenteral y para nutrición parenteral.<sup>47</sup>

*Aceite de girasol:* es un aceite obtenido por expresión mecánica seguida de un proceso de refinamiento de semillas de *Helianthus annuus* C. Puede contener hasta un 40% de ácido oleico y hasta un 74% de ácido linoléico. Se utiliza en nutrición parenteral.<sup>47</sup>

*Aceite de sésamo:* se obtiene de una o más variedades de semillas de *Sesamum indicum* (pedaliaceas) por expresión o extracción. Es utilizado como solvente o vehículo de productos parenterales de administración intramuscular.<sup>47</sup>

*Aceite de algodón:* se obtiene de la extracción en prensas hidráulicas del núcleo de las semillas de *Gossypium hirsutum* L, que contienen cerca de un 15% de aceite. Tiene hasta un 40% de ácido linoléico, se caracteriza por no tener un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturado. Se utiliza en emulsiones intravenosas y como vehículo de formas de dosificación intramuscular.<sup>47</sup>

*Aceite de Cártamo:* se obtiene a partir de la extracción o expresión de las semillas de *Carthamus tinctorius* L (compositae), es rico en ácido oleico (cis-9-octadecenoico). Su empleo en emulsiones parenterales es muy amplio en Estados Unidos.<sup>47</sup>

*Aceite de pescado:* aceite obtenido a partir de peces de las familias tales como Engraulidae, Carangidae, Clupeidae, Osmeridae, Scombridae y Ammodytidae (tipo I), o de los géneros *Thunnus* y *Sarda* dentro de la familia Scombridae (tipo II). Se ha introducido recientemente como aporte de ácidos grasos poliinsaturados omega 3. Los ácidos omega-3 se definen como los siguientes ácidos: ácido alfa-linolénico (C18: 3 n-3), ácido moroctic (C18: 4 n-3), ácido eicosatetraenoico (C20: 4 n-3), ácido eicosapentaenoico (C20: 5 n-3, EPA), ácido heneicosapentaenoic (C21: 5 n-3), ácido clupanodónico (C22: 5 n-3) y ácido docosahexaenoico o cervónico (C22: 6 n-3, DHA) Contiene no menos de 28% (w / w) del total de ácidos grasos omega-3 ácidos (expresados como ácidos libres) que consisten en no menos de 13% de EPA y no menos de 9% de DHA.<sup>47</sup>

### 1.2.2. FASE ACUOSA

Se utiliza agua para inyección. USP 36<sup>46</sup> especifica que el agua para inyección debe satisfacer los ensayos de esterilidad y pirogenicidad (concentración máxima de endotoxinas de 0,25UI/ml).

### 1.2.3. EMULGENTES

Los agentes emulgentes permiten la obtención de emulsiones fisicoquímicamente estables. El número de emulgentes que se consideran seguros para la administración parenteral es limitado, debido a que su uso por vía parenteral exige que tengan una

toxicidad muy baja o nula, además deben resistir los procesos de esterilización y deben ser biodegradables. Los emulgentes utilizados en este tipo de formulaciones, son siempre de tipo no iónico o anfótero y de HLB relativamente elevado, dado que las emulsiones a estabilizar son necesariamente de tipo O/A. En función de su origen, podemos considerar dos grupos.

#### 1.2.3.1 De Origen Natural.

Los más representativos son las lecitinas. Estos emulgentes son de elección en relación a las alternativas sintéticas debido a su total biodegradabilidad y metabolización, y a que forman parte de las membranas biológicas, por lo que virtualmente, no son tóxicos.

**Las lecitinas** son ésteres de glicerina unidos a ácidos grasos y ácido fosfórico (fosfátidos). La USP 36 las describe como una mezcla compleja de fosfátidos insolubles, que están constituidos principalmente por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol, combinados con otras sustancias tales como triglicéridos, ácidos grasos, y carbohidratos<sup>48</sup>.

Las lecitinas más utilizadas para administración parenteral son las de alta pureza, aisladas de la soja o de la yema de huevo, con un contenido de fosfatidilcolina superior al 95% y un contenido de lisofosfatidilcolina inferior al 2%.<sup>48</sup>

#### 1.2.3.2. De Origen Sintético

Los emulgentes de origen sintético más utilizados son Poloxamer 188 (Pluronic® F68), Polisorbato 80 (Tween® 80), PEG-660 –12 hidroxistearato (Solutol® HS-15 o Kolliphor HS-15) y el Macrogol-glicerol ricinolato (Cremophor® o Kolliphor ELP).

Se han ensayado combinaciones de fosfolípidos y emulgentes sintéticos<sup>49</sup>, tales como Poloxamer 188 que induce a la formación de una película continua con un empaquetamiento cerrado, que favorece la estabilidad de la emulsión<sup>50</sup>; se obtienen resultados similares cuando se asocia fosfolípidos con PEG-660-12 hidroxistearato.<sup>51,52</sup>

**Poloxamer 188**<sup>53</sup> es un copolímero no iónico de óxido de etileno y óxido de propileno. En la práctica farmacéutica se utiliza como agente emulsionante en emulsiones lipídicas y nanopartículas para uso parenteral, como agente solubilizante y estabilizante en jarabes, como humectante y como componente de bases para supositorios. Es un sólido que funde a 52°C, soluble en agua y etanol (a 95%). Los poloxámeros no son metabolizados por el organismo por lo que no producen irritación y no se consideran tóxicos.

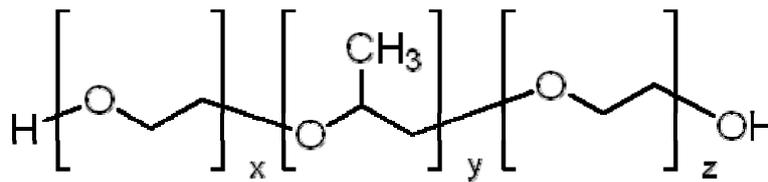


Figura 1. Estructura del Poloxamer 188.<sup>54</sup>

**Macrogol 15 Hidroxiestearato**<sup>47,51</sup> es un polietilenglicol que a temperatura ambiente tiene una apariencia de pasta amarillenta. Su solubilidad en agua disminuye con el aumento de la temperatura. Si se almacena a 25°C, se garantiza una estabilidad de 24 meses. Se utiliza como agente solubilizante de fármacos insolubles en agua, en preparados de administración parenteral.

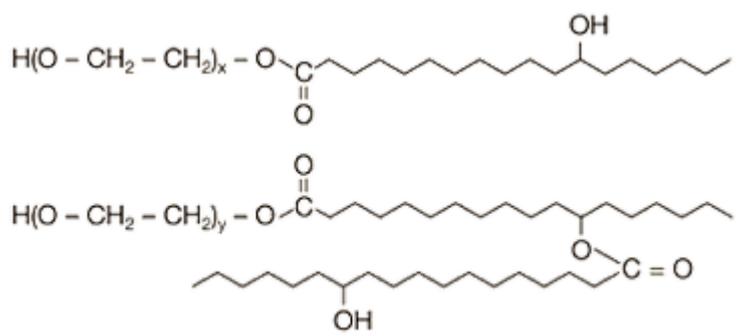


Figura 2. Estructura del Solutol Hs15 (Kolliphor Hs15).<sup>55</sup>

**Polisorbato 80**<sup>47,56</sup> es un ester del sorbitol ciclado o sorbitano, polioxi-etilenado (en concreto: monooleato de polioxi-etilen sorbitano). Es soluble en agua, y soluciones del mismo al 10% presentan una coloración amarillatransparente. Se utiliza como agente emulgente no iónico en preparados para administración por vía parenteral.

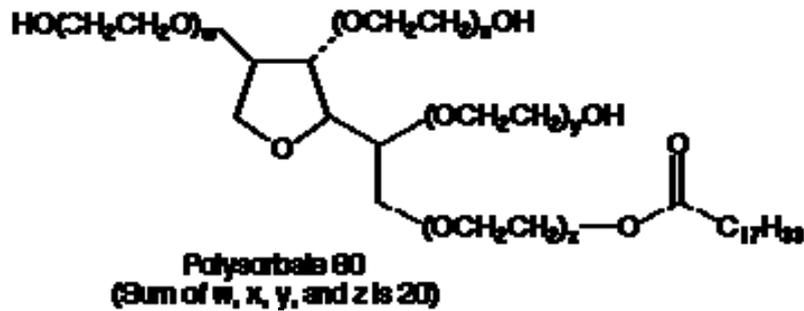


Figura 3. Estructura del polisorbato 80 (Tween 80).<sup>57</sup>

Por último, el **Macrogol-glicerol ricinoleato**<sup>47</sup> (Cremophor® o Kolliphor® ELP) es una pasta de color blanco a amarillento. Funde a 26°C en un líquido oleoso transparente con un ligero olor característico. Es un emulgente no iónico, relativamente soluble en agua y en solventes orgánicos como el etanol, cloroformo, tolueno, tricloroetileno, entre otros. Es especialmente utilizado como vehículos para formulaciones parenterales, ya que aumenta la estabilidad de dichas formulaciones; pero se ha asociado con reacciones anafilactoides graves, hiperlipidemias, alteraciones en la viscosidad de la sangre, y la agregación de eritrocitos. También pueden dar lugar a efectos adversos debido a las alteraciones en la farmacocinética del fármaco formulado.<sup>58</sup>

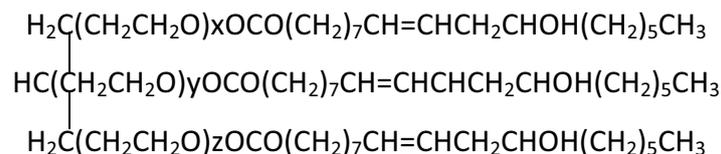


Figura 4. Estructura química del Macrogol-glicerol ricinoleato (Cremophor® EL).  
Constituyente primario con  $x + y + z \sim 35$

#### 1.2.4. Coadyuvantes

Deben considerarse

- Antioxidantes, tales como  $\alpha$ -tocoferol, con el fin de proteger la fase oleosa de procesos oxidativos y enranciamiento.
- Isotonizantes, habitualmente se utiliza **glicerol**, y en menor grado **sorbitol** y **xilitol**.
- Reguladores de pH, suelen utilizarse soluciones diluidas de hidróxido de sodio.

### 1.3. TÉCNICAS PARA ELABORACIÓN DE EMULSIONES LIPÍDICAS INYECTABLES

Para obtener emulsiones tipo ELI que sean estables se requiere, entre otras cuestiones, que el tamaño de gota en la fase dispersa sea submicrométrico ( $\leq 1\mu\text{m}$ ). Para este fin se utilizan diferentes técnicas de fabricación. De las que se menciona a continuación las más importantes.

#### 1.3.1. MÉTODOS DE ALTA ENERGÍA

Los métodos de dispersión (ver tabla 1) comprenden la elongación de las gotas a través de un elevado cizallamiento y una gran cantidad de energía mecánica comunicada al sistema para aumentar el área interfacial y disminuir el tamaño de gota.

| Método                        | Tamaño de gota ( $\mu\text{m}$ ) |
|-------------------------------|----------------------------------|
| Agitación                     | 10                               |
| Molino coloidal               | 5                                |
| Homogenizador de turbina      | 1,1                              |
| Homogenizador de alta presión | 0,3                              |
| Microfluidificador            | 0,1 - 0,2                        |
| Ultrasonido <sup>33</sup>     | 0,1 - 0,3                        |

**Tabla 1. Efecto del equipo de emulsificación en el tamaño de gota promedio de las emulsiones elaboradas por estos métodos.<sup>59</sup>**

La formación de este tipo de emulsiones por estos métodos generalmente es muy costosa, ya que requiere aparatos especializados. Entre los equipos de dispersión más eficaces destacan:

##### 1.3.1.1. Homogeneizador de Válvula.

Se utiliza para producir emulsiones intravenosas a gran escala. Esta técnica fuerza a pasar la mezcla de las 2 fases a través de un pequeño espacio anular, bajo una presión de 100 a 1500kg/cm<sup>2</sup> ejercida por medio de válvulas biseladas. La emulsión se somete a dicho tratamiento repetidamente, con lo que se consigue una división sucesiva de las partículas dispersas.<sup>60</sup>

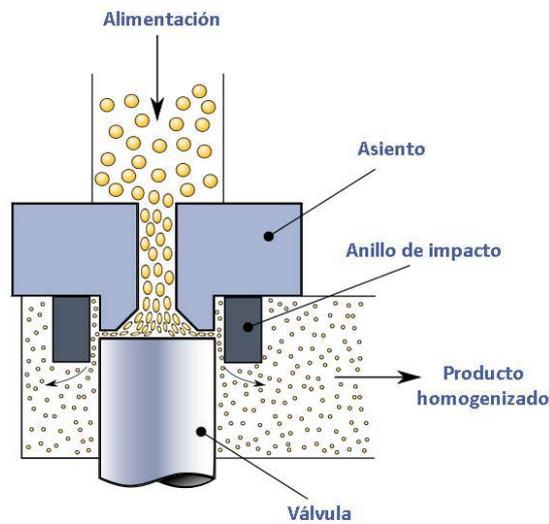


Figura 5. Esquema del homogeneizador de válvula.<sup>61</sup>

### 1.3.1.2. Homogeneizador de alta presión.

En este caso la mezcla de las dos fases de la emulsión en formación se somete a una fuerza de cizalla por un sistema de rodamientos, a través de unas válvulas de homogeneización. Este sistema aplica una presión de  $1000\text{kg}/\text{cm}^2$ , se puede aplicar mayor fuerza, pero viene limitado por el aumento de la temperatura del sistema.<sup>62</sup>

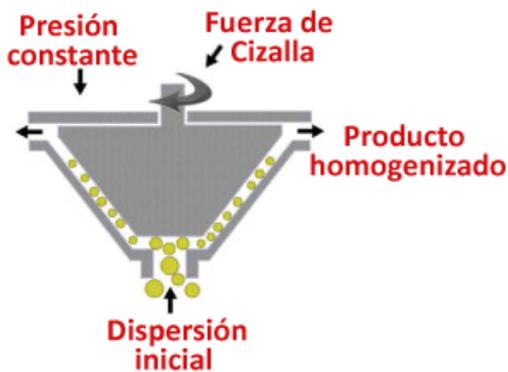


Figura 6. Esquema del homogeneizador de alta presión.<sup>63</sup>

### 1.3.1.3. Microfluidificador.

Esta técnica somete a la mezcla de las 2 fases de la emulsión en formación a través de una cámara de interacción por acción de la presión ejercida por aire comprimido que

puede llegar hasta  $1600\text{kg/cm}^2$ . En el interior de la cámara, el contenido se divide entre 2 canales independientes que confluyen finalmente en un punto. Como consecuencia de la alta velocidad a la que interacciona el líquido de ambos canales se produce la cizalla de las partículas lipídicas. La emulsión sigue sucesivos ciclos hasta alcanzar el tamaño de gota óptimo. Con esta misma técnica también se elaboran liposomas.<sup>64</sup>

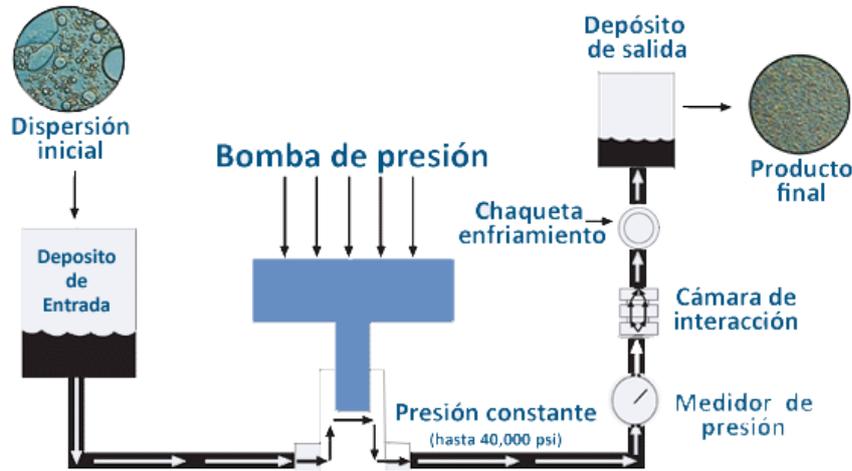


Figura 7. Esquema del homogeneizador Microfluidizer.<sup>65</sup>

#### 1.3.1.4. Ultrasonidos.

Esta técnica aplica un campo eléctrico oscilatorio en donde se generan unas vibraciones mecánicas de alta frecuencia. Las vibraciones se transmiten a través de una sonda de titanio al producto en formación. Dicha sonda se pone en contacto con la mezcla de las dos fases provocando alternancia de compresiones por la diferencia de presión que se origina en el seno del líquido.

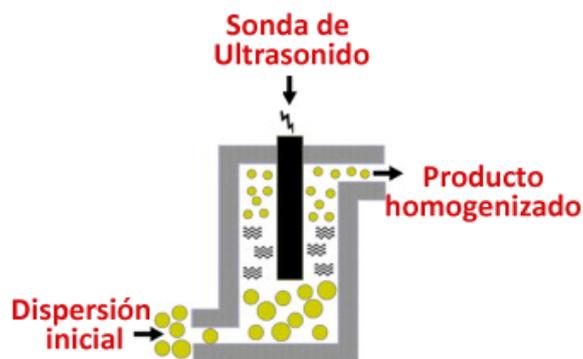


Figura 8. Esquema de homogenización por Ultrasonido.<sup>63</sup>

De este modo, se forman cavidades microscópicas que se rompen, con la consiguiente liberación de energía y agitación molecular (Fenómeno de cavitación)<sup>66</sup>, lo que provoca una reducción en el tamaño de gotícula. La emulsión sigue sucesivos ciclos hasta alcanzar el tamaño de gota deseado. La técnica de emulsificación por ultrasonidos es la utilizada en la parte experimental del presente trabajo y será ampliamente descrita en el apartado 3.2.2.1.

### 1.3.2. MÉTODOS DE BAJA ENERGÍA

Los métodos de baja energía son aquellos en los cuales la energía requerida para producir la emulsión proviene de las transiciones o cambios de fases que se producen durante la formación de las mismas<sup>67</sup>. Deben considerarse tres métodos:

#### 1.3.2.3. Emulsificación por inversión de fases.

Hoy en día, la mayoría de los sistemas formulados para producir emulsiones son sistemas multicomponentes<sup>68, 69</sup>, por lo tanto, es posible modificar la composición interfacial durante el proceso de emulsificación mediante cambios en las proporciones agua/aceite debido al fenómeno de partición de los diferentes tipos de emulgente en el sistema<sup>70</sup>. La inversión se produce cuando la fase dispersa supera una determinada concentración que dependerá del sistema formulado, en el denominado punto de inversión de fases. Con esta técnica se pueden elaborar nanoemulsiones y nanopartículas.

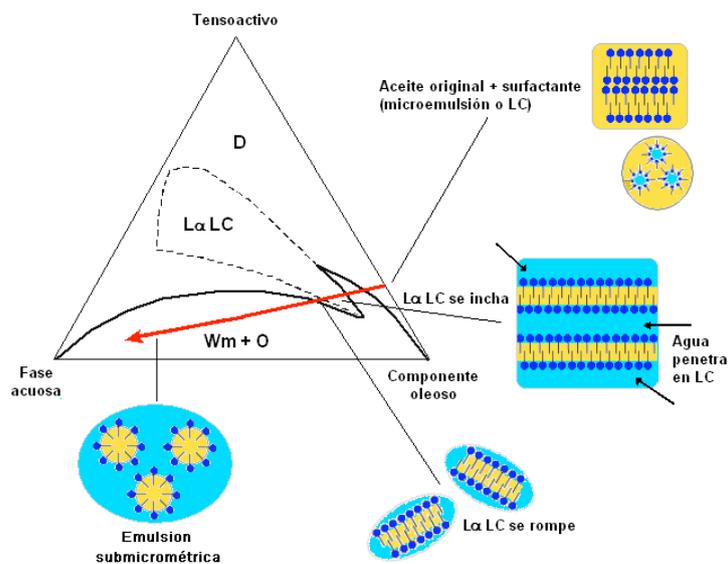


Figura 9. Representación gráfica de un proceso de inversión de fases.<sup>70</sup>

### 1.3.2.1. Inversión Transicional

Este método se basa en formar la emulsión utilizando un cambio brusco de temperatura.<sup>71</sup> Sin embargo, su uso está limitado a los sistemas formulados con emulgentes no iónicos del tipo etoxilado, los cuales cambian su balance hidrofílico-lipofílico con la temperatura: a temperaturas inferiores a la temperatura de inversión de fases (HLD<0) se forman emulsiones O/W mientras que a temperaturas superiores a la misma (HLD>0) forman emulsiones W/O.

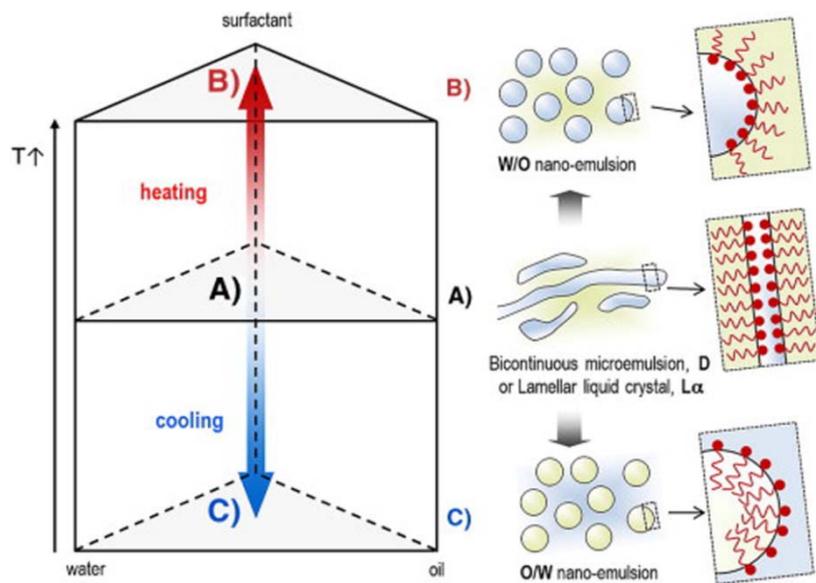


Figura 10. Representación gráfica del método de temperatura de inversión de fases.<sup>72</sup>

### 1.3.2.2. Inversión Catastrófica

La inversión catastrófica se produce cuando la concentración de la fase interna en un sistema tensioactivo/aceite/agua (SOW de sus siglas en inglés) es muy alta, generando la formación de una emulsión múltiple debido a que el sistema no puede solubilizar una mayor cantidad de fase dispersa en el interior de las gotas.

El proceso de Inversión de Fase catastrófica (IFC) por lo general, se produce en emulsiones en las que el tensioactivo tiene más afinidad hacia la fase dispersa que hacia la dispersante; que sería lo lógico de acuerdo con la concepción clásica de la formación interfacial y el concepto HLB en el que se basa la formulación de emulsiones. Durante un proceso de IFC, la inestabilidad de una emulsión “anormal” aumenta de forma progresiva hasta que se invierte a una emulsión “normal”, es decir, de signo contrario al obtenido inicialmente.<sup>73</sup>

La IFC se puede realizar de dos formas:

- 1) de una emulsión "normal" a una emulsión "anormal", cuando se aumenta la cantidad de fase interna,<sup>74</sup> o
- 2) de una emulsión anormal a una normal.<sup>75</sup>

La Inversión de fases catastrófica por lo general produce emulsiones más finas que el método de emulsión directa.<sup>76</sup>

Las emulsiones con un alto contenido de fase interna (HIPR: High Internal Phase Ratio), se fabrican a través de un mezclado lento que permite llegar a un altísimo contenido de esta fase; lo que aumenta la viscosidad y las interacciones entre las gotas, produciéndose un alto cizallamiento y emulsiones con diámetros de gota pequeños que luego pueden ser diluidas.<sup>77</sup>

En este caso, es inapropiado utilizar diagramas de fase triangular convencional para describir los cambios de fase en un sistema tensioactivo/aceite/agua (SOW), debido a la complejidad del proceso de inversión de fase y la existencia de múltiples componentes tensioactivos;<sup>78</sup> se puede utilizar, en cambio, un "mapa" de inversión de fase para representar la dinámica de los cambios durante los procesos de dispersión<sup>79</sup>. La figura 11 muestra un mapa de inversión de fases para un sistema SOW.

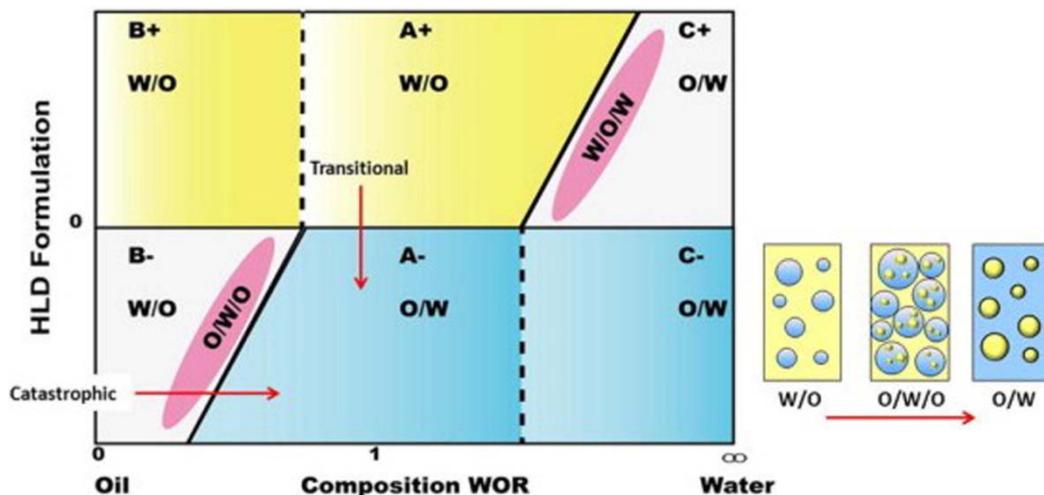


Figura 11. Esquema de inversión de fase, para un sistema tensioactivo/aceite/agua (SOW). Se ilustra la inversión de fase de transición y catastrófica.<sup>80</sup>

## 2. Nistatina

**Sinonimos:** νυστατίνη; Fungicidin; Nistatin; Nistatina; Nistatinas; Nisztatin; Nystatiini; Nystatine; Nystatinum; Nystatyna; ナイスタチン

**CAS:** 1400-61-9

**ATC code:** A07AA02; D01AA01; G01AA01

**ATC code (veterinary):** QA07AA02; QD01AA01; QG01AA01

**UNII code:** BDF1O1C72E (nystatin); W1LX4T91WI (nystatin A<sub>1</sub>)

**Nombre sistemático (IUPAC):** 1S,15S,16R,17R,18S,19E,21E,25E,27E,29E,31E)-33-[[2S,3S,4S,5S,6R)-4-amino-3,5-dihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-1,3,4,7,9,11,17,37-octahydroxy-15,16,18-trimethyl-13-oxo-14,39-dioxabicyclo[33.3.1]nonatriaconta-19,21,25,27,29,31-hexaene-36-carboxylic acid

La Nistatina<sup>47,58</sup> es un antibiótico antifúngico del grupo de los polienos macrólidos que se aísla de cultivos de *Streptomyces noursei*. Se caracteriza por poseer una cadena cíclica de 37 átomos de carbono y un oxígeno, con tres radicales metilo, un aminoazúcar (la micosamina, que es una hexosamina) y seis dobles enlaces.

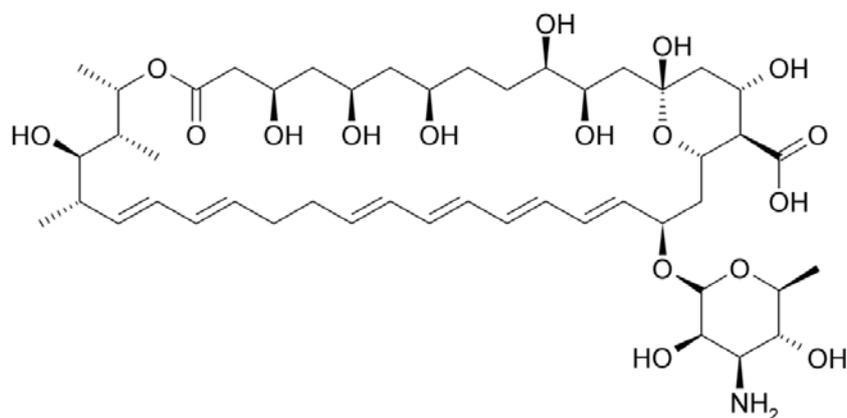


Figura 12. Estructura de la Nistatina A1.<sup>81</sup>

Estos dobles enlaces hacen a la molécula sensible a la luz, el oxígeno y las alteraciones del pH. Es un polvo higroscópico de color amarillo o pardo, prácticamente insoluble en agua y en alcohol, soluble en dimetilformamida y en sulfóxido de dimetilo, y

ligeramente soluble en alcohol metílico. Una suspensión al 3% en agua tiene un pH entre 6 a 8. La potencia no es menor de 4400 UI/mg y no menos de 5000 UI/mg si se destinan para uso oral, calculado con referencia a la sustancia seca.

La Nistatina aparece descrita en la Farmacopea Europea, Farmacopea Internacional, Farmacopea japonesa, Farmacopea de Vietnam y en USP NF

## 2.1. ANTECEDENTES Y PANORAMA ACTUAL

La Nistatina se desarrolló a través de una colaboración científica de larga distancia. Trabajando como investigadoras para el Departamento de Salud del Estado de Nueva York, Elizabeth Lee Hazen en Nueva York y Rachel Fuller Brown en Albania compartieron pruebas y muestras a través del correo de EEUU. Hazen trabajo en la obtención del antifúngico mientras que Brown añadió los conocimientos necesarios para identificar, caracterizar y purificar las diversas sustancias producidas por el cultivo bacteriano encontrados en centenares de muestras de suelo.<sup>82,83</sup>

Las dos científicas donaron las regalías de su invención, más de \$ 13 millones de dólares, a la Corporación de Investigación sin ánimo de lucro para la promoción de la investigación científica académica.

El fármaco fue introducido por primera vez en la práctica clínica en 1954 después de que la FDA lo aprobara; fue patentado en 1957. Se utilizó para tratar infecciones desfigurantes e incapacitantes de piel (boca, garganta y tracto intestinal). La Nistatina se combinó con otros medicamentos antibacterianos para equilibrar sus efectos. Sin embargo, solo se relegó a la utilización por vía tópica debido a los problemas de toxicidad que presentaba cuando la Nistatina se aplicaba por vía oral y parenteral, tales como: tromboflebitis, fiebre, escalofríos, náuseas, problemas renales y hepáticos que impidieron su aplicación por estas vías.<sup>84</sup>

Nistatina, se ha utilizado para el tratamiento de candidiasis cutánea, oral y vaginal, por vía oral<sup>85</sup>, en candidiasis pleural<sup>86</sup> por vía inhalatoria<sup>87</sup> y la administración tópica.<sup>88,89</sup> Actualmente la Nistatina es un medicamento aprobado por la FDA para el tratamiento de micosis cutánea y mucocutánea causadas por las diferentes especies de Candida.

## 2.2. MECANISMO DE ACCIÓN

La Nistatina es una molécula anfifílica y anfótera<sup>90</sup> que se inserta en las bicapas lipídicas del hongo, uniéndose al ergosterol, formando poros y desorganizando su configuración espacial, lo que lleva a una alteración de la permeabilidad de la membrana con pérdida de aminoácidos, purinas e iones potasio del interior de las células micóticas, teniendo como resultado la muerte celular.<sup>91</sup> No tiene actividad apreciable frente a bacterias, protozoos o virus.

## 2.3. ASPECTOS FARMACOLÓGICOS Y CLÍNICOS

### 2.3.1. Farmacocinética

La absorción gastrointestinal de la Nistatina es insignificante, por eso su acción es esencialmente local. La mayoría de la Nistatina administrada vía oral pasa sin cambios a las heces<sup>92</sup>. Cuando se aplica por vía tópica, no se absorbe a través de la piel o de las mucosas<sup>93,94</sup>.

#### 2.3.1.1. Datos preclínicos de Nistatina intravenosa

Dado que aun no existe en el mercado ninguna presentación de Nistatina que se administre por vía intravenosa, en este apartado, se presentan los datos clínicos de los estudios in vivo de Nistatina liposomal (LNYS; Nyotram®)<sup>95</sup>. En este estudio, Se administraron dosis respectivas de 2, 4 y 6 mg/kg/día de LNYS a conejos, durante 14 días. Nistatina liposomal demostró una farmacocinética no lineal, inicialmente con altos niveles en plasma, una distribución rápida y una eliminación del plasma con una vida media relativamente corta, entre 1 y 3 horas. Se observó una disminución en el aclaramiento total dependiente de la dosis.

La distribución inicial de la Nistatina en tejidos tiene lugar mayormente en pulmón, hígado, bazo y en menor medida a nivel renal. LNYS se elimina principalmente a través de la orina, aunque aparecen también cantidades significativas en bilis, por lo que no se descarta una excreción biliar o hepática. LNYS fue bien tolerada, con leve aumento de los niveles séricos de creatinina en el final de la terapia con la dosis más alta.

Un segundo estudio<sup>96</sup>, compara estas mismas dosis de Nistatina liposomal frente a 1mg de Amfotericina B deoxicolato (DAMB; Fungisone®) se observa que la eliminación

del plasma de la LNYS tiene lugar 8 veces más rápido que DAMB, con una acumulación en los tejidos 4 veces menores. En orina, se encontraron concentraciones de LNYS 10 veces superiores y valores de 4 a 7 veces mayores de AUC que DAMB. Sin embargo, el aclaramiento renal y las tasas de recuperación en orina no fueron significativamente diferentes de los de DAMB, lo que sugiere diferencias en la tasa de excreción biliar y/o hepática o metabolismo extrahepático como posibles causas de las diferencias en las disposiciones de los dos polienos.

Los resultados de este estudio demuestran la existencia de diferencias fundamentales en las disposiciones de LNYS y DAMB. En base a su mayor exposición urinaria, LNYS pueden ofrecer una ventaja terapéutica en las infecciones fúngicas sistémicas que involucran el tracto urinario superior e inferior y requieren tratamiento con antifúngicos polienos.

### 2.3.2 Indicaciones

Nistatina es un fármaco con propiedades fungicidas y fungistáticas, dependientes de la dosis administrada. Está indicada en profilaxis y tratamiento de la candidiasis de la piel y mucosas originadas por cepas de *Candida albicans*<sup>97</sup>: candidiasis orofaríngea, candidiasis vulvovaginal, candidiasis digestivas, etc; y las producidas por el género *Cryptococcus*. Se utiliza junto con antibacterianos en tratamientos para suprimir el crecimiento excesivo de la flora gastrointestinal y también en protocolos de descontaminación selectiva en unidades de cuidados intensivos (UCI)<sup>58</sup>.

También se puede emplear como profilaxis en pacientes diabéticos, inmunodeprimidos, en tratamientos con corticoides, en pacientes tratados con antibióticos o que estén en riesgo de desarrollar alguna una infección oportunista por hongos.

La Nistatina parece tener un efecto profiláctico ya que es capaz de suprimir la adhesión celular al epitelio de las mucosas<sup>98</sup> y a las dentaduras<sup>99</sup> previniendo así la propagación sistémica de la candidiasis oral en pacientes comprometidos. Además, se ha visto como suprime la actividad proteolítica de *Candida* tras su exposición<sup>100</sup>.

### 2.3.3 Posología y forma de administración

En España, sólo existe en el mercado una formulación de Nistatina oral que indicada para<sup>101</sup>:

- Tratamiento de candidiasis orofaríngea:

Adultos y niños mayores de 1 año: 250.000 UI - 500.000 UI (2,5 - 5 ml cada 6-12 horas).

Lactantes: 250.000 UI (2,5 ml cada 6 horas).

Recién nacidos y lactantes con bajo peso al nacer: 100.000 UI (1 ml cada 6 horas).

- Tratamiento Candidiasis intestinal:

Adultos: 500.000 - 1.000.000 UI/6 horas (5 - 10 ml cada 6 horas, 20 - 40 ml/día).

Niños: 250.000 - 750.000 UI/6 horas (2,5 - 7,5 ml cada 6 horas, 10 - 30 ml/día).

Lactantes: 100.000 - 300.000 UI/6 horas (1 - 3 ml cada 6 horas, 4 - 12 ml/día).

Modo de administración: La suspensión puede administrarse sola, con agua, o mezclándola con un líquido o alimento blando que no sea ácido, como leche, miel, jalea, etc. El paciente deberá mantener la suspensión en la boca el mayor tiempo posible (varios minutos) antes de ingerirla. En el caso de lactantes o niños pequeños, se recomienda aplicar la mitad de la dosis sobre cada lado de la boca. Esta posología debe mantenerse durante al menos 48 horas después de la desaparición de los síntomas, con el fin de evitar la recidiva. La suspensión oral no debe utilizarse en el tratamiento de infecciones micóticas sistémicas.

En EEUU y otros países<sup>58</sup>, la Nistatina está indicada para:

- candidiasis intestinal o esofágica:

Dosis orales de 500 000 o 1 000 000 UI, en forma de comprimidos, cápsulas o suspensión, 3 o 4 veces al día.

- Tratamiento de las lesiones de la boca:

Dosis orales de 100 000 UI, en forma de comprimidos o suspensión, 4 veces al día. En EE.UU, se utilizan dosis de la suspensión de 400 000 a 600 000 UI, 4 veces al día. La formulación debe estar en contacto con el área afectada durante el mayor tiempo

posible, y los pacientes deben evitar tomar comida y bebida durante una hora después de cada toma.

- Para el tratamiento de infecciones vaginales, la Nistatina se administra a dosis de 100 000 a 200 000 unidades al día en forma de óvulos o crema vaginal, durante 14 días o más.
- Para lesiones cutáneas, se administra a razón de 100000 unidades/g en forma de pomada, gel, crema o polvo de 2 a 4 veces al día.
- Para la profilaxis de la candidiasis intestinal en pacientes tratados con agentes antibacterianos de amplio espectro, se puede administrar comprimidos a una dosis total 1 000 000 unidades diarias.

Actualmente, se investigan nuevas formulaciones que permitan mejorar la solubilidad y reducir la toxicidad de la Nistatina, buscando el poder administrarla por vía parenteral. En este sentido cabe referenciar la incorporación de Nistatina a emulsiones lipídicas<sup>17</sup> y a una formulación liposomal para uso parenteral (Nyotran®) que se encuentra en fase III de ensayo clínico. Este tipo de preparados han demostrado disminuir la toxicidad de los polienos<sup>92,102</sup>.

### 2.3.3.1. Administración en niños

La Nistatina puede ser administrada por vía oral en lactantes y niños para la prevención y tratamiento de infecciones orofaríngeas y de las mucosas causadas por cepas de *Candida*. También puede ser usada por vía tópica para candidiasis en la piel.

Para niños inmunocomprometidos a partir de un mes de edad, el British National Formulary for children sugiere que como máximo se administren 500 000UI 4 veces al día<sup>103</sup>.

La suspensión oral de Nistatina se usa localmente para el tratamiento de las lesiones orales. Para los lactantes y niños: En el Reino Unido, se recomienda una aplicación de 100 000 UI, cuatro veces al día; en EE.UU., 200 000 UI para lactantes, y entre 400 000 y 600 000 UI para niños, administrado cuatro veces al día. La formulación debe ser mantenida en contacto con las áreas afectadas por el tiempo que sea posible<sup>58</sup>.

Para la profilaxis de infecciones orales en niños nacidos de madres con candidiasis vaginal, se recomienda Nistatina, 100000 unidades, una vez al día.

También se ha estudiado el empleo de Nistatina oral para la prevención de infecciones invasivas por hongos, como la candidiasis, en prematuros o niños de muy bajo peso al nacer, por lo general a dosis de 1 100 000 unidades, 3 veces al día<sup>104</sup>.

#### **2.3.4. Reacciones Adversas**

La Nistatina es generalmente bien tolerada a todas las edades inclusive en niños debilitados o en tratamientos prolongados. No es tóxica ni sensibilizante. Rara vez puede ocurrir irritación y sensibilización; si bien hay que discontinuar el tratamiento si esto ocurre.

Por vía oral a dosis muy altas, se han reportado ocasionalmente náuseas, vómitos, dispepsia, diarrea, irritación o sensibilización oral. En algunos casos, se ha comunicado la aparición de rash, incluyendo urticaria. Muy ocasionalmente, se ha manifestado el síndrome de Stevens-Johnson. También se han notificado casos de hipersensibilidad y angioedema, incluyendo edema facial.<sup>101</sup>

Por vía tópica rara vez se ha comunicado irritación en la zona de aplicación, erupciones, incluyendo urticaria<sup>105</sup>.

#### **2.3.5. Precauciones**

Si se presenta irritación o sensibilización debe suspenderse el tratamiento. Algunas preparaciones intravaginales de Nistatina pueden dañar los anticonceptivos de látex por lo que pueden ser necesarias medidas anticonceptivas alternativas durante el tratamiento<sup>58</sup>.

#### **2.3.6. Contraindicaciones**

La Nistatina está contraindicada en pacientes con historia de hipersensibilidad a cualquiera de sus componentes.

#### **2.3.7. Interacciones**

Se ha reportado una posible interacción entre Nistatina y warfarina. En un estudio retrospectivo<sup>106</sup> se identificaron 8 casos de pacientes crónicos tratados con warfarina

(de 6 a 8 años) y que presentaron hemorragias después de administrarse antifúngico orales, entre ellos suspensión de Nistatina oral durante al menos una semana. A estos pacientes se les tuvo que disminuir la dosis de warfarina en un 40%. Se desconoce el mecanismo de interacción, pues la Nistatina no interfiere con el Citocromo P450. Esta serie de casos parece ser el único informe publicado de esta interacción y dada su naturaleza, no se puede extraer una conclusión definitiva, por lo que se requieren más estudios que corroboren esta interacción y los posibles mecanismos subyacentes. Aun así, se debe tener en cuenta en pacientes que tengan tratamientos concomitantes con estos dos fármacos.

Después de administrar la suspensión de Nistatina, no se deben usar modificadores del tránsito intestinal o cualquier agente que pueda aislar la mucosa del principio activo, ya que puede verse disminuida la acción terapéutica de la Nistatina<sup>101</sup>.

### 2.3.8. Embarazo y lactancia

**Embarazo:** No se han practicado estudios de reproducción en animales con Nistatina. Tampoco se sabe si las preparaciones vaginales pueden causar daño fetal cuando se usa en mujeres embarazadas o si puede afectar la capacidad reproductora. Tanto las preparaciones vaginales como las orales no deben prescribirse durante el embarazo a menos que el beneficio para la madre sea mayor que el riesgo<sup>105</sup>.

**Lactancia:** Se desconoce si la Nistatina se excreta en la leche humana. Aun cuando la absorción gastrointestinal es insignificante se debe tener precaución cuando se utiliza durante la lactancia. Se aconseja observar la posible aparición de eventuales manifestaciones de intolerancia en el recién nacido tales como diarrea o rechazo de la leche materna<sup>101</sup>.

### 2.3.9 Sobredosis

Dosis superiores a 5 millones de UI al día provocan náuseas y molestias gastrointestinales. Dada la escasa absorción de este fármaco la posibilidad de intoxicación, incluso por ingestión accidental, es muy improbable. No obstante, en caso de producirse se debe interrumpir el tratamiento e instaurar la terapia adecuada de acuerdo con la sintomatología<sup>101</sup>.

### 2.3.10. Condiciones de almacenamiento.

La Nistatina se deteriora a causa del calor, la luz, la humedad o el aire<sup>107</sup>.

Nistatina en crema, ungüento, o polvo de uso tópico, comprimidos vaginales y comprimidos recubiertos con película deben almacenarse entre 15-30°C, protegidos del calor excesivo, en un lugar fresco y seco resguardado de la luz<sup>108\*</sup>.

La suspensión oral de Nistatina se debe almacenar en un contenedor sellado, resistente a la luz. El plazo de validez de la suspensión oral, una vez abierto el frasco, es de 7 días a temperatura por debajo de 25°C<sup>101</sup>.

Las suspensiones orales preparadas de forma extemporánea de Nistatina se deben almacenar en un contenedor sellado, resistente a la luz a 2-8°C. La potencia del polvo sólo se puede garantizar hasta por 90 días después de que el recipiente se abra por primera vez; tales suspensiones no contienen un conservante y deben utilizarse inmediatamente después de la preparación, no deben ser almacenadas<sup>108</sup>.

## 2.4. FORMULACIONES DE NISTATINA

Actualmente en España, solo existe una formulación de Nistatina, Mycostatin® suspensión oral (100000 UI/mL).

También se comercializan preparados para uso tópico que combinan corticoides y antibióticos con Nistatina, (Intraderm® crema, Positon® crema y Positon® ungüento)<sup>101</sup>, pero las asociaciones con otros activos no estarían indicadas para el tratamiento de infecciones cuya etiología sea únicamente de tipo fúngico.

En este momento, existen un gran número de estudios que investigan nuevas formulaciones que ayuden a vehiculizar la Nistatina por diferentes vías de administración. Así se pueden encontrar referencias de:

formulaciones para su administración intravenosa con Intralipid®<sup>17</sup>, niosomas<sup>109</sup>, o liposomas<sup>110,111</sup>; formulaciones para tratamiento de candidiasis oro-faríngeas: geles de chitosan<sup>112</sup>, comprimidos<sup>113</sup>, comprimidos mucoadhesivos<sup>114,114,115</sup>, nanoemulsiones<sup>116</sup>; formulaciones para administración intravaginal en excipientes mucoadhesivos<sup>117</sup>.

## 3. Infecciones fúngicas invasivas (IFI)

---

La infección fúngica invasiva se considera una infección de tipo oportunista que afecta casi en exclusiva a pacientes inmunodeprimidos y a pacientes críticos<sup>118-121</sup> con una elevada tasa de morbi-mortalidad<sup>122</sup>, así como un consumo elevado de recursos para su prevención, diagnóstico y tratamiento.

El conocimiento de la patogenia del hongo, así como de la respuesta inmunitaria del huésped frente a la agresión, se postula como una herramienta imprescindible para optimizar el manejo de estas infecciones<sup>123</sup>.

Su incidencia, evolución y pronóstico se ha modificado notablemente en los últimos años; se han puesto en marcha nuevas estrategias terapéuticas basadas sobre todo en nuevos fármacos antifúngicos, más eficaces y mejor tolerados, y se han desarrollado nuevos procedimientos que permiten un diagnóstico precoz de su presencia; aun así se ha visto un incremento en su incidencia y extensión a nuevos grupos de riesgo, ligado al avance en el tratamiento de determinadas patologías. Por ello, se sigue investigando en diferentes frentes a fin de intentar reducir la tendencia de morbi-mortalidad de esta enfermedad.

En la actualidad las infecciones fúngicas invasivas más frecuentes son las causadas por diferentes especies de *Candida* y de *Aspergillus*<sup>118,124</sup>.

La incidencia de candidiasis invasiva oscila entre 8-18% y la mortalidad por esta patología alcanza el 30-40% de los pacientes<sup>125</sup>. La incidencia de aspergilosis invasiva oscila entre 4-15%. La mortalidad atribuible a la misma en pacientes con leucemia llega a ser del 60 al 85%<sup>126</sup>; de ahí la importancia de buscar tratamientos eficaces.

### 3.1. CANDIDIASIS INVASIVA

La candidiasis invasiva engloba dos entidades distintas, la candidemia o invasión limitada al torrente circulatorio y la candidiasis diseminada o infección multiorgánica. La candidemia constituye la 3ª causa de infección del torrente circulatorio en la infección nosocomial (IN) y la 4ª de todas las infecciones<sup>127</sup>. Es asimismo la IFI más frecuente en pacientes críticos no-neutropénicos<sup>128</sup>. Ha experimentado un incremento muy notable en los últimos 20 años. Su incidencia en lactantes es de 38/1.000.000 hab.

La especie más frecuente es *Candida albicans* (40-60%), si bien se detecta actualmente un incremento en la incidencia de otras especies<sup>118,129</sup>: 23% *C. parapsilosis*, 10% *C. tropicalis*, 9% *C. glabrata*, 4% *C. krusei*. La mortalidad global es elevada, llegando a cifras del 44% a los 30 días en determinados grupos que incluyen pacientes pediátricos<sup>127</sup>.

Las especies de *Candida* colonizan las mucosas gastrointestinal, genitourinaria y respiratoria, así como la piel. La transición entre la colonización y la invasión de mucosas o la diseminación de la infección depende mayoritariamente de la respuesta que sea capaz de ofrecer el huésped frente al hongo. Cuando la barrera de la piel o las mucosas se encuentran alteradas, las candidiasis muco-cutáneas pueden pasar al torrente sanguíneo y diseminarse<sup>128</sup>. Otros factores de riesgo importantes que favorecen la diseminación son:

- uso de antibióticos de amplio espectro > 5 d,
- catéter venoso central,
- nutrición parenteral,
- ventilación mecánica > 48 h,
- paciente sometido a UCI,
- pacientes con quemaduras graves, inmunosupresión, corticoterapia, neutropenia, cáncer, cirugía abdominal mayor, pancreatitis aguda, diabetes mellitus<sup>130</sup>.

### 3.2. ASPERGILOSIS INVASIVA

*Aspergillus* sp es un hongo filamentoso de distribución universal, presente en el suelo, aire, agua, plantas y materia orgánica en descomposición. Se conocen unas 900 especies, de las cuales sólo 12 se relacionan con enfermedad humana. Las más frecuentes son *A. fumigatus* (85%), *A. flavus* (5-10%), *A. niger* (2-3%) y *A. terreus* (2-3%)<sup>131</sup>.

La infección se produce como consecuencia de la inhalación de esporas presentes en el aire<sup>132</sup> por lo que la enfermedad afecta muy frecuentemente a pulmones y senos paranasales<sup>133</sup>. Otras formas clínicas de aspergilosis invasiva son la afectación orbitaria, cerebral, cutánea y de tejidos blandos (celular subcutáneo, fascia, músculo e incluso hueso) y formas diseminadas con afectación pulmonar, cerebral, cardíaca,

renal, esplénica y gastrointestinal. Tienen una gran tendencia a invadir los vasos sanguíneos ocasionando trombosis y necrosis isquémica con la consecuente formación de cavidades<sup>134</sup>.

Los pacientes con un mayor riesgo de aspergilosis invasiva son los que padecen leucemia aguda mieloblástica<sup>135</sup> y los receptores de trasplantes de progenitores hematopoyéticos<sup>136</sup> y de órgano sólido<sup>137,138</sup>.

Los principales factores de riesgo son la neutropenia grave (< 500 neutrófilos/mm<sup>3</sup>) y prolongada (> 10 días), la disfunción cualitativa grave de los neutrófilos (enfermedad granulomatosa crónica) y el déficit de inmunidad celular en pacientes que requieren tratamientos inmunosupresores intensos (corticoides, inmunoglobulinas antilinfocíticas, anti-TNF, fludarabina, alemtuzumab)<sup>139</sup>.

PARTE  
EXPERIMENTAL

---

# OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

---

## 4. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

---

Los antibióticos macrólidos polienicos han tenido una creciente incidencia en su empleo debido a la utilización de tratamientos agresivos contra el cáncer, cirugía mayor, pacientes con quemaduras graves, trasplantes de órganos y médula ósea, la utilización de dispositivos médicos permanentes y terapias con fármacos inmunosupresores y la aparición de infecciones asociadas al SIDA<sup>122,140-142</sup>, que pueden conducir al peligro de tener poblaciones propensas a sufrir infecciones oportunistas.

Las infecciones fúngicas invasivas (IFI), son infecciones oportunistas, causada principalmente por *Candida* y *Aspergillus* constituyen una causa importante de morbilidad en pacientes inmunocomprometidos, complican el curso de sus enfermedades y provocan una alta tasa de mortalidad en esta población<sup>143,144</sup>.

La Nistatina presenta una estructura similar y un espectro de acción más amplio que la anfotericina B (AmB), contra *Aspergillus*, *Candidas* y otros hongos<sup>17,145,146</sup>. AmB es otro polieno macrólido que actualmente está aprobado para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas graves y ha sido utilizada como terapia de primera elección para la aspergilosis invasiva. AmB presenta no obstante, efectos secundarios importantes asociados a su administración.

Hasta el momento, La Nistatina no ha sido autorizada para su administración sistémica debido a problemas de toxicidad. Las moléculas de Nistatina tienen una alta capacidad de autoagregación, lo que inhibe su selectividad por el ergosterol y permite que se fijen al colesterol de la membrana celular humana, dada su similitud estructural con el ergosterol de la membrana fúngica, de tal manera que se forman poros en la superficie de la nefrona alterando la permeabilidad de ésta, causando nefrotoxicidad<sup>147</sup>. De ahí la importancia de obtener formulaciones que permitan evitar esa agregación y por ende disminuir su toxicidad.

La estructura molecular de la Nistatina plantea retos adicionales a la hora de realizar una formulación. Es una molécula que a la vez es anfifílica, anfótera<sup>90</sup> y es poco soluble

en la mayoría de medios acuosos, lo que provoca la aparición de incompatibilidades con muchos otros fármacos.

La Nistatina es uno de los medicamentos disponibles que es potencialmente utilizable por vía sistémica, especialmente interesante en razón de su demostrada actividad frente a algunas cepas de *Candida* patógenas resistentes a otros antifúngicos, incluida AmB<sup>143,148\*</sup>. *Candida* es en la actualidad el cuarto patógeno presente en la mayor parte de las infecciones nosocomiales sistémicas<sup>149</sup>. Aunque durante la última década han aparecido nuevos agentes antifúngicos, la terapia de las micosis invasivas sigue siendo problemática, ha aumentado durante la última década y se caracteriza por una tasa de mortalidad significativa. Por lo tanto, son necesarias más investigaciones a fin de desarrollar nuevos fármacos antimicóticos o nuevas formulaciones de medicamentos para combatir estas alarmantes tendencias<sup>149</sup>.

En este momento, existen un gran número de estudios que investigan nuevas formulaciones que ayuden a vehicular la Nistatina para su administración por vía intravenosa, como formulaciones con Intralipid<sup>®</sup>, niosomas y liposomas. Esta última se encuentra en Fase III de ensayo clínico (Niotran<sup>®</sup>).

En este contexto se enmarca el objetivo de la presente memoria, que es el de desarrollar y validar una nueva técnica para producir emulsiones lipídicas inyectables de bajo volumen de inyección, mediante sonicación como única fuente de energía mecánica suministrada al sistema en formación, susceptibles de ser elaboradas a nivel oficial (en servicios de farmacia hospitalaria) que permitan ser empleadas para vehicular de forma farmacotécnica y biofarmacéuticamente aceptable Nistatina, para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas por *Candidas* y *Aspergillus*.

Se exponen a continuación los principales aspectos metodológicos del plan de trabajo realizado:

La primera parte se centra en el diseño de un sistema que permita elaborar un volumen mínimo de 250ml de emulsión lipídica inyectable (ELI), utilizando

exclusivamente ultrasonidos como fuente de energía, con un dispositivo que permita la circulación de la mezcla a emulsionar a través de la sonda de sonicación.

A continuación y con objeto de establecer condiciones de fabricación que conduzcan a la obtención de emulsiones fisicoquímicamente estables se ensayan diferentes parámetros de producción (temperatura de mezclado, tiempo de sonicación, enfriamiento, etc.). En esta fase del trabajo se seleccionan 12 posibles formulaciones que pueden cumplir las especificaciones inicialmente planteadas. Se realiza la caracterización físico-química y la estabilidad a largo plazo de las 12 formulaciones anteriormente mencionadas.

Una vez escogida la formulación más estable, se procede a incorporar el principio activo objeto de estudio (Nistatina). En una primera fase se evalúa la idoneidad de diferentes co-emulgentes que permitan incorporar la Nistatina a la ELI. Se realiza la caracterización físico-química y los estudios de estabilidad a largo plazo de las cuatro formulaciones seleccionadas en esta fase del estudio. Posteriormente, se determina la capacidad de incorporación y estabilidad del fármaco objeto de estudio.

Se evalúa la cinética de liberación del antifúngico desde las formulaciones previamente seleccionadas. Se valora el efecto de los factores que presumiblemente afectan a la liberación *in vivo*: características del medio de liberación, tipo de vehiculización de fármaco, y cantidad de fármaco incorporado.

Por último se realiza un estudio *in vitro* de la eficacia antifúngica de las cuatro formulaciones de Nistatina-ELI para valorar su capacidad fungicida sobre cepas de *Candida albicans* y *Aspergillum fumigatum*.

# MATERIAS PRIMAS

---

# 5. MATERIAS PRIMAS

## 5.1. EXCIPIENTE: EMULSION LIPIDICA INYECTABLE (ELI)

### 5.1.1. Fase Oleosa

#### 5.1.1.1. Aceite de Soja.

**Sinónimos:** BP: soya oil, JP: soybean oil, F. Eur: Sojae oleum, USP: Soybean oil, F. Esp: aceite de soja.

**Fórmula:** un análisis del aceite de soja refinado muestra la siguiente composición de ácidos, presentes como glicéridos<sup>56</sup>:

| Ácidos grasos    | %      |
|------------------|--------|
| Ácido linoléico  | 50-57  |
| Ácido oleico     | 17-26  |
| Ácido linolenico | 5-10   |
| Ácido palmítico  | 9-13   |
| Ácido esteárico  | 3-6    |
| Otros ácidos     | trazas |

**Tabla2. Composición de ácidos grasos presentes en el aceite de soja**

**Categoría:** Solvente; vehículo oleoso

**Descripción:** USP y la Farmacopea Europea describen al aceite de soja como un aceite fijo refinado obtenido del grano de soja *glicina* (leguminosae). Su grano contiene de un 18-20% de aceite. Es un aceite de color amarillo pálido, transparente, inodoro o casi inodoro, insípido que solidifica entre -10 y 16°C.

#### Índices y parámetros característicos

|                             |                                           |
|-----------------------------|-------------------------------------------|
| Temperatura de autoignición | 445°C                                     |
| Densidad                    | 0.9616-0.922g/cm <sup>3</sup> a 25°C      |
| Punto de inflamación        | 228°C                                     |
| Punto de congelación        | -10°C                                     |
| Tensión interfacial         | 50mN/m(dinas/m) a 20°C                    |
| Índice de refracción        | n <sub>D</sub> <sup>25</sup> =1.471-1.475 |
| Tensión superficial         | 25mN/m (dinas/m) a 20°C                   |
| Viscosidad                  | 50.09mPa s a 25°C.                        |

Solubilidad

Prácticamente insoluble en etanol (95%) y agua; miscible con bisulfito de carbono, cloroformo, éter y petróleo fumante.

**Tabla 3. Características fisicoquímicas del aceite de soja**

**Condiciones de almacenamiento y estabilidad:** el aceite de soja es estable si se protege del oxígeno atmosférico, por lo que se recomienda conservarlo bajo atmósfera de nitrógeno, a temperatura  $\leq 25^{\circ}\text{C}$ , en envases herméticos de vidrio topacio y resistentes a la luz.

La estabilidad del aceite de soja emulsionado se ve considerablemente condicionada por los demás componentes de la formulación<sup>150</sup>.

En el presente trabajo se utiliza **Aceite de Soja** purificado y ultrarefinado apto para uso parenteral Karlshmann (representante: Quimigranel), N° de lote: 351

Los resultados analíticos del producto facilitados por el proveedor se exponen en la tabla 4.

| Certificado de Calidad        | Resultado      | Aceptación       |
|-------------------------------|----------------|------------------|
| Identificación                | Conforme       | Conforme         |
| Densidad (a 25°C)             | 0,918g/cc      | 0,916-0,922g/cc  |
| Índice de refracción (a 25°C) | 1,472          | 1,465-1,475      |
| Índice de acidez              | 0              | Máx. 0,28        |
| Índice de peróxidos           | 0              | Máx. 5           |
| Materias insaponificables     | 0,47%          | Máx. 1%          |
| Contenido de agua             | 0,08%          | Máx. 0,3%        |
| Índice de yodo                | 125,0(g/100g)  | 79-128(g/100g)   |
| Índice de saponificación      | 194,8(mgKOH/g) | 180-200(mgKOH/g) |

**Tabla 4. Certificado de calidad del aceite de soja Karlshmann**

### 5.1.1.2. Agente Emulgente

#### 5.1.1.2.1. Lecitinas

**Sinónimos:** lecitina de huevo, mezcla de fosfátidos de soja, ovolectina, lecitina de soja, lecitina vegetal.

**Descripción**<sup>56</sup>: las lecitinas varían en su aspecto físico, y pueden presentarse en forma de líquido viscoso a sólidos pulverizados, dependiendo del contenido y naturaleza de los ácidos grasos libres presentes. El color varía de pardo a amarillo brillante dependiendo de su grado de pureza. Se oxidan rápidamente al exponerse al aire, lo que resulta en un oscurecimiento del color. Las lecitinas son prácticamente inodoras y presentan un ligero sabor a nueces. Sus principales características fisicoquímicas se exponen en la tabla 5.

#### Fórmula estructural

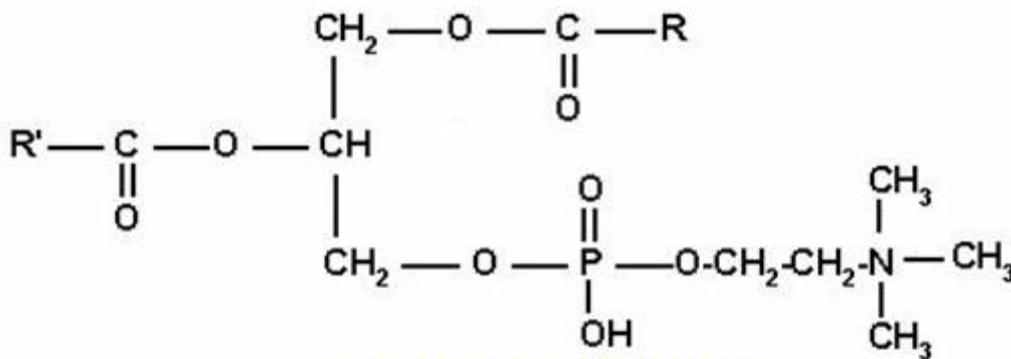


Figura 13. Estructura química de las lecitinas  $14\alpha$ -Fosfatidilcolina. R1 y R2 son ácidos grasos que pueden ser iguales o diferentes.

| Propiedades              | Lecitina líquida                                   | Lecitina en polvo |
|--------------------------|----------------------------------------------------|-------------------|
| Densidad                 | 0.97g/cc                                           | 0.5g/cc           |
| Índice de Iodo           | 95 - 100                                           | 82 - 88           |
| Punto isoeléctrico       | ≈ 3.5                                              | ≈ 3.5             |
| Índice de saponificación | 196                                                | 196               |
| Solubilidad              | Solubles en hidrocarburos alifáticos y aromáticos, |                   |

hidrocarburos halogenados, aceite mineral, y ácidos grasos. Prácticamente insoluble en aceites fríos vegetales o animales, solventes polares y agua.

*Tabla 5. Características fisicoquímicas de la lecitina de soja<sup>56</sup>*

#### **Condiciones de almacenamiento y estabilidad:**

Las lecitinas se descomponen a pH extremos. Son higroscópicas y susceptibles de presentar degradación microbiana.

Cuando se calientan, se oxidan, se oscurecen y se descomponen. Tras aproximadamente 24 horas a temperaturas de 160-180°C se degradan. Deben almacenarse en envases herméticos, protegidas de la luz y la oxidación a temperaturas  $\leq 25^{\circ}\text{C}$ . Cuando se almacenan a temperaturas  $< 10^{\circ}\text{C}$  pueden producirse separaciones. Las lecitinas sólidas deben almacenarse a temperaturas de subcongelación.

#### **Aplicación en formulación o tecnológica farmacéutica.**

Las lecitinas se utilizan en numerosas aplicaciones farmacéuticas, principalmente como dispersantes, agentes emulgentes y estabilizantes y forman parte de preparados inyectables por vía intramuscular e intravenosa, de formulaciones para nutrición parenteral y de productos para uso tópico tales como cremas, pomadas y bases para la preparación de supositorios con el fin de reducir su quebramiento. También se utilizan en cosmética y en la industria de alimentos.

El agente emulgente utilizado en esta memoria es **Lecitina de Soja** purificada (Phospholipon® 90) Natterman Phospholipid GMBH. Rhône –Poulenc Rorer. Código del producto: 228106, N° lote: 31013200

Los resultados analíticos del producto facilitados por el proveedor se exponen en la tabla 6:

| Certificado de Calidad    | Resultado | Aceptación  |
|---------------------------|-----------|-------------|
| Identificación            | Conforme  | Conforme    |
| Etanol residual           | 0.15%     | Máx. 0,5%   |
| Indice de peróxidos       | 2,7       | Max. 5,0    |
| Agua (K. Fisher)          | 0,4%      | Máx. 1.5%   |
| d,l - $\alpha$ -tocoferol | 0,18%     | Min. 0,1%   |
| Fosfatidilcolina          | 93,9%     | 93 $\pm$ 3% |
| lisofosfatidilcolina      | 1,0%      | Máx. 3%     |

**Tabla 6. Certificado de calidad de la lecitina de soja (Phospholipon®90)**

## 5.1.2. Fase Acuosa.

### 5.1.2.1. Agua para inyección

Agua para inyección Mili Q. Obtenida en nuestro laboratorio.

### 5.1.2.2. Isotonizante

Glicerina bidestilada líquida para uso intravenoso. N° Lote 199017, Riqueza: 99,90% (Acofarma).

## 5.2. MATERIA PRIMA PARA INCORPORAR LA NISTATINA EN ELI

### 5.2.1. CO- EMULGENTE

#### 5.2.1.1. SOLUTOL Hs15

Actualmente BASF® ha cambiado su nombre comercial a Kolliphor Hs15.

**Sinonimos:** Macrogol 15 hidroxistearato, polioxil 15 hidroxistearato, Polyethylene glycol-15-hydroxystearate, 2-hydroxyethyl 12-hydroxyoctadecanoate, poly(oxy-1,2-ethanediyl), |A-(12-hydroxy-1-oxooctadecyl)-|O-hydroxy-

Formula Molecular: C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>

Peso Molecular: 344.5292

**Formula estructural:** ver sección 1.2.3.2

**Categoría:** emulgente, tensoactivo no iónico.

**Descripción**<sup>47,151</sup>: Solutol HS 15 está compuesto por ~ 70% de moléculas lipófilas mono y diéster poliglicol del ácido 12-hidroxiesteárico y ~ 30% de moléculas hidrofílicas, en concreto polietilenglicol. Es un polímero derivado del polietilenglicol, producido a partir de 1 mol de ácido 12-hidroxiesteárico y 15 mol de óxido de etileno. Contiene macrogol libre. La apariencia a temperatura ambiente es de pasta amarillenta y cerosa que al calentarla se convierte en un líquido transparente. Es muy soluble en agua, soluble en etanol al 96% e insoluble en parafina líquida. Su solubilidad en agua disminuye con el aumento de la temperatura. Solidifica a 25°C. Se utiliza como un agente solubilizante de fármacos insolubles en agua, en preparados de administración parenteral.

| <b>Propiedades físicas y químicas</b> |                                                                                 |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Estado físico                         | Pastoso                                                                         |
| Olor                                  | casi inodoro                                                                    |
| Color                                 | blanco hasta ligeramente amarillento                                            |
| Valor pH                              | 5 - 7 ( 100 g/l, 20 °C)                                                         |
| Temp. de solidificación               | 25 - 30 °C                                                                      |
| Presión de vapor                      | 0.009 hPa ( 100 °C)                                                             |
| Densidad                              | 1.03 g/cm <sup>3</sup> ( 60 °C) (DIN 51757)<br>1.048 g/cm <sup>3</sup> ( 20 °C) |
| Viscosidad, dinámica                  | 73 mPa.s ( 60 °C) (DIN 53018)                                                   |
| Solubilidad en agua                   | > 200 g/l ( 30 °C)                                                              |

*Tabla 7. Características fisicoquímicas del Solutol Hs15®*

#### **Almacenamiento y estabilidad.**

Guardar en lugar seco en recipientes cerrados herméticamente. Temperatura de almacenamiento: ≤ 25 °C. Evitar temperaturas superiores a 30 °C.

El Solutol Hs15 fue cedido por BASF, para la realización del presente trabajo. Nº de lote: 01351456PO

Los resultados analíticos del producto facilitados por el proveedor se exponen en la tabla 8

| Certificado de Calidad   | Requerimientos             | Resultados |
|--------------------------|----------------------------|------------|
| Apariencia               | Pasta ligeramente amarilla | Conforme   |
| Identificación           | Conforme                   | Conforme   |
| Macrogol libre           | Min: 27, max: 37 g/100g    | 32         |
| pH (100g/L en agua)      | 5 - 7                      | 6.3        |
| Índice de acides         | máximo 1.0 mg KOH/g        | 1          |
| Índice de hidroxilo      | 90 a 110. mg KOH/g         | 96         |
| índice de yodo           | Max 2 g iodo/100g          | 2          |
| Indice de peróxidos      | Max 3 meq/kg               | 3          |
| Índice de saponificación | Min: 53, max: 63 mg KOH/g  | 58         |
| Oxido de etileno         | Max 1 mg/kg                | 1          |
| Metales pesados          | Max 10mg/kg                | 10         |
| Níquel                   | Max 1 mg/kg                | < 1        |
| Dioxano                  | Max 10 mg/kg               | < 1        |
| Agua (K. Fisher)         | Max 0.50                   | 0.11       |
| Punto de congelacion     | Min 22, max 30 °C          | 27         |

*Tabla 8. Certificado de calidad del Solutol Hs15®*

### 5.2.2. PRINCIPIO ACTIVO: NISTATINA

La Nistatina es un polieno con actividad antifúngica, su molécula tiene la polaridad dual de ser anfifílica y anfótera<sup>90</sup> a la vez, lo que dificulta su estabilidad en los vehículos convencionales y su biodisponibilidad a la hora de ser administrada por vía oral, parenteral o tópica, lo que justifica el interés del estudio abordado en la presente memoria.

La Nistatina utilizada fue proporcionada por Fagron Iberica (Spain) N° de lote: 11J12-B01, riqueza: 5946 UI/mg. Los resultados analíticos del producto facilitados por el proveedor se exponen en la tabla 9:

| ENSAYOS                | ESPECIFICACIONES               | RESULTADOS |
|------------------------|--------------------------------|------------|
| Identificación         | B, E                           | Conforme   |
| Pérdida por desecación | < 5.0 %                        | 3,4 %      |
| Riqueza                | >4400 UI/mg                    | 5946 UI/mg |
| Metales pesados        | < 20 ppm                       | < 20 ppm   |
| Cenizas sulfúricas     | < 3.5 %                        | 1,0 %      |
| Absorbancia 305 nm:    | > 0.60                         | 0,74       |
| Composición            | Test Ph.Eur.                   | Conforme   |
| Disolventes residuales | Test Ph.Eur.                   | Conforme   |
| Toxicidad anormal      | (Para admón. oral)<br>Positiva | Conforme   |

**Tabla 9. Certificado de calidad de la Nistatina (ref: KEUR-78017)**

# MÉTODOS

---

# 6. Métodos

---

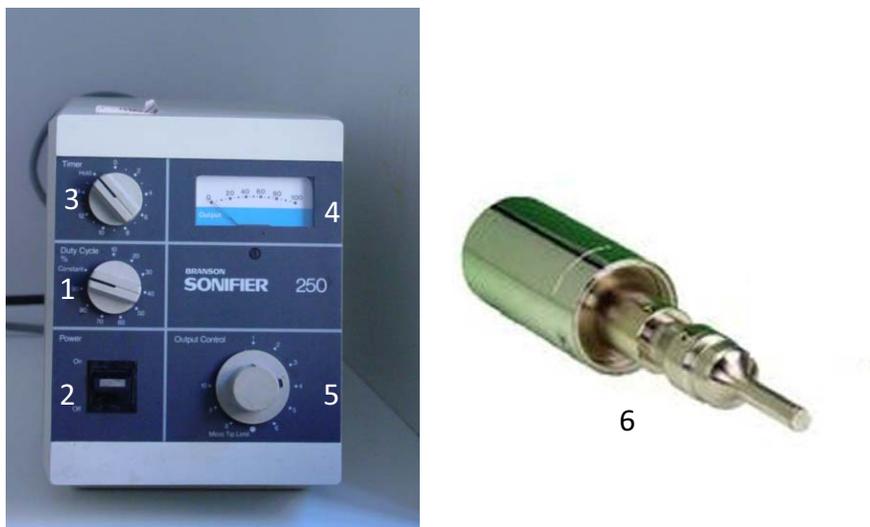
## 6.1. METODOS PREPARATIVOS

### 6.1.1. Diseño del sistema de trabajo

#### 6.1.1.1. Utillaje

##### 5.1.1.1.1. Equipo de Ultrasonidos.

Sonifier<sup>®</sup> 250 (Branson Ultrasonic Corporation; Analab S.A) Está integrado por un generador de ultrasonidos, un convertidor de energía y una sonda de titanio (figura 14). La potencia máxima del equipo es de 250W<sup>152</sup>.



*Figura 14. Fotografía del equipo de ultrasonidos*

El sistema de ultrasonidos permite graduar diferentes funciones:

**1. Funciones de Ciclo:** regula la energía aplicada en una pulsación. La duración de la pulsación se puede ajustar entre 0,1 y 0,9 segundos. Dispone además, de una posición “constant” (aplicación constante y continua de la energía de sonicación).

**2. Interruptor:** interruptor de corriente on/off

**3. Tiempo:** temporizador de aplicación de ultrasonidos, con una escala de 0 a 15 minutos, y una posición “hold”, donde se puede aplicar ultrasonido durante el tiempo que se requiera (forma manual).

**4. Indicador de carga:** indica el porcentaje de energía eléctrica que utiliza el convertidor de energía, para producir fuerza ultrasónica, emitida en forma de vibración mecánica. Este equipo tiene un aprovechamiento del 95% de la energía. (Según catálogo del fabricante).

**5. Control de rendimiento:** indica la cantidad de energía que se imprime al sistema a través de la amplitud de la vibración ultrasónica. Posee una escala de 1 a 10, que puede correlacionarse con la potencia en Watts. La posición 1 de la escala se equipara a 55W, y la 10 a 180W.

**6. Sonda de titanio:** tiene un diámetro de 12.5 mm y está constituida por una aleación no contaminante de titanio (ref. EDP 101-147-056).

#### **6.1.1.1.2. Bomba Peristáltica.**

Dinka modelo D-25V, serie N.3001.

#### **6.1.1.1.3. Placa de Calefacción y Agitación.**

Agimatic-E. P-selecta. Características: Motor con capacidad de 1600 rpm.

Calefacción con capacidad de 50 a 350°C.

#### **6.1.1.1.4. Autoclave Eléctrico de Vapor:**

Microclave (P selecta) cod. 4000477. Características:

Permite la esterilización desde 105 a 134°C.

Capacidad de 7 litros.

Provisto de temporizador de 0 a 120 minutos.

Presión de 0 a 2 kg/cm<sup>2</sup> 24

#### **6.1.1.1.5. Sistema de purificación de agua:**

Equipo Milli Q<sup>®</sup> Millipore. Características: 2-18MΩ · cm ó 0,5 – 0,05μS a 25°C.

#### **6.1.1.1.6. Reactor**

Reactor cilíndrico de vidrio Pyrex,(Anorsa SL, Barcelona).

Especificaciones: reactor de 2L de capacidad. Diámetro base: 11cm; altura total: 17cm.

#### **6.1.1.1.7. Otros Materiales**

Tapón elastomérico de 11cm.

3 mangueras de silicona de 1cm de diámetro y 12, 15 y 17cm de largo respectivamente

Balanza monoplato Mettler PJ 300 (sensibilidad  $300 \pm 1g$ ).

Balanza monoplato Mettler Toledo AB104 (sensibilidad  $100 \pm 0,1mg$ ).

Termómetro digital de  $770^{\circ}C$  (Temperatura máxima).

Baño de metacrilato.

### 6.1.1.2. Formulación del excipiente

La formulación de partida que se utiliza para la realización de la presente memoria, es la que se optimizó en un estudio previo<sup>8</sup> (ver tabla 10).

| Sustancia                         | Proporción |
|-----------------------------------|------------|
| Aceite de soja purificado         | 20%        |
| Lecitina de Soja ultra purificada | 2.0%       |
| Glicerina bidestilada             | 2,5%       |
| Agua p.i. c.s.p.                  | 250ml.     |

**Tabla 10. Fórmula de Emulsión lipídica inyectable utilizada en este estudio.**

### 6.1.1.3. Diseño del sistema de trabajo

Se plantea diseñar un sistema de trabajo que permita elaborar lotes de emulsión de volúmenes superiores a 100ml, cantidad máxima que, hasta el momento, se había elaborado con esta técnica<sup>12</sup>. Se propone un circuito cerrado que permita recircular el líquido del sistema (emulsión en formación) mediante una bomba peristáltica. En su recorrido, éste pasa a través de la sonda de ultrasonido las veces que sean necesarias hasta obtener una emulsión homogénea. El sistema debe permitir controlar la temperatura y agitación del proceso, además de ser hermético y no desprender partículas.

Se estudian diferentes parámetros relacionados con el correcto funcionamiento del sistema:

- Flujo de circulación del líquido.
- Hermeticidad.
- Altura y posición de la sonda de sonicación en el punto de trabajo.
- Facilidad para la limpieza del montaje.

#### 6.1.1.4. Ensayos preliminares de las condiciones de fabricación

Tras diseñar un sistema que permite aplicar la energía de sonicación requerida por la mezcla inicial de componentes de la emulsión, se aborda el planteamiento de las condiciones experimentales, que permitan reproducir las condiciones establecidas en el trabajo previo.<sup>8</sup> Para ello se realizan los siguientes ensayos:

##### 6.1.1.4.1. Análisis de la temperatura de mezclado de las fases

Se determina la temperatura a la que deben mezclarse las dos fases de la emulsión que permita realizar la emulsificación adecuadamente y obtener emulsiones tipo ELL, teniendo en cuenta que existe una pérdida de calor por parte del sistema de recirculación durante el proceso. Se ensayan las siguientes temperaturas de mezclado: 75, 80, 85, 90, 100°C. realizando en todos los casos triplicados de los diferentes ensayos.

El método de elaboración de estas emulsiones es el siguiente:

**Fase oleosa:** el aceite de soja ( $50\text{g} \pm 0.5$ ), se calienta en el reactor mediante placa calefactora hasta 110°C. Se adiciona a continuación la lecitina de soja ( $5\text{g} \pm 0.1$ ) y se agita el conjunto a 700rpm. El proceso de fusión dura aproximadamente 1 hora. Cuando la lecitina ha fundido totalmente, la fase oleosa se lleva, en cada caso, a la temperatura de mezclado a ensayar (75, 80, 85, 90 o 100°C, respectivamente).

**Fase acuosa:** Se calientan aproximadamente 200ml de agua, en un vaso de precipitados de 500ml de capacidad, sobre placa calefactora hasta la temperatura a ensayar (75, 80, 85, 90, 100°C.). Se añaden a continuación 6.25g de glicerina.

Cuando las dos fases están a la temperatura objeto de ensayo, se adiciona la fase acuosa sobre la fase oleosa en el reactor, se realiza una premezcla mediante agitador magnético, se cierra el reactor, y se conecta la bomba peristáltica que hace circular la mezcla a través del sistema.

Se observa que no haya aire en el circuito, (aprox. 1 minuto) y finalmente se conecta el equipo de ultrasonidos.

El sistema pierde calor hasta estabilizarse a una temperatura determinada (ver tabla 1), en aproximadamente 2 minutos, por lo que debe proseguirse el aporte externo de calor con el fin de mantener dicha temperatura.

Simultáneamente, se programan 20 minutos de sonicación; este valor se toma de forma arbitraria, intentando simular las condiciones de elaboración del estudio<sup>8</sup> inicial. Se establece además una potencia de 80W; dicha potencia se escoge de forma arbitraria, debido a que según las especificaciones del fabricante el equipo tiene una capacidad máxima real de 160W, por lo que se programa una potencia intermedia. Cuando se cumple el tiempo de sonicación, se procede a enfriar la muestra por lo que se cambia el reactor de la placa calefactora y se sumerge en un baño de metacrilato con hielo hasta alcanzar una temperatura final de 25°C.

#### **6.1.1.4.2. Condiciones preliminares de sonicación**

Las condiciones en que se preparan estas emulsiones son:

- Temperatura de mezclado: 90°C.
- Temperatura de emulsificación:  $74 \pm 1$ °C.
- Tiempo de aplicación de energía de ultrasonidos: 20 minutos.
- Potencia de sonicación : 80W de potencia.

Los ensayos se realizan por triplicado.

#### **6.1.1.4.3. Enfriamiento**

Se analizan las condiciones de esta fase del proceso con objeto de poder fijar dos protocolos de trabajo diferentes y estudiar la posible influencia de este factor en la calidad de los productos elaborados. Las condiciones de trabajo estudiadas fueron las siguientes:

- 1) a temperatura ambiente.
- 2) en baño de Maria (BM) a 10°C, 15 y 25°C.
- 3) en baño con hielo.

#### **6.1.1.4.4. Aplicación de ultrasonidos durante el enfriamiento**

Se estudió la posible influencia del aporte de energía de sonicación a las muestras durante la fase de enfriamiento de las mismas. A este respecto, se ensayan procesos

de enfriamiento sin aplicación de potencia y de enfriamiento con una potencia inferior a la que se aplica para emulsificar (65W, tomados arbitrariamente, intentando una vez más, reproducir las condiciones de trabajo del estudio anterior) <sup>8</sup>.

#### 6.1.1.4.5. Análisis del tiempo de sonicación

Se estudia la posible influencia del tiempo de sonicación (potencia constante: 80W) en las características finales de las emulsiones elaboradas.

Así, se preparan muestras aplicando 10, 20 y 30 minutos de sonicación. Tras lo que se procede a enfriar muestras respectivamente con los dos tipos de enfriamiento anteriormente descritos: en BM con hielo (enfriamiento rápido) o en BM con agua a 10°C (enfriamiento lento) hasta que se alcanza una temperatura final de 25°C. (2 series de productos).

### 6.1.2. OPTIMIZACION DEL EXCIPIENTE

Una vez establecido el diseño del sistema de trabajo, se procede a optimizar las condiciones de fabricación de las ELI.

#### 6.1.2.1. Ustillaje

En esta parte del estudio se utilizan los mismos equipos y materiales expuestos en la sección 6.1.1.1.

#### 6.1.2.2. Método De Preparación De Emulsiones

En los estudios preliminares (sección 6.1.1.4) se establecieron variables básicas que permiten tener un punto de partida para elaborar ELI de características farmacotécnicas relativamente aceptables. El siguiente paso consiste en optimizar dichas condiciones de fabricación y poder evaluar las características fisicoquímicas y de estabilidad de las emulsiones resultantes.

**Fase oleosa:** el aceite de soja (50g  $\pm$  0.5), se calienta en el reactor mediante placa calefactora hasta 110°C, se adiciona entonces la lecitina de soja (5g  $\pm$  0.1) y se agita a 700rpm (Agimatic-E. P-selecta). El proceso de fusión dura aproximadamente 1 hora. Cuando la lecitina ha fundido totalmente, la fase oleosa se lleva a la temperatura de mezclado (90°C $\pm$ 2°C).

**Fase acuosa:** 200ml de agua p.i. situados en un vaso de precipitados de 500ml de capacidad se calientan sobre placa calefactora a  $90^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Sobre ella, se incorporan a continuación 6.25g de glicerina.

**Homogenización/emulsificación:** Cuando ambas fases alcanzan la temperatura de mezclado establecida, se vierte la fase acuosa sobre la fase oleosa en el reactor, se realiza una pre-mezcla mediante agitación magnética, se cierra el reactor y se conecta la bomba peristáltica, que hace circular la mezcla a través del sistema manteniendo la agitación y el calor. Se observa que no haya aire en el circuito, (aprox. 1 minuto) y se conecta el equipo de ultrasonidos. El sistema pierde calor hasta estabilizarse a  $75^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  en aproximadamente 2 minutos; a partir de este momento se prosigue el calentamiento con el fin de mantener dicha temperatura.

**Enfriamiento:** Cuando se cumple el tiempo de sonicación previsto en cada caso, se procede a enfriar la muestra. Para ello se retira el reactor de la placa calefactora, se sumerge en un baño de metacrilato con hielo durante 20 minutos, y mediante el sonicador se aplica energía (65W) hasta alcanzar la muestra una temperatura final de  $25^{\circ}\text{C}$ . El proceso total de obtención de la emulsión dura aproximadamente 90 min.

**Autoclavado:** Se toma un volumen de 125 ml (fracción B) de cada una de las emulsiones y se somete a esterilización por autoclave, 24 horas después de su elaboración, con objeto de ver si resisten dicho proceso (condiciones de trabajo: presión de  $1,2 \text{ Kg/cm}^2$ ,  $121^{\circ}\text{C}$  durante 30 min)

Las fracciones autoclavadas (fracción B) se someten a los mismos análisis que las correspondientes fracciones no esterilizadas (fracción A) de cada una de las formulas elaboradas.

### 6.1.2.3. Análisis de las condiciones de fabricación

Se estudian diferentes parámetros de elaboración:

#### 6.1.2.3.1. Potencia de sonicación

Hasta el momento, todas las emulsiones objeto de estudio se han elaborado por aplicación de una potencia de 80W. En lo que sigue se ensaya la emulsificación aplicando una potencia superior afín de poder evaluar su impacto en la estabilidad y

características de las emulsiones resultantes. Así, se preparan emulsiones con potencia de sonicación de 80 y 120w.

#### ***6.1.2.3.2. Tiempo de sonicación***

Se estudia la posible influencia del tiempo de sonicación en las características fisicoquímicas de la emulsión final; para ello se incrementa el valor de dicho parámetro, y en paralelo, se estudia la posible correlación entre ambas variables y la potencia de sonicación aplicada en lo que respecta a las características finales de las emulsiones.

Los tiempos de sonicación estudiados son 30 y 50 min.

#### ***6.1.2.3.3. Efecto de la neutralización***

Se estudiaron tres condiciones operativas diferentes en relación a la neutralización con objeto de observar la posible influencia de dicho tratamiento en el tamaño de gota y la estabilidad de las emulsiones objeto de estudio:

Neutralización con NaOH 0,1M durante la fabricación (adición de NaOH 0,1M a la fase acuosa hasta pH final  $7,5 \pm 0,2$ )

Neutralización con NaOH 0,1M después de la fabricación (pH final  $7,5 \pm 0,2$ )

No neutralización (pH aprox.: 4,5).

#### ***6.1.2.3.4. Esterilización por autoclavado***

24 horas después de la elaboración de las emulsiones, se toma un volumen de 125 ml y se someten a esterilización en autoclave (Microclave P®, de Selecta) durante 30 min a  $121^{\circ}\text{C}$  y  $1,2 \text{ Kg/cm}^2$ , con objeto de evaluar si resisten dicho proceso, obligatorio en la práctica, dado que se trata de modelos de emulsiones para administración parenteral. Alícuotas autoclavadas se comparan a otras no sometidas al proceso de esterilización, del mismo lote de elaboración.

#### ***6.1.2.3.5. Estabilidad física en función del tiempo***

La finalidad de este control es determinar la estabilidad física de las diferentes muestras ensayadas a diferentes temperaturas de almacenamiento mediante examen regular de los parámetros fisicoquímicos.

## Utillaje

Nevera marca LG para las muestras a  $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Estufa Heraeus Modelo B 5042E para las muestras a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

## Muestras

Se toman muestras de las fracciones autoclavadas y no autoclavadas de cada una de las emulsiones elaboradas y se acondicionan en viales de vidrio transparente a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  y a  $4^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$  respectivamente. Se realiza un examen visual, se analiza el tamaño de partícula, índice de polidispersidad, pH, potencial Z y  $\text{LD}_{99}$  de las emulsiones recién elaboradas ( $t_0$ ) y cada semana durante los 3 primeros meses, y posteriormente a los 6, 9 y 12 meses. Todas las determinaciones se realizan por triplicado.

Las condiciones del estudio corresponden a las descritas en las ICH Guidelines<sup>153</sup> para este tipo de producto terminado. Los datos experimentales obtenidos, se someten a un estudio estadístico multifactorial de la varianza (M-ANOVA) (ver sección 6.3.2.)

La ELI optimizada se compara con una emulsión comercial disponible en el mercado, Intralipid® 20% (Pharmacia, Barcelona, España), utilizada en nutrición parenteral. Se escogió este preparado pues su formulación (20% aceite de soja, 1.2% fosfolípidos de yema de huevo, 2.25% glicerina, y agua para inyección) es la más parecida a la ensayada en este estudio.

### 6.1.3. ESTUDIO DE PREFORMULACIÓN

Una vez optimizada la emulsión lipídica inyectable que se va a utilizar como vehículo, se realiza un estudio de preformulación con objeto de determinar la técnica de incorporación más adecuada de la Nistatina al vehículo.

En este sentido se propone la incorporación de la Nistatina en el vehículo emulsión en dos momentos diferentes:

#### 6.1.3.1. Incorporación de NYS durante el proceso de formación del vehículo emulsión

Se incorpora la Nistatina a la fase oleosa de ELI, justo antes de mezclar las dos fases y elaborar la emulsión. El inconveniente de este método es saber si la Nistatina sufre

algún proceso de degradación dada la elevada temperatura de mezclado de las fases (90°C).

Se pesa 1mg/ml de Nistatina (dosis final de la NYS-ELI) y se incorpora a la fase oleosa de la emulsión, una vez esté totalmente fundida la lecitina de soja. La fase oleosa con la Nistatina se lleva a la temperatura de mezclado de fases, se incorpora la fase acuosa, se cierra el sistema y se procede a elaborar la emulsión según procedimiento descrito en 6.1.2.2.

#### **6.1.3.2. Incorporación en frío de NYS sobre el vehículo previamente preparado**

Se incorpora la Nistatina 24 horas después de elaborado el vehículo emulsión (ELI). Para este fin, se hace necesario un co-emulgente compatible con la Nistatina y que aporte estabilidad al sistema. En este sentido se realiza un estudio bibliográfico de una selección de 3 co-emulgentes<sup>52</sup> de entre los más habitualmente empleados en la formulación de preparados de administración por vía parenteral.

Tween 80 (HLB: 15)

Cremophor EL o ELP (HLB: 12 a 14)

Solutol Hs15 (HLB: 14 a 16)

### **6.1.4. ELABORACION DE FORMULACIONES NYS-ELI**

#### **6.1.4.1. Formulación**

##### **6.1.4.1.1. Concentración de principio activo**

Se preparan emulsiones lipídicas inyectables con 1mg/ml de Nistatina. Recientes estudios demuestran que esta concentración es lo suficientemente efectiva para el tratamiento de las micosis sistémicas objeto del presente trabajo.

##### **6.1.4.1.2. Concentración de co-emulgente**

Una vez seleccionado el co-emulgente, (Solutol<sup>®</sup> Hs15) se procede a ensayar diferentes concentraciones del mismo, teniendo en cuenta que ELI ya incorpora un primer emulgente, en este caso la lecitina de soja.

Se decidió ensayar dos diferentes concentraciones, al 2 y al 4%.

#### **6.1.4.1.3. Concentración de fase oleosa**

La estructura química (ver figura 7) y el carácter anfifílico de la Nistatina, sugieren que teóricamente, en un sistema o/w, el fármaco tendrá más afinidad por la fase oleosa que por la acuosa, y en gran parte se unirá al emulgente<sup>90</sup>.

De acuerdo con las anteriores premisas, estudia la posibilidad de incrementar el porcentaje de fase oleosa, con objeto de determinar la posible influencia de dicho cambio en la estabilidad de la Nistatina en la emulsión. En este sentido se elabora ELI con un 30% de fase oleosa, del mismo modo que la ELI al 20% optimizada (ver sección 6.1.2.2.).

#### **6.1.4.2. Proceso de elaboración de las formulaciones NYS-ELI**

##### **6.1.4.2.1. Ustillaje**

Además de los equipos y materiales descritos en la sección 4.1.1.1. se utiliza un agitador de turbina Ultra-Turrax T-50 (Jahnke & Kunkel, Staufen, Germany)

##### **6.1.4.2.2. Protocolo de trabajo**

Una vez preparado el vehículo (ELI), se procede a incorporar la Nistatina con ayuda de un co-emulgente, en frío, según se especifica a continuación:

En un vaso de precipitados, se pesa la cantidad de co-emulgente correspondiente a los diferentes ensayos programados (2% o 4% de Solutol HS15, respectivamente) y se funde a 30°C. Se añade 1mg/ml de Nistatina y se mezcla con Ultra-Turrax a 10000 rpm durante 5 min, manteniendo la temperatura a 25 °C con ayuda de un baño con hielo a fin de evitar la degradación de la Nistatina por efecto de la temperatura, dado que ésta es termolábil<sup>47</sup>.

Se incorporan 100g de ELI (al 20% o al 30% w/w de fase oleosa, respectivamente) a la mezcla y se mantiene bajo agitación con el Ultra-turrax durante 15 min más a la misma velocidad.

La mezcla NYS-ELI-Solutol HS15 se traspara al reactor, se incorpora el resto de vehículo hasta un volumen final de 250g y se procede a sonicar en circuito cerrado durante 1 h a 80W.

En total, se elaboran 4 NYS-ELI diferentes.

| Formulación | % aceite | % coemulgente |
|-------------|----------|---------------|
| NYS-ELI 1   | 20       | 2             |
| NYS-ELI 2   | 20       | 4             |
| NYS-ELI 3   | 30       | 2             |
| NYS-ELI 4   | 30       | 4             |

**Tabla 12. Composición NYS-ELI. Aceite: aceite de soja; co-emulgente: Solutol HS15**

## **6.2. MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **6.2.1. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE ELI**

#### **6.2.1.1. Muestras**

El volumen final de todas las emulsiones obtenidas (250 g) se divide en 2 fracciones (A y B de 125 g cada una). La fracción B se esteriliza por autoclavado (ver sección 4.1.2.3.4).

De cada fracción, se preparan muestras de 5 ml cada una, acondicionadas en viales de vidrio (tipo 1) de 10 ml de capacidad, se cierran con un tapón elastomérico y se capsulan. Estas muestras se almacenan a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  respectivamente.

El resto de producto de ambas fracciones (A y B) se conserva en viales herméticos de vidrio (tipo1) de 150 ml de capacidad resguardados de la luz, a temperatura ambiente, a efectos de control.

Las diferentes muestras se destinan a la realización de los siguientes controles, que se llevan a cabo por triplicado.

#### **6.2.1.2. Examen Visual**

Los diferentes viales se sitúan frente a una fuente de luz blanca. Se observa y valora si la muestra es homogénea y/o si presenta cremado, floculación o glóbulos de grasa en superficie. Así mismo, se observa si las paredes del vial permanecen transparentes al movimiento de la emulsión o si esta deja residuos adheridos. Este examen se realiza justo al terminar el acondicionamiento de cada emulsión, recién elaborada (aprox. al cabo de 1h). Las diferentes muestras situadas tanto en estufa a  $30^\circ\text{C}$ , como en nevera  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ , son objeto de dicho examen visual cada 7 días hasta que se observa algún signo de inestabilidad.

#### **6.2.1.3. Medida del pH**

##### **6.2.1.3.1. Utillaje**

pHmetro Crison micro pH 2000.

### **6.2.1.3.2. Método**

El pH se determina por lectura directa en los viales de las muestras. Este examen se realiza por triplicado en la muestra de emulsión recién elaborada (fracción A y B) y en el estudio de estabilidad física en función del tiempo (a 3, 6, 9 y 12 meses).

El procedimiento para la determinación del pH en las diferentes muestras es el siguiente:

Se conecta el aparato y se deja estabilizar durante 10 minutos.

Se calibra el aparato utilizando las soluciones patrón, tampones de pH 4 y 7,2 respectivamente, extraídos previamente de la nevera.

Se limpia el electrodo con agua destilada y se procede a realizar las lecturas, sumergiendo el electrodo dentro del vial con la muestra problema.

Una vez estabilizada la lectura de la muestra, se anota el resultado en la correspondiente guía, el electrodo se enjuaga con abundante agua destilada y se seca con papel de celulosa. El electrodo se sumerge finalmente en una solución de KCl 3M (forma de mantenerlo entre determinaciones).

Este parámetro es importante, debido a que un posible descenso del pH durante el almacenamiento de las emulsiones lipídicas puede ser un signo de inestabilidad. Valores de pH inferiores a 5 pueden provocar una reducción de la repulsión electrostática entre las partículas lipídicas, y por tanto un aumento en el tamaño de partícula, por coalescencia entre ellas. La esterilización por autoclave provoca un descenso del pH, por liberación de ácidos grasos por lo que se recomienda ajustar el pH a valores alcalinos (aprox. 8.0) para que después de la esterilización se obtenga un pH entre 6 y 7<sup>154</sup>.

### **6.2.1.4. Análisis de la distribución del tamaño de partícula**

#### **6.2.1.4.1. Utillaje**

Espectrómetro de Correlación Fotónica (PCS): Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

Difracción láser (LDA): Beckman Coulter LS 13 320

#### 6.2.1.4.2. Métodos de análisis de tamaño de partícula

Dado que la emulsión que se desea formular debe reunir una serie de características que la hagan apta para su empleo por vía Intravenosa (IV), este parámetro es determinante, en razón del riesgo potencial de producir tromboembolismo, si en la población analizada se detectan gotas de diámetro  $> 5\mu\text{m}$ , aun cuando su aspecto visual sea correcto. Este último parámetro se determina 24h después de elaborada la emulsión. Así mismo, se inspecciona en las muestras situadas en la estufa a  $30^{\circ}\text{C}$  y en nevera  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ , una vez cada mes hasta que se observe algún signo de inestabilidad.

En el presente trabajo, se utilizan dos técnicas diferentes con objeto de afinar al máximo los resultados de este parámetro que como se ha indicado anteriormente, resulta crítico a nivel de valoración de la estabilidad de este tipo de preparaciones.

##### 6.2.1.4.3.1. Espectrometría de Correlación Fotónica (PCS)

La técnica utilizada para la medida del tamaño de gota es la espectrometría de correlación fotónica (PCS, de sus siglas en ingles) que permite determinar partículas que se encuentran en un intervalo comprendido entre  $0,003$  y  $3\mu\text{m}$ .

El equipo de PCS consta de una fuente de radiación láser, una celda termostatazada, un tubo fotomultiplicador que actúa como detector y el correlador 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, respecto a la radiación incidente<sup>155</sup>.



Figura 15. Equipo Malvern Zetasizer<sup>156</sup>.

### Muestra

La muestra se prepara como sigue: se toma una gota de la emulsión con un capilar y se sitúa en una cubeta de precisión de cuarzo tipo 101-QS. Se diluye con agua destilada Milli Q, para reducir la opalescencia, hasta alcanzar una dilución óptima (lo indica el aparato). Los resultados se expresan en función del diámetro medio de las gotículas y la polidispersidad de la muestra.

### Método

El análisis en el Zetasizer se ha realizado según el siguiente protocolo:

Se conecta el Zetasizer y el ordenador asociado al equipo.

En el software del ZetaSizer se selecciona el modo “size” para la determinación del tamaño de gota.

Se prepara la muestra en la celda de cuarzo tipo 101-QS.

Se introduce la celda en el cubículo indicado para ello el ZetaSizer, se rotula la muestra en el software con el nombre, número de análisis, así como las condiciones de temperatura (25°C) y el tipo de celda utilizado, y se procede a la lectura de la muestra por triplicado.

Se registra el resultado de la lectura.

El programa informático procesa los datos obtenidos, y entre otra información nos proporciona gráficas de intensidad (Intensity %) versus tamaño de gota (diameter-nm) de las muestras analizadas. Esta información es útil para tener una idea clara de las características de la emulsión.

La técnica PCS analiza el tamaño de gotícula (Zave en nm) y calcula el índice de polidispersidad (PI) de la muestra, parámetro utilizado para determinar si el tamaño de las gotículas sigue o no una distribución monomodal; sus cuyos valores se hallan acotados entre 0 para un tamaño de gota homogéneo y 1 para un sistema completamente disperso.<sup>157</sup> Valores de  $PI \leq 0,250$  son aceptables para las ELI.<sup>158</sup>

#### **6.2.1.4.3.2. Difracción Laser (LDA)**

Las gotículas de mayor tamaño (rango de 0,04 a 2000µm) se detectan por análisis de difracción láser (LDA) (Beckman Coulter LS 13 320). Este aparato, incorpora además una tecnología complementaria de dispersión de luz denominada PIDS (Polarization Intensity Differential Scattering) para el rango submicrométrico. El sistema PIDS se

basa en la medida de la dispersión de luz polarizada vertical y horizontalmente a 3 longitudes de onda diferentes, 450 nm, 600 nm y 900 nm, con detección a 6 ángulos.



*Figura 16. Equipo Beckman Coulter LS 13 320<sup>159</sup>.*

La información proporcionada por el sistema procede de la diferencia de dispersión de luz polarizada verticalmente y horizontalmente, no del valor absoluto.

#### Muestra

En esencia, la muestra dispersada en agua p.i., es iluminada por un haz de luz láser de una determinada longitud de onda. Las partículas dispersan la luz con un patrón de difracción frente al ángulo que depende de su tamaño. El patrón de difracción se mide mediante detectores de luz situados a diferentes ángulos, y a partir de él se infiere una distribución de tamaños de gota en la muestra.

Las diferentes muestras de emulsiones analizadas fueron caracterizadas por el diámetro expresado en volumen LD<sub>99</sub>. Este parámetro indica que el 99% de las partículas medidas poseen un diámetro inferior al valor dado.

#### Método

El análisis LDA se ha realiza según el siguiente protocolo:

Se conecta el Beckman Coulter LDA y el ordenador asociado al equipo.

En el software del LDA se selecciona el modulo óptico y se escoge el ciclo a ejecutar (cicle run), en concreto en este caso:

**Auto aclarado (auto rinse):** de este modo el aparato se limpia automáticamente tras cada medición.

**Compensación de la medida (Measure offsets):** este paso permite que, con el laser apagado, se pueda medir un blanco, que es el medio de dispersión sin muestra. En este caso es agua p.i.

**Alinear (Aling):** Durante este paso, el haz de luz del láser se alinea automáticamente dentro de 1-2 micras en el centro de la matriz de detectores en los ejes horizontal y vertical, para medir con precisión la intensidad de la luz como una función del ángulo de dispersión.

**Medida del fondo (Measure background):** en este paso, se miden los niveles de intensidad de luz recibida por los detectores sin ninguna muestra en el sistema, y luego se resta de la medición. Este procedimiento elimina la señal de aberraciones de cualquier fuga de luz o la dispersión del polvo en las lentes o cualquier otra partículas presente en el modulo óptico. El fondo siempre debe ser medido antes de añadir muestra al sistema.

Luego se prepara la muestra en la celda y se introduce ésta en el aparato.

**Medida de carga (Measure Loading):** Esta función mide la cantidad de luz dispersada fuera del haz por las partículas con el fin de determinar una concentración apropiada de la muestra. Si la concentración de la muestra es suficiente, proporciona una señal aceptable del nivel de ruido en los canales del detector, pero si hay demasiadas partículas, la luz ya dispersada por una gota es probable que se solape en otra partícula, desdibujando la intensidad de la luz patrón lo que puede dar lugar a errores de medición.

Una vez que el grado de dilución la muestra es adecuado para realizar las determinaciones se selecciona la opción de información de la muestra (sample info) y se rotula la muestra en el software con el nombre, numero de análisis, así como las condiciones de temperatura (25°C) y el tipo de medio utilizado.

En Run setting, se configura el tiempo de ejecución de las lecturas, que generalmente es de 60 segundos. Por último, Se escoge el modelo óptico que seguirán las mediciones. Las muestras a analizar son translúcidas y ligeramente coloreadas, según las instrucciones del aparato, el modelo óptico debe estar en el rango de 0,01 a 0,1. Finalmente, se procede a la lectura de la muestra por triplicado.

### 6.2.1.5. Determinación del potencial Z (PZ)

El potencial zeta es una medida de la magnitud de la repulsión o la atracción electrostática entre partículas adyacentes, cargadas de manera similar en una dispersión. Si todas las partículas presentes en el sistema tienen un valor de potencial zeta alto, sea negativo o positivo, tenderán a repelerse entre sí, resistiéndose a la agregación, por lo que el sistema es estable. Sin embargo, si las partículas tienen valores de potencial zeta bajo, sea negativo o positivo, las fuerzas de atracción superan a las de repulsión, y en consecuencia, las partículas tenderán a unirse y flocular.

Por lo tanto, emulsiones con potencial zeta (negativo o positivo) elevado están eléctricamente estabilizadas, mientras que los coloides con bajos valores de potencial zeta tienden a coagular o flocular. La línea divisoria general entre suspensiones estables e inestables está generalmente entre +30 o -30 mV. Las partículas con potenciales zeta más positivas que +30 mV o más negativo de -30 mV son normalmente consideradas estables.

El potencial zeta no es una medición directa; en el presente estudio se determina mediante una celda de inmersión para potencial Z en un aparato Zetasizer Nano ZS90. Esta técnica se realiza a través de la aplicación de un campo eléctrico controlado por medio de electrodos inmersos en la muestra; esto provoca que las partículas cargadas se muevan a través del electrodo de polaridad opuesta, a una velocidad determinada. Las fuerzas viscosas que actúan en la partícula en movimiento tienden a oponerse a este movimiento, estableciéndose un equilibrio entre ambas fuerzas de atracción electrostática y la resistencia de viscosidad.

Esta velocidad se mide usando una técnica láser interferométrica patentado llamado M3-PALS (análisis de fase de dispersión de luz). Esto permite el cálculo de la movilidad electroforética, y a partir de ella, el potencial zeta. Estas técnicas aplican la ecuación de Henry con la aproximación de **Smoluchowski**<sup>160-162</sup> incluido en el software del sistema.

En el presente estudio se analiza el potencial Z de las diferentes emulsiones elaboradas, con el fin de evaluar la estabilidad física de las muestras<sup>160</sup> y poder predecir su inestabilidad antes de que las muestras presenten signos visibles, como floculación o cremado.

#### 6.2.1.5.1. *Utillaje*

Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

Celda de inmersión para potencial Z. celda de 12 mm (ref: PCS1115)



*Figura 17. Celda de inmersión para PZ*

#### 6.2.1.5.2. *Muestras*

Las muestras se prepararon de manera similar a las utilizadas en las mediciones del tamaño de gota (sección 4.2.1.4.3.1). Se diferencia en que, en este caso, se ajusta la conductividad de las mismas a  $50\mu\text{S}/\text{cm}$  con solución de cloruro sódico (0,9%, w / v) a  $25^{\circ}\text{C}$ .

#### 6.2.1.5.3. *Método*

El método de medición del potencial Z es muy parecido al descrito en la sección 4.2.1.4.3.1. En el software del ZetaSizer se selecciona el método para la determinación del potencial Z (Z potential). Se introduce la celda, se selecciona los procedimientos operativos estándares (SOP) y se rotula la muestra en el software con el nombre, número de análisis, temperatura ( $25^{\circ}\text{C}$ ) y tipo de celda utilizado, y se procede a la lectura de la muestra por triplicado.

## 6.2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS FORMULACIONES NYS-ELI

Para el análisis fisicoquímico de las 4 formulaciones NYS-ELI preparadas en el presente trabajo (según procedimiento descrito en 6.2.1.1.) se determina tamaño de gota (Zave), índice polidispersidad (PI),  $\text{LD}_{99}$ , pH y Potencial Zeta.

El análisis fisicoquímico se realiza 24h después de la elaboración, nuevamente a  $t = 30$  y 60 días. Los resultados se analizaron a través de un análisis multifactorial de varianza (M-ANOVA), para determinar la posible existencia de diferencias estadísticamente significativas entre ellas, así como si la Nistatina modifica las propiedades. (Ver sección 6.3.2.)

#### 6.2.2.1. Ensayo de estabilidad acelerada NYS-ELI

TurbiScan LabR (Formulacion, L'Union, Francia) utiliza el análisis de dispersión múltiple de la luz (Multiple Light Scattering) para la predicción de la estabilidad física a largo plazo de las formulaciones elaboradas<sup>163-165</sup>.

El principio de TurbiscanLabR se basa en la medición de la retrodispersión (backscattering, BS) y las señales de transmisión (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.

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 de transmisión), y la luz retrodispersada por la muestra (135° de la radiación incidente, detector backscattering).

##### 6.2.2.1.1. Utillaje

TurbiScan<sup>®</sup> LabR, Formulacion, L'Union, France (figura 18).

Ordenador conectado al aparato, con el software Turbisoft Lab.

Viales cilíndricos de vidrio transparente con tapa de rosca.



Figura 18. Equipo TurbiScan<sup>®</sup> LabR<sup>166</sup>

### 6.2.2.1.2. Muestras

35 ml de cada una de las formulaciones objeto de estudio, sin diluir, se sitúan, respectivamente, en celdas de vidrio cilíndricas (diámetro: 27,5 mm, Altura: 70 mm) que en cada caso son escaneadas en toda su longitud por el cabezal de lectura. Dado que estas formulaciones son opalescentes, únicamente se utilizan los perfiles de Backscattering (BS) para evaluar la estabilidad fisicoquímica de las mismas.

### 6.2.2.1.3. Método

El análisis se realiza según el siguiente protocolo de trabajo:

Se conecta el aparato y se esperan 30 minutos (estabilización)

Se selecciona la temperatura y el tiempo de trabajo, así como el intervalo de lecturas:

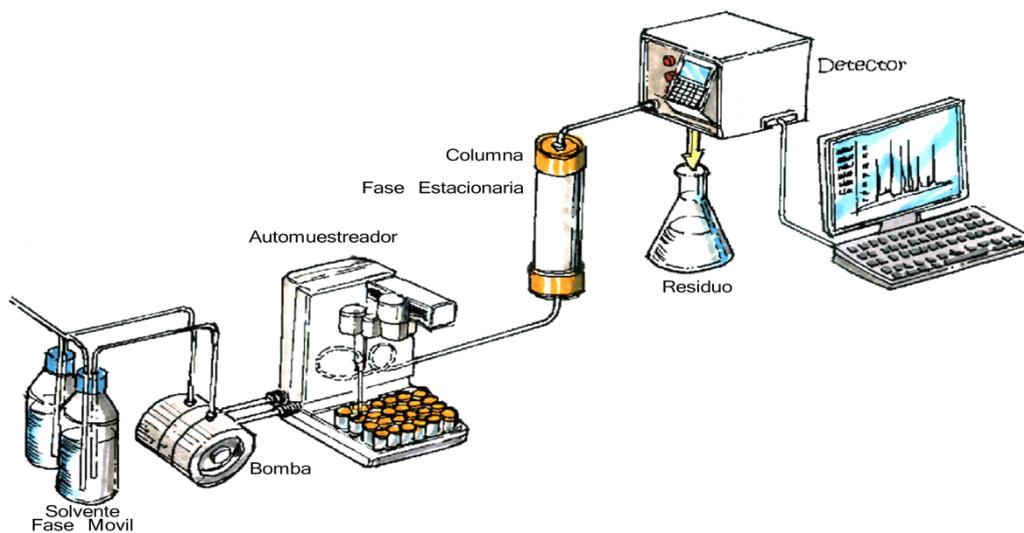
Las lecturas se realizan a temperatura ambiente. Lecturas BS cada 40µm, tres veces en un período de 5 minutos.

Se sitúa la muestra en el vial cilíndrico y se introduce el conjunto en la zona correspondiente del aparato, para su lectura. Se llevan a cabo lecturas en las muestras recién preparadas y posteriormente, cada semana durante 30 días.

Los datos obtenidos se representan en forma de graficas, procesadas por el software del aparato, que permiten caracterizar los diferentes fenómenos de desestabilización que la muestra puede experimentar en las condiciones de trabajo y conservación de las muestras previamente establecidas. Estos resultados se comparan con los estudios de estabilidad física en tiempo real.

### 6.2.2.2. Método para cuantificar Nistatina en ELI: análisis por HPLC

El contenido de Nistatina presente en las diferentes emulsiones elaboradas se analiza por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, de sus siglas en inglés). La técnica fue validada previamente<sup>89</sup>, según las normas internacionales. Todos los ensayos se realizan en condiciones isocráticas y a temperatura ambiente. HPLC es una técnica cromatográfica de elución, utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.



*Figura 19. Esquema del HPLC<sup>167</sup>.*

En esta técnica (figura 19), la fase móvil se pone en contacto con la muestra a analizar y se bombea a alta presión a través de la columna de cromatografía donde se encuentra la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie). A medida que la muestra avanza por la columna, sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria. 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, lo que lleva implícito que, después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas eluirán a un tiempo diferente, y estarán separadas.

El tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos y reduce su difusión dentro de la columna, mejorando con ello la resolución de la cromatografía.

Las condiciones cromatográficas utilizadas en este análisis se indican a continuación

|                      |                                                               |
|----------------------|---------------------------------------------------------------|
| Disolvente           | MeOH:DMF:agua (55:15:30)                                      |
| Columna              | Columna de fase reversa (Kromasil 100, 5 $\mu$ m, 15x0.46 cm) |
| Fase móvil           | 1% ácido acético glacial, acetonitrilo:agua (40:60 v/v)       |
| Longitud de onda     | 305 nm.                                                       |
| flujo                | 0,8ml/min                                                     |
| Volumen de inyección | 50 $\mu$ l                                                    |
| Tiempo total         | 8 min                                                         |

**Tabla 13. Condiciones cromatográficas utilizadas para cuantificar NYS-ELI. MeOH: Metanol, DMF: dimetilformamida**

#### 6.2.2.2.1. Utillaje

Equipo de HPLC, Bomba: Waters 515 (Waters, Milford, MA)

Detector: UV-VIS 2487 (Waters, Milford, MA)

#### 6.2.2.2.2. Muestras

Se toman muestras de la parte superior, media, e inferior de cada vial objeto de análisis, por triplicado. Cada muestra se diluyó 1:100 en MeOH: DMF: Agua (55:15:30).

#### 6.2.2.2.3. Método

Las rectas de calibración necesarias para asegurar la cuantificación de Nistatina.

**Solución patrón de Nistatina:** 6,4mg de Nistatina y se diluyen con dimetilsulfoxido (DMSO) 10ml en matraz aforado. A partir de esta solución patrón (640 $\mu$ m/ml) se preparan las siguientes diluciones: 32, 16, 8, 4, 2, 1  $\mu$ g/ml de Nistatina para la cuantificación de concentraciones altas y 2, 1, 0.5, 0.25, 0,125 y 0,0625  $\mu$ g/ml de Nistatina para la cuantificación de concentraciones bajas.

Se toman 500 $\mu$ l de cada dilución por triplicado, se rotulan y acondicionan en viales para HPLC de color topacio y se sitúan en el auto-muestreador del equipo.

Se toman 500 $\mu$ l de cada muestra de NYS-ELI por triplicado, se rotularon y acondicionan en viales para HPLC de color topacio y se sitúan en el auto-muestreador del equipo. Se procede a realizar las lecturas de las muestras.

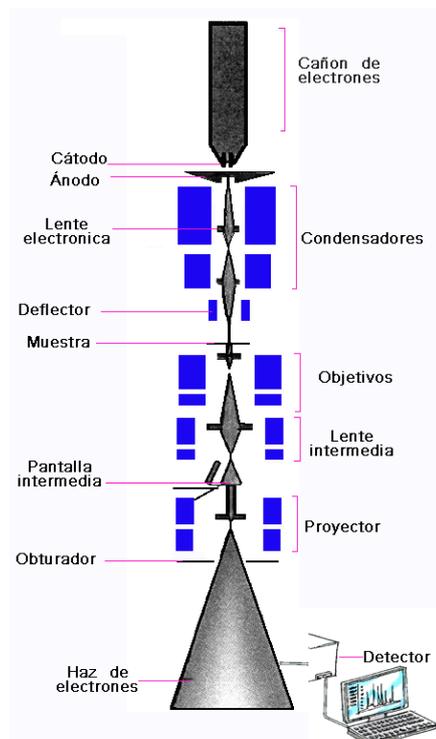
La cuantificación de Nistatina por HPLC se lleva a cabo a partir de las rectas de calibración que corresponden a las áreas de los picos cromatográficos obtenidos con

las concentraciones teóricas de la solución patrón. La concentración de la muestra problema se determina por interpolación del área contenida en la recta de calibración correspondiente, obteniendo el valor de concentración de dicha muestra.

### 6.2.2.3. Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido

La microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscope, SEM) 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, siempre y cuando la muestra permanezca ultracongelada durante el proceso de observación. 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. Para este fin, se hace necesario ultracongelar la muestra y recubrirla con una capa delgada de un metal como el oro o el platino.



**Figura 20. Esquema del Microscopio Electrónico de Barrido**

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 20). 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 la luz visible.

#### ***6.2.2.3.1. Preparación de la muestra***

La muestra NYS ELI 4 se inserta dentro de un cilindro metálico hueco (portamuestra) y se sumerge en la unidad de congelación con nitrógeno líquido ( $-210^{\circ}\text{C}$ ) en vacío (1 kPa), con lo que se consigue una congelación inmediata. La muestra se fractura con un pequeño punzón previamente enfriado a  $-196^{\circ}\text{C}$ . La superficie fracturada de la emulsión se introduce en la cámara del microscopio para ser sublimada a  $-90^{\circ}\text{C}$ , con el fin de eliminar el exceso de “agua nieve”. Finalmente, la muestra se recubre con oro mediante un diodo de pulverización catódico (Cryo-Trans, 0,2 kPa y 40 mA) y se disponen para su lectura.

#### ***6.2.2.3.2. Método***

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-840 equipado con una unidad de congelación Cryo-trans ZT 1500 (Oxford Instruments), para caracterizar la estructura interfacial de la emulsión NYS ELI 4. Una vez preparada la muestra, se introduce en el microscopio y se emite un haz de electrones a un voltaje entre 7 - 15 kV y una intensidad de 0,2 – 0,5nA con el fin de no generar cargas electrostáticas, a una distancia de trabajo de 11 mm. Por último, el detector transfiere la información a un programa de imágenes de barrido lento en el ordenador y se procede a la proyección de imagen.

## 6.3. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

### 6.3.1. Métodos estadísticos para optimizar el excipiente (ELI).

Para establecer las mejores condiciones de elaboración, se realiza un diseño multifactorial (M-ANOVA), teniendo en cuenta los diferentes parámetros de fabricación, así como la estabilidad física en función del tiempo y las condiciones de almacenamiento de las mismas. La Tabla 13 muestra los seis factores experimentales estudiados con sus niveles correspondientes.

Se preparan doce diferentes ELI, con sus respectivos triplicados. En cada caso se produjeron 250 g de emulsión variando la potencia de sonicación, de 80 a 120 W y el tiempo de exposición de 30 a 50 min.

Con el fin de determinar el posible efecto de neutralización en tamaño de gota y la estabilidad física de las emulsiones, tres enfoques diferentes:

- Adición de NaOH 0,1 M a la fase acuosa durante la producción (pH final  $7,5 \pm 0,2$ ),
- Neutralización con NaOH 0,1 M después de la producción (pH final  $7,5 \pm 0,2$ ), y
- No neutralización (pH aprox: 4,5).

Cada emulsión se esteriliza en autoclave, 24 horas después de su elaboración, durante 30 min. a  $121^\circ\text{C}$  y  $1,2\text{ Kg/cm}^2$ , para determinar si el proceso afecta a su estabilidad.

La media de Z-ave, PI y LD<sub>99</sub> fueron las variables dependientes. Los datos fueron analizados mediante el software Statgraphics versión 5,1 (Statgraphics.net, Madrid, España).

#### 6.3.1.1. Planteo del diseño experimental

- Respuestas: Tamaño de gota(Zave), índice de Polidispersidad (PI) y LD<sub>99</sub>
- Número de factores experimentales: 6
- Número de respuestas: 3
- Grados de libertad: 143

| Factores       |                   | Niveles | Unidades           |
|----------------|-------------------|---------|--------------------|
| X <sub>1</sub> | Estabilidad       | 4       | 0/3/6/9 meses      |
| X <sub>2</sub> | Tiempo sonicación | 2       | 30/50 min          |
| X <sub>3</sub> | Potencia          | 2       | 80/120 W           |
| X <sub>4</sub> | Autoclavado       | 2       | No/si              |
| X <sub>5</sub> | Neutralización    | 3       | No/durante/después |
| X <sub>6</sub> | Almacenamiento    | 2       | 30º/4ºC            |

**Tabla 14. Diseño multifactorial. Factores y niveles**

### 6.3.1.2. Comparación entre ELI e Intralipid®

Intralipid® emulsión (20% de aceite de soja, 1,2% fosfolípidos de yema de huevo, 2,25% de glicerina, y agua para inyección) es una emulsión de lípidos disponibles comercialmente para administración intravenosa. Se utiliza normalmente en nutrición parenteral total, y su composición es muy similar a las ELIs preparadas por nosotros en el presente trabajo (20% de aceite de soja, fosfolípidos de soja 2%, 2,25% de glicerina, y agua para inyección).

Ambas formulaciones, Intralipid® y ELI (C2), se caracterizan, en términos de Z-ave y PI durante un año. Los resultados se analizaron mediante una prueba t-student no pareada. De este modo se comparan las dos emulsiones para determinar si existían diferencias significativas entre ellas, o no.

### 6.3.2. Métodos estadísticos empleados para el estudio de las formulaciones NYS-ELI

Con el fin de comprobar la capacidad de ELIs como posibles vehículos para Nistatina, se preparan 4 formulaciones diferentes (sección 6.1.4.2.) a las que se incorpora 1mg/mL de NYS.

Con objeto de caracterizar las 4 formulaciones NYS-ELI se determinan los parámetros de tamaño de partícula, PI, LD99, valores de pH y ZP y se diseña un análisis multifactorial de la varianza (ANOVA M-) para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las formulaciones NYS-ELI entre sí y con el excipiente (ELI).

### 6.3.2.1. Planteo del diseño experimental

Se eligen tres variables independientes (tabla 14): formulación, estabilidad física a largo plazo, y temperatura durante el almacenamiento. Las variables dependientes son tamaño medio de gota (Zave) y PI. El M-ANOVA se realiza utilizando el software Statgraphics versión 5,1 (Statgraphics.net. Madrid, España).

La estabilidad física de las cuatro formulaciones NYS-ELI se determina a través del estudio de la posible evolución en el tiempo de Z-ave y PI, por PCS. Para confirmar la ausencia de partículas de mayor tamaño, se determinó también el LD<sub>99</sub> también. Las diferentes muestras se almacenan a  $30 \pm 1$  ° C y a  $4 \pm 1$  ° C y las mediciones se realizan a las 24 horas, y 15, 30 y 60 días posteriores a la preparación.

- Respuestas: Tamaño de gota (Zave), índice de Polidispersidad (PI)
- Número de factores experimentales: 3
- Número de respuestas: 2
- Grados de libertad: 119

|                | Factores                         | niveles | Unidades                                                          |
|----------------|----------------------------------|---------|-------------------------------------------------------------------|
| X <sub>1</sub> | Estabilidad física a largo plazo | 4       | 1/15/30/60 días                                                   |
| X <sub>2</sub> | Almacenamiento                   | 2       | 30º/ 4ºC                                                          |
| X <sub>3</sub> | Formulaciones                    | 5       | NYS-ELI 1,<br>NYS-ELI 2,<br>NYS-ELI 3,<br>NYS-ELI 4,<br>ELI libre |

**Tabla 15. M-ANOVA entre NYS-ELI y ELI libre. Factores y nivel**

### 6.3.3. Método estadístico empleado en el estudio de liberación.

Se diseña un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para la comparación de la cinética de liberación de más de una formulación, con el nivel de significación de  $p=0,05$ . El estudio se realiza con el software WinNonLin® (WinNonlin® Professional Edition Versión 3.3, Pharsight Corporation, CA).

## 6.4 CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE NYS-ELI

### 6.4.1. UTILLAJE

Balanza de precisión monoplato Mettler Toledo H-35 AR

Equipo de muestreo manual: consola manual Crown glass Co modelo FDCD-9. Este equipo consta de los siguientes componentes:

Consola de agitación modelo FDC-400

Celdas de Franz Vidrafoc

Baño termostático Tectron S-473.100

Membrana de diálisis de celulosa (MWCO 12KDa)

Equipo de HPLC:

Bomba: Waters 515 (Waters, Milford, MA)

Detector: UV-VIS 2487 (Waters, Milford, MA)

### 6.4.2. Descripción de la celda de difusión

Una de las metodologías más utilizadas para el estudio de liberación de formas líquidas, es la celda de difusión de Franz<sup>168</sup>. En este ensayo se ha utilizado el modelo FDC-400.

Las celdas de difusión constan de dos compartimentos, el donante y el receptor. Los compartimentos son de vidrio neutro color topacio. Entre el donante y el receptor se dispone la membrana de difusión, la cual está fijada durante todo el ensayo, mediante mordazas y unas pinzas de acero inoxidable que garantizan la hermeticidad del sistema.

El área útil para la difusión entre los dos compartimentos es de  $2,54\text{cm}^2$  y el volumen aproximado del compartimento receptor es de aproximadamente 12ml.

El compartimento inferior o receptor, se llena con la solución receptora; se coloca la membrana de difusión en la celda 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 al interior de la celda en  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante todo el tiempo de ensayo.

La homogenización del sistema se consigue mediante agitación de la solución receptora con un núcleo de agitación magnética recubierto de teflón y movido por un agitador externo.

En el compartimiento 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 lamina de parafina (Parafilm<sup>®</sup>).

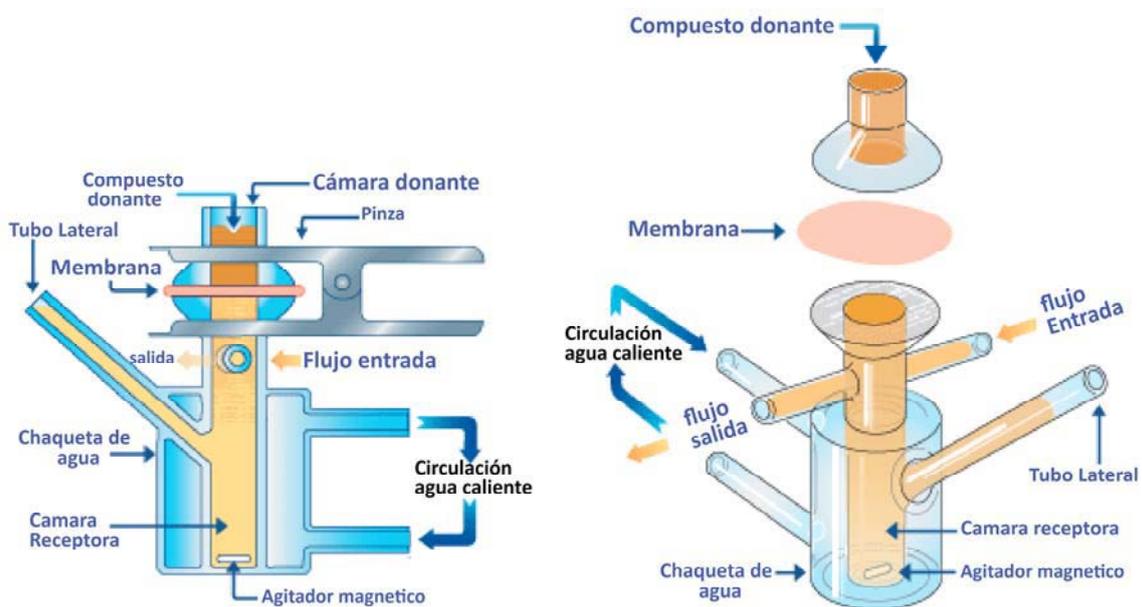


Figura 21. Celda de Franz<sup>169</sup>.

### 6.4.3. Membrana de difusión

Las formulaciones desarrolladas en el presente trabajo son para administración por vía intravenosa; por ello no hace falta utilizar ninguna membrana biológica en los estudios de liberación. El estudio se desarrolla para observar el comportamiento que tendría la formulación dentro del sistema endovenoso y qué porcentaje de Nistatina se libera.

En este sentido, debe emplearse una membrana que minimice al máximo la resistencia al paso del principio activo, con el objeto de determinar con fiabilidad la influencia de las emulsiones en la cesión del activo. Por este motivo y teniendo en cuenta que el tamaño medio de gota de las emulsiones ensayadas es de 200nm se decide utilizar la membrana de diálisis de celulosa (MWCO 12KDa).

#### 6.4.4. Protocolo de trabajo

Para cada una de las formulaciones seleccionadas, el estudio de liberación se ha realiza como sigue:

**Temperatura:** 37°C

**Medio receptor:** Metanol (MeOH): Dimetilformamida(DMF): agua (55:15:30 v/v/v)

**Medio de reposición:** MeOH: DMF: agua (55:15:30 v/v/v)

**Volumen de extracción/reposición:** 0,2 ml

**Velocidad de agitación:** 700 rpm

**Cantidad de siembra:** 1ml

**Duración del experimento:** 76 horas

**Toma de muestra:** a  $t_0$ , cada hora durante las primeras 12h y después cada 8 horas hasta completar las 76h.

A fin de garantizar que todo el principio activo que atraviesa la membrana quede disuelto en la solución receptora y no se ralentice su paso, es necesario que la concentración de fármaco en el fluido de disolución no supere el 20% de su concentración de saturación (condiciones SINK) a lo largo de toda la experiencia.

Estudios previos indican que el medio receptor DMF: agua (55:15:30 v/v/v) permite mantener condiciones SINK durante todo el experimento<sup>89,116</sup>.

La toma de muestras se realiza manualmente a través del tubo lateral de la celda de Franz. A los intervalos de tiempo de muestreo prefijados se introduce una aguja de inyección intrarraquídea con ayuda de una pipeta automática. Inmediatamente después de extraída la muestra, se substituye el volumen extraído con el medio de reposición. Las muestras se sitúan en tubos Eppendorf con 1ml de medio receptor. En todo momento las muestras se resguardan de la luz.

Posteriormente, las muestras se analizan por HPLC de acuerdo con el protocolo descrito en 6.2.2.2. Los resultados se tabulan en forma de valor medio de las seis repeticiones de lectura  $\pm$  DS (desviación estándar).

### 6.4.5. Cinética de liberación

Para determinar la cinética que explica mejor el proceso de liberación en cada formulación, se ajustan los datos experimentales a modelos matemáticos que intentan describir el curso evolutivo del proceso de difusión.

Se ensayan cinco modelos cinéticos diferentes (orden cero, primer orden, Peppas Korsmeyer, Higuchi y Función de Weibull) para ajustar los datos obtenidos en los experimentos de liberación del fármaco<sup>170</sup>.

$$\%R_t / \%R_\infty = k \times t \quad \text{Ecuación de orden cero} \quad (1)$$

$$\%R_t / \%R_\infty = 1 - e^{-k \times t} \quad \text{Ecuación de orden uno} \quad (2)$$

$$\%R_t / \%R_\infty = k \times t^{1/2} \quad \text{Ecuación de Higuchi} \quad (3)$$

$$\%R_t / \%R_\infty = 1 - e^{-(t/t_d)^\beta} \quad \text{Ecuación de Weibull} \quad (4)$$

$$\%R_t / \%R_\infty = k \times t^n \quad \text{Ecuación de Korsmeyer-Peppas'} \quad (5)$$

Donde:

**% R<sub>t</sub>** : porcentaje de fármaco liberado en el tiempo t.

**% R<sub>∞</sub>**: porcentaje total de fármaco liberado.

**% R<sub>t</sub> / % R<sub>∞</sub>**: fracción de fármaco liberada en el tiempo t.

**K**: velocidad de liberación constante.

**n**: exponente de liberación difusión; se utiliza para caracterizar los diferentes mecanismos de liberación :  $n \leq 0,43$  (difusión de Fick);  $0,43 < n < 0,85$  (transporte anómalo);  $n \geq 0,85$  (caso II de transporte, ej: liberación de orden cero).

**t<sub>d</sub>** : tiempo en el que se ha liberado el 63,2% del fármaco.

**β**: parámetro de forma, adimensional.<sup>171</sup>

### 6.4.6. Tratamiento de los datos experimentales

El tratamiento de los datos experimentales se realiza a partir de la tabulación experimental de la cantidad de activo liberado acumulado en función del tiempo.

Los datos experimentales se ajustan a las funciones representativas de los modelos de liberación, expresadas de manera que la variable dependiente sea común en todos ellos.

### 6.4.7. Elección del modelo de liberación

Se realiza una regresión no lineal por mínimos cuadrados y el análisis de los parámetros del modelo calculados, utilizando el software WinNonLin® (WinNonlin® Professional Edition Versión 3.3, Pharsight Corporation, CA).

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<sup>172</sup>. La ecuación se expresa como sigue:

$$AIC = n \ln SSQ + 2p \quad (6)$$

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.

Para la selección del modelo, también se han tenido en cuenta el parámetro de exactitud, expresado como % coeficiente de variación (% CV) y los gráficos de distribución residual.

El procedimiento aplicado es el siguiente:

De cada muestra, se obtiene un número mínimo de seis replicados.

Se toman las muestras al mismo tiempo para cada formulación.

Se ajustan las funciones representativas de los diferentes modelos de liberación a los valores promedios (de las cantidades cedidas a cada tiempo de toma de muestra) correspondiente a los replicados. se escoge el mejor ajustado global por aplicación del parámetro AIC. Por último, se ajusta el modelo escogido al conjunto de resultados experimentales individuales, a fin de obtener los valores medios de los parámetros y su desviación estándar (DS).

## 6.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

### 6.5.1. Test de susceptibilidad *in vitro* para *Candida Albicans* ATCC 10231

El Test de susceptibilidad para *Candida Albicans* ATCC 10231 (American Type Culture Collection ATCC, Manassas, VA, USA) se realiza según el protocolo del Comité Europeo de pruebas de susceptibilidad para antimicrobianos (EUCAST)<sup>173</sup>, documento definitivo: EDef 7.1. Este método estándar proporciona un procedimiento válido para probar la susceptibilidad de levaduras contra agentes antifúngicos mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC de su sigla en inglés). La MIC se define como la concentración más baja de un agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo.

Para este fin, se utiliza la dilución en caldo de cultivo o método de microdilución<sup>174</sup>. 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 MIC. Estas diluciones se realizan en placas de microdilución con una capacidad nominal de 300µL/celda. Las más utilizadas son Placas Microtiter® con 96 celdas.

#### 6.5.1.1. UTILLAJE

Placas Microtiter® con 96 celdas de microtitulación.

Pipetas multicanal

Lector de placa Microtiter® modelo 680 (Bio-Rad, Madrid, España)

Estufa Heraeus Modelo B 5042E a 30±1°C

Cámara de Neubauer

Medio sintético RPMI 1640 en polvo ref. 518000-35 (INVITROGENT)

Tampón MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanesulfónico) en polvo ref. M1254 (Sigma–Aldrich)

Cultivo tipo *Candida Albicans* ATCC 10231

### 6.5.1.2. MEDIO DE CULTIVO

Se utiliza el medio sintético RPMI 1640 en polvo. Este medio se prepara con glutamina e indicador de pH pero sin bicarbonato. Como el medio sólo contiene 0.2% (w/v) de glucosa, se añade glucosa hasta un 2%, que es una concentración más adecuada para el crecimiento de las levaduras. Para la preparación del medio se utiliza tampón MOPS (ácido 3-(N-morfolino)-propanesulfónico) en polvo.

El medio de cultivo sintético RPMI 1640 suplementado con glutamina y un 2% de glucosa (RPMI 1640 2% G) se prepara disolviendo las cantidades indicadas en la tabla 16.

| PRODUCTO       | [1X] 1L | [2X] 1L | [2X] 250mL |
|----------------|---------|---------|------------|
| Agua destilada | 900ml   | 900 ml  | 200 ml     |
| RPMI 1640      | 10.4 g  | 20.8g   | 5.2g       |
| MOPS           | 34.53g  | 69.06   | 17.26g     |
| GLUCOSA        | 18g     | 36g     | 9g         |

**Tabla 16. Composición del medio de cultivo**

El medio de cultivo se prepara doble concentrado en agua destilada y se ajusta el pH a 7 con NaOH 1M. El medio se filtra por 0,22µm y se distribuye en fracciones de 25 ml en tubos de 50 ml estériles.

En el momento del ensayo, para evitar la contaminación bacteriana procedente de las muestras problema no estériles, se añade Cloramfenicol al medio de cultivo para una concentración final de 500 µg/ml. Este antibiótico no interfiere con el crecimiento de hongos y levaduras.<sup>175</sup>

### 6.5.1.3. Muestras

#### 6.5.1.3.1. Nistatina Patrón

La solución de Nistatina Patrón se prepara como sigue:

Solución de Partida: Nistatina en DMSO a una concentración de 6400 mg/ml.

De ella se realizan las siguientes diluciones con DMSO, en tubos Eppendorf:

- 100 µl Nistatina [6400 µg/ml] /300 µl DMSO ⇒ Nistatina [1600 µg/ml]
- 125 µl Nistatina [1600 µg/ml] /875 µl DMSO ⇒ Nistatina [200 µg/ml]
- 200µl Nistatina [200µg/ml]/200µl RPMI-1640 2%G[X2]-Cloramfenicol ⇒ **100 µg/ml**

### **Nistatina**

La concentración final de DMSO representa menos del 1% (v/v) del total de la solución utilizada para el experimento<sup>98</sup>.

#### **6.5.1.3.2. Muestras problema: Nistatina-ELI**

Se valoran cuatro formulaciones con Nistatina (ELI –NYS 1, ELI –NYS 2, ELI –NYS 3, ELI –NYS 4) que se diferencian entre sí en el porcentaje de co-emulgente y aceite (ver tabla 12) de ELI, en cada caso. La concentración de Nistatina en estas emulsiones es de 1 mg/ml.

Se valora asimismo el vehículo sin Nistatina (ELI 1, ELI 2, ELI 3 y ELI 4), para verificar que él no interfiere con la prueba, ni tiene per-se efecto antifúngico.

#### **6.5.1.4. Inóculo**

Se prepara un primer cultivo de *Candida albicans* ATCC 10231 en Agar Dextrosa de Sabouraud (SDA), incubando durante 48 horas a 30 ° C. Luego se realiza una segunda resiembra de 24h de incubación. El inóculo se prepara suspendiendo 4-5 colonias en agua destilada estéril hasta una turbidez de 0.5 en la escala de McFarland. Posteriormente, se recuentan las colonias con la cámara de Neubauer. La concentración del inóculo debe estar entre  $1-5 \times 10^6$  UFC/ml. A partir de esta suspensión, se realiza otra dilución (1:10) en agua destilada estéril, para obtener una suspensión de  $1-5 \times 10^5$  CFU/ml que se utiliza como inóculo (100 µl /celda).

#### **6.5.1.5. Distribución de las muestras**

El medio RPMI 1640 2% G doble concentrado (RPMI 1640 2% G x 2) se distribuye en dos placas de Microtitter, 1 y 2, a razón de 100µl por pozo en 18 columnas y 200µl en la 19 para el control del medio. En la primera columna de la placa 1, se introducen 100 µl de cada una de las muestras de acuerdo a la distribución señalada en la tabla 17.

PLACA 1 [NISTATINA µg/µl ]

|   | Columna 1                                                                | Muestra   |
|---|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| A | 100 µl de 1000µg/ml <b>NYS-ELI 1</b> + 100 µl RPMI [2X] + 100 µl inoculo | NYS-ELI 1 |
| B | 100 µl <b>ELI 1</b> + 100 µl RPMI [2X] + 100 µl inoculo                  | ELI 1     |
| C | 100 µl 1000µg/ml <b>NYS-ELI 2</b> + 100 µl RPMI [2X] + 100 µl inoculo    | NYS-ELI 2 |
| D | 100 µl <b>ELI 2</b> + 100 µl RPMI [2X] + 100 µl inoculo                  | ELI 2     |
| E | 100 µl de 1000µg/ml <b>NYS-ELI 3</b> + 100 µl RPMI [2X] + 100 µl inoculo | NYS-ELI 3 |
| F | 100 µl <b>ELI 3</b> + 100 µl RPMI [2X] + 100 µl inoculo                  | ELI 3     |
| G | 100 µl de 1000µg/ml <b>NYS-ELI 4</b> + 100 µl RPMI [2X] + 100 µl inoculo | NYS-ELI 4 |
| H | 100 µl <b>ELI 4</b> + 100 µl RPMI [2X] + 100 µl inoculo                  | ELI 4     |

**Tabla 17. Distribución de las muestras en la placa de microtiter. Inóculo: Candida Albicans****6.5.1.5.1. Distribución de las diluciones en las placas de Microtiter.**

A partir de la columna 1, se realizan microdiluciones pasando 100µl de la columna 1 a la 2 y así hasta la columna 17, diluyendo de 500 hasta 0.00762 µg/mL la concentración de Nistatina. A continuación se añaden 100 µl de inóculo desde la columna 1 hasta la 16. También se inocula la columna 18 para el control del inóculo. El control de la muestra se realiza en la columna 17 y el control del medio en la 19. Las tablas 18 y 19 muestran la distribución de concentraciones en Nistatina en la placa de microtiter.

|   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10     | 11     | 12     | Muestra          |
|---|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------|
| A | 250   | 125   | 62.5  | 31.25 | 15.625 | 7.8125 | 3.9062 | 1.9531 | 0.9765 | 0.4882 | 0.2441 | 0.1220 | <b>NYS-ELI 1</b> |
| B | ELI 1  | ELI 1  | ELI 1  | ELI 1  | ELI 1  | ELI 1  | ELI 1  | ELI 1  | <b>ELI 1</b>     |
| C | 250   | 125   | 62.5  | 31.25 | 15.625 | 7.8125 | 3.9062 | 1.9531 | 0.9765 | 0.4882 | 0.2441 | 0.1220 | <b>NYS-ELI 2</b> |
| D | ELI 2  | ELI 2  | ELI 2  | ELI 2  | ELI 2  | ELI 2  | ELI 2  | ELI 2  | <b>ELI 2</b>     |
| E | 250   | 125   | 62.5  | 31.25 | 15.625 | 7.8125 | 3.9062 | 1.9531 | 0.9765 | 0.4882 | 0.2441 | 0.1220 | <b>NYS-ELI 3</b> |
| F | ELI 3  | ELI 3  | ELI 3  | ELI 3  | ELI 3  | ELI 3  | ELI 3  | ELI 3  | <b>ELI 3</b>     |
| G | 250   | 125   | 62.5  | 31.25 | 15.625 | 7.8125 | 3.9062 | 1.9531 | 0.9765 | 0.4882 | 0.2441 | 0.1220 | <b>NYS-ELI 4</b> |
| H | ELI 4  | ELI 4  | ELI 4  | ELI 4  | ELI 4  | ELI 4  | ELI 4  | ELI 4  | <b>ELI 4</b>     |

**Tabla 18. Distribución de las diluciones en la placa 1 para el test contra Candida Albicans.**

|   | 13     | 14     | 15     | 16      | 17      | 18      | 19  | Muestra          |
|---|--------|--------|--------|---------|---------|---------|-----|------------------|
| A | 0.0610 | 0.0305 | 0.0152 | 0.00762 | 0.00762 | Inóculo | MX2 | <b>NYS-ELI 1</b> |
| B | ELI 1  | ELI 1  | ELI 1  | ELI 1   | ELI 1   | Inóculo | MX2 | <b>ELI 1</b>     |
| C | 0.0610 | 0.0305 | 0.0152 | 0.00762 | 0.00762 | Inóculo | MX2 | <b>NYS-ELI 2</b> |
| D | ELI 2  | ELI 2  | ELI 2  | ELI 2   | ELI 2   | Inóculo | MX2 | <b>ELI 2</b>     |
| E | 0.0610 | 0.0305 | 0.0152 | 0.00762 | 0.00762 | Inóculo | MX2 | <b>NYS-ELI 3</b> |
| F | ELI 3  | ELI 3  | ELI 3  | ELI 3   | ELI 3   | Inóculo | MX2 | <b>ELI 3</b>     |
| G | 0.0610 | 0.0305 | 0.0152 | 0.00762 | 0.00762 | Inóculo | MX2 | <b>NYS-ELI 4</b> |
| H | ELI 4  | ELI 4  | ELI 4  | ELI 4   | ELI 4   | Inóculo | MX2 | <b>ELI 4</b>     |

**Tabla 19. Distribución de las diluciones en la placa 2 para el test contra Candida Albicans.**

De igual forma en una tercera placa de Microtiter se ensaya la solución patrón de Nistatina estudiando un rango de concentraciones de 50 a 0.003 µg/mL.

#### 6.5.1.6. Lectura

La lectura de las placas Microtiter® se realiza por espectrofotometría en un lector de placas de microdilución modelo 680 (Bio-Rad, Madrid, España) a 595nm. Las lecturas se realizan con las placas recién inoculadas (t=0), y las 24h de incubación.

#### 6.5.2. Test de susceptibilidad in vitro para *Aspergillus fumigatus* ATCC 9197

El Test de susceptibilidad para *Aspergillus Fumigatus* se realiza según el protocolo NCCLS M38-A<sup>176</sup> para hongos filamentosos. Al igual que el protocolo utilizado para levaduras, este protocolo estándar permite utilizar un procedimiento válido para probar la susceptibilidad de hongos contra agentes antifúngicos. Del mismo modo, se utiliza un método de microdilución para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).

##### 6.5.2.1. Utillaje

Placas Microtiter® con 96 celdas de microtitración.

Pipetas multicanal

Lector de placas Microtiter® modelo 680 (Bio-Rad, Madrid, España)

Estufa Heraeus Modelo B 5042E a 25 y 30±1°C

Cámara de Neubauer

Medio sintético RPMI 1640 en polvo ref. 518000-35 (INVITROGENT)

Tampón MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanesulfónico) ref. M1254 (Sigma–Aldrich).

Cultivo tipo *Aspergillus fumigatus* ATCC 9197.

##### 6.5.2.2. MEDIO DE CULTIVO

RPMI 1640 2% G x 2, descrito en 6.5.1.2.

##### 6.5.2.3. Muestras

Se prepara una muestra patrón de Nistatina, tal como se describe en 6.5.1.3.1.

### 6.5.2.3.1. Muestras problema: Nistatina-ELI

Las muestras problema con Nistatina y patrón de Nistatina se preparan tal como se describe en el apartado 6.5.1.3. En este ensayo únicamente se estudian las emulsiones con Nistatina. La posible toxicidad o inhibición de la formulación per se, queda determinada en el anterior ensayo (6.5.1.).

### 6.5.2.4. Inoculo

*Aspergillus fumigatus* ATCC 9197 se siembra en tres puntos en una placa de Agar dextrosa de Sabouraud durante 5 días a 25 ° C.

Esporas y micelio se resuspenden en solución salina estéril de Ringer con unas gotas de Tween 20 con la ayuda de un asa de Digralsky. La suspensión resultante se mezcla bien con un agitador tipo Vortex. A continuación se deja sedimentar las partículas pesadas durante 3-5 min. El micelio de la parte superior se retira, quedando básicamente una suspensión de esporas. Esta suspensión debe de tener una turbidez tal que contenga sobre  $1 \times 10^6$  UFC/ml.

Para asegurar la carga inicial del inóculo se realizan recuentos en placa sobre Agar Dextrosa de Sabouraud de forma que la suspensión se ajusta a una concentración de  $2 \times 10^6$  UFC/ml. A partir de esta suspensión se inoculan las placas Microtitter® con 100 µl/celda.

### 6.5.2.5. Distribución de las muestras

Se utilizan dos placas Microtitter®. En cada celda se incorporan 100µl de medio de cultivo. En la columna 1 de la placa 1 se añade 100µl de las muestras y de la solución patrón (ver tabla 20).

| PLACA 1 [NISTATINA µg/µl] |                                                                |           |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------|
| Fila                      | Columna 1                                                      | Muestras  |
| A                         | 100 µl de 100µg/ml NYS patrón + 100 µl RPMI [2X] ⇒ [50 µg/ml]  | Patrón    |
| B                         | 100 µl de 1000µg/ml NYS-ELI 1 + 100 µl RPMI [2X] ⇒ [500 µg/ml] | NYS-ELI 1 |
| C                         | 100 µl de 1000µg/ml NYS-ELI 2 + 100 µl RPMI [2X] ⇒ [500 µg/ml] | NYS-ELI 2 |
| D                         | 100 µl de 1000µg/ml NYS-ELI 3 + 100 µl RPMI [2X] ⇒ [500 µg/ml] | NYS-ELI 3 |
| E                         | 100 µl de 1000µg/ml NYS-ELI 4 + 100 µl RPMI [2X] ⇒ [500 µg/ml] | NYS-ELI 4 |

**Tabla 20. Distribución de las muestras analizadas en la placa Microtitter® para el test contra *Aspergillus Fumigatus*.**

### 6.5.2.5.1. Distribución de las diluciones de las muestras en las placas Microtiter.

Se procede del mismo modo como se describe en el apartado 6.5.1.5, la única diferencia es que no se ensayan las emulsiones lipídicas sin Nistatina y se incluye en la misma placa el patrón de Nistatina. La distribución final de las diluciones tras haber añadido el inóculo se reflejan en las tablas 21 y 22. Las placas se incuban a 30°C en presencia de oxígeno.

| Placa 1 [NISTATINA µg/ml] |     |     |      |       |        |        |        |        |        |        |        |        |           |
|---------------------------|-----|-----|------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------|
|                           | 1   | 2   | 3    | 4     | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10     | 11     | 12     | Muestra   |
| A                         | 50  | 25  | 12.5 | 6,25  | 3.125  | 1.5625 | 0.7812 | 0.3906 | 0.1953 | 0.0976 | 0.0488 | 0.0610 | Patrón    |
| B                         | 250 | 125 | 62.5 | 31.25 | 15.625 | 7.8125 | 3.9062 | 1.9531 | 0.9765 | 0.4882 | 0.2441 | 0.1220 | NYS-ELI 1 |
| C                         | 250 | 125 | 62.5 | 31.25 | 15.625 | 7.8125 | 3.9062 | 1.9531 | 0.9765 | 0.4882 | 0.2441 | 0.1220 | NYS-ELI 2 |
| D                         | 250 | 125 | 62.5 | 31.25 | 15.625 | 7.8125 | 3.9062 | 1.9531 | 0.9765 | 0.4882 | 0.2441 | 0.1220 | NYS-ELI 3 |
| E                         | 250 | 125 | 62.5 | 31.25 | 15.625 | 7.8125 | 3.9062 | 1.9531 | 0.9765 | 0.4882 | 0.2441 | 0.1220 | NYS-ELI 4 |

**Tabla 21. Distribución de las diluciones en la placa 1, para el test contra *Aspergillus Fumigatus***

| Placa 2 [NISTATINA µg/ml] |        |        |        |         |         |         |     |           |
|---------------------------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|-----|-----------|
|                           | 13     | 14     | 15     | 16      | 17      | 18      | 19  | Muestra   |
| A                         | 0.0122 | 0.0061 | 0.003  | 0.0015  | 0.0015  | Inóculo | MX2 | Patrón    |
| B                         | 0.0610 | 0.0305 | 0.0152 | 0.00762 | 0.00762 | Inóculo | MX2 | NYS-ELI 1 |
| C                         | 0.0610 | 0.0305 | 0.0152 | 0.00762 | 0.00762 | Inóculo | MX2 | NYS-ELI 2 |
| D                         | 0.0610 | 0.0305 | 0.0152 | 0.00762 | 0.00762 | Inóculo | MX2 | NYS-ELI 3 |
| E                         | 0.0610 | 0.0305 | 0.0152 | 0.00762 | 0.00762 | Inóculo | MX2 | NYS-ELI 4 |

**Tabla 22. Distribución de las diluciones en la placa 2 para el test contra *Aspergillus Fumigatus*.**

### 6.5.2.6. Lectura

La lectura de las placas Microtiter® se realiza por espectrofotometría en un lector de placas de microdilución modelo 680 (Bio-Rad, Madrid, España) a 595nm.

Las lecturas se realizan con las placas recién inoculadas (t=0), y a las 24h, 48h y 72h de incubación.

### 6.5.3. ENSAYO DE EFICACIA DE LAS FORMULACIONES NYS-ELI

Es un estudio cinético de la muerte del microorganismo por cuenta de una formulación antimicrobiana. Este ensayo in vitro permite evaluar la acción de la formulación antifúngica original sobre una población microbiana de concentración conocida (UFC/ml) y observar la reducción del número de UFC en función del tiempo. Permite

determinar la capacidad antifúngica de la formulación sin alterarla por diluciones como ocurre en los ensayos anteriores.

### 6.5.3.1. Utillaje

Placas de Petri

Estufas Heraeus Modelo B 5042E a 30 y 37 ±1°C

Escala de McFarland

Medio de cultivo Agar Dextrosa de Sabouraud (SDA) +Cloramfenicol

Medio de cultivo Triptona Soya Agar (TSA)

Solución Ringer

Asa de Digralsky

Tubos y Ependorffs estériles

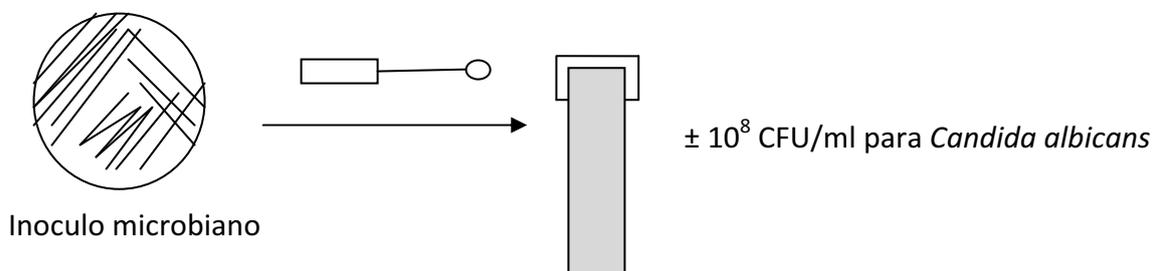
Cultivos tipo de *Candida Albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus fumigatus* ATCC 9197

### 6.5.3.2. Muestras

Se evalúan las formulaciones NYS-ELI 1, NYS-ELI 2, NYS-ELI 3 y NYS-ELI 4. Se realiza un control previo de las diferentes formulaciones objeto de estudio, mediante la inoculación de 100 µl en TSA (Triptona Soya Agar). Este medio de cultivo nutritivo, adecuado para la detección de microorganismos aeróbicos mesófilos, permite descartar una posible contaminación microbiana del producto antes de la realización del ensayo que pudiera interferir en el desarrollo del mismo.

### 6.5.3.3. Ensayo para *Candida Albicans* ATCC 10231

#### 6.5.3.3.1. Preparación del inculo



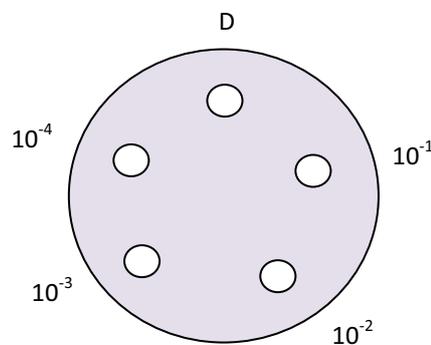
**Figura 22. Diagrama del cultivo en placa y la correspondiente dilución del inculo.**

Se prepara un cultivo en placa de la levadura a analizar usando el medio de cultivo Agar Dextrosa de Sabouraud (SDA), y se incuba entre 24-48h. A partir de este cultivo

en placa, se prepara el inóculo vertiendo solución Ringer sobre esta placa. La suspensión turbia resultante se ajusta a una concentración de turbidez igual a 2 en la escala de McFarland. Posteriormente se procede al recuento del inóculo en placa de Sabouraud +Cloramfenicol, para conocer exactamente la carga microbiana.

#### 6.5.3.3.2 Procedimiento

Se utiliza un micro método para evaluar las distintas formulaciones de Nistatina. Esta técnica permite trabajar con pequeñas cantidades de producto, analizar un mayor número de muestras al mismo tiempo y es comparable a los métodos convencionales. Para ello se toma 1 ml del preparado antimicrobiano y se le añade 10  $\mu$ l del correspondiente inóculo. A partir de esta mezcla, se realizan 4 diluciones empleando Ependorffs con 900  $\mu$ l de solución Ringer. Se siembran por triplicado 10  $\mu$ l de cada una de las diluciones y del producto directo inoculado en placas con el medio de cultivo Agar Dextrosa de Sabouraud (SDA) y Cloramfenicol para evitar la contaminación bacteriana. El cultivo resultante, se incuba a 37°C. De este modo, se intenta simular unas condiciones próximas a las de una situación real, tales como, infección en humanos cuya temperatura corporal está entre 36 y 37 °C.



**Figura 23. Esquema de la siembra de las diferentes diluciones del inóculo. D: directo.**

Las emulsiones lipídicas contaminadas así como las placas para el recuento, se incuban a 37°C en lugar de 30°C que sería una temperatura óptima para *Candida albicans*. De este modo, se intenta simular unas condiciones de temperatura próximas a las de una situación real, tales como, infección en humanos cuya temperatura corporal está entre 36 y 37 °C.

#### 6.5.3.3.3. *Lectura*

Se estudia la reducción de la carga microbiana a tiempo cero a las 2, 4 y 24 horas de incubación a 37 °C. A tiempo 0 prácticamente se realiza el recuento inicial de la carga microbiana añadida, ya que el producto no ha podido aún ejercer su efecto. A partir de 2h ya se evalúa si el producto ha eliminado total o parcialmente la carga inoculada.

#### 6.5.3.4. **Ensayo para *Aspergillus Fumigatus* ATCC 9197**

##### 6.5.3.4.1. *Preparación del inóculo*

Para preparar el inóculo de *Aspergillus fumigatus* se procede de la misma forma que el apartado 6.5.2.4., realizando los recuentos sobre agar Sabouraud + Cloramfenicol.

##### 6.5.3.4.2 *Procedimiento*

Igual que en el apartado 6.5.3.3.2, se toma 1 ml de cada una de las formulaciones antifúngicas, se les añade 10 µl del inóculo en este caso de *Aspergillus fumigatus* 10<sup>6</sup> CFU/ml. Se mezcla bien y se proceden a realizar solamente 2 diluciones (10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup>) empleando Ependorffs con 900 µl de solución Ringer.

Se siembran de forma confluyente y por duplicado 100 µl de cada una de las diluciones, (10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup>) y del problema directo (D) sobre Sabouraud+Cloramfenicol. Las placas se incuban a 30°C. Se ha escogido esta temperatura como la más elevada para un correcto crecimiento de *Aspergillus*, pues a temperaturas superiores no podríamos determinar si la falta de crecimiento es debida a la acción de las emulsiones problemas o a la temperatura de incubación que es demasiado elevada.

En este ensayo, también se añade una muestra más para el estudio correspondiente a la solución de Nistatina patrón en DMSO a una concentración de 1600 µl/ml (sección 6.5.1.3.1).

#### 6.5.3.2.3. *Lectura*

Se estudia la reducción de la carga microbiana a tiempo cero a 3, 24 y 48 horas de incubación. A tiempo 0 se realiza el recuento inicial, ya que el producto no ha podido ejercer su efecto. A partir de 3h se evalúa si el producto ha eliminado total o parcialmente la carga inoculada hasta las 48h.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

# 7. Resultados y Discusión

En líneas generales, el trabajo experimental se plantea como se explica en el siguiente diagrama de flujo.

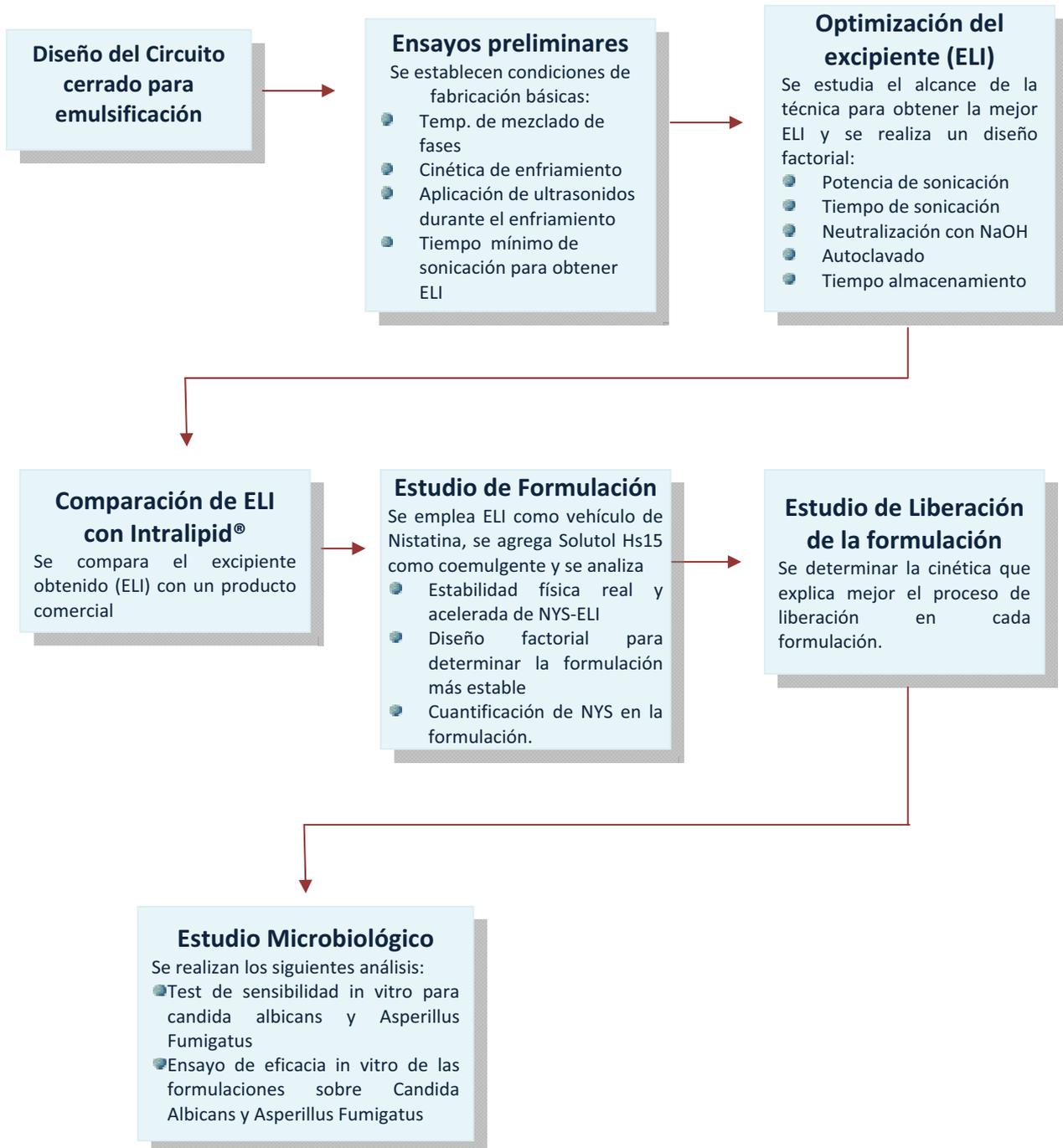
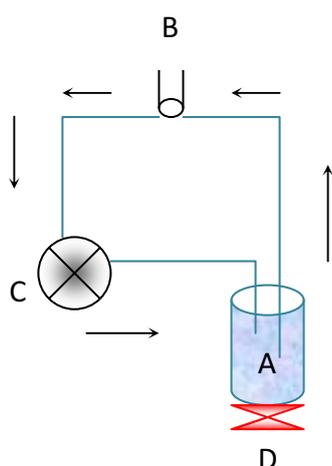


Figura 24. Esquema del plan de trabajo

## 7.1 DISEÑO DEL CIRCUITO CERRADO PARA EMULSIFICACIÓN

Hasta el momento, sólo se habían elaborado emulsiones lipídicas inyectables por sonicación sumergiendo la sonda de ultrasonidos en un vaso de precipitados de vidrio de 250ml que contenía la mezcla de las dos fases de la futura emulsión, utilizando 80W de potencia durante 20 minutos, lo que permitió obtener un máximo de 100ml de emulsión con las características deseadas<sup>12</sup>. Al intentar elaborar mayores volúmenes de dicha emulsión, en concreto 250ml de esta misma forma, se observa que el radio de acción de la sonda de ultrasonido resulta limitado, lo que ocasiona que la emulsión no se forme homogéneamente, resultando físicamente inestable.

En consecuencia, se hace necesario diseñar un sistema de circuito cerrado que permita obtener un mayor volumen de emulsión (se inicia con un volumen de 250ml) que cumpla con las condiciones de propiedades galénicas y estabilidad fisicoquímica deseadas. Para ello se plantea el siguiente diseño:



*Figura 25. Esquema del circuito cerrado*

- A: reactor
- B: sonda de sonicación,
- C: bomba peristáltica,
- D: placa de agitación y calefacción

Reactor (A) con capacidad para 2 Litros, con un tapón elastomérico que contiene 4 orificios; en el primero se sitúa un termómetro, en el segundo incluye un tubo de entrada, el tercero un tubo de salida y el cuarto una válvula de escape (entrada de aire). El tubo de entrada se conecta a un receptáculo de vidrio donde se inserta la sonda de ultrasonidos (B). El tubo de salida está conectado a través de un tubo de silicona a una bomba peristáltica (C). Para cerrar el sistema, se conecta un tubo de silicona entre la entrada de la bomba peristáltica y el receptáculo de vidrio antes citado. Los materiales utilizados para este sistema no desprenden partículas y no son

tóxicos. El sistema incluye una placa calefactora con agitación magnética (D) para graduar la temperatura de mezcla y de formación de la emulsión.



*Figura 26. Fotografía del circuito cerrado.*

Este sistema de circuito cerrado permite la circulación del líquido a emulsionar a través de la sonda de ultrasonidos que así puede imprimir energía suficiente a todo el volumen de emulsión en formación. El flujo de circulación del líquido a emulsionar se establece en 250ml/min, debido a que es la capacidad máxima de la bomba peristáltica lo que significa que la totalidad del volumen de líquido a emulsionar pasa 20 veces a través de la sonda de ultrasonidos.

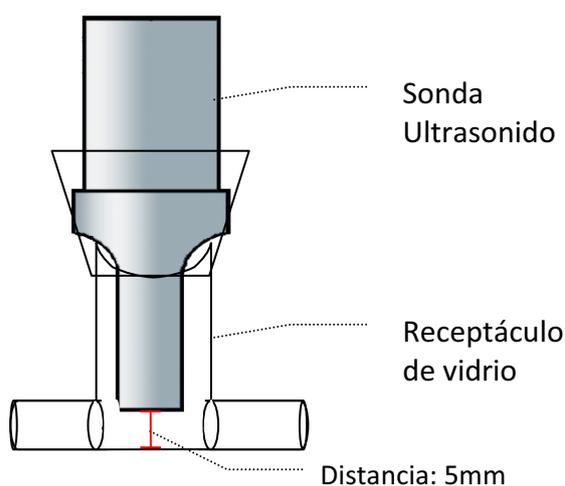


*Figura 27. Receptáculo de vidrio que contiene la sonda de ultrasonidos.*

En la puesta a punto del sistema de trabajo aparecieron diferentes puntos críticos, tales como lograr su hermeticidad, condición necesaria para la recirculación del líquido lo que se resolvió insertando una junta de goma hermética entre la sonda de ultrasonidos y el receptáculo de vidrio.

Otro problema se presentó al realizar la limpieza del sistema; al intentar remover el receptáculo de vidrio, este se rompió, por lo que se cambió el diseño del receptáculo dividiéndolo en dos piezas que encajan herméticamente a través de una junta esmerilada. (Ver Figura 27).

La altura de la sonda dentro del receptáculo de vidrio también tuvo que ser optimizada, ya que, situada a 2mm del fondo del receptáculo de vidrio esta se rompía al aplicar la energía de sonicación, mientras que situada a 1cm del fondo, no imprimía suficiente potencia como para evitar la aparición de glóbulos de grasa en la superficie de la emulsión; por ello se optimiza la situación de la sonda a una distancia intermedia, concretamente a 5mm del receptáculo de vidrio, obteniéndose resultados satisfactorios desde el punto de vista de estabilidad fisicoquímica de las emulsiones obtenidas (Figura 28).



**Figura 28. Distancia de la sonda de ultrasonidos en el receptáculo de vidrio.**

## 7.2. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE FABRICACIÓN: RESULTADOS PRELIMINARES

Se analiza el efecto de 4 variables experimentales básicas del proceso de elaboración de las ELI objeto de estudio:

- La temperatura de mezclado de las fases a emulsionar
- La cinética de enfriamiento de la emulsión previamente formada
- El tiempo de sonicación que se aplica para conseguir la emulsificación
- La aplicación de ultrasonidos durante el enfriamiento

En primera instancia, se analizan la temperatura de mezclado de las fases a emulsionar y la cinética de enfriamiento de las emulsiones previamente formadas, manteniendo constante el tiempo de sonicación (30 min) y la potencia de sonicación (80W). De este modo se puede evaluar su efecto en el proceso de elaboración y elegir el mejor método.

### 7.2.1. Análisis de la temperatura de mezclado de las fases

Se ensayan las siguientes temperaturas de mezclado: 75, 80, 85, 90, 100°C. Los ensayos se realizan por triplicado. (Sección 6.1.1.4)

Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 24.

| Mezclado de fases T(°C) | T (°C) de estabilización del sistema. |    |     |           | Observaciones                                                                            |
|-------------------------|---------------------------------------|----|-----|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------|
|                         | I                                     | II | III | $\bar{X}$ |                                                                                          |
| 75                      | 60                                    | 59 | 61  | 60±1,0    | No se forma la emulsión                                                                  |
| 80                      | 66                                    | 65 | 66  | 65±1,5    | No se forma la emulsión                                                                  |
| 85                      | 70                                    | 70 | 71  | 70.5±0,5  | Se rompe la emulsión (separación de fases) tras 10 minutos de sonicación                 |
| 90                      | 74                                    | 74 | 75  | 74.5±0,5  | Se forma la emulsión y se mantiene estable tras el proceso de enfriamiento               |
| 100                     | 81                                    | 80 | 79  | 80±1,0    | Se forma la emulsión pero ésta sufre separación de fases tras el proceso de enfriamiento |

**Tabla 24. Temperatura de mezclado ensayados para la elaboración de emulsiones tipo ELI.**

De acuerdo con dichos resultados, una temperatura de mezclado de las fases de 90°C permite una temperatura de estabilización de  $74 \pm 1^\circ\text{C}$  así como la obtención de emulsión aparentemente estable tras la aplicación del proceso completo de emulsificación.

### 7.2.2. Análisis de la cinética de enfriamiento

Se ensayan diferentes protocolos de enfriamiento de las ELI producidas mediante sonicación, con el requerimiento de obtener emulsiones de tamaño de gota y polidispersidad acordes con las especificaciones previamente fijadas (ver sección 6.2.1.4.3.1.).

#### 7.2.2.1. Enfriamiento a temperatura ambiente

Las ELIs requieren aproximadamente 1 hora para alcanzar la temperatura de  $25^\circ\text{C}$  (tomada como final del proceso de enfriamiento). El tamaño de gota de las emulsiones enfriadas de esta manera es de 290nm, pero con una polidispersidad media de 0.430 por lo que se descarta este tipo de enfriamiento.

#### 7.2.2.2. Enfriamiento en Baño de María (BM).

##### Enfriamiento en BM a $10^\circ\text{C}$

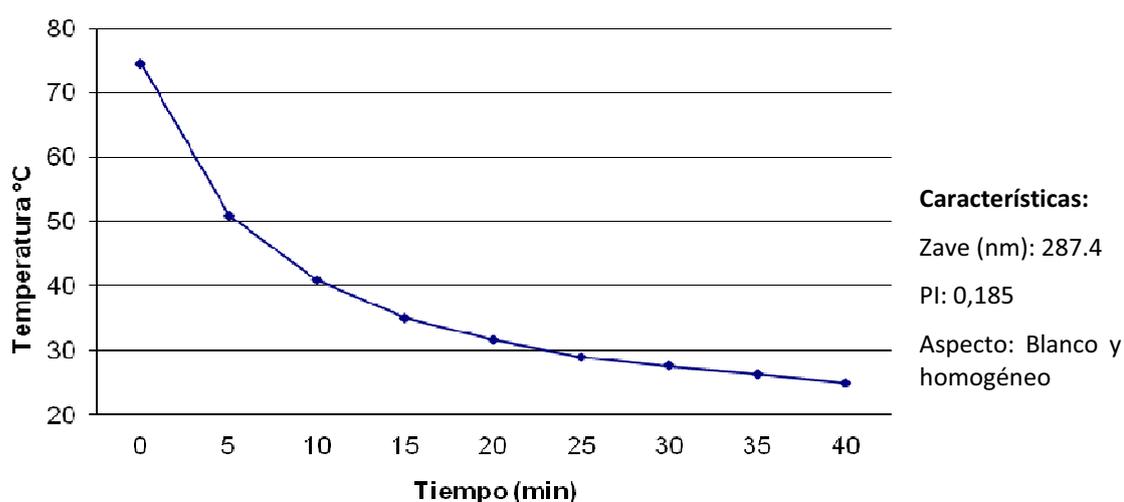
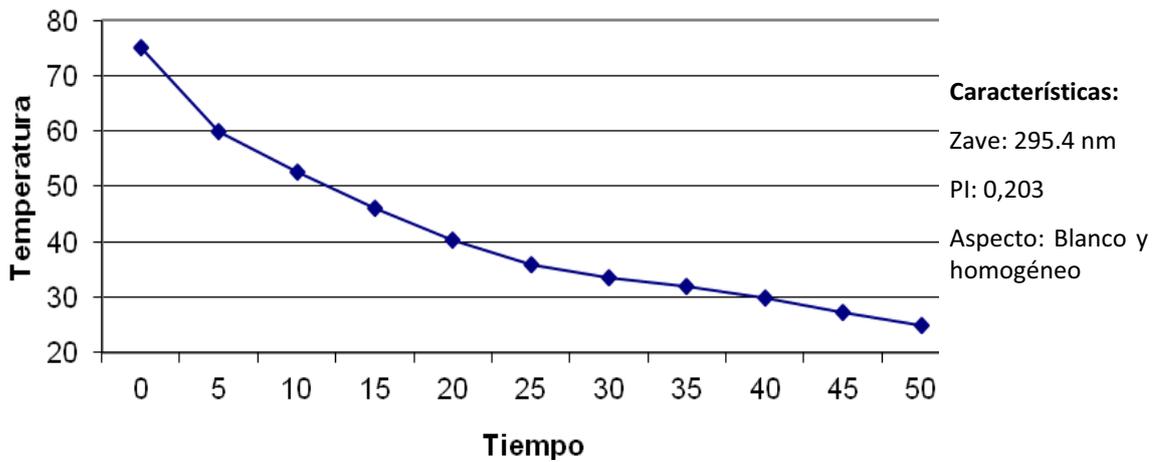
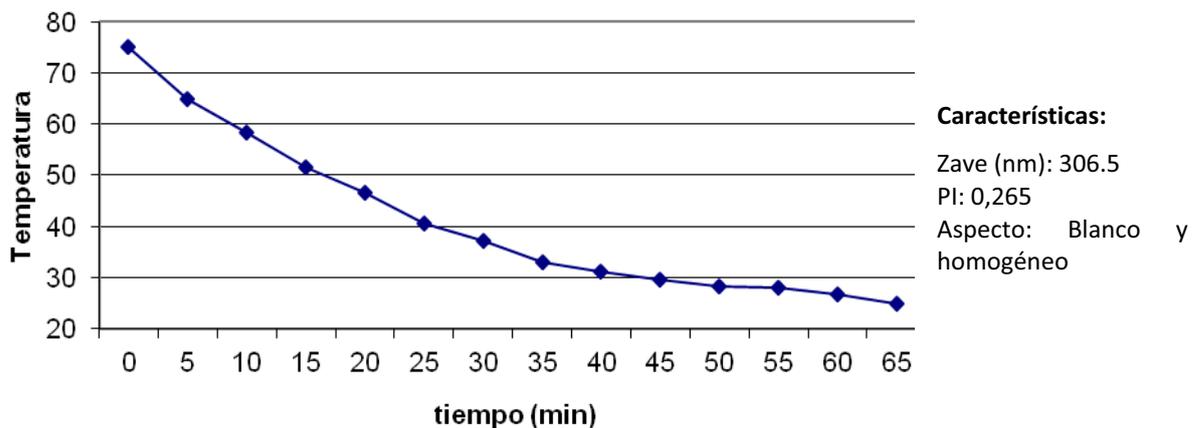


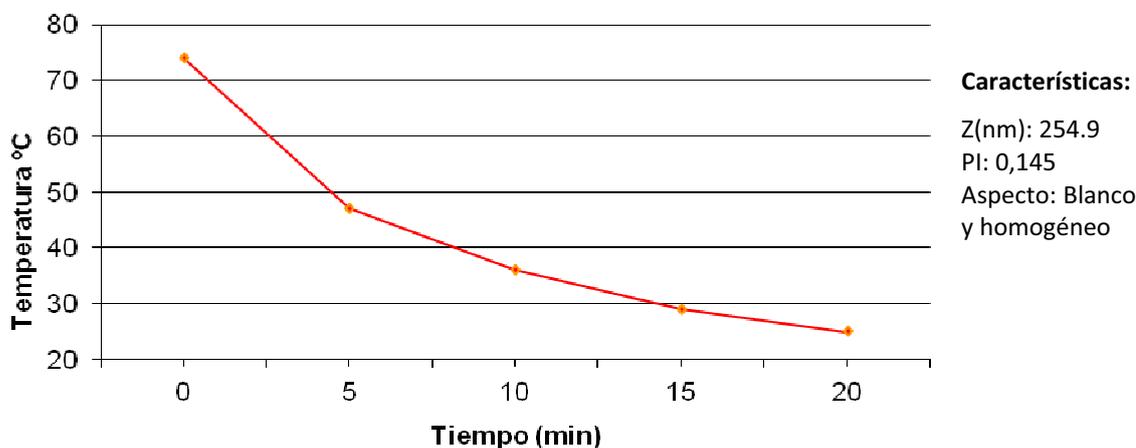
Figura 29. Resultados de la cinética de enfriamiento a  $10^\circ\text{C}$

**Enfriamiento en BM a 15 °C:***Figura 30. Resultados de la cinética de enfriamiento a 15°C***Enfriamiento en BM a 25 °C***Figura 31. Resultados de la cinética de enfriamiento a 25°C*

En relación a los enfriamientos realizados en BM, se observa que los valores de tamaño de gota y polidispersidad son más elevados cuanto mayor es la temperatura de enfriamiento. Así, el procedimiento que conduce a preparados finales de mayor estabilidad fisicoquímica, es el realizado en baño maría a 10°C (Zave: 287,4nm; PI: 0,187, por lo que se descarta enfriar en BM a 15 y 25°C, que además dan lugar a cinéticas de enfriamiento excesivamente largas sin que ello conlleve mejora alguna en la calidad del producto final (ver figuras 20 y 21).

### *Enfriamiento en BM con hielo*

Se tarda aprox. 20 minutos en llegar a 25°C y se obtienen productos con una polidispersidad media de 0,145.



*Figura 32. Resultados de la cinética de enfriamiento con hielo.*

De acuerdo con los resultados comentados anteriormente, se escogen dos tipos de enfriamiento: rápido (con hielo), y lento (con agua a 10°C) para proseguir el estudio de optimización del proceso de producción de las ELI.

Una vez establecida la temperatura de mezclado de las fases en 90°C (con una temperatura de estabilización de  $74 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y los dos tipos de enfriamiento a ensayar, se procede a estudiar:

- El efecto producido por el tiempo de sonicación aplicado durante la fase de emulsificación, (Potencia: 80W, aplicada respectivamente durante 10, 20 o 30 minutos), y
- El efecto producido por la aplicación o no de ultrasonidos (potencia: 65W) durante el enfriamiento (realizado respectivamente a 10°C o en baño de hielo) en la calidad de las ELIs obtenidas.

Finalmente, se procede al autoclavado de las ELIs obtenidas, con objeto de valorar si son susceptibles de ser esterilizadas mediante dicha técnica.

En la tabla 25 se exponen las 12 ELIs propuestas en base a las variables tecnológicas aplicadas en sus respectivos procesos de elaboración.

| Nomenclatura      | Tiempo de sonicación (min.) | Tipo de enfriamiento | Potencia en el enfriamiento |
|-------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|
| Emulsión 1 (E1)   | 10                          | R                    | C                           |
| Emulsión 2 (E2)   |                             |                      | S                           |
| Emulsión 3 (E3)   |                             | L                    | C                           |
| Emulsión 4 (E4)   |                             |                      | S                           |
| Emulsión 5 (E5)   | 20                          | R                    | C                           |
| Emulsión 6 (E6)   |                             |                      | S                           |
| Emulsión 7 (E7)   |                             | L                    | C                           |
| Emulsión 8 (E8)   |                             |                      | S                           |
| Emulsión 9 (E9)   | 30                          | R                    | C                           |
| Emulsión 10 (E10) |                             |                      | S                           |
| Emulsión 11 (E11) |                             | L                    | C                           |
| Emulsión 12 (E12) |                             |                      | S                           |

Tabla 25. Emulsiones elaboradas en función de los parámetros de elaboración ensayados. R: rápido, L: lento, C: con potencia, S: sin potencia.

### 7.2.3. Estudio preliminar: Evaluación de las características fisicoquímicas y farmacotécnicas de las ELIs recién elaboradas

24 horas después de la elaboración de las ELIs, cada una de ellas se divide en dos “sublotes”, uno de los cuales se somete a esterilización por autoclavado y el otro no, de forma a poder analizarlos, compararlos y establecer el posible efecto de dicha variable en la calidad de las emulsiones.

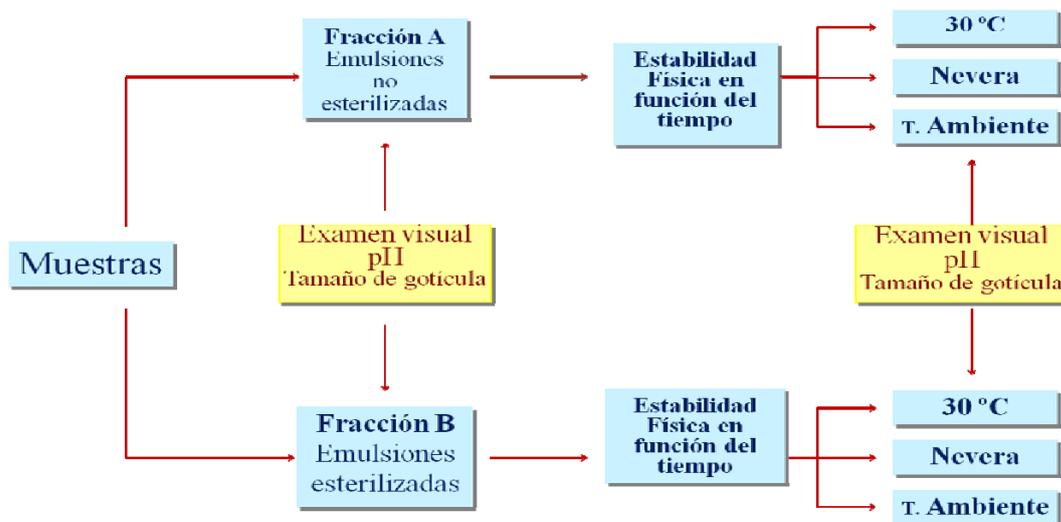


Figura 33. Esquema de trabajo del estudio preliminar

### 7.2.3.1. Fracción A: muestras no esterilizadas a t=24h.

En la tabla 26 se exponen los resultados de los análisis realizados a las emulsiones recién elaboradas, (aprox. al cabo de 24h). Todas las emulsiones preparan por triplicado, los valores numéricos corresponden a la media aritmética de los datos experimentales).

| <i>Muestra</i> | <i>Zave(nm)</i> | <i>PI</i>  | <i>pH</i> | <i>Examen visual</i> |
|----------------|-----------------|------------|-----------|----------------------|
| E1             | 318,4±1,30      | 0,305±0,01 | 4,49±0,03 | Correcto             |
| E2             | 363,2±2,90      | 0,532±0,01 | 4,52±0,01 | Cremado              |
| E3             | 306,3±1,47      | 0,328±0,07 | 4,54±0,21 | Correcto             |
| E4             | 354,5±1,32      | 0,625±0,02 | 4,40±0,15 | Grasa en superficie  |
| E5             | 271,3±1,86      | 0,165±0,08 | 4,58±0,14 | Correcto             |
| E6             | 301,3±1,55      | 0,249±0,05 | 4,65±0,08 | Correcto             |
| E7             | 287,8±1,09      | 0,165±0,03 | 4,63±0,17 | Correcto             |
| E8             | 317,8±1,28      | 0,236±0,04 | 4,68±0,24 | Correcto             |
| E9             | 268,6±0,95      | 0,070±0,01 | 4,56±0,12 | Correcto             |
| E10            | 298,1±1,77      | 0,179±0,07 | 4,60±0,26 | Correcto             |
| E11            | 277,2±1,42      | 0,145±0,03 | 4,63±0,13 | Correcto             |
| E12            | 312,5±1,14      | 0,191±0,04 | 4,58±0,06 | Correcto             |

**Tabla 26. Análisis realizados a las emulsiones 1 hora después de su elaboración.**

Se observa que las emulsiones E1, E2, E3, E4 sonicadas 10 minutos, presentan un tamaño de gota (Zave), correcto desde el punto de vista galénico, si bien más elevado que el obtenido con otras condiciones operativas; así mismo, la polidispersidad (PI) es elevada (>0,3), lo que marca una tendencia a la inestabilización fisicoquímica del sistema, motivo por el cual se descartan del estudio.

El segundo grupo de emulsiones (E5, E6, E7, E8) sonicadas 20 minutos y el tercer grupo (E9, E10, E11, E12) sonicadas 30 minutos, son más parecidos entre sí y cumplen con los criterios farmacotécnicos planteados en la fase de diseño del producto.

Se observa que las emulsiones que reciben energía durante el proceso de enfriamiento (E5, E7, E9, E11), presentan tamaño de gota y polidispersidad inferior que las que no reciben (E6, E8, E10, E12) (Ver figuras 34 y 35).

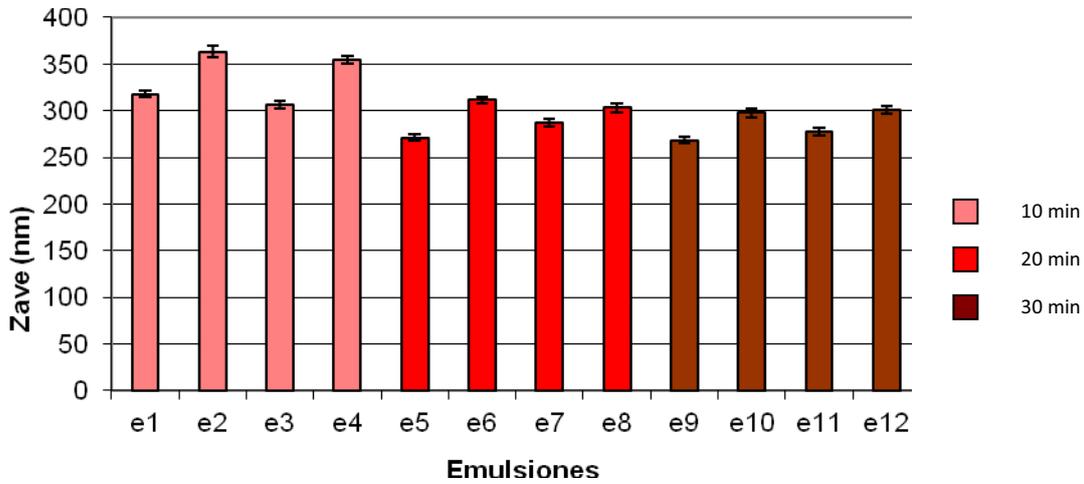


Figura 34. Representación gráfica de los valores de tamaño de gota de las diferentes emulsiones elaboradas. (24h después de su elaboración)

La energía comunicada al sistema mediante sonicación parece no poder superar, en las condiciones operativas establecidas, un tamaño medio de gota que oscila entre 250 y 350nm, si bien la calidad de las emulsiones (menor polidispersidad) si se diferencia, en concreto al aplicar energía de sonicación durante 20 o 30 minutos, tal como lo ponen de manifiesto los valores de polidispersidad, netamente inferiores de las emulsiones (ver figura 35).

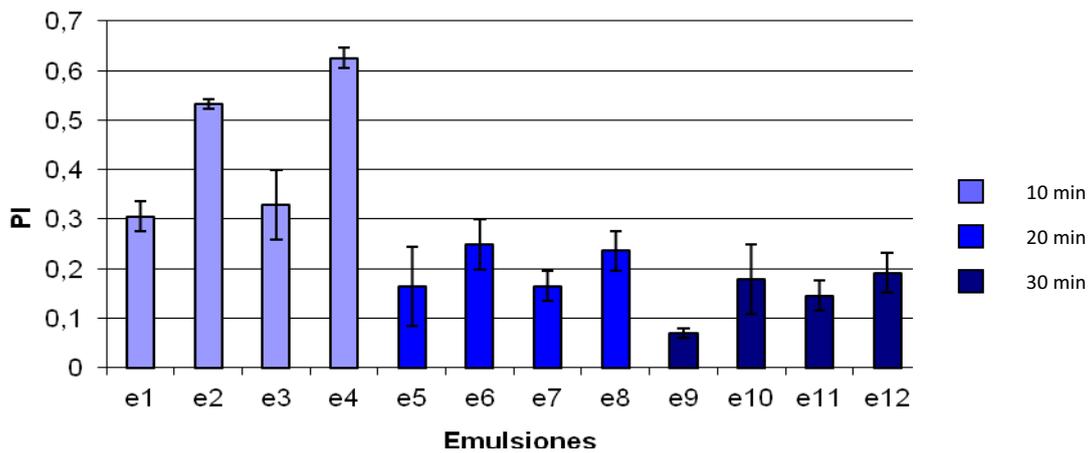


Figura 35. Valores de polidispersidad de las emulsiones elaboradas. Lectura 1h después del acondicionamiento de las muestras.

En cambio, el tipo de enfriamiento no parece tener una influencia decisiva en las características de las emulsiones, no apreciándose diferencias entre las emulsiones que se enfriaron de forma rápida en relación con las que se enfriaron de forma lenta.

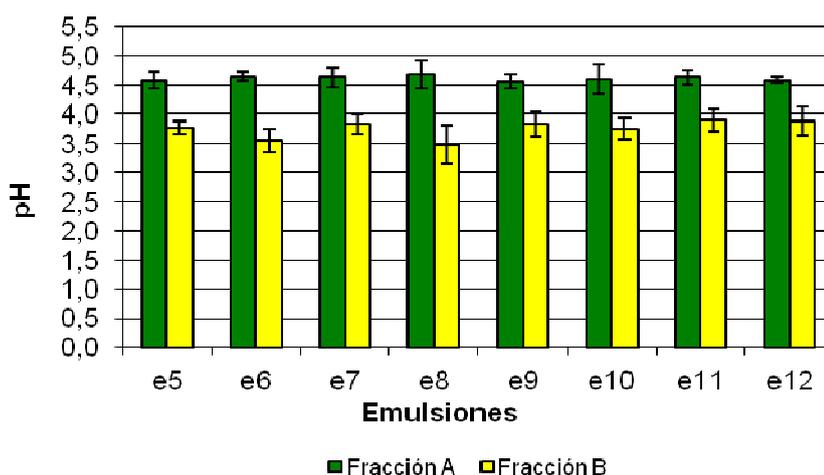
### 7.2.3.2. Fracción B: muestras de emulsiones esterilizadas a t=24h.

Las emulsiones E1, E2, E3 y E4 sufrieron separación de fases al ser sometidas a esterilización. Las restantes (ver tabla 27), aparecen correctas al examen visual (1h después de ser esterilizadas).

| Muestra | Zave       | PI         | pH        | Examen visual |
|---------|------------|------------|-----------|---------------|
| E 5     | 238,0±1,30 | 0,160±0,01 | 3,78±0,11 | Correcto      |
| E 6     | 272,4±1,56 | 0,246±0,05 | 3,55±0,21 | Correcto      |
| E 7     | 262,3±1,38 | 0,185±0,02 | 3,83±0,17 | Correcto      |
| E 8     | 260,7±0,85 | 0,250±0,03 | 3,48±0,33 | Correcto      |
| E 9     | 246,4±1,06 | 0,120±0,06 | 3,83±0,41 | Correcto      |
| E10     | 278,3±0,90 | 0,181±0,08 | 3,75±0,17 | Correcto      |
| E11     | 265,4±0,76 | 0,156±0,03 | 3,90±0,19 | Correcto      |
| E12     | 295,3±1,54 | 0,189±0,01 | 3,88±0,25 | Correcto      |

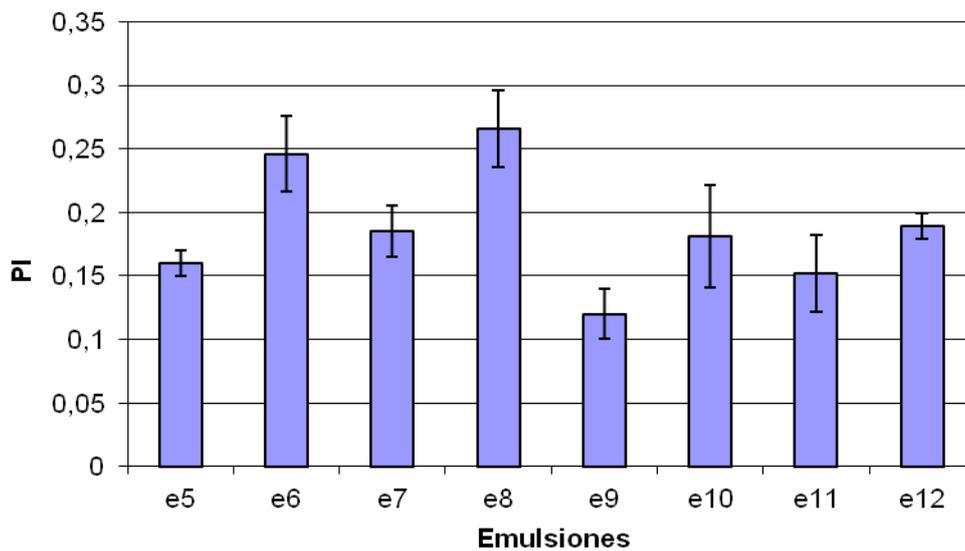
**Tabla 27. Resultados de los análisis realizados a las emulsiones autoclavadas.**

No se aprecian diferencias entre los valores medios de tamaño de gota (Zave) de las emulsiones 5 a 12, siendo en todos los casos < 300nm. El aspecto visual es correcto (blanco homogéneo y opaco). Aparentemente no hay diferencias entre estos valores y los correspondientes a la fracción A; se observa en cambio una disminución de los valores de pH entre la fracción autoclavada y la fracción no esterilizada. (Ver figura 36.)



**Figura 36. Comparación gráfica entre los valores de pH de las emulsiones no esterilizadas (fracción A) en relación a las esterilizadas (fracción B).**

No se observan grandes variaciones en los valores de tamaño de gota ( $Z_{ave}$ ), por lo que se decide evaluar el PI. En la figura 37. Se representan los valores de polidispersidad expresados en la tabla 27. En todos los casos dichos valores son  $<0,25$ , valor propuesto como límite para garantizar las especificaciones de calidad de las muestras elaboradas. Se aprecia así mismo, que los valores de polidispersidad de las emulsiones E5, E7, E9, E11 que reciben potencia durante el enfriamiento son inferiores a los de sus homologas E6, E8, E10, E12, enfriadas sin sonicación; siendo este comportamiento similar al obtenido en las muestras de la fracción A.



*Figura 37. Valores de polidispersidad de las emulsiones autoclavadas.*

#### 7.2.4. Estudio preliminar: Evaluación de la estabilidad física de las ELIs en función del tiempo.

Alícuotas de 5ml de las fracciones autoclavadas y no autoclavadas de las diferentes ELIs elaboradas se almacenan a temperatura ambiente ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ), a  $30\pm 1^\circ\text{C}$  y a  $4\pm 1^\circ\text{C}$ . a fin de evaluar su estabilidad física en función del tiempo.

##### 7.2.4.1. Fracción A: muestras de emulsiones no esterilizadas

###### 7.2.4.1.1. Resultados de estabilidad física de la Fracción A, a $t = 1$ semana

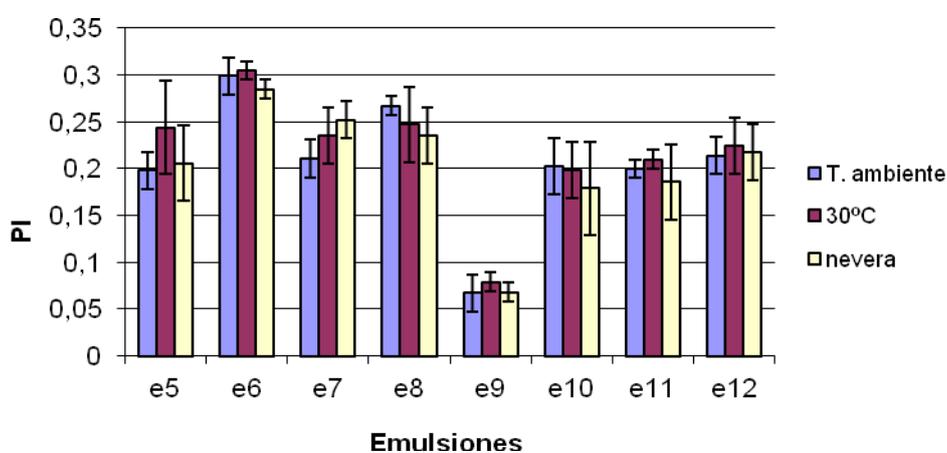
Se considera que una emulsión con una polidispersidad inferior a 0,25 es conforme (☑) y por encima de este valor se considera no conforme (☒); por lo tanto con signos de

inestabilidad, el tamaño de gota (Zave) no difiere apreciablemente en ninguno de los casos estudiados. Los resultados se exponen en la tabla 28. Únicamente aparecen los correspondientes a las emulsiones 5 a 12. Las emulsiones 1 al 4 se descartan en razón de su inestabilidad física al ser autoclavadas.

| Muestra | T ambiente |            |    | 30°C       |            |    | Nevera (4± 1°C) |            |    |
|---------|------------|------------|----|------------|------------|----|-----------------|------------|----|
|         | Zave       | PI         | Ob | Zave       | PI         | Ob | Zave            | PI         | Ob |
| E 5     | 289,5±1.12 | 0,198±0,04 | ✓  | 261,6±2,11 | 0,244±0,05 | ✓  | 268,2±0,20      | 0,206±0,06 | ✓  |
| E 6     | 351,1±3.24 | 0,289±0,01 | ✓  | 370,9±3,53 | 0,295±0,01 | ✓  | 365,9±3,00      | 0,285±0,02 | ✓  |
| E 7     | 282,8±1.65 | 0,210±0,06 | ✓  | 291,3±0,76 | 0,236±0,03 | ✓  | 301,2±2,65      | 0,252±0,02 | ✓  |
| E 8     | 325,4±2.43 | 0,267±0,03 | ✓  | 328,8±3,48 | 0,247±0,04 | ✓  | 320,3±1,58      | 0,236±0,01 | ✓  |
| E 9     | 285,5±2.21 | 0,067±0,01 | ✓  | 293,5±1,65 | 0,079±0,01 | ✓  | 293,1±3,14      | 0,068±0,03 | ✓  |
| E 10    | 278,6±1.84 | 0,203±0,05 | ✓  | 285,4±2,32 | 0,199±0,07 | ✓  | 274,3±3,27      | 0,179±0,05 | ✓  |
| E 11    | 265,3±1.35 | 0,200±0,09 | ✓  | 275,1±1,51 | 0,21±0,01  | ✓  | 283,4±5,23      | 0,186±0,01 | ✓  |
| E 12    | 313,4±1.55 | 0,214±0,07 | ✓  | 301,6±1,03 | 0,225±0,03 | ✓  | 306,5±3,75      | 0,218±0,02 | ✓  |

**Tabla 28. Resultados del análisis de estabilidad térmica (primera semana). Ob: observación, PI: polidispersidad, Zave: tamaños de gota en nanómetros.**

Igualmente, se compara la polidispersidad de la muestras en función de la temperatura de almacenamiento. Al a vista de las barras de dispersión que aparecen en los resultados de la figura 38 se puede decir que, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores de polidispersidad de las mismas muestras, independientemente de las condiciones de almacenamiento. Sin embargo, se observa claramente una diferencia importante entre la E9 y las demás muestras.



**Figura 38. Representación gráfica de la polidispersidad (PI) en función de las condiciones de almacenamiento durante la primera semana.**

**7.2.4.1.2. Resultados de estabilidad física de la Fracción A, a t= 2 semana**

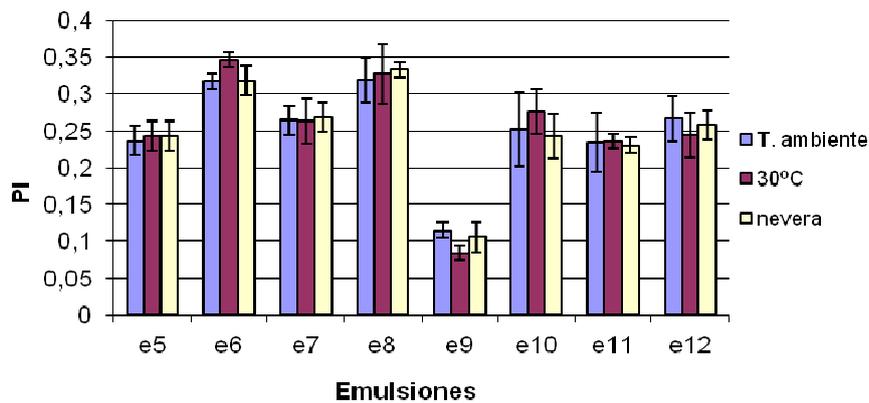
Las determinaciones de PI y Zave se exponen en la tabla 29:

Las emulsiones E6 y E8 presentan valores de polidispersidad superiores a los establecidos como límite de conformidad (> 0,25), por lo que se retiran del estudio. Se observa que ambas son emulsiones obtenidas con un mismo tiempo de sonicación (20min), aunque diferente tipo de enfriamiento, pero en ambos casos sin aplicación de potencia durante el enfriamiento.

| Muestra | T ambiente |            |    | 30°C       |            |    | Nevera (4± 1°C) |            |    |
|---------|------------|------------|----|------------|------------|----|-----------------|------------|----|
|         | Zave       | PI.        | Ob | Zave       | PI.        | Ob | Zave            | PI.        | Ob |
| E 5     | 265,1±2,35 | 0,236±0,02 | ☑  | 261,3±3,86 | 0,243±0,08 | ☑  | 263,9±3,42      | 0,243±0,01 | ☑  |
| E 6     | 348,5±1,89 | 0,317±0,05 | ☒  | 356,3±2,46 | 0,346±0,03 | ☒  | 368,2±4,21      | 0,318±0,09 | ☒  |
| E 7     | 296,1±1,32 | 0,264±0,01 | ☑  | 293,4±4,01 | 0,263±0,01 | ☑  | 296,5±2,53      | 0,268±0,03 | ☑  |
| E 8     | 322,1±1,47 | 0,319±0,01 | ☒  | 315,5±5,23 | 0,327±0,17 | ☒  | 318,6±3,28      | 0,333±0,14 | ☒  |
| E 9     | 269,5±1,31 | 0,115±0,06 | ☑  | 265,1±1,81 | 0,073±0,03 | ☑  | 273,6±1,13      | 0,106±0,01 | ☑  |
| E 10    | 281,1±3,16 | 0,252±0,04 | ☑  | 283,3±2,59 | 0,276±0,01 | ☑  | 268,9±1,41      | 0,242±0,05 | ☑  |
| E 11    | 270,7±2,31 | 0,235±0,03 | ☑  | 268,2±2,03 | 0,236±0,02 | ☑  | 270,1±1,64      | 0,230±0,03 | ☑  |
| E 12    | 318,1±2,63 | 0,266±0,02 | ☑  | 322,9±1,44 | 0,244±0,05 | ☑  | 308,2±2,10      | 0,258±0,02 | ☑  |

**Tabla 29. Resultados del análisis de estabilidad térmica (segunda semana). Ob: observación, PI: polidispersidad, Zave: tamaños de gota en nanómetros.**

De forma general, se observa una diferencia significativa entre el valor medio de PI de la emulsión E9, netamente inferior a los correspondientes las restantes formulaciones objeto de estudio.



**Figura 39. Representación gráfica de la polidispersidad (PI) en función de las condiciones de almacenamiento durante la segunda semana.**

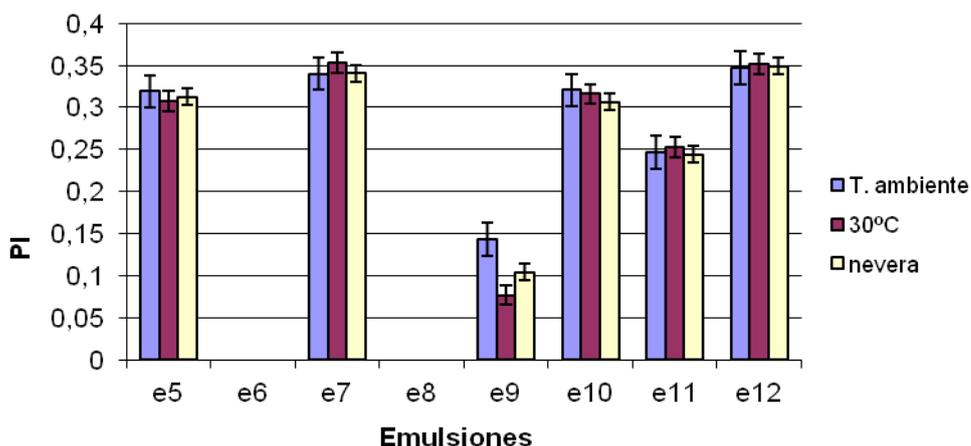
**7.2.4.1.3. Resultados de estabilidad física de la Fracción A, a t= 3 semana**

Se descartan las emulsiones E5 y E7 sonicadas 20 minutos y sonicadas durante el enfriamiento, y así mismo las emulsiones E10 y E12 sonicadas 30 minutos y no sonicadas durante el enfriamiento. Sólo permanecen conformes las emulsiones E9 y E11 sonicadas 30 minutos y sonicadas durante el enfriamiento (ver tabla 30).

| Muestra | T ambiente |            |    | 30°C       |            |    | Nevera (4 ± 1°C) |            |    |
|---------|------------|------------|----|------------|------------|----|------------------|------------|----|
|         | Zave       | PI.        | Ob | Zave       | PI.        | ob | Zave             | PI.        | Ob |
| E 5     | 293,4±1,15 | 0,319±0,06 | ☒  | 275,4±1,32 | 0,307±1,32 | ☒  | 286,3±1,32       | 0,312±1,32 | ☒  |
| E 7     | 297,4±3,24 | 0,341±1,32 | ☒  | 301,6±1,32 | 0,354±1,32 | ☒  | 311,1±1,32       | 0,342±1,32 | ☒  |
| E 9     | 267,3±4,18 | 0,143±1,32 | ☑  | 271,3±1,32 | 0,077±1,32 | ☑  | 269,2±1,32       | 0,104±1,32 | ☑  |
| E10     | 316,3±1,25 | 0,321±1,32 | ☒  | 321,4±1,32 | 0,316±1,32 | ☒  | 311,5±1,32       | 0,306±1,32 | ☒  |
| E 11    | 281,4±2,47 | 0,246±1,32 | ☑  | 271,7±1,32 | 0,253±1,32 | ☑  | 276,9±1,32       | 0,244±1,32 | ☑  |
| E 12    | 365,3±2,15 | 0,348±1,32 | ☒  | 348,2±1,32 | 0,353±1,32 | ☒  | 345,6±1,32       | 0,350±1,32 | ☒  |

**Tabla 30. Resultados del análisis de estabilidad térmica (tercera semana). Ob: observación, PI: polidispersidad, Zave: tamaños de gota en nanómetros.**

Se compara la polidispersidad de la muestras en función de la temperatura de almacenamiento (figura 40), y se observa la tendencia de las muestras a aumentar su PI, excepto E9. No se observan variaciones con respecto a la temperatura de almacenamiento.



**Figura 40. Representación gráfica de la polidispersidad (PI) en función de las condiciones de almacenamiento durante la tercera semana.**

Los resultados expuestos en las tablas 29 y 30 son indicativos de que la estabilidad física (determinada en base al estudio de la variación de la polidispersidad (PI) en el tiempo es independiente del tipo de enfriamiento (lento o rápido), debido a que las

emulsiones E5, E6, E9 y E10 enfriadas de forma rápida y las emulsiones E7, E8, E11 y E12 enfriadas de forma lenta presentan una estabilidad física similar. La aplicación de ultrasonidos durante la etapa de enfriamiento en cambio debe considerarse en consecuencia, un parámetro crítico, que favorece la estabilidad física de estos sistemas.

Se observa, que las emulsiones que más rápido se deterioran son las que no reciben energía durante el enfriamiento, (E6, E8, E10, E12) independientemente de si el enfriamiento es rápido o lento. Así mismo, se observa, que las emulsiones sonicadas 20 minutos (E5, E6, E7, E8) se deterioran más rápido que las sonicadas 30 minutos (E9, E10, E11, E12).

**7.2.4.1.4. Resultados finales del estudio de estabilidad física de la Fracción A.**

En la tabla 31 se exponen los datos de estabilidad de las muestras E9 y E11 hasta el final del estudio en base al criterio de aceptación adoptado (PI < 0,25). En este sentido ninguna de las emulsiones elaboradas supera las 5-6 semanas, tiempo que de acuerdo con la aplicabilidad requerida para este tipo de formulaciones (preparación de ELI a pequeña escala con objeto de utilizarlas para vehiculizar diferentes tipos de activos a nivel hospitalario).

| T  | M    | T ambiente |            |    | 30°C       |            |    | Nevera (4± 1°C) |            |    |
|----|------|------------|------------|----|------------|------------|----|-----------------|------------|----|
|    |      | Z(nm)      | PI.        | Ob | Z(nm)      | PI.        | Ob | Z(nm)           | PI.        | Ob |
| 4ª | E 9  | 270,8±2,11 | 0,170±0,01 | ☑  | 281,1±2,43 | 0,096±0,02 | ☑  | 280,6±2,38      | 0,115±0,01 | ☑  |
|    | E 11 | 302,1±1,65 | 0,278±0,03 | ☑  | 297,3±1,80 | 0,266±0,01 | ☑  | 283,5±2,61      | 0,261±0,07 | ☑  |
| 5ª | E 9  | 272,3±3,75 | 0,186±0,05 | ☑  | 286,4±2,36 | 0,145±0,07 | ☑  | 285,4±3,31      | 0,142±0,02 | ☑  |
|    | E 11 | 308,7±2,18 | 0,314±0,11 | ☒  | 300,1±3,04 | 0,308±0,15 | ☒  | 289,8±1,57      | 0,312±0,12 | ☒  |
| 9ª | E 9  | 313,1±1,38 | 0,304±0,09 | ☒  | 297,9±3,26 | 0,285±0,13 | ☒  | 303,3±2,42      | 0,291±0,08 | ☒  |

**Tabla 31. Resultados del análisis de estabilidad térmica (a t= 4, 5 y 9 semanas). T: tiempo en semanas, M: muestra, Ob: observación, PI: polidispersidad, Z(nm): tamaños de gota.**

En la gráfica de la fig. 41 se comparan los valores de polidispersidad en función de la temperatura de almacenamiento a t=4 semanas para las muestras E9 y E11. Se observa que no hay diferencia aparente entre los valores de polidispersidad de cada una de las emulsiones en las diferentes temperaturas de almacenamiento. Se considera que dicho parámetro, cuanto menos en las condiciones experimentales propuestas, no influye en la estabilidad física del producto final.

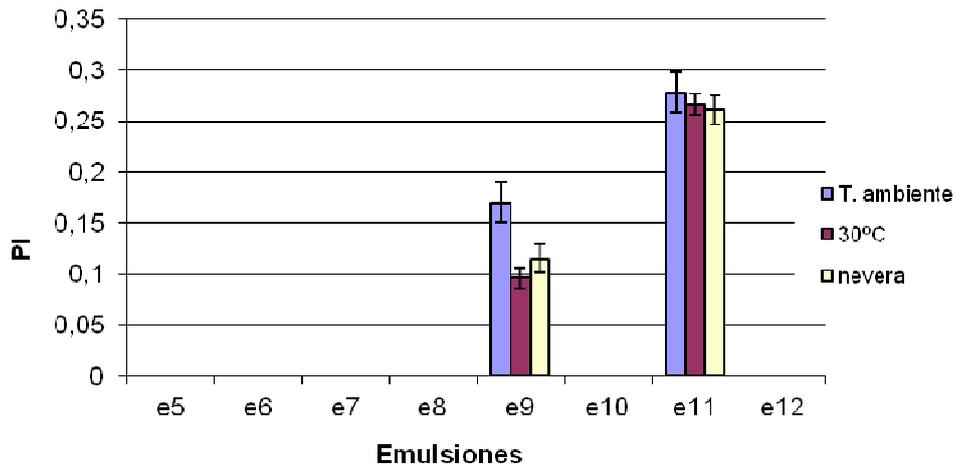


Figura 41. Representación gráfica de polidispersidad (PI) en función de las condiciones de almacenamiento durante la cuarta semana.

Existe una diferencia neta de los valores de polidispersidad de la emulsión E9 desde el momento de su fabricación en relación con las demás muestras de la serie, lo que corrobora el interés en este parámetro (la polidispersidad) con relación a otros parámetros como por ejemplo el tamaño de gota, para el enjuiciamiento de las características de estabilidad física de este tipo de preparados.

**7.2.4.2. Fracción B: emulsiones esterilizadas.**

Las emulsiones 1, 2, 3, 4 presentan separación de fases al ser sometidas a esterilización, por lo que se descartan del estudio. Al igual que para el estudio de estabilidad física de las emulsiones no esterilizadas (fracción A), se valoran los resultados experimentales de polidispersidad (ver figura 42).

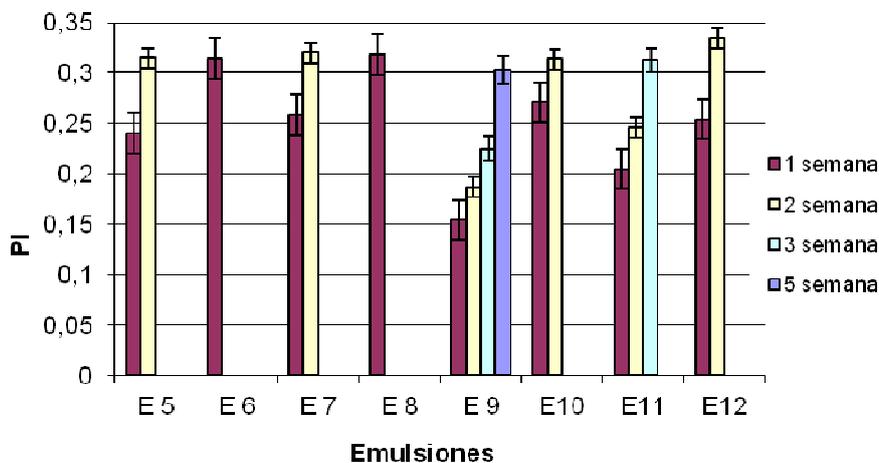


Figura 42. Valores de polidispersión (PI) en función del tiempo (fracción B).

La figura 42 permite observar que al igual que sucede en las emulsiones no esterilizadas, las emulsiones E6 y E8 fueron las primeras en dejar de cumplir las especificaciones requeridas de estabilidad física (1 semana); las emulsiones E5, E7, E10 y E12 se descartan la segunda semana, la E11 la tercera y la E9 se descartó la quinta semana. Los valores de polidispersidad aumentan sensiblemente en función del tiempo de almacenamiento; así mismo, se observa que el proceso de autoclavado afecta a la estabilidad física de las ELIs objeto de estudio, que dejan de cumplir con las especificaciones planteadas en el diseño de las mismas ( $PI < 0,25$ ) antes que sus correspondientes homólogas no esterilizadas; este hecho puede tener relación con la disminución de los valores de pH que se observa en las emulsiones autoclavadas (ver figura 24).

### **7.2.5. RESUMEN FINAL DEL ESTUDIO PRELIMINAR**

En el estudio preliminar (ver sección 6.1.1.4), se establecieron las condiciones necesarias para la elaboración de emulsiones tipo ELI: temperatura de mezclado de fases: 90°C, temperatura de emulsificación:  $74 \pm 1^\circ\text{C}$ , potencia de sonicación: 80W, tiempo de sonicación: 30 minutos, cinética de enfriamiento: baño con hielo y aplicación de energía durante el enfriamiento: 65W. El tamaño medio de gota oscila entre 250 y 350nm y una polidispersidad mínima de 0,070; con un aspecto blanco, homogéneo y opaco. Se utiliza un sistema de circuito cerrado que permite obtener un volumen de emulsión de 250ml.

### **7.3. RESULTADOS DE LA OPTIMIZACIÓN DEL EXCIPIENTE**

Una vez obtenida una ELI con una vida útil de 5 semanas, se decide averiguar los requerimientos tecnológicos necesarios para obtener preparados con una vida útil más prolongada. En este sentido, se elabora un plan de trabajo (ver Figura 43), para indagar en los diferentes factores a fin de optimizar las condiciones de fabricación.

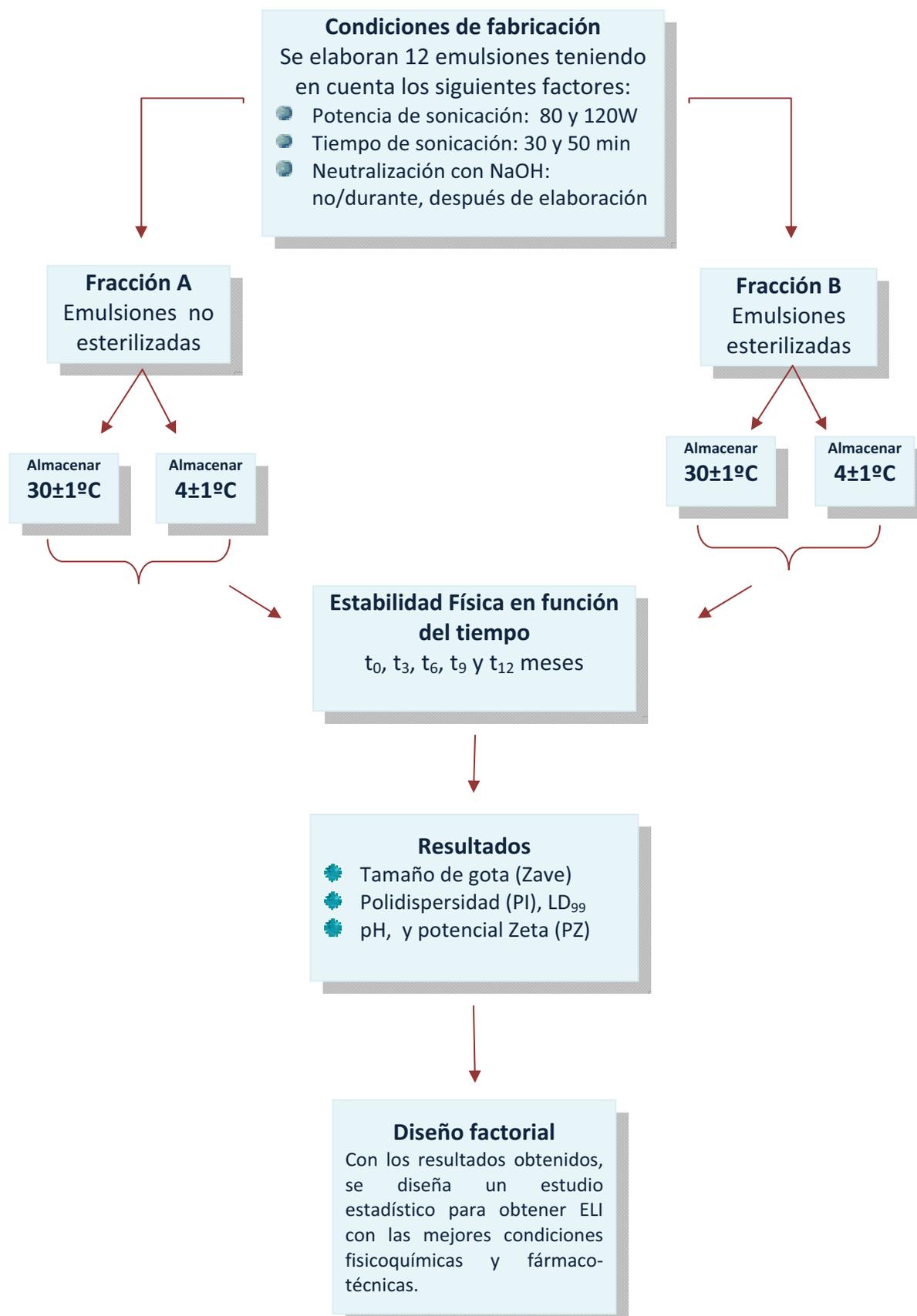


Figura 43. Diagrama de flujo del proceso de optimización del excipiente

- Se ensayan dos diferentes valores de potencia de sonicación (80 y 120w).
- Se incrementa el tiempo de sonicación (30 y 50 min).
- Se decide neutralizar las emulsiones con objeto de compensar la reducción de pH que la esterilización por calor lleva siempre asociada en vehículos tipo ELI, por liberación de algunas fracciones de ácidos grasos de los glicéridos presentes en la fase oleosa. Dado que la incorporación de NaOH es susceptible de influir en la estructura de las emulsiones, se ensaya dicha variable neutralizando durante o después de la fabricación. Se prepara también, un grupo de emulsiones que no se neutraliza, con objeto de que sirvan como grupo control.

Las ELIs así elaboradas se almacenan a 2 temperaturas diferentes ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Se realiza el correspondiente estudio de valoración de la estabilidad física en función del tiempo, mediante examen regular de los parámetros fisicoquímicos y de estabilidad de las emulsiones resultantes. (Sección 6.1.2)

A partir de los resultados obtenidos se diseña un estudio estadístico para determinar cuáles son las condiciones óptimas para obtener ELI con las características fisicoquímicas y farmacotécnicas determinadas para este tipo de excipiente.

### **7.3.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD EN FUNCIÓN DEL TIEMPO**

#### **7.3.1.1. Resultados de la evaluación de las emulsiones recién elaboradas**

Se preparan 12 emulsiones diferentes con la combinación de factores antes mencionados. Cada ELI elaborada se dividió en dos fracciones de 125ml cada una. Una fracción se esteriliza y la otra no. De cada fracción se toman muestras, se almacenan a las diferentes temperaturas seleccionadas y se analizan cada semana hasta mostrar signos de inestabilidad, tras lo cual se descartan del estudio. Los tiempos de lectura para este estudio son:  $t_0$  (24h después de su elaboración), y 1, 3, 6, 9 y 12 meses.

### 7.3.1.1.1. Fracción A: muestras no esterilizadas a $t_0$

En la tabla 32 figuran los valores promedio de Zave y PI, con sus respectivas desviaciones estándar de las determinaciones realizadas en emulsiones recién elaboradas (24 hora después de concluir el proceso preparativo).

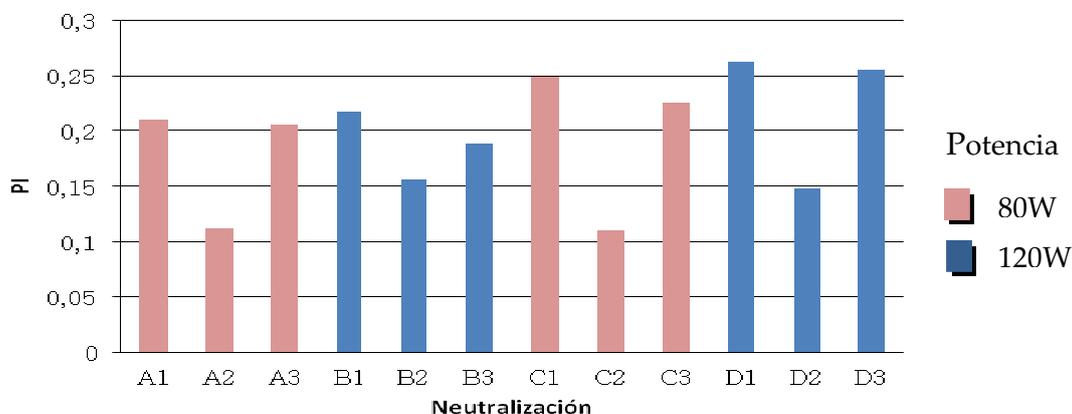
| TS (min) | P (W) | N   | Zave (nm)  | PI         | LD <sub>99</sub> (nm) | pH        | ZP (mV)     | Muestra |
|----------|-------|-----|------------|------------|-----------------------|-----------|-------------|---------|
| 30       | 80    | N/N | 253.9±3.64 | 0.211±0.03 | 845.2±1.92            | 4.51±0.42 | -38.10±2.66 | A1      |
|          |       | NDE | 257.3±2.95 | 0.112±0.04 | 565.3±5.27            | 7.82±0.35 | -50.70±1.42 | A2      |
|          |       | NAE | 245.1±3.13 | 0.206±0.01 | 857.3±7.54            | 7.52±0.75 | -46.45±1.82 | A3      |
|          | 120   | N/N | 236.0±2.43 | 0.217±0.06 | 981.0±2.32            | 4.43±0.59 | -37.39±0.13 | B1      |
|          |       | NDE | 258.5±2.98 | 0.176±0.04 | 623.4±1.86            | 7.64±0.51 | -45.18±2.02 | B2      |
|          |       | NAE | 246.7±2.98 | 0.189±0.03 | 685.1±1.87            | 6.64±0.54 | -40.89±0.92 | B3      |
| 50       | 80    | N/N | 270.6±2.60 | 0.248±0.07 | 993.1±3.90            | 4.11±0.57 | -33.65±1.06 | C1      |
|          |       | NDE | 237.5±2.67 | 0.110±0.05 | 567.8±4.09            | 7.66±0.55 | -46.77±1.71 | C2      |
|          |       | NAE | 225.7±3.29 | 0.265±0.02 | 734.2±3.91            | 7.42±0.54 | -41.39±3.32 | C3      |
|          | 120   | N/N | 266.1±3.29 | 0.263±0.08 | 893.7±1.86            | 4.24±0.79 | -39.19±1.24 | D1      |
|          |       | NDE | 245.6±1.86 | 0.148±0.01 | 562.5±2.01            | 7.41±0.42 | -46.44±1.20 | D2      |
|          |       | NAE | 266.1±2.53 | 0.255±0.05 | 786.8±1.98            | 6.95±0.35 | -44.76±3.51 | D3      |

**Tabla 32. Caracterización de ELI a  $t_0$  (n=3). TS: tiempo de sonicación, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD<sub>99</sub>: difracción laser diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, S/N: no neutralización, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración.**

Las emulsiones presentan un tamaño de gota (Zave) correcto desde el punto de vista galénico; no hay diferencias aparentes entre ellas que puedan asociarse al tiempo y/o la potencia aplicada en los diferentes métodos de fabricación. No obstante, la polidispersidad es superior a 0,2 en las emulsiones no neutralizadas y en las que se neutralizan después de la fabricación (figura 44), lo que deja entrever que las emulsiones neutralizadas antes de la fabricación pueden tener una mejor estabilidad fisicoquímica. La energía comunicada al sistema mediante la técnica de ultrasonidos en las condiciones operativas empleadas permite conseguir un tamaño medio de gota que oscila entre 250 y 270nm.

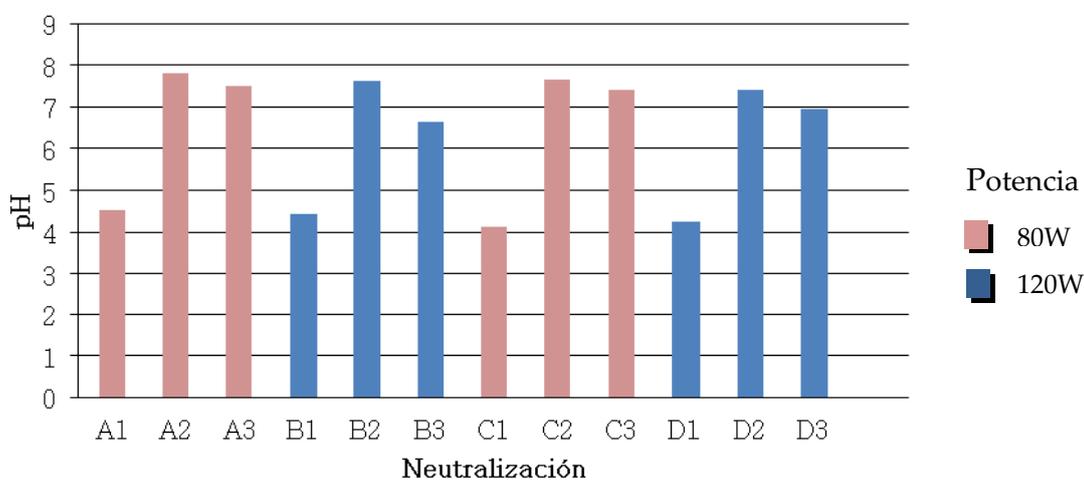
La calidad de las emulsiones (menor polidispersidad) sí se diferencia, en concreto al neutralizar las emulsiones antes de la fabricación, posiblemente debido a que la

adición de una base que neutralice los ácidos grasos libres que se generan durante el autoclavado, interfiere en la estabilización de las capas interlipídicas de la emulsión<sup>49</sup>, lo que no sucede al incorporar la base antes de la emulsificación y autoclavado.



**Figura 44.** Efecto de la neutralización en la polidispersidad de ELI elaboradas a  $t_0$ .

Asimismo, se observa un descenso notable del pH en las emulsiones no neutralizadas con respecto a las que se neutralizan en algún momento de la fabricación (figura 45), si bien no parece haber diferencias apreciables entre los valores de pH de las que se neutralizaron antes o después de la fabricación.



**Figura 45.** Efecto del pH en la neutralización de las ELI elaboradas a  $t_0$ .

En relación al Potencial Z, se obtiene una superficie de carga de las gotas entre -30 y -50mV. ELIs con valores del orden de -30mV (menor estabilidad) se asocian a valores de pH comprendidos entre 4,1 y 4,6. ELIs con valores de potencial Z cercanos a -50mV (mayor estabilidad) se asocian a valores de pH próximos a 8 (figura 46).

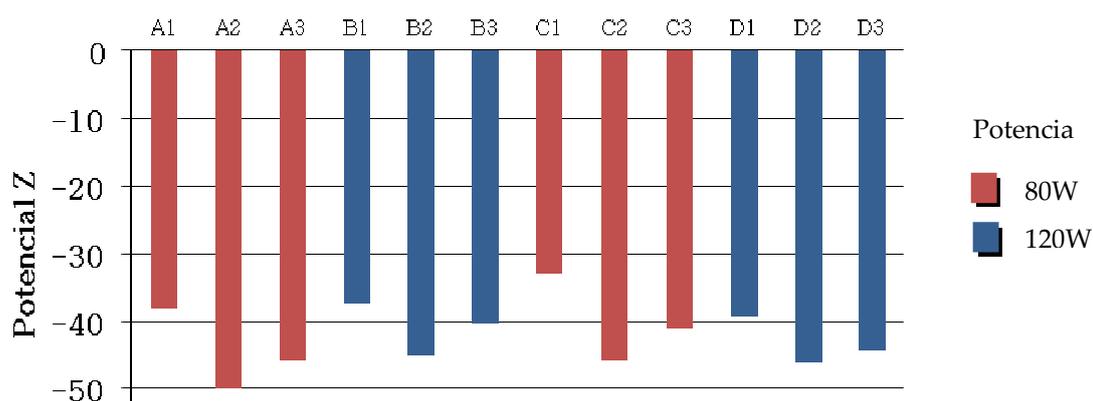


Figura 46. Efecto de la neutralización en el potencial Z de las ELI elaboradas a t<sub>0</sub>.

7.3.1.1.2. Fracción B: muestras de emulsiones esterilizadas a t<sub>0</sub>

En la tabla 33 se exponen los resultados de los análisis realizados a emulsiones autoclavadas 24h después de su elaboración (n=3).

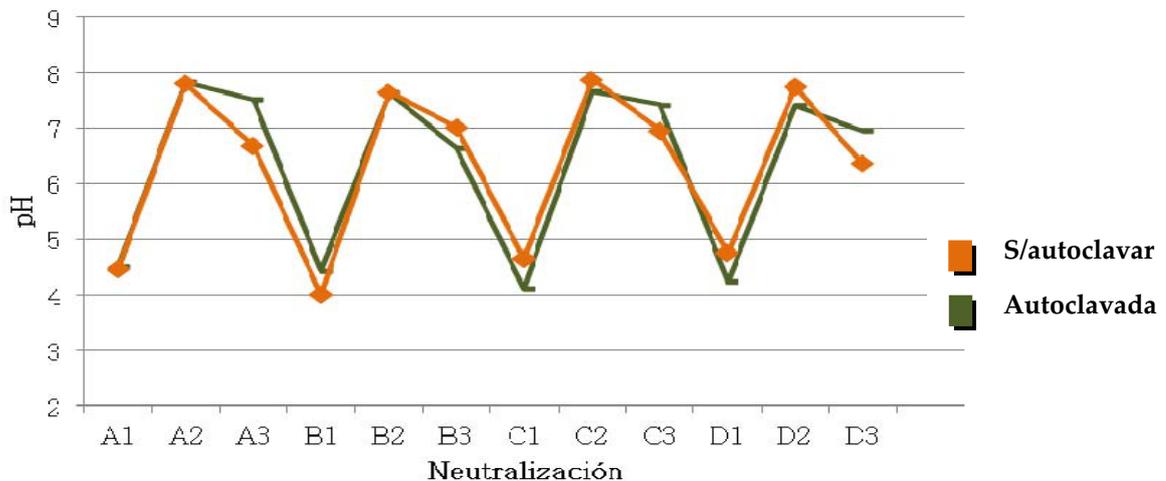
| TS (min) | P (W) | N   | Zave (nm)  | PI         | LD <sub>99</sub> (nm) | pH        | ZP (mV)     | Muestra |
|----------|-------|-----|------------|------------|-----------------------|-----------|-------------|---------|
| 30       | 80    | N/N | 293,7±2.98 | 0,235±0.08 | 921,3±1.86            | 4,46±0.51 | -37,23±1.24 | A1      |
|          |       | NDE | 262,5±2.60 | 0,168±0.01 | 501,4±2.01            | 7,81±0.54 | -49,18±1.20 | A2      |
|          |       | NAE | 262,4±2.67 | 0,201±0.05 | 785,1±1.98            | 6,68±0.57 | -44,13±3.51 | A3      |
|          | 120   | N/N | 255,3±3.29 | 0,242±0.02 | 940,3±1.92            | 4,01±0.55 | -31,45±3.32 | B1      |
|          |       | NDE | 226,7±3.64 | 0,156±0.03 | 518,6±5.27            | 7,65±0.54 | -47,65±2.66 | B2      |
|          |       | NAE | 255,7±2.95 | 0,203±0.04 | 885,6±4.09            | 7,01±0.79 | -43,73±0.92 | B3      |
| 50       | 80    | N/N | 253,9±3.29 | 0,286±0.07 | 916,8±7.54            | 4,65±0.42 | -39,05±1.06 | C1      |
|          |       | NDE | 286,0±1.86 | 0,118±0.05 | 426,1±2.32            | 7,88±0.35 | -46,35±1.71 | C2      |
|          |       | NAE | 243,3±2.53 | 0,247±0.01 | 892,6±1.86            | 6,96±0.42 | -46,12±1.42 | C3      |
|          | 120   | N/N | 248,8±3.13 | 0,198±0.06 | 684,2±1.87            | 4,75±0.35 | -39,98±1.82 | D1      |
|          |       | NDE | 283,6±2.43 | 0,188±0.04 | 644,6±3.91            | 7,75±0.75 | -44,35±0.13 | D2      |
|          |       | NAE | 265,4±2.98 | 0,211±0.03 | 879,3±3.90            | 6,36±0.59 | -41,93±2.02 | D3      |

Tabla 33. Caracterización de ELI a t<sub>0</sub> (n=3). TS: tiempo de sonicación, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD<sub>99</sub>: difracción laser diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, S/N: no neutralización, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración.

La comparación de datos obtenidos tras autoclavado con las correspondientes muestras no autoclavadas permite deducir que no hay diferencias apreciables entre los valores de tamaño de gota y de polidispersidad en las emulsiones evaluadas a t<sub>0</sub>.

En todos los casos se obtienen valores dentro de un rango óptimo, si bien las emulsiones no neutralizadas presentan valores de pH significativamente inferiores que las neutralizadas en algún momento de su fabricación (figura 47).

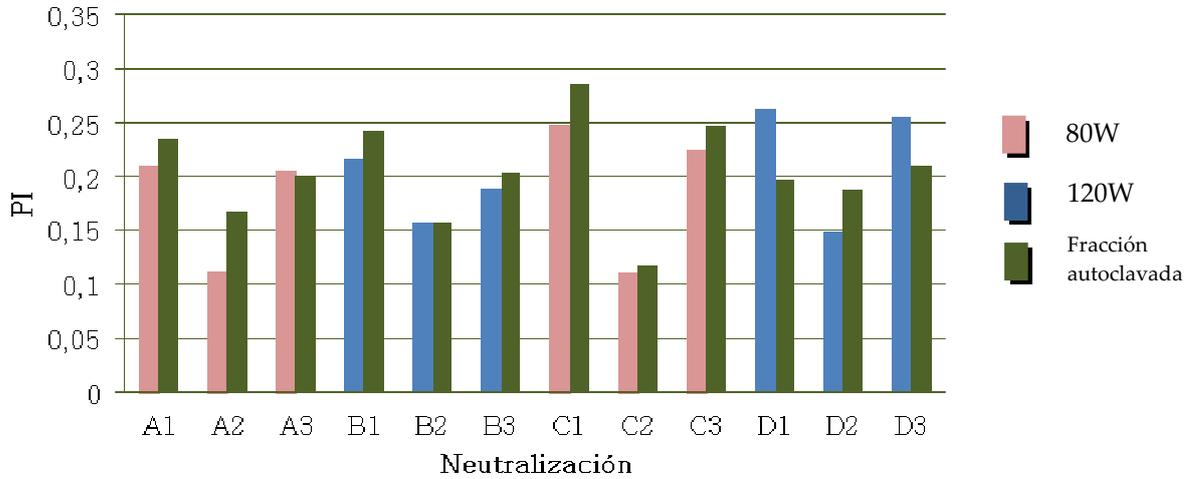
Los valores de potencial Z también difieren en ambos grupos, (-30mV en las no neutralizadas y de -50mV en las neutralizadas en cualquier momento de la fabricación).



**Figura 47. Efecto de la neutralización en el pH de las ELI elaboradas a t0. Comparativa con la fracción autoclavada.**

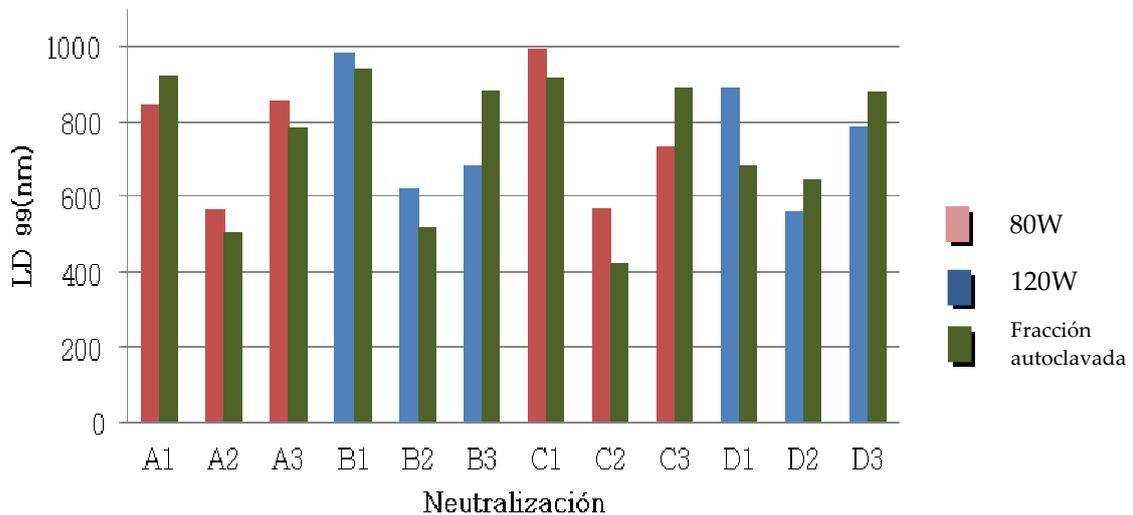
En cuanto a la polidispersidad (figura 48) es de destacar que los valores de las emulsiones neutralizadas antes de la fabricación (A2, B2, C2 y D2) presentan valores significativamente inferiores que el resto de emulsiones.

No existen diferencias significativas entre las fracciones autoclavadas de cada muestra en relación con su homóloga no esterilizada, y aparentemente, tampoco existen grandes diferencias entre aplicar potencia de 80W o de 120W atendiendo a los valores de polidispersidad.



**Figura 48. Efecto de la neutralización en PI de las ELI elaboradas a t0. Comparativa con la fracción autoclavada**

El LD<sub>99</sub> nos muestra la distribución global de las gotas en las distintas emulsiones. Los datos muestran que las emulsiones con un tamaño de gota inferior a 600nm en el 99% de la distribución son las neutralizadas antes de la fabricación, a diferencia de las emulsiones no neutralizadas que presentan valores cercanos a 1µm.



**Figura 49. Efecto de la neutralización en LD<sub>99</sub> de las ELI elaboradas a t0 meses. Comparativa con la fracción autoclavada.**

**7.3.1.2. Evaluación de Las emulsiones A t = 3 meses**

En esta fase del estudio además de los parámetros estudiados hasta el momento, se considera también en el efecto del almacenamiento de las muestras en diferentes condiciones: nevera a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  (ver tabla 34) y estufa a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  (ver tabla 35).

| TS (min) | P (W) | A   | N   | Zave (nm)  | PI         | LD <sub>99</sub> (nm) | pH        | ZP (mV)     | Muestra |
|----------|-------|-----|-----|------------|------------|-----------------------|-----------|-------------|---------|
| 30       | 80    | S/A | N/N | 303,5±1.65 | 0,351±0.07 | 944,4±1.86            | 4,36±0.51 | -35,76±3.51 | A1      |
|          |       |     | NDE | 230,4±2.60 | 0,175±0.05 | 487,1±2.01            | 7,78±0.14 | -48,23±1.20 | A2      |
|          |       |     | NAE | 235,5±2.17 | 0,248±0.01 | 990,8±1.98            | 6,48±0.37 | -41,65±1.24 | A3      |
|          |       | A   | N/N | 266,1±2.14 | 0,315±0.08 | 941,6±2.44            | 4,13±0.21 | -34,32±3.32 | A1-A    |
|          |       |     | NDE | 234,9±3.64 | 0,127±0.01 | 612,4±3.12            | 7,79±0.44 | -48,12±2.66 | A2-A    |
|          |       |     | NAE | 228,5±2.98 | 0,198±0.02 | 1005,0±2.32           | 5,96±0.38 | -39,88±0.92 | A3-A    |
|          | 120   | S/A | N/N | 260,3±3.29 | 0,322±0.05 | 980,0±1.92            | 4,01±0.55 | -32,17±3.52 | B1      |
|          |       |     | NDE | 242,4±3.64 | 0,165±0.03 | 817,4±5.07            | 7,42±0.24 | -45,20±2.66 | B2      |
|          |       |     | NAE | 256,1±2.95 | 0,231±0.04 | 716,8±4.49            | 6,34±0.79 | -40,87±0.92 | B3      |
|          |       | A   | N/N | 272,0±2.67 | 0,369±0.01 | 909,0±6.54            | 3,99±0.81 | -31,03±1.62 | B1-A    |
|          |       |     | NDE | 219,6±2.84 | 0,163±0.05 | 604,6±2.32            | 7,60±0.14 | 47,75±2.16  | B2-A    |
|          |       |     | NAE | 245,5±3.64 | 0,295±0.02 | 874,9±4.02            | 6,54±0.67 | -40,32±0.92 | B3-A    |
| 50       | 80    | S/A | N/N | 264,4±3.29 | 0,371±0.05 | 929,8±1.54            | 3,88±0.62 | -30,96±1.06 | C1      |
|          |       |     | NDE | 234,4±1.86 | 0,151±0.07 | 453,5±2.32            | 7,64±0.35 | -46,56±1.71 | C2      |
|          |       |     | NAE | 239,2±2.53 | 0,337±0.01 | 737,9±1.86            | 7,30±0.42 | -41,24±1.42 | C3      |
|          |       | A   | N/N | 216,3±2.67 | 0,459±0.05 | 970,1±5.24            | 4,02±0.51 | -32,33±2.82 | C1-A    |
|          |       |     | NDE | 235,0±1.94 | 0,165±0.03 | 552,1±2.32            | 7,65±0.34 | -46,54±0.66 | C2-A    |
|          |       |     | NAE | 228,0±3.64 | 0,315±0.04 | 839,1±3.92            | 6,87±0.57 | -44,72±0.92 | C3-A    |
|          | 120   | S/A | N/N | 242,0±3.13 | 0,361±0.06 | 1034,1±1.87           | 4,11±0.35 | -34,35±1.82 | D1      |
|          |       |     | NDE | 236,1±2.43 | 0,163±0.01 | 570,9±3.91            | 7,43±0.75 | -46,58±0.13 | D2      |
|          |       |     | NAE | 255,3±2.98 | 0,199±0.03 | 706,8±3.70            | 6,55±0.29 | -41,69±2.02 | D3      |
|          |       | A   | N/N | 265,7±2.67 | 0,306±0.05 | 998,2±4.54            | 4,32±0.53 | -36,46±3.32 | D1-A    |
|          |       |     | NDE | 227,7±3.35 | 0,265±0.02 | 449,1±2.32            | 7,87±0.13 | -45,08±2.66 | D2-A    |
|          |       |     | NAE | 255,3±3.64 | 0,306±0.04 | 872,3±0.32            | 6,40±0.37 | -42,19±0.92 | D3-A    |

**Tabla 34. Resultados de las muestras de ELIs almacenadas  $4^\circ\text{C}$  a t3 meses. TS: tiempo de sonicación, P: potencia, A: autoclavado, S/A: sin autoclavar, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD99: difracción laser diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, S/N: no neutralización, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración.**

| TS (min) | P (W) | A   | N   | Zave (nm)  | PI         | LD <sub>99</sub> (nm) | pH        | ZP (mV)     | Muestra |
|----------|-------|-----|-----|------------|------------|-----------------------|-----------|-------------|---------|
| 30       | 80    | S/A | N/N | 313,2±2.98 | 0,304±0.06 | 1171,0±1.92           | 4,26±0.14 | -33,76±0.92 | A1      |
|          |       |     | NDE | 247,5±3.29 | 0,152±0.01 | 554,9±5.07            | 7,65±0.67 | -47,23±3.52 | A2      |
|          |       |     | NAE | 226,7±3.64 | 0,206±0.03 | 829,2±4.49            | 6,44±0.62 | -41,65±2.66 | A3      |
|          |       | A   | N/N | 293,7±2.95 | 0,313±0.05 | 1140,5±6.54           | 4,09±0.35 | -32,32±0.92 | A1-A    |
|          |       |     | NDE | 246,7±2.67 | 0,189±0.02 | 496,2±2.32            | 7,46±0.42 | -45,12±1.71 | A2-A    |
|          |       |     | NAE | 253,9±2.67 | 0,201±0.02 | 655,9±5.24            | 5,80±0.51 | -39,88±1.42 | A3-A    |
|          | 120   | S/A | N/N | 248,8±1.94 | 0,357±0.05 | 981,0±2.32            | 4,12±0.34 | -32,17±2.82 | B1      |
|          |       |     | NDE | 241,4±3.64 | 0,169±0.03 | 610,8±3.92            | 7,35±0.57 | -45,20±0.66 | B2      |
|          |       |     | NAE | 253,9±3.13 | 0,198±0.04 | 710,9±1.87            | 6,41±0.35 | -41,87±0.92 | B3      |
|          |       | A   | N/N | 257,3±2.84 | 0,222±0.01 | 940,3±4.02            | 3,86±0.75 | -29,03±1.62 | B1-A    |
|          |       |     | NDE | 245,1±3.64 | 0,173±0.07 | 651,2±1.54            | 7,43±0.38 | -45,75±2.02 | B2-A    |
|          |       |     | NAE | 255,7±3.29 | 0,371±0.05 | 911,5±2.32            | 5,50±0.55 | -36,32±3.32 | B3-A    |
| 50       | 80    | S/A | N/N | 270,6±1.86 | 0,333±0.01 | 993,1±1.86            | 3,81±0.24 | -30,96±2.66 | C1      |
|          |       |     | NDE | 237,5±2.53 | 0,101±0.08 | 557,8±3.91            | 7,61±0.79 | -45,56±2.16 | C2      |
|          |       |     | NAE | 262,5±2.43 | 0,290±0.01 | 764,2±3.70            | 7,24±0.81 | -41,24±0.92 | C3      |
|          |       | A   | N/N | 262,4±2.98 | 0,475±0.05 | 937,8±4.54            | 3,87±0.29 | -31,33±1.06 | C1-A    |
|          |       |     | NDE | 236,0±2.67 | 0,130±0.03 | 437,1±2.32            | 7,58±0.53 | -45,54±0.13 | C2-A    |
|          |       |     | NAE | 283,6±3.35 | 0,303±0.04 | 902,6±0.32            | 6,87±0.13 | -45,72±3.51 | C3-A    |
|          | 120   | S/A | N/N | 265,4±3.64 | 0,397±0.04 | 1195,7±1.86           | 4,11±0.37 | -34,35±1.20 | D1      |
|          |       |     | NDE | 245,6±1.65 | 0,154±0.05 | 625,5±2.01            | 7,40±0.51 | -46,58±1.24 | D2      |
|          |       |     | NAE | 266,1±2.60 | 0,282±0.02 | 686,0±1.98            | 6,55±0.14 | -41,69±3.32 | D3      |
|          |       | A   | N/N | 286,0±2.17 | 0,352±0.05 | 968,8±2.44            | 4,26±0.37 | -35,46±2.66 | D1-A    |
|          |       |     | NDE | 243,3±2.14 | 0,223±0.07 | 666,6±3.12            | 7,83±0.21 | -45,08±0.92 | D2-A    |
|          |       |     | NAE | 266,1±3.64 | 0,238±0.01 | 897,3±2.32            | 6,20±0.44 | -40,19±1.62 | D3-A    |

**Tabla 35. Resultados de las muestras de ELIs almacenadas 30°C a t3 meses. TS: tiempo de sonicación, P: potencia, A: autoclavado, S/A: sin autoclavar, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD99: difracción laser diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, S/N: no neutralización, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración.**

Los resultados experimentales muestran que no existe una diferencia apreciable entre los valores de tamaño de gota de las dos distribuciones; el valor más elevado no supera los 315nm, por lo que cumplen las especificaciones exigibles a este tipo de preparaciones. En cuanto a la polidispersidad, se observa una tendencia muy similar en la distribución de los resultados experimentales, por lo que almacenar a 4± 1°C o a 30±1°C, no parece influir en la estabilidad de las ELI objeto de estudio.

Las emulsiones no neutralizadas sobrepasan el límite de polidispersidad de 0,25 requerido como criterio de seguridad, por lo que se descartan para proseguir el presente estudio.

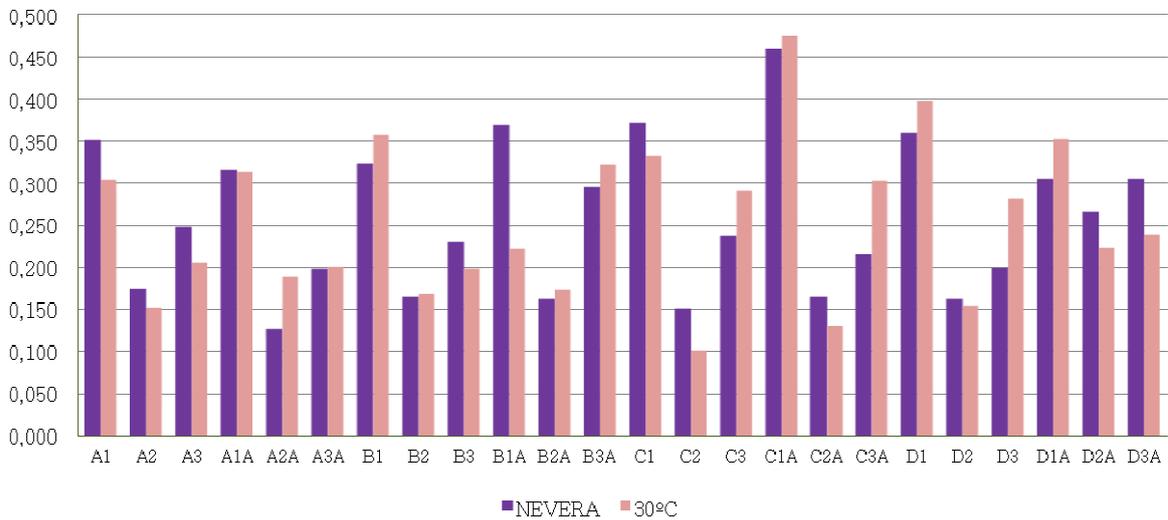


Figura 50. Efecto del almacenamiento en la polidispersidad de las ELIs elaboradas a t3 meses. Comparativa de la fracción almacenada a 4 y a 30°C.

Del mismo modo el LD<sub>99</sub> nos muestra que la comparativa de los datos es muy similar entre sí, y confirma que las emulsiones no neutralizadas tienen valores cercanos a 1µm y que incluso algunas lo superan, mientras que las emulsiones neutralizadas durante la fabricación son las que presentan valores LD<sub>99</sub> no mayores de 600nm.

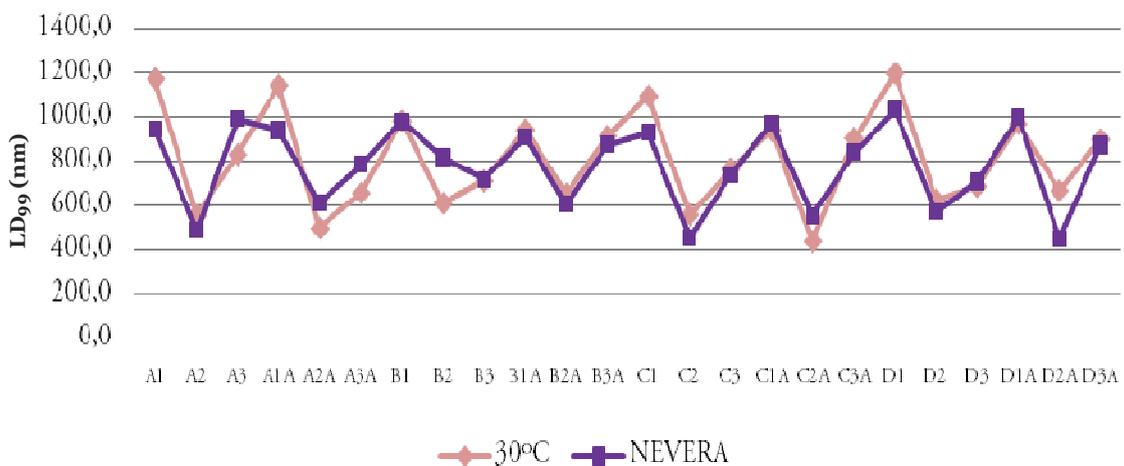


Figura 51. Efecto del almacenamiento en LD99 de las ELIs elaboradas a t3 meses. Comparativa de la fracción almacenada en nevera y a 30°C.

Por último, se compara la tendencia de los valores de pH en función del potencial Z. Se observa una correlación muy directa entre los datos confirmándose que valores de pH bajos (< 5) se corresponden con valores de potencial Z indicativos de una menor estabilidad física. En la figura 52 se presentaron los datos obtenidos a 30°C.

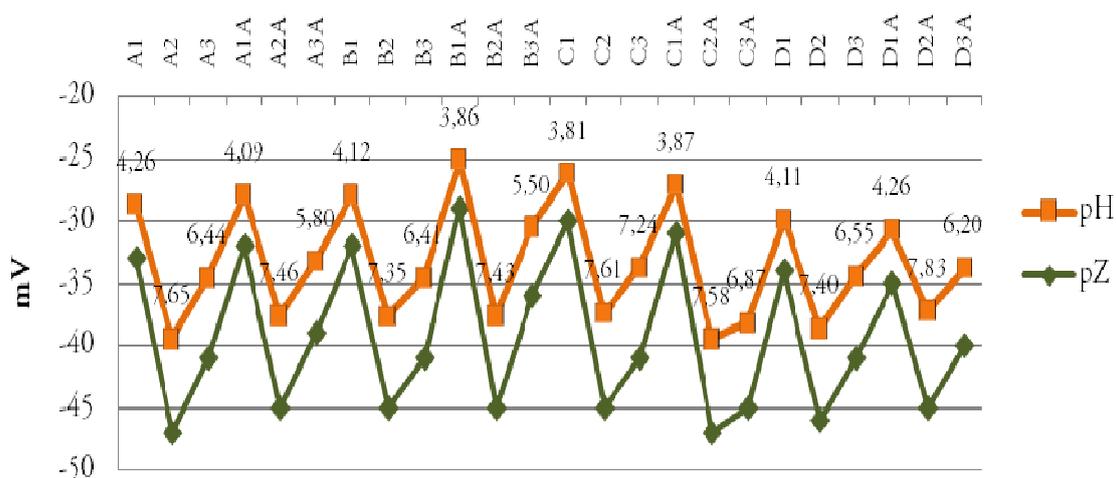


Figura 52. Comparativa de los valores de pH y pZ de las emulsiones almacenadas a 30°C a t3 meses.

### 7.3.2.2. Evaluación de las emulsiones a T = 6 meses

Se descartan todas las emulsiones no neutralizadas dado que los valores de PI y LD<sub>99</sub> sobrepasan los estipulados en las este estudio. Los datos obtenidos tras 6 meses de almacenamiento a 4± 1°C se presentan en la tabla 36 y los valores del almacenamiento a 30± 1°C en la tabla 37.

| TS  | P  | A   | N   | Zave (nm)   | PI          | LD <sub>99</sub> (nm) | pH         | ZP (mV)     | Muestra     |      |
|-----|----|-----|-----|-------------|-------------|-----------------------|------------|-------------|-------------|------|
| 30  | 80 | S/A | NDE | 218,0±3.29  | 0,245±0.01  | 517,7±5.07            | 7,64±0.67  | -47,56±2.02 | A2          |      |
|     |    |     | NAE | 260,5±3.64  | 0,377±0.03  | 1091,1±4.49           | 5,36±0.62  | -34,28±3.32 | A3          |      |
|     |    | A   | NDE | 223,9±2.67  | 1,710±0.02  | 637,4±2.32            | 7,65±0.42  | -47,15±2.16 | A2-A        |      |
|     |    |     | NAE | 261,1±2.67  | 0,377±0.02  | 937,7±5.24            | 5,85±0.51  | -38,29±0.92 | A3-A        |      |
|     |    | 120 | S/A | NDE         | 231,5±3.64  | 0,191±0.03            | 643,3±3.92 | 7,29±0.57   | -44,81±0.66 | B2   |
|     |    |     |     | NAE         | 265,7±3.13  | 0,316±0.04            | 830,3±1.87 | 5,23±0.35   | -34,72±0.92 | B3   |
|     | A  |     | NDE | 238,9±3.64  | 0,193±0.07  | 569,5±1.54            | 7,46±0.38  | 46,31±1.24  | B2-A        |      |
|     |    |     | NAE | 270,0±3.29  | 0,316±0.05  | 988,4±2.32            | 5,42±0.55  | -35,07±3.32 | B3-A        |      |
|     | 50 | 80  | S/A | NDE         | 220,2±2.53  | 0,173±0.08            | 667,5±3.91 | 7,50±0.79   | -45,16±0.92 | C2   |
|     |    |     |     | NAE         | 272,0±2.43  | 0,281±0.01            | 871,0±3.70 | 7,17±0.81   | -40,22±1.62 | C3   |
|     |    |     | A   | NDE         | 218,5±2.67  | 0,161±0.03            | 555,3±2.32 | 7,51±0.53   | -45,46±0.13 | C2-A |
|     |    |     |     | NAE         | 274,7±3.35  | 0,217±0.04            | 892,9±0.32 | 5,75±0.13   | -36,83±3.51 | C3-A |
| 120 |    |     | S/A | NDE         | 229,4 ±1.65 | 0,275±0.05            | 612,0±2.01 | 7,30±0.51   | -45,09±3.52 | D2   |
|     |    |     |     | NAE         | 240,3 ±2.60 | 0,199±0.02            | 750,7±1.98 | 6,43±0.14   | -40,26±2.66 | D3   |
|     |    | A   | NDE | 241,0 ±2.14 | 0,259±0.07  | 601,5±3.12            | 7,73±0.21  | -44,47±1.71 | D2-A        |      |
|     |    |     | NAE | 247,5 ±3.64 | 0,272±0.01  | 884,4±2.32            | 6,28±0.44  | -41,12±1.42 | D3-A        |      |

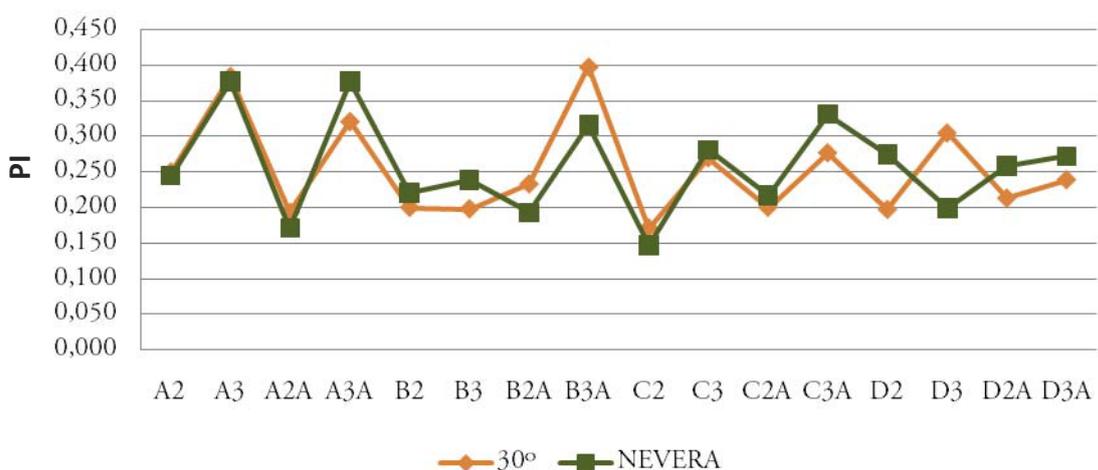
**Tabla 36. Resultados de las muestras de ELIs almacenadas 4°C a t6 meses. TS: tiempo de sonicación, P: potencia, A: autoclavado, S/A: sin autoclavar, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD<sub>99</sub>: diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración.**

| TS (min) | P (W) | A   | N   | Zave (nm)  | PI         | LD <sub>99</sub> (nm) | pH         | ZP (mV)     | Muestra     |      |
|----------|-------|-----|-----|------------|------------|-----------------------|------------|-------------|-------------|------|
| 30       | 80    | S/A | NDE | 220,0±3.13 | 0,245±0.03 | 517,7±3.92            | 7,51±0.35  | -46,04±0.92 | A2          |      |
|          |       |     | NAE | 271,3±3.64 | 0,377±0.04 | 1091,1±1.87           | 5,32±0.38  | -35,82±1.62 | A3          |      |
|          |       | A   | NDE | 225,4±3.29 | 1,710±0.07 | 637,4±1.54            | 7,33±0.55  | -44,13±0.13 | A2-A        |      |
|          |       |     | NAE | 255,1±2.53 | 0,377±0.05 | 937,7±2.32            | 5,70±0.79  | -38,29±3.51 | A3-A        |      |
|          |       | 120 | S/A | NDE        | 238,1±3.64 | 0,221±0.08            | 643,3±5.07 | 7,22±0.57   | -44,35±0.66 | B2   |
|          |       |     |     | NAE        | 259,7±3.29 | 0,316±0.01            | 830,3±4.49 | 5,83±0.81   | -36,29±0.92 | B3   |
|          | A     |     | NDE | 240,1±3.64 | 0,193±0.03 | 569,5±2.32            | 7,30±0.53  | -44,17±1.24 | B2-A        |      |
|          |       |     | NAE | 264,4±2.67 | 0,316±0.04 | 988,4±5.24            | 5,40±0.13  | -35,42±3.32 | B3-A        |      |
|          | 50    | 80  | S/A | NDE        | 215,4±1.65 | 0,173±0.05            | 667,5±3.91 | 7,47±0.51   | -44,58±3.52 | C2   |
|          |       |     |     | NAE        | 258,4±2.60 | 0,281±0.02            | 871,0±1.98 | 6,11±0.14   | -38,27±2.66 | C3   |
|          |       |     | A   | NDE        | 226,0±2.14 | 0,161±0.07            | 555,3±3.12 | 7,44±0.21   | -46,41±1.71 | C2-A |
|          |       |     |     | NAE        | 271,6±3.64 | 0,19 ±0.01            | 892,9±2.32 | 6,25±0.44   | -39,03±1.42 | C3-A |
| 120      |       |     | S/A | NDE        | 239,1±2.67 | 0,275±0.01            | 612,0±3.70 | 7,27±0.67   | -45,14±2.02 | D2   |
|          |       |     |     | NAE        | 220,0±2.43 | 0,199±0.03            | 750,7±2.32 | 7,51±0.62   | -46,01±3.32 | D3   |
|          |       | A   | NDE | 271,3±2.67 | 0,259±0.02 | 601,5±0.32            | 5,32±0.42  | -35,90±2.16 | D2-A        |      |
|          |       |     | NAE | 225,4±3.35 | 0,272±0.02 | 884,4±2.01            | 7,33±0.51  | -44,23±0.92 | D3-A        |      |

**Tabla 37. Resultados de las muestras de ELIs almacenadas 30°C a t6 meses. TS: tiempo de sonicación, P: potencia, A: autoclavado, S/A: sin autoclavar, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD<sub>99</sub>: diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración.**

La evaluación de los valores de polidispersidad de las muestras almacenadas, respectivamente, a 4 y a 30°C (figura 53), permiten apreciar un aumento importante en las emulsiones neutralizadas tras la fabricación (A3, B3, C3, D3 y sus fracciones autoclavadas). En general, los valores de las emulsiones NDE aumentan muy rápidamente en función del tiempo y superan el margen de seguridad impuesto para dicho parámetro, motivo por el cual deben descartarse del estudio.

Potencial Z y pH siguen mostrando la tendencia esperada: a medida que aumenta la polidispersidad disminuye el pH y los valores negativos de ZP se acercan a -30mV, un signo más de que las emulsiones descartadas son ya menos estables a nivel fisicoquímico.



**Figura 53. Comparativa de los valores de PI de ELI a 4 y 30°C a t6 meses.**

En relación al LD<sub>99</sub>, los resultados experimentales correspondientes a las emulsiones almacenadas a 30°C no muestran diferencias apreciables en relación a los de las almacenadas en nevera. La mayoría de datos muestran que las emulsiones no superan 1µm, si bien la mayoría de emulsiones neutralizadas después de la fabricación se acercan mucho a dicho valor (ver fig. 54).

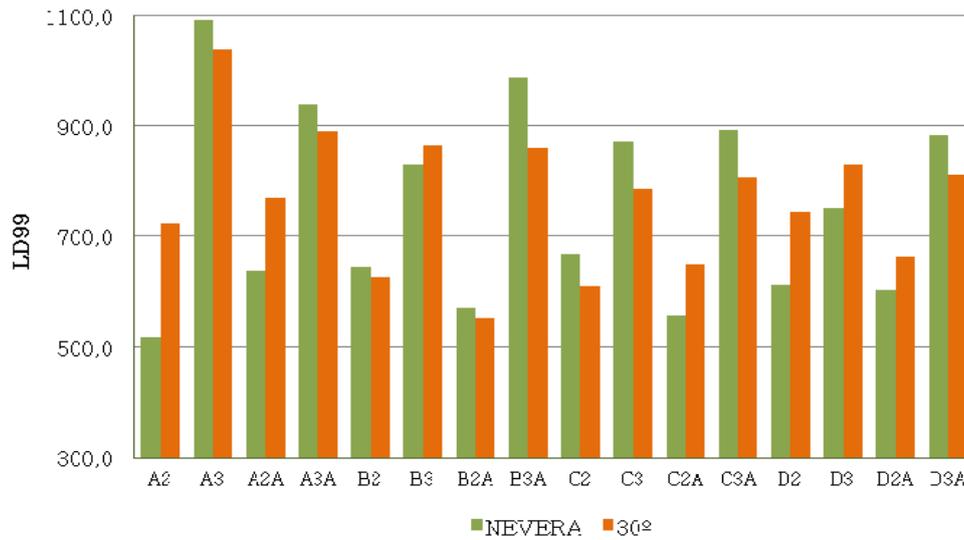


Figura 54. Comparativa de los valores de LD99 de las ELI a 4 y 30°C a t6 meses.

### 7.3.2.3. Evaluación de las emulsiones a t = 9 meses

A t= 9meses, únicamente permanecen en estudio las emulsiones neutralizadas durante la fabricación. Se observa que los valores de Zave son similares para todas ellas (entre 213 y 247nm), a diferencia de lo que sucede con los valores de PI; algunas superan el valor límite fijado de 0,25, pero ninguna supera el valor límite de LD<sub>99</sub> fijado en 1µm por lo que siguen considerándose objeto de estudio. En las tablas38 y 39, se exponen los resultados experimentales obtenidos.

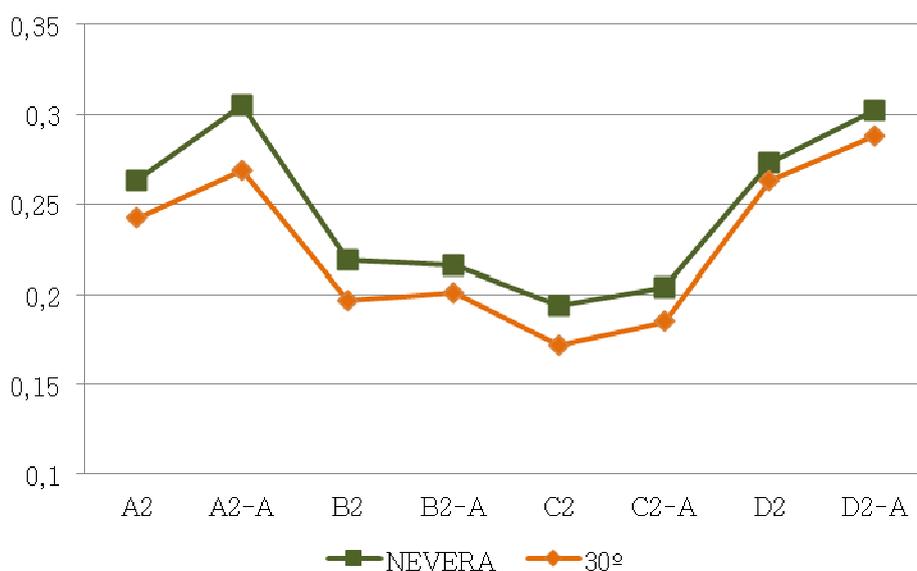
| TS | P   | A   | N   | Zave (nm)  | PI         | LD <sub>99</sub> (nm) | pH        | ZP (mV)     | Muestra |
|----|-----|-----|-----|------------|------------|-----------------------|-----------|-------------|---------|
| 30 | 80  | S/A | NDE | 229,4±2.53 | 0,253±0.04 | 780,4±1.54            | 7,64±0.57 | -47,39±0.13 | A2      |
|    |     | A   | NDE | 229,2±3.64 | 0,302±0.05 | 656,1±2.32            | 7,65±0.81 | -45,01±3.51 | A2-A    |
|    | 120 | S/A | NDE | 230,0±3.29 | 0,213±0.02 | 698,2±5.07            | 7,29±0.53 | -44,73±0.66 | B2      |
|    |     | A   | NDE | 229,2±3.64 | 0,206±0.07 | 677,5±4.49            | 7,46±0.13 | 46,09±0.92  | B2-A    |
| 50 | 80  | S/A | NDE | 213,3±2.67 | 0,194±0.01 | 621,2±2.32            | 7,50±0.51 | -45,52±1.24 | C2      |
|    |     | A   | NDE | 222,2±1.65 | 0,204±0.01 | 582,8±5.24            | 7,51±0.14 | -45,81±3.32 | C2-A    |
|    | 120 | S/A | NDE | 240,3±2.60 | 0,213±0.03 | 657,1±3.91            | 7,30±0.21 | -45,30±3.52 | D2      |
|    |     | A   | NDE | 247,5±2.14 | 0,302±0.02 | 547,3±1.98            | 7,73±0.44 | -44,18±2.66 | D2-A    |

Tabla 38. Resultados de las muestras de ELIs almacenadas 4°C a t6 meses. TS: tiempo de sonicación, P: potencia, A: autoclavado, S/A: sin autoclavar, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD<sub>99</sub>: diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración.

| TS | P   | A   | N   | Zave (nm)  | PI         | LD <sub>99</sub> (nm) | pH        | ZP (mV)      | Muestra |
|----|-----|-----|-----|------------|------------|-----------------------|-----------|--------------|---------|
| 30 | 80  | S/A | NDE | 214,5±2.53 | 0,242±0.04 | 776,5±1.54            | 7,51±0.57 | -46,38 ±0.13 | A2      |
|    |     | A   | NDE | 242,5±3.64 | 0,246±0.05 | 728,8±2.32            | 7,33±0.81 | -44,20 ±3.51 | A2-A    |
|    | 120 | S/A | NDE | 237,9±3.29 | 0,197±0.02 | 738,5±5.07            | 7,22±0.53 | -44,79 ±0.66 | B2      |
|    |     | A   | NDE | 239,6±3.64 | 0,179±0.07 | 695,5±4.49            | 7,30±0.13 | -44,97 ±0.92 | B2-A    |
| 50 | 80  | S/A | NDE | 235,0±2.67 | 0,172±0.01 | 634,3±2.32            | 7,47±0.51 | -44,25 ±1.24 | C2      |
|    |     | A   | NDE | 229,6±1.65 | 0,185±0.01 | 609,1±5.24            | 7,44±0.14 | -46,34 ±3.32 | C2-A    |
|    | 120 | S/A | NDE | 243,7±2.60 | 0,230±0.03 | 681,6±3.91            | 7,27±0.21 | -45,67 ±3.52 | D2      |
|    |     | A   | NDE | 235,9±2.14 | 0,213±0.02 | 645,6±1.98            | 7,69±0.44 | -44,53 ±2.66 | D2-A    |

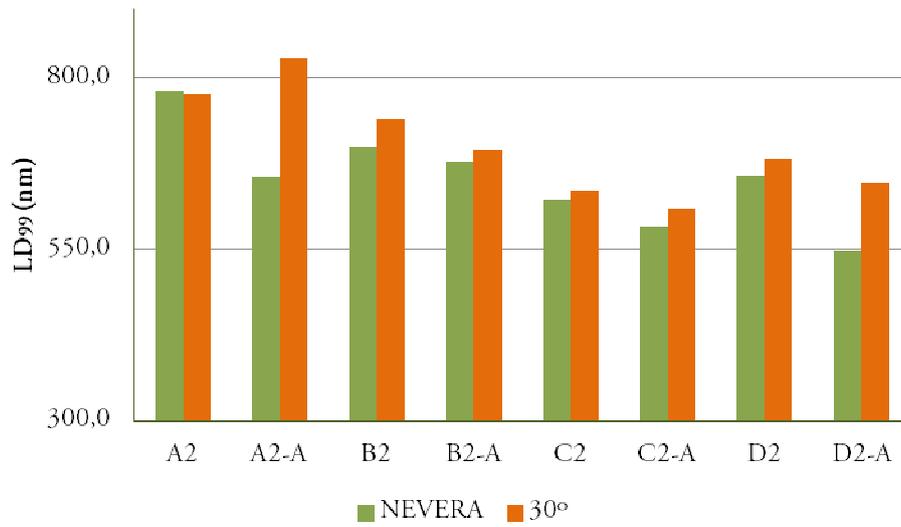
**Tabla 39. Resultados de las muestras de ELIs almacenadas 30°C a t6 meses. TS: tiempo de sonicación, P: potencia, A: autoclavado, S/A: sin autoclavar, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD<sub>99</sub>: difracción laser diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización post elaboración.**

La figura 55 muestra que tanto la emulsión B2 y C2 como su fracción autoclavada presentan valores de polidispersidad inferiores a los de las demás.



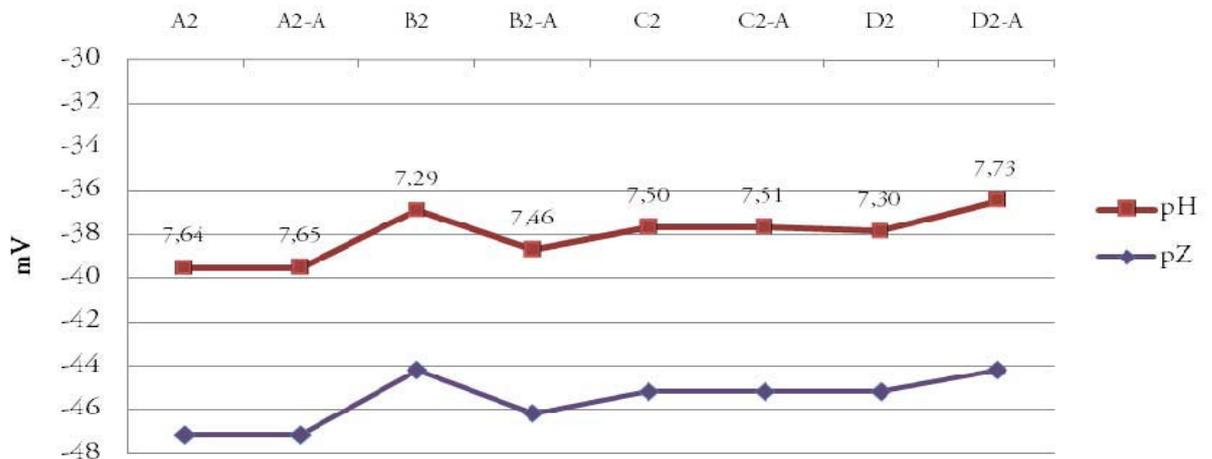
**Figura 55. Comparativa de los valores de PI de las ELI almacenada a 4 y 30°C a t9 meses.**

En relación al D99, a pesar de los 9 meses de almacenamiento, ninguna de las emulsiones objeto de estudio superan los 800nm (figura 56).



**Figura 56. Valores de LD99 de las ELI almacenada a 4 y 30°C t9 meses**

Por último, la comparación de los valores de pH y Pz de las emulsiones objeto de estudio a t<sub>9</sub> meses, indica que el nivel de estabilidad de las mismas sigue dentro de los de las especificaciones prefijadas, por lo que prosiguen en el estudio.



**Figura 57. Valores de pH y ZP de las ELI almacenada a 4°C t9 meses.**

Doce meses después de su elaboración, sólo las ELI B2 y C2, con su fracción autoclavada, continúan en el estudio tras su almacenamiento a 4 °C (tabla 40) o a 30°C (tabla 41).

| ST | P   | A   | N   | Zave<br>(nm) | PI         | LD <sub>99</sub><br>(nm) | pH        | ZP<br>(mV)  | Muestra |
|----|-----|-----|-----|--------------|------------|--------------------------|-----------|-------------|---------|
| 30 | 120 | S/A | NDE | 230,0±2.32   | 0,213±0.03 | 898,2±1.09               | 6,57±0.11 | -39,57±3.32 | B2      |
|    |     | A   | NDE | 229,2±1.86   | 0,206±0.01 | 877,5±3.91               | 6,46±0.14 | -37,98±1.24 | B2-A    |
| 50 | 80  | S/A | NDE | 223,3±1.87   | 0,173±0.01 | 651,2±1.86               | 7,50±0.15 | -45,19±1.20 | C2      |
|    |     | A   | NDE | 231,2±3.90   | 0,176±0.02 | 642,8±2.01               | 7,41±0.23 | -44,24±3.51 | C2-A    |

**Tabla 40. Resultados de las muestras de ELIs almacenadas 4± 1°C a t<sub>12</sub> meses. TS: tiempo de sonicación, P: potencia, A: autoclavado, S/A: sin autoclavar, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD<sub>99</sub>: diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, NDE: neutralización durante elaboración.**

| ST | P   | A   | N   | Zave(nm)   | PI         | LD <sub>99</sub><br>(nm) | pH        | ZP<br>(mV)  | Muestra |
|----|-----|-----|-----|------------|------------|--------------------------|-----------|-------------|---------|
| 30 | 120 | S/A | NDE | 237,9±3.29 | 0,199±0.01 | 738,±1.86                | 6,62±0.13 | -39,65±2.71 | B2      |
|    |     | A   | NDE | 239,6±1.66 | 0,205±0.03 | 695,±2.01                | 6,40±0.24 | -38,46±1.36 | B2-A    |
| 50 | 80  | S/A | NDE | 229,0±2.72 | 0,175±0.11 | 654,±1.98                | 7,37±0.05 | -45,18±1.80 | C2      |
|    |     | A   | NDE | 234,6±1.45 | 0,179±0.02 | 639,±2.98                | 7,34±0.18 | -44,37±2.75 | C2-A    |

**Tabla 41. Resultados de las muestras de ELIs almacenadas 30°C a t<sub>12</sub> meses. TS: tiempo de sonicación, P: potencia, A: autoclavado, S/A: sin autoclavar, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD<sub>99</sub>: diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, NDE: neutralización durante elaboración.**

Con los resultados obtenidos hasta este momento, se decide hacer un diseño factorial para determinar que parámetros son determinantes y decidir cuáles son las mejores condiciones de fabricación.

## 7.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Con el fin de determinar los mejores parámetros de producción: Estabilidad física a largo plazo ( $t_0$ , 3, 6 y 9 meses), tiempo de sonicación, potencia de sonicación, esterilización, neutralización y condiciones de almacenamiento) se realizó un análisis multifactorial de la varianza (M-ANOVA, Statgraphics Plus 5.1) sobre la base de tres variables dependientes relacionadas con la tamaño y distribución de las gotas de emulsión (Zave, PI y LD<sub>99</sub>) parámetros relacionados tanto con su estabilidad como con la seguridad para el paciente tras su administración por vía intravenosa.

### 7.4.1. Planteo del diseño experimental

- Respuestas: Tamaño de gota (Zave), Polidispersidad (PI) y LD<sub>99</sub>
- Número de factores experimentales: 6
- Número de respuestas: 3
- Grados de libertad: 143

|                | Factores           | Niveles | unidades           |
|----------------|--------------------|---------|--------------------|
| X <sub>1</sub> | Estabilidad física | 4       | 0/3/6/9 meses      |
| X <sub>2</sub> | Tiempo sonicación  | 2       | 30/50 min          |
| X <sub>3</sub> | Potencia           | 2       | 80/120 W           |
| X <sub>4</sub> | Autoclavado        | 2       | No/si              |
| X <sub>5</sub> | Neutralización     | 3       | No/durante/después |
| X <sub>6</sub> | Almacenamiento     | 2       | 30º/nevera         |

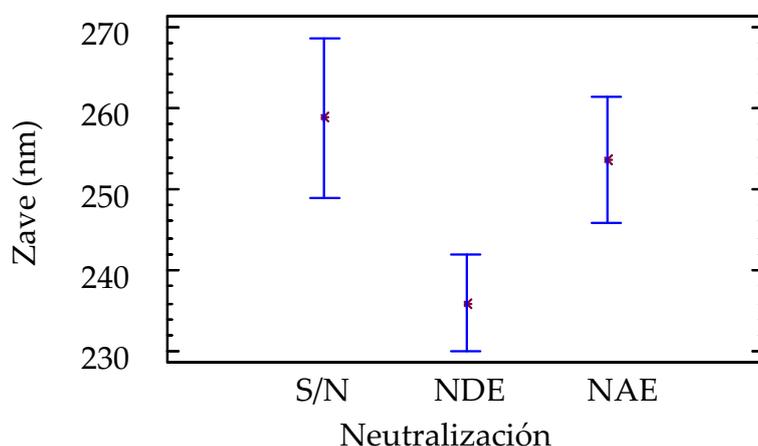
**Tabla 42. Planteamiento del diseño experimental para optimizar ELI**

### 7.4.2. Análisis de la varianza para tamaño medio de gota (Zave)

| Fuente                     |                    | Suma de cuadrados | GL  | Media Cuadratica | Cociente-F | P-Valor |
|----------------------------|--------------------|-------------------|-----|------------------|------------|---------|
| <b>Efectos Principales</b> |                    |                   |     |                  |            |         |
| X <sub>1</sub>             | Estabilidad física | 3823,62           | 3   | 1274,54          | 2,18       | 0,0934  |
| X <sub>2</sub>             | Tiempo de Son      | 296,127           | 1   | 296,127          | 0,51       | 0,4780  |
| X <sub>3</sub>             | Potencia           | 285,892           | 1   | 285,892          | 0,49       | 0,4857  |
| X <sub>4</sub>             | Autoclavado        | 1334,08           | 1   | 1334,08          | 2,28       | 0,1333  |
| X <sub>5</sub>             | Neutralización     | 11559,6           | 2   | 5779,81          | 9,88       | 0,0001  |
| X <sub>6</sub>             | Almacenamiento     | 142,603           | 1   | 142,603          | 0,24       | 0,6223  |
| Residuos                   |                    | 78367,1           | 134 | 584,829          |            |         |
| Total (corregido)          |                    | 103675,0          | 143 |                  |            |         |

**Tabla 43. Análisis de varianza para Zave - Suma de cuadrados de Tipo III. Estabilidad física a largo plazo (24 horas, 3 meses, 6 meses 9 meses), tiempo de sonicación (30 min, 50 min), potencia (80W, 120W), autoclave (sí/no), neutralización (sin neutralización, neutralización durante la elaboración, neutralización después de la elaboración), almacenamiento (30 y 4°C)**

El análisis de la varianza de Zave (tabla 43) muestra que la neutralización es un factor significativo que afecta el tamaño de la gota ( $p < 0,0001$ ). Los valores promedio de tamaño gota, son de  $236 \pm 3,4$  nm cuando la neutralización se llevó a cabo durante la preparación, de  $258 \pm 2,8$  nm cuando se neutraliza después del procesamiento, y de  $260 \pm 6,3$  nm, cuando no se neutraliza (ver figura 58). Sin embargo, esta variación no es relevante desde el punto de vista tecnológico, ya que en todos los casos, los valores experimentales se encuentran dentro de un rango adecuado para la administración intravenosa.



**Figura 58.** Efecto de la neutralización en el tamaño de gota (Zave) de las emulsiones objeto de estudio. S/N: no neutralización, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración.

#### 7.4.3. Análisis de la varianza para Polidispersidad (PI)

El Índice de polidispersidad (PI) es un parámetro importante en la caracterización de emulsión porque muestra la diferencia en la distribución del tamaño de gota, como evidencia de la estabilidad del sistema. El análisis de los valores de PI (Tabla 49) indica que la estabilidad física a largo plazo y la neutralización tienen un efecto significativo sobre PI determinado por PCS (valor  $p < 0,05$ ).

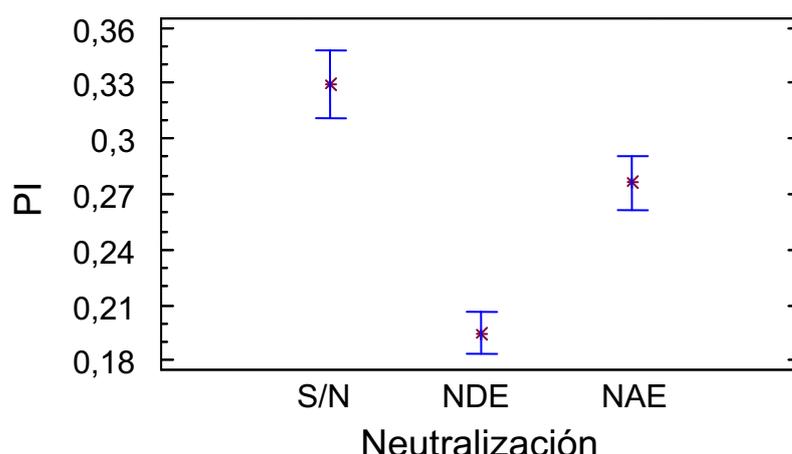
| Fuente              |                    | Suma de cuadrados | GL       | Media Cuadratica | Cociente-F | P-Valor |
|---------------------|--------------------|-------------------|----------|------------------|------------|---------|
| Efectos Principales |                    |                   |          |                  |            |         |
| X <sub>1</sub>      | Estabilidad física | 0,202722          | 3        | 0,0675739        | 31,55      | 0,0000  |
| X <sub>2</sub>      | Tiempo de Son      | 0,007744          | 1        | 0,007744         | 3,62       | 0,0594  |
| X <sub>3</sub>      | Potencia           | 0,000256          | 1        | 0,000256         | 0,12       | 0,7301  |
| X <sub>4</sub>      | Autoclavado        | 0,000536694       | 1        | 0,000536694      | 0,25       | 0,6175  |
| X <sub>5</sub>      | Neutralización     | 0,346854          | 2        | 0,173427         | 80,97      | 0,0000  |
| X <sub>6</sub>      | Almacenamiento     | 0,00893025        | 1        | 0,000893025      | 4,17       | 0,0531  |
| Residuos            |                    | 78367,1           | 0,286997 | 134              | 0,00214177 |         |
| Total (corregido)   |                    | 103675,0          | 0,747604 | 143              |            |         |

**Tabla 44. Análisis de varianza para PI - Suma de cuadrados de Tipo III. Estabilidad física a largo plazo (24 horas, 3 meses, 6 meses 9 meses), tiempo de sonicación (30 min, 50 min), potencia (80W, 120W), autoclave (sí/no), neutralización (sin neutralización, neutralización durante la elaboración, neutralización después de la elaboración), almacenamiento (30 y 4°C)**

Las diferencias estadísticamente significativas en los valores de PI indican que en función del tiempo de almacenamiento (desde cero a nueve meses), confirman el manifiesto incremento de dicho parámetro (experimentalmente: de 0,15 a 0,41).

Después de la elaboración de ELI ( $t_0$ ), los valores de PI son aceptables en todos los casos ( $\leq 0,25$ ). Tres meses ( $t_3$ ) después de la fabricación, las ELIs no neutralizadas se descartan del estudio en razón de exceder el límite aceptable y observarse además la formación de cremado en la parte superior de los viales. Después de 9 meses ( $t_9$ ), prácticamente todas las emulsiones están alteradas o exceden los límites aceptables de PI, excepto las neutralizadas durante la elaboración.

Como se puede observar, el proceso de neutralización es también un factor significativo ( $p < 0,05$ ) para la calidad y estabilidad de las emulsiones objeto de estudio. El PI de las ELIs que se neutralizan durante la elaboración se sitúa entre 0,154 y 0,204; en cambio, los valores de PI de las ELI obtenidas por aplicación de los otros dos métodos de neutralización superan el umbral de PI fijado en las especificaciones iniciales para poder proseguir el estudio. La Figura 59 muestra que los valores de distribución PI de las muestras al final del estudio, en función del método de neutralización utilizado.



**Figura 59.** Análisis de varianza. Efecto de la neutralización en PI de ELI. S/N: no neutralización, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración.

#### 7.4.4. Análisis de la varianza para LD<sub>99</sub>

LD<sub>99</sub> expresa la distribución del volumen de gota y significa que el 99% de las gotas medidas son más pequeñas que los valores indicados. Es un factor crucial cuando la formulación se administra por vía intravenosa y se utiliza para la determinación de gotas agregadas que no pueden ser detectados por PCS.

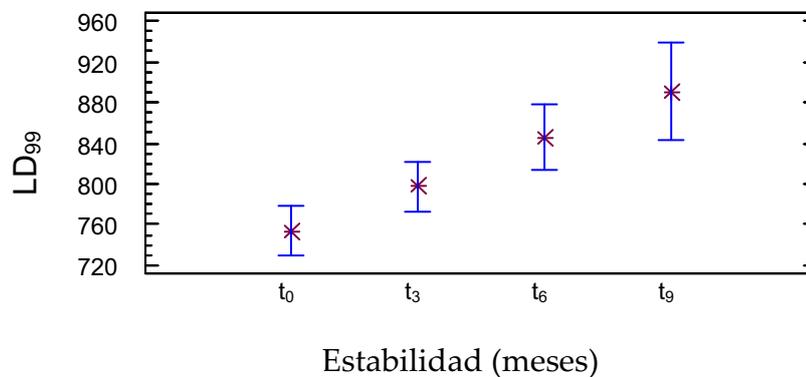
El máximo valor de LD<sub>99</sub> aceptable para proseguir el estudio se fija en 1 µm, lo que garantiza que el volumen de las gotas sea lo suficientemente pequeño, minimizando de este modo la posibilidad de que estas preparaciones puedan causar obliteraciones vasculares a nivel periférico al ser inyectadas por vía IV.

| Fuente                     |                    | Suma de cuadrados | GL  | Media Cuadrática | Cociente-F | P-Valor |
|----------------------------|--------------------|-------------------|-----|------------------|------------|---------|
| <b>Efectos Principales</b> |                    |                   |     |                  |            |         |
| X <sub>1</sub>             | Estabilidad física | 249897,0          | 3   | 83299,1          | 11,16      | 0,0000  |
| X <sub>2</sub>             | Tiempo de Son      | 51752,5           | 1   | 51752,5          | 6,93       | 0,0095  |
| X <sub>3</sub>             | Potencia           | 102,516           | 1   | 102,516          | 0,01       | 0,9069  |
| X <sub>4</sub>             | Autoclavado        | 1680,32           | 1   | 1680,32          | 0,23       | 0,6360  |
| X <sub>5</sub>             | Neutralización     | 2,98838E6         | 2   | 1,49419E6        | 200,12     | 0,0000  |
| X <sub>6</sub>             | Almacenamiento     | 4954,99           | 1   | 4954,99          | 0,66       | 0,4167  |
| Residuos                   |                    | 1,0005E6          | 134 | 7466,4           |            |         |
| Total (corregido)          |                    | 4,22744E6         | 143 |                  |            |         |

**Tabla 45.** Análisis de varianza para LD<sub>99</sub>. Suma de cuadrados de Tipo III. Estabilidad física a largo plazo (24 horas, 3 meses, 6 meses 9 meses), tiempo de sonicación (30 min, 50 min), potencia (80W, 120W), autoclave (sí/no), neutralización (sin neutralización, neutralización durante la elaboración, neutralización después de la elaboración), almacenamiento (30 y 4°C)

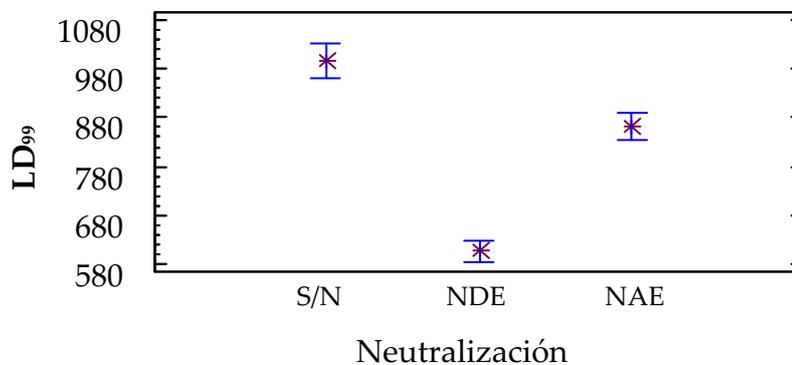
El análisis de la varianza, pone de manifiesto como la estabilidad física a largo plazo ( $p < 0,0001$ ), neutralización ( $p < 0,0001$ ), y el tiempo de sonicación ( $p < 0,0095$ ) afectan significativamente a los valores del parámetro  $LD_{99}$  (ver Tabla 45).

No obstante, aunque el análisis estadístico revela diferencias en  $LD_{99}$  en función del tiempo (estabilidad a largo plazo física), ninguna de las muestras supera el valor límite de  $LD_{99}$ ; así, 9 meses después de la elaboración de las ELIs, este valor se sitúa en el rango 729 - 938nm (ver figura 60).



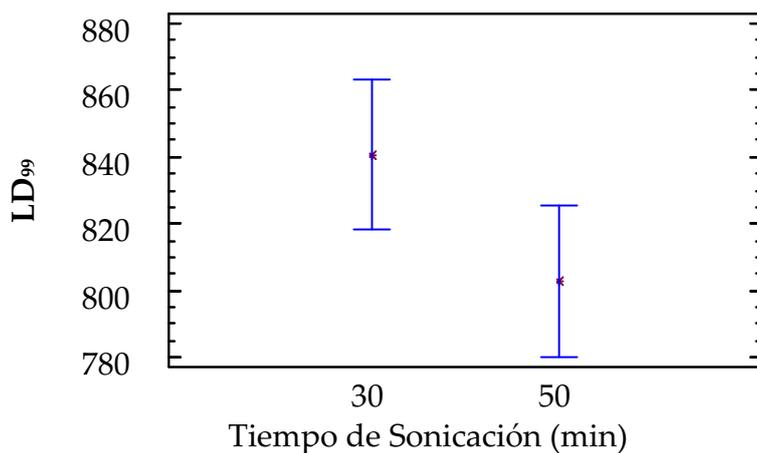
**Figura 60.** Análisis de varianza. Efecto del almacenamiento en  $LD_{99}$  de ELI después de 9 meses.

Como ya se observó, existe una diferencia estadísticamente significativa entre emulsiones neutralizadas durante la elaboración y no neutralizadas o neutralizadas después de la elaboración (Figura 61). El menor valor  $LD_{99}$  se obtiene cuando la neutralización se lleva a cabo durante la elaboración ( $LD_{99}$  se sitúa en el rango 586 - 629 nm).



**Figura 61.** Análisis de varianza. Efecto de neutralización en  $LD_{99}$  de ELI. S/N: no neutralización, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración.

La exposición al ultrasonido durante 50 min dio como resultado, emulsiones con LD<sub>99</sub> entre 780 a 825nm, ligeramente menor que las emulsiones correspondientes a 30 min de exposición (818 <LD<sub>99</sub> <864nm). Aunque existen diferencias significativas, este factor no es relevante desde el punto de vista tecnológico debido a la pequeña diferencia entre los valores.



*Figura 62. Análisis de varianza. Efecto del tiempo de sonicación en LD<sub>99</sub> de ELI.*

En cualquier caso, ni la potencia de ultrasonido, ni la temperatura de almacenamiento, ni procedimiento de esterilización en autoclave resultan ser factores determinantes para la estabilidad de las emulsiones ( $p > 0,05$ ), por lo que estas emulsiones no necesitan refrigerarse para mantener su estabilidad y resisten perfectamente el proceso de esterilización por autoclavado, algo importante en este tipo de preparados. En cambio, y como se observa en este estudio, el método de neutralización sí resulta ser un factor que afecta a la estabilidad de las ELI (Zave, PI y LD<sub>99</sub>).

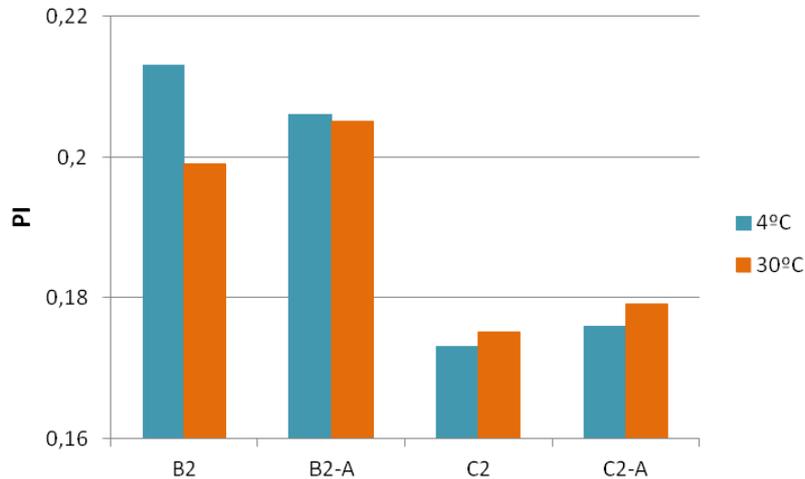
#### 7.4.5. Elección de ELI óptima

Doce meses después de la elaboración de ELIs, únicamente las emulsiones B2 y C2, con su fracción autoclavada, prosiguen el estudio (muestras almacenadas a 4 y 30°C) (ver tablas 45 y 46).

Al comparar los diferentes parámetros de estudio, ELI C2 con su fracción autoclavada muestra una estabilidad ligeramente mejor (con independencia de la temperatura de

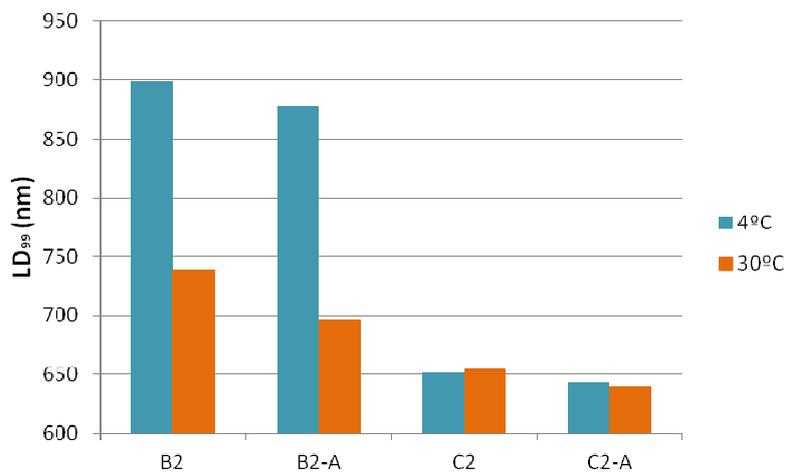
almacenamiento), que la emulsión B2. No se toma como parámetro de referencia los datos de tamaño de gota (Zave) pues no hay diferencia entre estos valores.

Los valores de PI de ELI C2 a t=12 meses se sitúan entre 0,173 - 0,179, mientras que los valores de PI para B2 lo hacen entre 0,199 - 0,216 (figura 63).



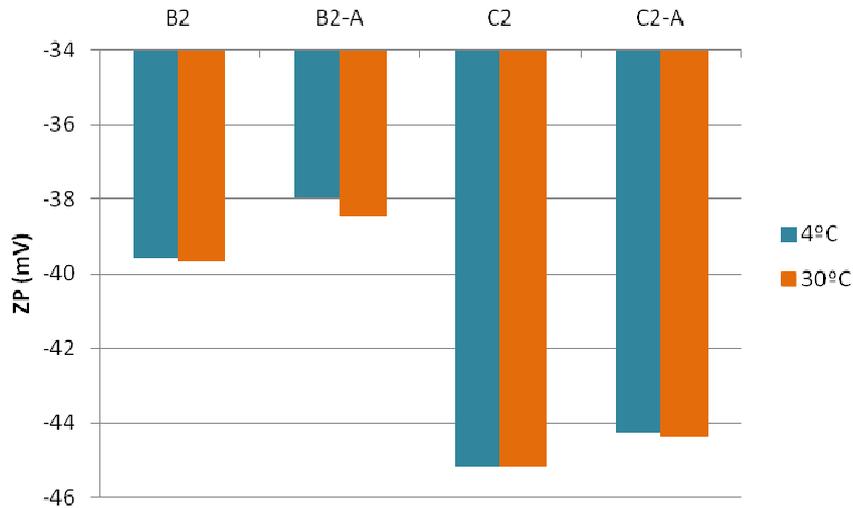
**Figura 63.** PI de ELI B2 y C2 con sus fracciones autoclavadas almacenadas a 4 y 30°C

Así mismo, se comparan los valores de LD<sub>99</sub>; los resultados experimentales para C2 se sitúan entre 639 - 652nm, a diferencia de los correspondientes valores para B2, que son del orden de 900nm. Además se observa una ligera diferencia entre las muestras almacenadas a 4 y 30°C (ver figura 64).



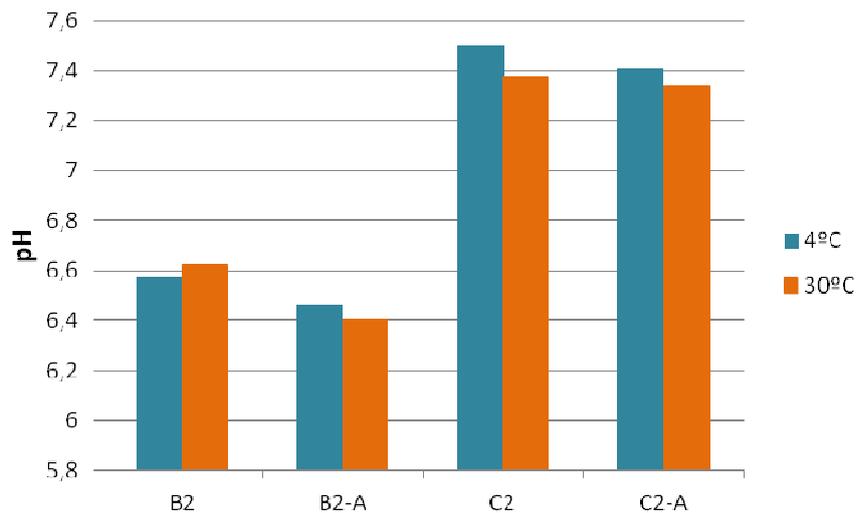
**Figura 64.** LD<sub>99</sub> de ELI B2 y C2 con sus fracciones autoclavadas almacenadas a 4 y 30°C

En cuanto a los valores de ZP, los de B2 son cercanos a los -38mV mientras que los de C2 permanecen por encima de -45mV, lo que sugiere que B2 empieza a mostrar signos de inestabilidad (ver figura 65).



**Figura 65.** ZP de ELI B2 y C2 con sus fracciones autoclavadas almacenadas a 4 y 30°C

Por último, se comparan los valores de pH, encontrándose como era de esperar, que los de C2 son del orden de 7,5 mientras que B2 muestra valores ligeramente ácidos, del orden de 6 (ver figura 66).



**Figura 66.** pH de ELI B2 y C2 con sus fracciones autoclavadas almacenadas a 4 y 30°C

De acuerdo con los resultados obtenidos hasta aquí, las condiciones operativas óptimas para elaborar 250 ml de ELI utilizando ultrasonidos como única fuente de homogenización/emulsificación a través del circuito cerrado diseñado en este estudio se resumen en la tabla 51, y corresponden al prototipo C2 del estudio realizado.

| Condiciones operativas | Respuesta           |
|------------------------|---------------------|
| Tiempo sonicación      | 50 min              |
| Potencia               | 80W                 |
| Autoclavado            | si                  |
| Neutralización         | Durante elaboración |
| Almacenamiento         | Indiferente         |
| Estabilidad física     | 12 meses            |

***Tabla 46. Condiciones operativas optimizadas***

## 7.5. COMPARACIÓN ENTRE ELI (OPTIMIZADA) OBTENIDA POR SONICACIÓN E INTRALIPID® 20%.

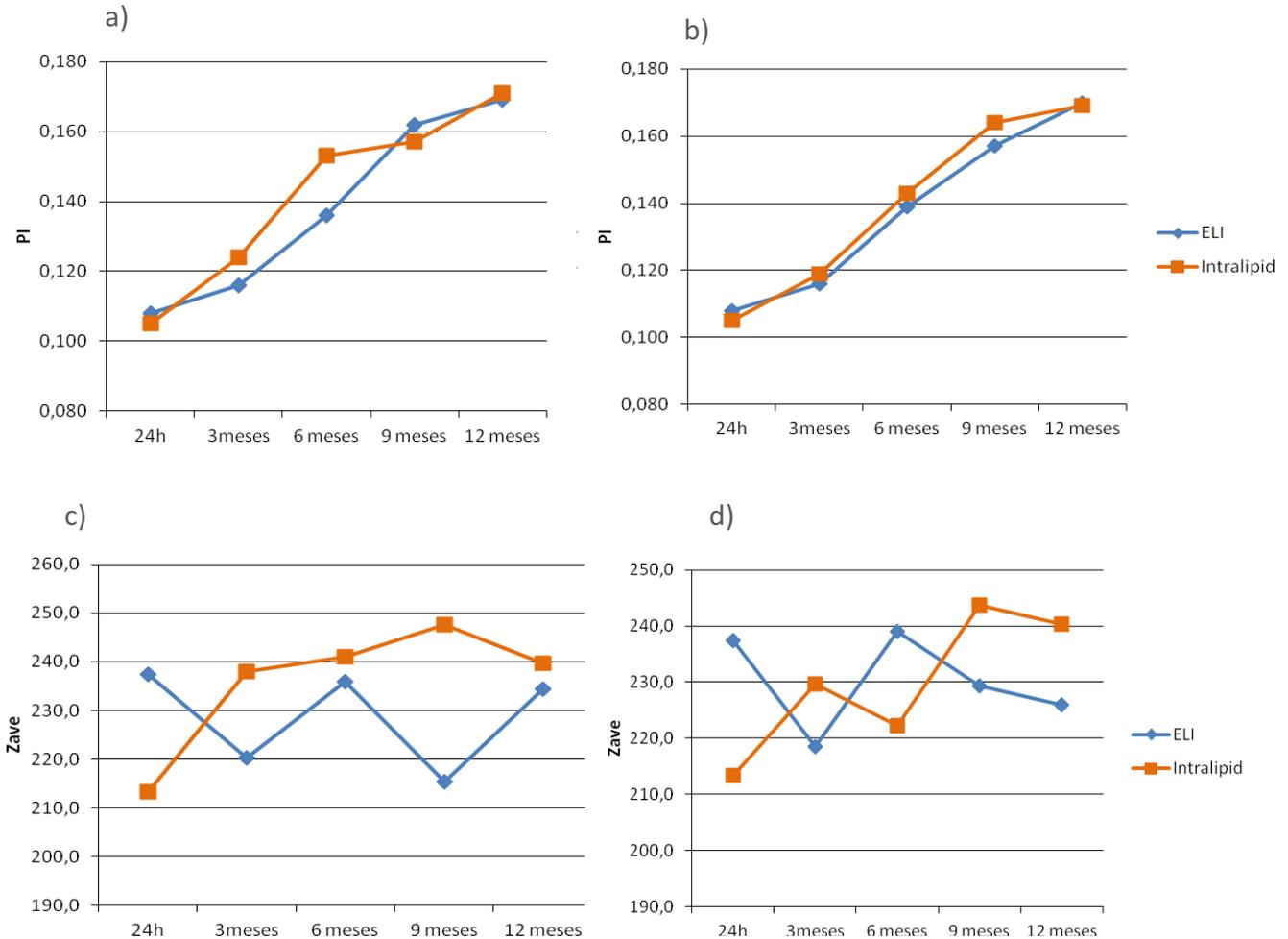
Intralipid 20%® (20% de aceite de soja, 1,2% fosfolípidos de yema de huevo, 2,25% de glicerina, y agua para inyección) es una emulsión lipídica inyectable disponible comercialmente para administración intravenosa. Se utiliza normalmente en nutrición parenteral total y su composición es muy similar a las de las ELIs preparadas y optimizadas en el presente estudio (20% de aceite de soja, fosfolípidos de soja 2%, 2,25% de glicerina, y agua para inyección).

Ambas formulaciones, Intralipid 20%® y ELI (C2), se caracterizan en términos de Zave y PI durante un año. La Tabla 47 muestra los resultados de la prueba t de Student no pareada para comparar Zave y PI promedio de ambas formulaciones.

| Tiempo    | ELI        |            | Intralipid® |            | PI p- valor | Zave p- valor |
|-----------|------------|------------|-------------|------------|-------------|---------------|
|           | size       | PI         | size        | PI         |             |               |
| 24h       | 237,5±2,11 | 0,108±0,08 | 213,3±2,98  | 0,105±0,02 | 0,561       | 0,557         |
| 30°C      |            |            |             |            |             |               |
| 3meses    | 220,2±3,30 | 0,116±0,04 | 229,6±2,53  | 0,124±0,03 | 0,476       | 0,554         |
| 6 meses   | 236,0±3,77 | 0,136±0,01 | 222,2±1,92  | 0,153±0,08 | 0,256       | 0,604         |
| 9 meses   | 215,4±4,00 | 0,162±0,04 | 243,7±5,27  | 0,157±0,02 | 0,414       | 0,390         |
| 12 meses  | 234,4±3,29 | 0,169±0,05 | 240,3±7,54  | 0,171±0,04 | 0,748       | 0,579         |
| 4°C       |            |            |             |            |             |               |
| 3meses    | 218,5±2,35 | 0,116±0,01 | 237,9±3,90  | 0,119±0,01 | 0,561       | 0,527         |
| 6 meses   | 239,1±3,54 | 0,139±0,02 | 241,0±4,09  | 0,143±0,04 | 0,369       | 0,478         |
| 9 meses   | 229,4±2,32 | 0,157±0,01 | 247,5±3,91  | 0,164±0,02 | 0,144       | 0,375         |
| 12 meses  | 226,0±1,86 | 0,170±0,02 | 239,6±1,86  | 0,169±0,07 | 0,711       | 0,698         |
| p- values | 0,735      | 0,410      | 0,168       | 0,533      |             |               |

**Tabla 47. Cambios en el tamaño medio de gota (z-ave) y el índice de polidispersidad (PI) de ELI (C2) e Intralipid®. La columna p-valor indica la significancia de PI y Zave para cada punto en el tiempo, respectivamente. La fila p-valor indica cuan diferentes son los valores de PI y Zave en función del tiempo y temperaturas ensayadas.**

En ningún caso, se encuentran diferencias significativas de los parámetros de estabilidad entre la formulación comercial y la nueva formulación, en las condiciones experimentales objeto de estudio (ver figura 67).



**Figura 67. Comparación de ELI e Intralipid®. a) Comparación de PI de las muestras almacenadas a 30°C, b) Comparación de PI de las muestras almacenadas a 4°C, c) Comparación de Zave de las muestras almacenadas a 30°C, d) Comparación de Zave de las muestras almacenadas a 4°C. Datos tomados de la tabla 51.**

Por lo tanto, se puede observar que la sustitución de lecitina de huevo por la lecitina de soja no modifica la estabilidad física de las ELIs. Esta sustitución puede ser interesante debido a que la lecitina que deriva de la yema de huevo es susceptible de causar reacciones alérgicas en algunos pacientes.

Asimismo, el presente estudio demuestra la equivalencia de la ELI obtenida a pequeña escala (250ml) mediante sonicación con el producto comercial obtenido a escala industrial. La ELI preparada es compatible con el uso humano, y de acuerdo con estudios previos estas emulsiones podrían ser utilizadas como vehículo de fármacos poco solubles en agua<sup>2,12,17,177</sup>.

## 7.6. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE PREFORMULACIÓN

### 7.6.1. Incorporación de NYS durante el proceso de formación del vehículo emulsión

Tras investigar en la bibliografía la mejor manera de incorporar Nistatina a la emulsión lipídica inyectable, se determina que dado que es un fármaco termolábil no es posible hacerlo durante el proceso de elaboración de la ELI, debido a que durante este proceso se alcanzan temperaturas de hasta 90°C. Ensayos preliminares realizados con este fármaco, muestran un cambio en la coloración de la Nistatina a un color pardo oscuro, indicativo de que el fármaco cambia su estado fisicoquímico.

### 7.6.2. Incorporación en frío de NYS sobre el vehículo previamente preparado

Los macrólidos poliénicos antifúngicos son particularmente difíciles de formular, debido a la facilidad de autoagregación de dichas moléculas.

Se ha demostrado que monómeros de Nistatina se unen, con gran selectividad al ergosterol, molécula que se encuentra sólo en las células de hongos (no en las de los mamíferos), causando una perturbación significativa de la membrana que conduce a la muerte celular. Sin embargo, los agregados de Nistatina que se forman en razón de su escasa solubilidad en agua son no selectivos, por lo que pueden romper la integridad tanto de las membranas celulares fúngicas como de los mamíferos, lo que conduce, en ambos casos, a la muerte celular, y explica la toxicidad atribuida a la Nistatina<sup>178,179</sup>.

La incorporación de tensoactivos no iónicos a formulaciones líquidas de Nistatina con objeto de incrementar su solubilidad podría conseguir mejorar su índice terapéutico y prevenir la aparición de toxicidad relacionada con la agregación del activo.

Cremophor EL<sup>®</sup> (polioxietilenglicerol 35 triricinoleato), Tween 80<sup>®</sup> (polisorbato 80; polioxietileno-sorbitan-20-monooleato) y Solutol HS 15<sup>®</sup> (Macrogol 15 hidroxistearato) son los principales tensoactivos no iónicos aprobados como excipientes en formulaciones parenterales para administración intravenosa en humanos.

Por otro lado, la estructura química de la Nistatina revela que es una molécula anfifílica y anfótera a la vez. En presencia de agua y un tensioactivo no iónico, tiende a unirse a la parte hidrófoba del tensioactivo<sup>180</sup>. Cremophor EL contiene un 83% de constituyentes hidrófobos, mientras que Tween 80 contiene un 80% y solutol Hs15 ~70% de estos constituyentes; los tres tienen un HLB similar. Croy y Know., determinaron que la concentración crítica de agregación (CAC) de la Nistatina en  $4 \times 10^{-3}$  M de Cremophor EL y Tween 80 respectivamente fue de  $150 \mu\text{M}$  frente a  $10 \mu\text{M}$  de Nistatina en solución salina tamponada con fosfato (PBS), concluyendo que los tensioactivos fueron capaces de solubilizar y desagregar de 50 a 70 veces más de Nistatina que el control de PBS<sup>180</sup>.

La bibliografía especializada pone de manifiesto como los tensioactivos antes referenciados se emplean en vehículos de formulación de diferentes fármacos, incluidos antineoplásicos, tales como Taxano<sup>181</sup>, Paclitaxel<sup>182</sup> y Docetaxel<sup>183</sup>.

Si bien este tipo de interacciones han permitido que algunos fármacos antitumorales, formulados con estos tensoactivos, puedan revertir la resistencia a múltiples fármacos en células tumorales, su uso como vehículos parece correlacionarse con una serie de efectos adversos clínicamente importantes, incluyendo reacciones de hipersensibilidad aguda y neuropatías periféricas<sup>184</sup>.

Así mismo, está referenciado que Cremophor EL<sup>®</sup> y Polisorbato 80 pueden influir en la modulación de la actividad de P-glicoproteína<sup>185</sup>, que interfieren en el comportamiento farmacocinético<sup>186-189</sup> y en la disposición de fármacos solubilizados que se administran por vía intravenosa<sup>184</sup> debido a su capacidad para formar micelas en solución acuosa, así como en fluidos biológicos, como el plasma<sup>190,191</sup>, y que reducen la absorción celular del fármaco<sup>192</sup> e influyen en la distribución de diferentes medicamentos, así como en las rutas de eliminación. El efecto resultante es en general, una alteración en las características farmacodinámicas del fármaco solubilizado<sup>181,193</sup> con la consecuente exacerbación de los efectos secundarios no deseados de dichos fármacos.

En cuanto al Solutol HS 15, hasta la fecha, poco se ha reportado en la literatura sobre su impacto en la biodistribución de los medicamentos en sangre. Se ha podido determinar que puede interferir en la unión de los fármacos con las proteínas plasmáticas<sup>193</sup>. Así, por ejemplo, se reportó una interferencia entre Solutol HS15 y el aclaramiento intrínseco de Colchicina en ratas, sugiriéndose que podía ser debido a la interacción del tensoactivo con las p-glicoproteínas<sup>194</sup>. En otro estudio, se determinó que el Solutol HS15 no alteraba los parámetros farmacocinéticos generales del Midazolam ni de sus principales metabolitos 10OH-MDZ y 4OH-MDZ en ratas<sup>195</sup> debido a su débil interacción con CYP3A responsable del aclaramiento del midazolam. También se reportó una menor toxicidad y un mayor aclaramiento del Paclitaxel en una formulación con Solutol HS15, comparada con la especialidad comercializada (Taxol®), que utiliza Cremophor-EL en su formulación<sup>196</sup>.

En formulaciones intravenosas, Solutol HS-15 se utiliza a concentraciones de hasta el 50% para solubilizar Propanidid (Panitol® Cryopharma, México), 7% para solubilizar la Vitamina K1 (Sabex® en Canadá) y Diclofenaco (Argentina)<sup>197</sup> debido a su baja toxicidad<sup>198</sup>. Solutol HS 15 cumple con los requisitos de la Farmacopea Europea (Macrogol-15 hidroxistearato), y del US-NF (polioxil 15 hidroxistearato). También se ha utilizado con éxito en formulaciones preclínicas de formulaciones inyectables sobresaturadas de moléculas insolubles en agua<sup>199</sup> demostrando no causar reacciones de hipersensibilidad<sup>200</sup>, y con una toxicidad mucho más baja que Cremophor EL y polisorbato 80<sup>196,198</sup>.

Debido a su toxicidad y reacciones adversas, las formulaciones concentradas con Cremophor EL y/o Tween 80 deben ser diluidas en solución salina, dextrosa al 5% o solución Ringer. Este hecho, aumenta la posibilidad de que se formen grandes micelas y que en su interior queden secuestradas diferentes cantidades de fármaco, evitando su liberación en los fluidos corporales, retrasando su aclaramiento y aumentando su toxicidad. La elección de Solutol HS15 para la elaboración de las formulaciones NYS-

ELI, parece en consecuencia lo más aconsejable ya que este puede utilizarse incluso al 50% en la formulación (ver tabla 53), sin necesidad de diluirla. Además, la formulación descrita en este estudio esta vehiculizada en una emulsión lipídica inyectable que no necesita ser diluida.

| Tensoactivos  | % en la formulación comercializada | % administrado                    | Medicamento vehiculizado | Posibles desventajas       |
|---------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Cremophor EL  | 11–65%                             | ≤ 10% (infusión)                  | Paclitaxel               | Dolor, irritación          |
| Tween 80      | 0.075–100%                         | ≤ 0.4% (bolus)<br>≤ 2% (infusion) | Amiodarona<br>Docetaxel  | Precipitación<br>hemolisis |
| Solutol HS 15 | 50%                                | 50%                               | Propanidid               |                            |

**Tabla 48. Ejemplos de formulaciones que incluyen los co-emulgentes seleccionados<sup>201</sup>.**

Se escoge por tanto Solutol HS15, por ser un tensoactivo no iónico anfifílico, con potente capacidad emulsionante y baja toxicidad, aprobado por la División de Productos de Salud y Alimentos de Canadá (HPFB por su sigla en inglés) para la aplicación intravenosa humana debido a su tolerancia fisiológica y compatibilidad, pudiendo utilizarse a bajas concentraciones sin que esto pueda afectar la liberación del fármaco de la formulación<sup>201</sup> a diferencia del Tween 80 y Cremophor EL, los cuales hay evidencias de que pueden interferir en la biodisponibilidad de los fármacos que acompañan, reacciones de hipersensibilidad agudas y neuropatías periféricas<sup>184,202</sup>.

## 7.7. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE FORMULACIÓN

Tal y como se ha comentado anteriormente, la introducción de fármacos poco solubles en excipiente con carácter lipídico parece ser una buena aproximación para mejorar las propiedades de eficacia y seguridad de estos fármacos. Una gran parte de los fármacos utilizados en la terapia antifúngica sistémica poseen elevadas reacciones adversas, entre otros motivos, por su baja solubilidad en agua, como es el caso de la Nistatina. Estudios previos han demostrado la disminución de la toxicidad al introducir la Nistatina en formulaciones lipídicas (como liposomas, niosomas y ELI).

En el presente trabajo se procede a la evaluación de este nuevo excipiente producido para la vehiculización de la Nistatina. Se preparan 4 formulaciones incorporando 1mg/mL de NYS. El fin de estas formulaciones fue comprobar la capacidad de ELI para vehicular un fármaco con una solubilidad muy baja. Esta es la concentración empleada en formulaciones de liposomas con NYS<sup>111,203</sup>. Semis et al realizó una aproximación similar preparando una formulación con una concentración de NYS inferior (0,8 mg/ml)<sup>17</sup>.

De acuerdo con el procedimiento presentado por Semis et al, la incorporación de NYS en la emulsión requirió la utilización de DMSO y un período de agitación prolongada. El DMSO, es una sustancia toxica e irritante, y aunque su uso está permitido en pequeñas cantidades (<0,1%) por vía parenteral, su presencia puede aumentar los efectos secundarios del fármaco, tales como irritación en el punto de inyección, daño y destrucción del tejido, entre otros.

Para facilitar la incorporación del NYS en la emulsión, se elaboró una dispersión del NYS en Solutol HS 15 (hidroxiestearato de Macrogol 15, HLB de 14-16) a una concentración final del 2 y 4%, respectivamente. En razón de la baja solubilidad en agua de NYS, se preparan ELIs con 20 y 30% de fase oleosa (ver sección 6.1.2.2.) de este modo, podría mejorar la incorporación de NYS. Las formulaciones de NYS-ELI se elaboran según el procedimiento expresado en la sección 6.1.4.2.2.

El trabajo experimental se plantea como sigue:

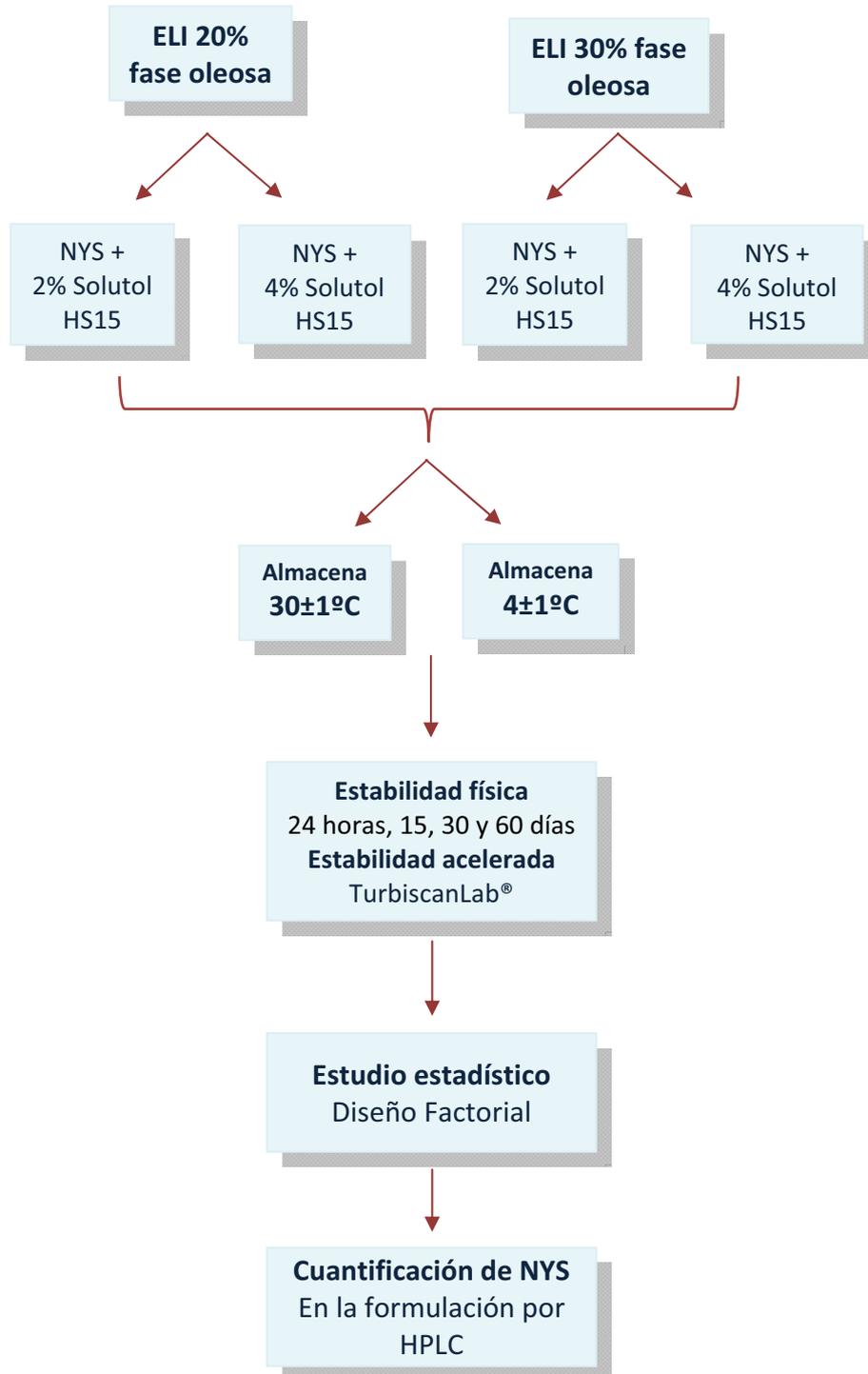


Figura 68. Diagrama de flujo de la formulación de NYS-ELI

### 7.7.1. Resultados de la estabilidad física de NYS-ELI

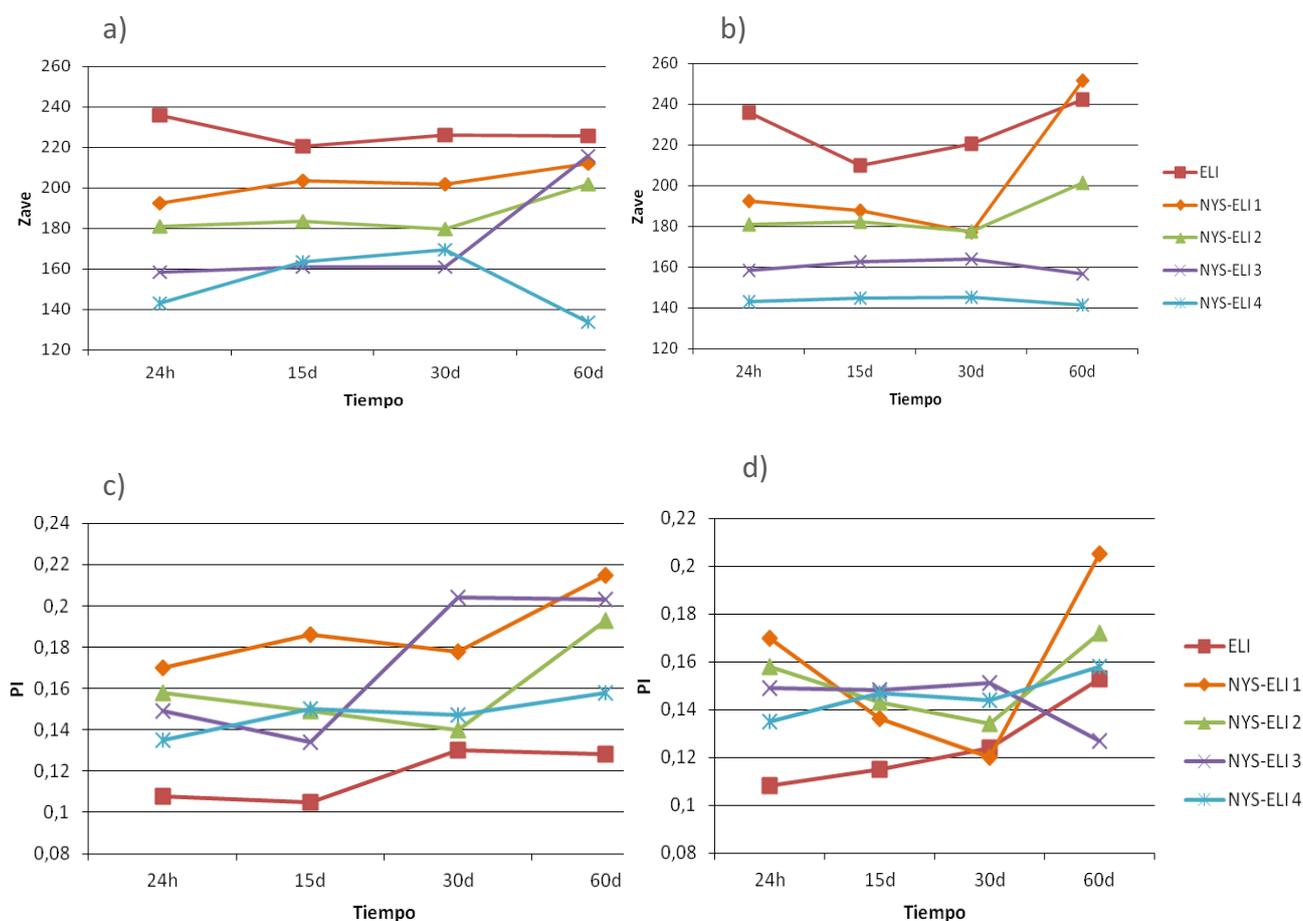
La estabilidad física de las cuatro NYS-ELI y de ELI sin principio activo se determina midiendo el tamaño medio de gota (Zave) y su índice de polidispersidad (PI) por espectrofotometría de correlación fotónica (PCS). Para confirmar la ausencia de gotas de mayor tamaño, se determina el LD<sub>99</sub>, por difracción laser. Se determina asimismo, pH y PZ con objeto de apreciar posibles indicios de inestabilización. Las muestras se almacenan a 30 ± 1 ° C y a 4 ± 1 ° C y las diferentes mediciones se realizan a t=24 horas, y 15, 30 y 60 días después de la preparación. Los resultados se exponen en las tablas 49 y 50.

| Tiempo      | ELI        | NYS-ELI 1  | NYS-ELI 2  | NYS-ELI 3  | NYS-ELI 4  |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 24h         | 236,0      | 192,53     | 181,0      | 158,2      | 143,0      |
| <b>30°C</b> |            |            |            |            |            |
| 15d         | 220,5±1.92 | 203,5±3.64 | 183,5±1.86 | 160,8±2.60 | 163,4±2.98 |
| 30d         | 226,0±5.27 | 201,9±2.95 | 179,7±2.01 | 215,7±2.67 | 169,4±3.65 |
| 60d         | 225,4±7.54 | 212,0±3.13 | 201,7±1.98 | 161,1±3.29 | 133,7±5.86 |
| <b>4°C</b>  |            |            |            |            |            |
| 15d         | 209,8±2.32 | 187,7±3.90 | 182,3±2.43 | 162,7±3.29 | 144,6±2.11 |
| 30d         | 220,5±1.86 | 177,1±4.09 | 177,3±2.98 | 164,0±1.86 | 145,0±2.35 |
| 60d         | 242,1±1.87 | 251,7±3.91 | 201,5±2.98 | 156,8±2.53 | 141,1±3.30 |

**Tabla 49. Cambios en el tamaño medio de gota (z-ave) de ELI (C2) y de las 4 formulaciones de NYS-ELI almacenadas a 30 y 4°C**

| Tiempo      | ELI        | NYS-ELI 1  | NYS-ELI 2  | NYS-ELI 3  | NYS-ELI 4  |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 24h         | 0,108      | 0,170      | 0,158      | 0,149      | 0,135      |
| <b>30°C</b> |            |            |            |            |            |
| 15d         | 0,105±0.08 | 0,186±0.02 | 0,149±0.04 | 0,134±0.02 | 0,150±0.03 |
| 30d         | 0,130±0.02 | 0,178±0.04 | 0,140±0.05 | 0,204±0.02 | 0,147±0.02 |
| 60d         | 0,128±0.04 | 0,215±0.07 | 0,193±0.02 | 0,203±0.07 | 0,158±0.05 |
| <b>4°C</b>  |            |            |            |            |            |
| 15d         | 0,115±0.03 | 0,136±0.03 | 0,143±0.04 | 0,148±0.01 | 0,147±0.04 |
| 30d         | 0,124±0.03 | 0,120±0.04 | 0,134±0.05 | 0,151±0.04 | 0,144±0.02 |
| 60d         | 0,153±0.05 | 0,205±0.07 | 0,172±0.02 | 0,127±0.07 | 0,158±0.08 |

**Tabla 50. Cambios en el índice de polidispersidad (PI) de ELI (C2) y de las 4 formulaciones de NYS-ELI almacenadas a 30 y 4°C.**



**Figura 69. Comparación de ELI y las 4 formulaciones de NYS-ELI. a), Comparación de Zave de las muestras almacenadas a 30°C, b) Comparación de Zave de las muestras almacenadas a 4°C, c) Comparación de PI de las muestras almacenadas a 30°C. d) Comparación de PI de las muestras almacenadas a 4°C.**

La figura 69 muestra que durante los 60 días de estudio, los valores de tamaño de gota de cada muestra permanecieron sin cambios apreciables, pero se observa que las formulaciones que contienen mayor cantidad de co-emulgente (NYS-ELI 3 y 4) tienden a presentar valores de tamaño de gota menores (140 - 160nm) que el blanco (220 - 240nm), lo que puede deberse a que la presencia del Solutol Hs15.

La polidispersidad de todas las formulaciones ELI-NYS objeto de estudio permanecen constante, con valores comprendidos entre 0,1 y 0,2, por lo que se consideran acordes a las especificaciones previamente fijadas durante todo el estudio.

Después de 24 horas y durante los 60 días del estudio, los valores de pH de ELI y de todas las formulaciones NYS-ELI elaboradas se sitúan en un rango entre 7,11 y 7,53; los

valores ZP se sitúan entre -46 y -44 mV, y el rango para LD<sub>99</sub> entre 580 y 670 nm. Estos parámetros se mantienen sin variaciones apreciables durante todo el estudio.

Con el fin de comprobar el efecto de la formulación (NYS-ELI 1-4 y ELI), el tiempo de almacenamiento (24 horas - 60 días) y la temperatura de almacenamiento (4 - 30 ° C) en el tamaño de gota y su distribución (Zave y PI, respectivamente) se realiza un diseño multifactorial (M-ANOVA) de acuerdo a lo indicado en la sección 6.3.2.

Se comparan las 4 formulaciones de Nistatina preparadas con el excipiente (ELI), con objeto de determinar si la incorporación de este principio activo modifica la estabilidad de la emulsión.

#### 7.7.1.1. Análisis de varianza (M-ANOVA) del tamaño medio de gota (Zave) para las formulaciones NYS-ELI y ELI

El análisis de varianza (figura 58) puso de manifiesto que el tipo de formulación ( $p < 0,01$ ) y el período de estabilidad física ( $p = 0,0152$ ) tienen un efecto significativo sobre Zave de las muestras analizadas. Aunque no aparecen diferencias significativas en relación al tipo de almacenamiento, si existen diferencias entre el tamaño de gota de las muestras durante el tiempo (desde  $t = 24h$  a  $t = 60$  días (ver figuras 70).

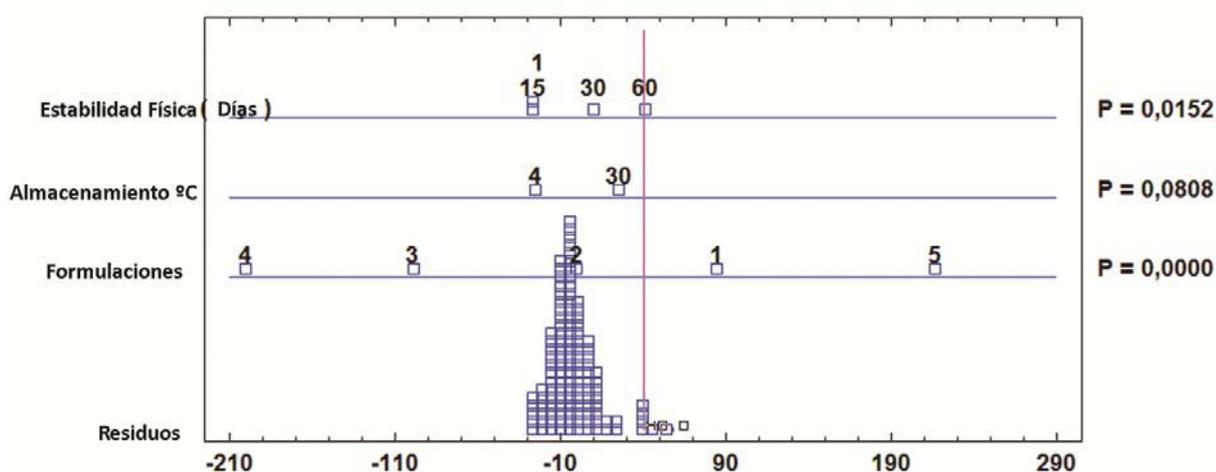
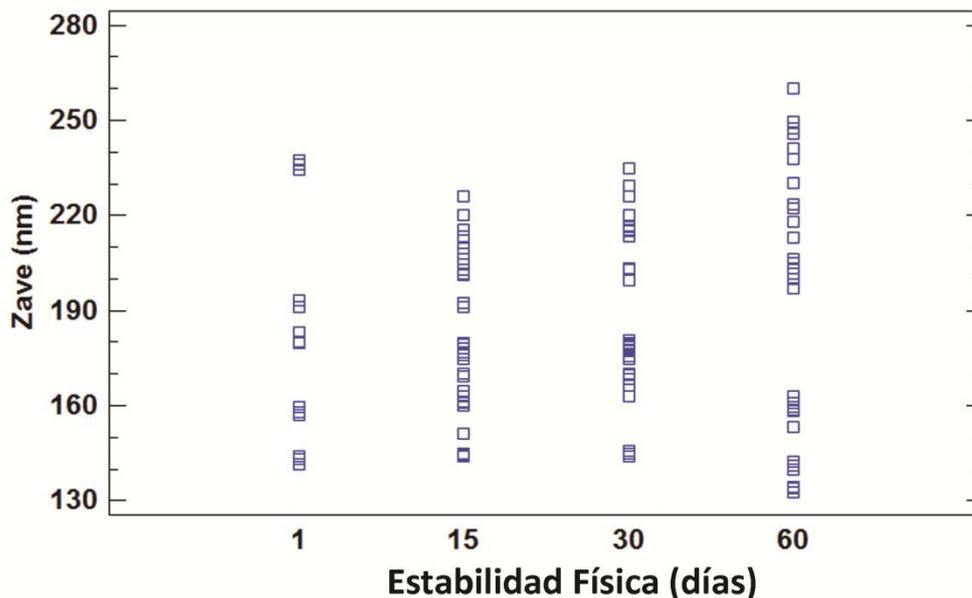


Figura 70. M-ANOVA de Zave (nm) para formulaciones NYS-ELI y ELI sin fármaco. Las formulaciones: (1) NYS-ELI 1, (2) NYS-ELI 2, (3) NYS-ELI 3, (4) NYS-ELI 4, (5) ELI.

La Figura 71 muestra como, en función del tiempo de almacenamiento, los datos experimentales se agrupan en dos subpoblaciones, respectivamente en torno a máximos de 150 nm y 220 nm. Una posible explicación de dicho comportamiento podría ser, la inclusión de NYS pre-dispersada en Solutol Hs15 disminuye significativamente Zave de las emulsiones preparadas, pero la incorporación de fármaco podría modificar el sistema de emulsión debido a las interacciones moleculares, especialmente cuando el fármaco tiene propiedades anfífilas como es el caso de NYS<sup>90</sup>.



*Figura 71. Dispersión de tamaño medio de gota (Zave) por código de nivel en diferentes tiempos de almacenamiento (1, 15 30 y día 60).*

La figura 72 muestra una diferencia sustancial entre los valores de Zave de todas las formulaciones NYS-ELI y ELI sin fármaco, debido al efecto de la adición de co-emulgente (Solutol Hs15) lo que podría ser la causa de la reducción de Zave, cuando los porcentajes de fase oleosa se incrementan del 20 al 30%.

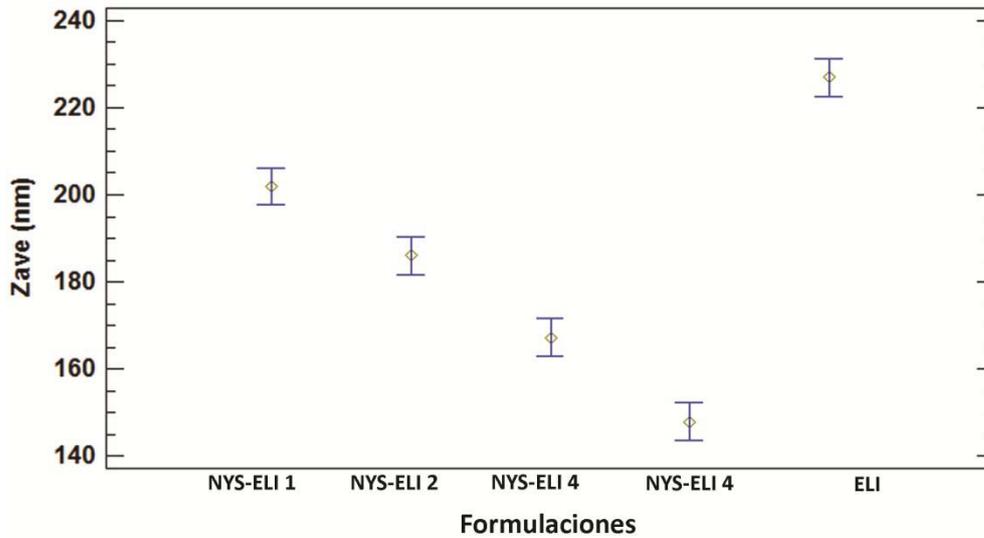


Figura 72. Influencia de las diferentes formulaciones ensayadas en Zave.

Este efecto también se observa cuando se comparan las formulaciones con el mismo contenido de fase oleosa, NYS-ELI 1 y 2 (20% de la fase oleosa) y NYS ELI-3 y 4 (30% de la fase oleosa); en ambos casos el aumento del contenido de Solutol Hs15 coincide con una reducción del tamaño de la gota.

### 7.7.1.2 Análisis de varianza (M-ANOVA) para polidispersidad (PI) de formulaciones NYS-ELI y ELI

El análisis de varianza de PI (ver figura 73) muestra diferencias significativas entre todos los factores estudiados.

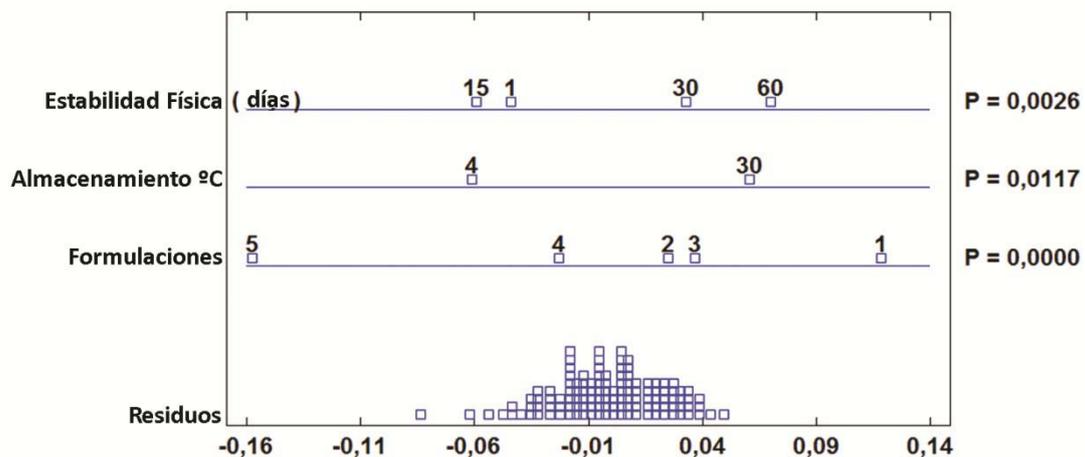
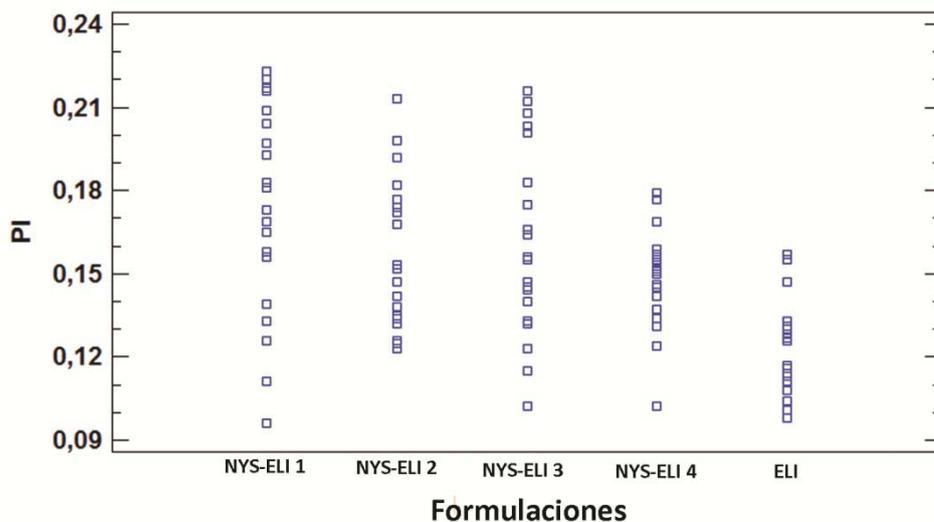


Figura 73. M-ANOVA de la polidispersidad (PI) para formulaciones NYS-ELI y ELI sin fármaco. Las formulaciones: (1) NYS-ELI 1, (2) NYS-ELI 2, (3) NYS-ELI 3, (4) NYS-ELI 4, (5) ELI.

Durante los 60 días del estudio, todas las formulaciones ensayadas presentan valores de PI entre 0,10 y 0,21, y por tanto acordes con las especificaciones planteadas como aceptables en todos los casos ( $\leq 0,25$ ).

La gráfica de dispersión (Figura 74) muestra la tendencia de los datos de PI en función de las diferentes formulaciones. Durante todo el estudio, la formulación NYS-ELI 4 y ELI presentan menor dispersión de los datos que el resto de las formulaciones; una distribución de tamaños de gota uniforme es indicativo de una buena estabilidad fisicoquímica del preparado. Aunque la temperatura de almacenamiento (4 y 30°C) afecta a PI ( $p = 0,0117$ ), las diferencias no son relevantes desde el punto de vista tecnológico y clínico (entre 0,14 y 0,16).



**Figura 74.** Dispersión de los datos de polidispersidad (PI) por código de nivel de las diferentes formulaciones estudiadas.

El último factor considerado en este análisis estadístico es la estabilidad física a largo plazo de las formulaciones NYS-ELI y ELI sin fármaco (Figura 75). La tendencia de los datos indica un ligero aumento en los valores de PI después de 30 días de su preparación que se mantiene hasta el final del estudio.

Sin embargo, este aumento es insignificante porque dado que, en paralelo, no hay cambios significativos en los valores PZ, lo que da prueba la estabilidad física de estas formulaciones durante el estudio.

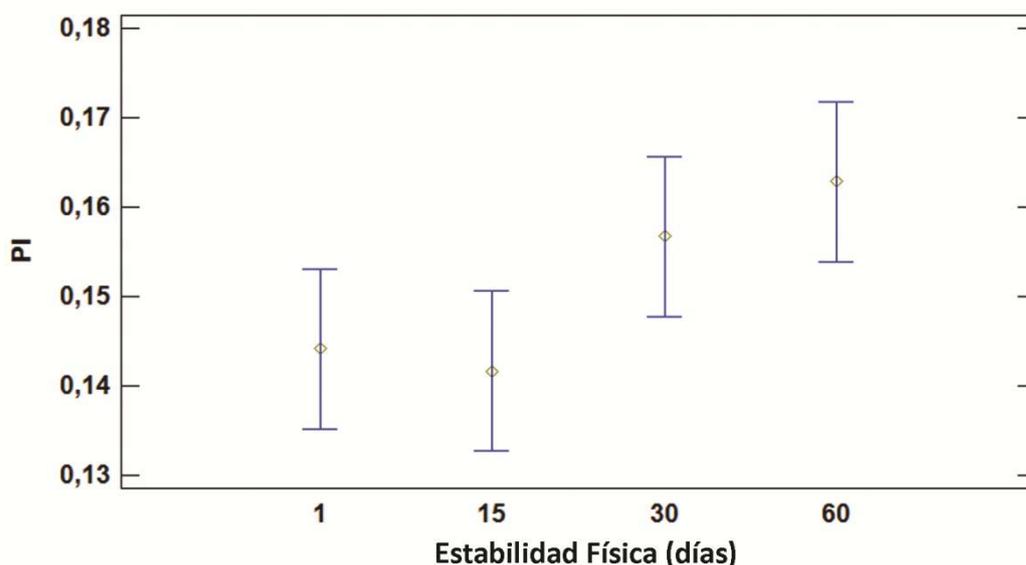
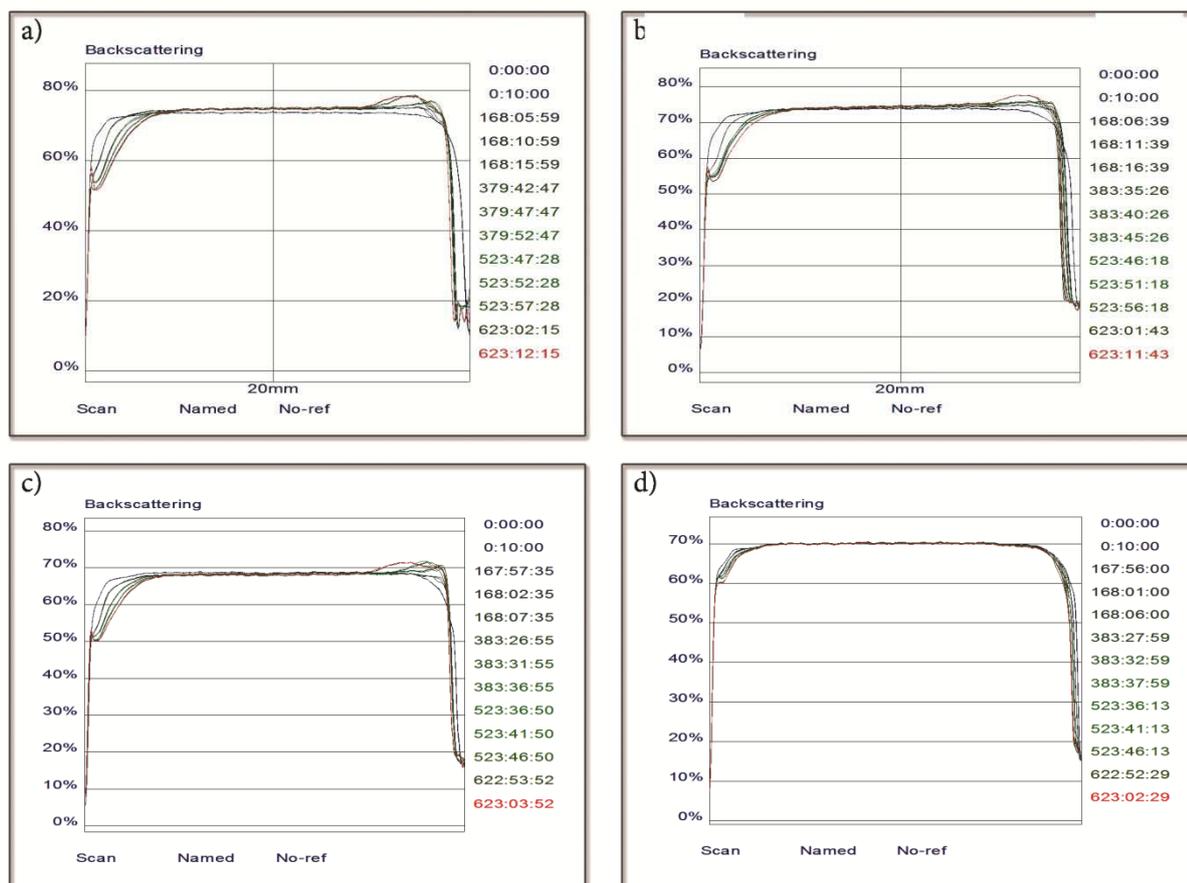


Figura 75. Influencia de la estabilidad física a largo plazo (1, 15 30 y 60 días) en PI.

### 7.7.2. Ensayo de estabilidad óptica para NYS-ELI

Con el fin de confirmar las propiedades de estabilidad observada en los resultados anteriores, se realizó un ensayo óptico mediante el equipo TurbiscanLab®. La principal ventaja de este análisis, es la capacidad de detectar los fenómenos de desestabilización mucho antes que el ojo humano. Por lo tanto, se considera que es un dispositivo que predice la estabilidad, siendo capaz de detectar la desestabilización de la fórmula analizada antes que los métodos clásicos de estabilidad (observación visual, microscopía, espectroscopía). Además, proporciona información en tiempo real sobre el proceso de desestabilización. Esta técnica es capaz de detectar la formación de precipitados en un tiempo de 20 minutos (4 veces antes de que otras técnicas), la coalescencia en una hora, y la sedimentación en 12 horas<sup>165</sup>.



**Figura 76.** Análisis Turbiscan® de las formulaciones NYS-ELI a temperatura ambiente. a) NYS-ELI1; b) NYS-ELI2; c) NYS-ELI3; d) NYS-ELI4.

La Figura 76 muestra los perfiles de retrodispersión de las cuatro muestras de NYS-ELI, correspondientes a las mediciones a  $t=1, 7, 15, 21$  y  $26$  días después de la elaboración. 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. Cuando se produce sedimentación, se observa un aumento de la retrodispersión en la parte inferior de la muestra. Cuando la muestra sufre un proceso de cremado, se observa un aumento de la retrodispersión en la parte superior del vial. Si se produce el fenómeno de desestabilización debido a la agregación de gotas, se puede observar en toda la altura de la muestra un incremento de la retrodispersión en función del tiempo<sup>204</sup>. Si los perfiles de retrodispersión tienen una desviación de  $\pm 2\%$  se puede considerar que no hay variaciones significativas en el tamaño de gota. Variaciones de hasta  $\pm 10\%$  indican formulaciones inestables.

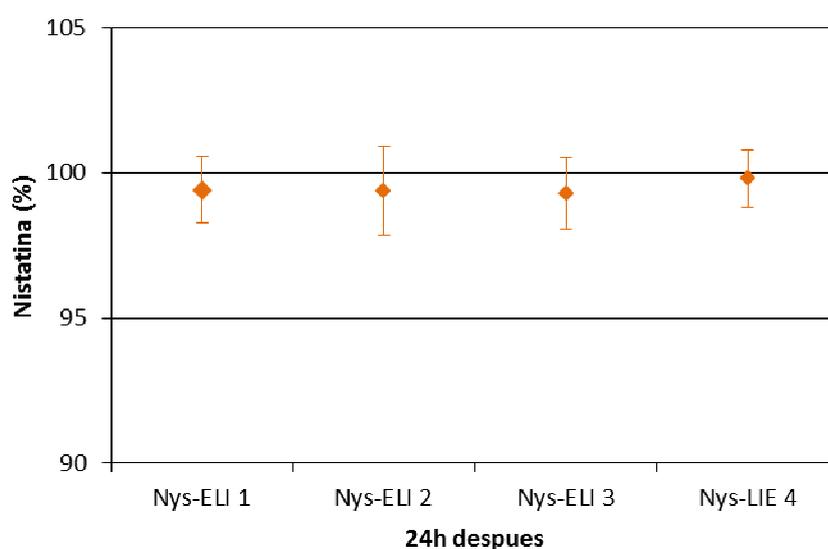
A medida que pasa el tiempo, se puede observar una disminución de la retrodispersión en la parte izquierda de la gráfica y un aumento en la parte derecha de la misma, que podría corresponder a un proceso incipiente de cremado.

Se observa también, un pequeño pico de retrodispersión en la parte inferior de la última medición. A simple vista se pudo ver un ligero sedimento amarillo, que podría corresponder a sedimentación de NYS. Este sedimento resulta fácil de redispersar y no se observa durante unos días, por lo que se supuso que una parte de NYS pudo sedimentar con parte del co-emulgente de modo que al agitar la muestra, la NYS se reincorpora con facilidad al sistema.

Este perfil es muy claro en emulsiones NYS-ELI 1 y 2, menor en NYS-ELI 3, y prácticamente inexistente en la muestra NYS-ELI 4. En base a estas apreciaciones, este sistema, integrado por la emulsión 4 (30% de fase oleosa y fase 4% de co-emulgente) es el más estable de entre los estudiados; su Zave y su PI se mantienen prácticamente constantes a lo largo del estudio y no aparece formación de cremado ni precipitación de NYS. Debido a las propiedades físico-químicas de este fármaco un aumento de la fase oleosa y del co-emulgente implica un aumento en la estabilidad de la emulsión.

### 7.7.3. Cuantificación de NYS en ELI

El método de HPLC validado, que se describe en la sección 6.2.2.2, se utiliza para cuantificar el contenido de fármaco en la ELI. Se toman muestras de la parte superior, media e inferior del contenedor de cada formulación objeto de estudio por triplicado. Previo al análisis en el cromatógrafo se realiza una dilución 1:100 en MeOH: DMF: agua (55:15:30). En todos los casos el contenido de fármaco fue  $> 98 \pm 1,5\%$  a  $t=24$  horas después de la preparación (ver figura 77).



*Figura 77. Porcentaje de Nistatina presente en NYS-ELI 24h después de su elaboración.*

### 7.7.3.1. Análisis del precipitado presente en emulsiones NYS-ELI

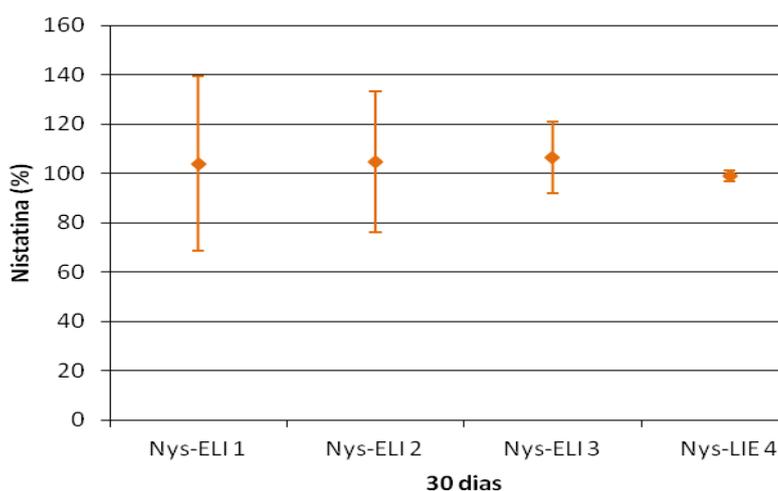
Un mes después de la preparación de las muestras, NYS-ELI 1, NYS-ELI 2 y NYS-ELI 3 muestran una disminución en el contenido de NYS en la parte superior del recipiente y un aumento del contenido de fármaco en la parte inferior, confirmando que el sedimento amarillo observado en la sección 7.7.2 era NYS.

El precipitado de las emulsiones se recupera para su análisis. Este se diluye en metanol: DMF: agua (55:15:30) y se analiza por HPLC para determinar el porcentaje de NYS presente en la muestra. Por otra parte, se toman muestras para el análisis de Zave, PI y LD<sub>99</sub> del mismo.

Los resultados del análisis por HPLC muestran que el precipitado de NYS ELI 1 corresponde al 35,48±3,95%, en el caso de NYS ELI 2, al 28,25±3,73% y en el de NYS ELI 3 al 14,61±4,02% de NYS presente en el preparado. A modo de conclusión, en los casos estudiados, existe unos determinados porcentajes de Nistatina no incluida en la emulsión; éstos decrecen a medida que aumenta el porcentaje de la fase oleosa y de coemulgente, al punto de que, en la NYS-ELI 4 no hay presencia de precipitado, lo que

sugiere que estos cambios en la formulación podrían estabilizar el mantenimiento de NYS en el seno de la emulsión.

El porcentaje de fármaco en la emulsión NYS-ELI 4, se mantiene casi constante durante todo el estudio lo que confirma la capacidad de esta formulación para mantener NYS asociado a la emulsión (figura 78).

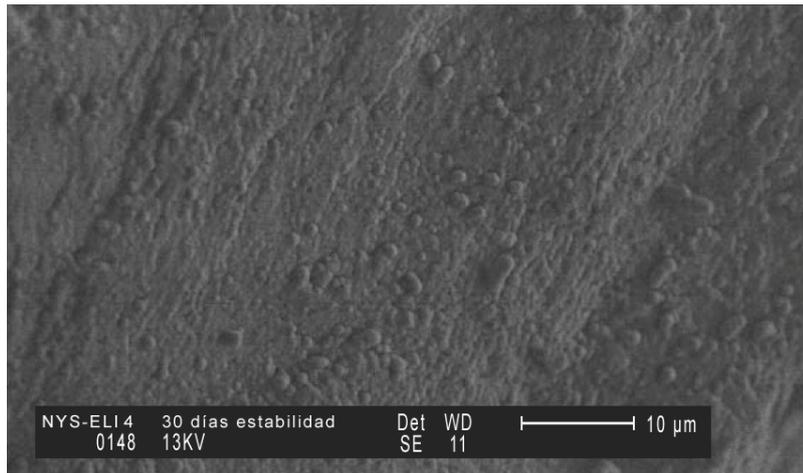


**Figura 78. Porcentaje de Nistatina presente en NYS-ELI 30 días después de su elaboración.**

En cuanto al análisis del tamaño de gota del precipitado, los valores de Zave de los tres preparados oscilan entre  $84,7 \pm 2,63$  y  $95,18 \pm 5,78$  nm, PI entre  $0,107 \pm 0,01$  y  $0,118 \pm 0,04$  y  $LD_{99}$  entre  $225 \pm 6,29$  y  $276 \pm 2,43$  nm. El tamaño de gota del precipitado más pequeño que el de la formulación y la baja dispersión de los datos, refuerzan la idea de que NYS podría estar en forma de micelas que al precipitar se pueden resuspender e incorporar a la emulsión sin riesgos para el sistema. Estos datos sugieren además, que la presencia del precipitado en el preparado no afectaría su uso por vía intravenosa.

#### 7.7.4. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Una vez identificada la formulación más estable, se utiliza la microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar la estructura de la fase dispersa y la distribución de las gotícula lipídicas de la emulsión NYS-ELI 4. Este análisis permite tener una idea visual de lo que ocurre en el seno de la emulsión.



*Figura 79. Imagen de la criofractura de NYS-ELI 4 analizada por SEM, 30 días después de su elaboración (test a largo plazo). Bar: 10 μm*

El análisis se realiza 30 días después de su elaboración, para poder determinar si la muestra permanece estable durante el tiempo de almacenamiento, en lo que hace referencia a posible crecimiento del tamaño de partícula. Así, el registro fotográfico conseguido a través de SEM de NYS-ELI 4 mostró gotitas de la emulsión no aglomeradas, prácticamente casi esféricas y con un rango de tamaño submicrométrico que se ajusta al determinado mediante espectrometría de correlación fotónica (sección 7.7.1.). El aspecto macroscópico y consistencia sugieren que la emulsión permanece estable durante el tiempo de estudio.

## 7.8. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE LAS FORMULACIONES NYS-ELI

Los estudios de liberación han sido ampliamente utilizados durante el proceso de desarrollo de la formulación, ya que en función de los parámetros cinéticos obtenidos se puede seleccionar los componentes y las proporciones asociadas más interesantes para el fin específico de la formulación. Por ejemplo, si se quiere obtener una formulación de liberación modificada se seleccionarían la proporción de excipiente con la que se obtuviera una constante de liberación más lenta.

Los excipientes pueden interactuar con el fármaco que portan<sup>192,202</sup>. Los estudios cinéticos, permiten determinar el tipo de interacciones que existen entre ellos. Así por ejemplo, en ocasiones, la afinidad del fármaco por el excipiente es tan grande que puede dificultar la liberación del mismo; de tal forma que los estudios de liberación permiten predecir la efectividad y disponibilidad del fármaco una vez liberado de la forma farmacéutica.

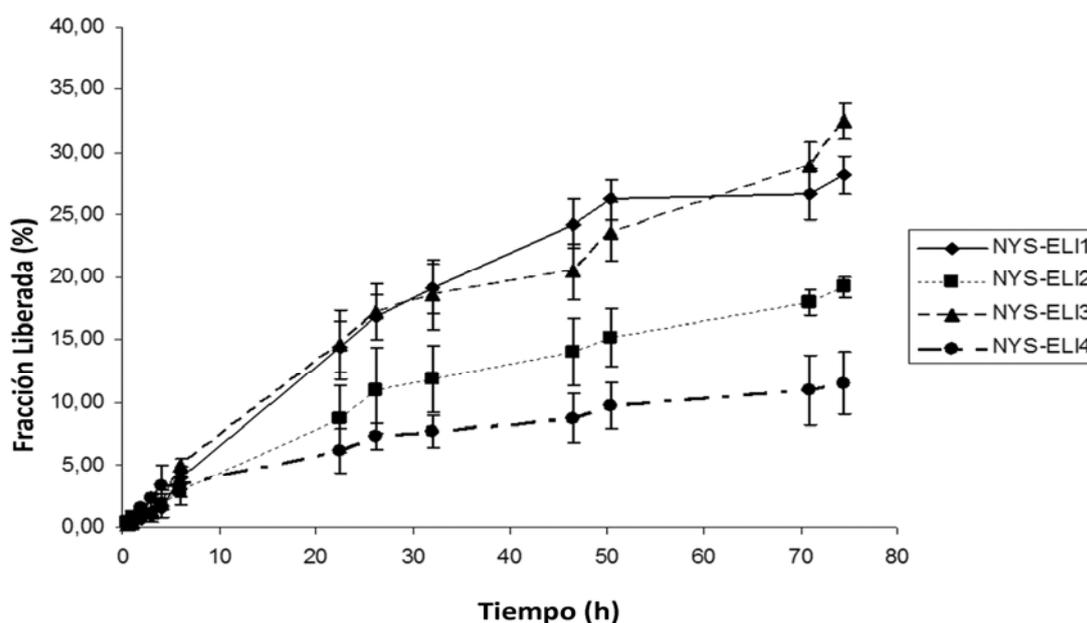
Por otro lado los estudios de liberación resultan especialmente interesantes porque pueden llegar a predecir el efecto terapéutico del fármaco y cuanta cantidad de fármaco liberado está disponible para la interacción con la diana terapéutica, como es el caso de los fármacos administrados por vía IV. De hecho ya existen en la literatura estudios biofarmacéuticos/farmacodinámicos que pretenden predecir el efecto terapéutico en base a parámetros de liberación del fármaco de la formulación<sup>205</sup>.

Existen numerosos modelos cinéticos con los que se pretende explicar el mecanismo de liberación del fármaco a partir de la forma farmacéutica. Este es el caso de los llamados modelos mecanísticos o de base fisicoquímica. Ejemplo de estos modelos sería los modelos de Korsmeyer Peppas, Higuchi, Orden 1 y cero. Por otro lado existen los modelos no mecanísticos, los cuales no explican explícitamente el mecanismo de liberación y únicamente pretender describir matemáticamente la cinética de liberación obtenida, modelos de este tipo sería por ejemplo el correspondiente a ecuación de

Weibull, estas ecuaciones son muy flexibles y en muchas ocasiones permiten obtener adecuadas descripciones de las cinéticas de liberación.

Estudios anteriores<sup>89,116</sup> demostraron que la mezcla de MeOH: DMF: agua (55:15:30 v/v/v) tenía la capacidad de mantener las condiciones de inmersión (Sink) cuando se llevaron a cabo experimentos de liberación de NYS. También demostraron que este medio receptor es compatible con el uso de membranas de diálisis de celulosa en dichos experimentos.

La Figura 80 muestra los perfiles de liberación de NYS a partir de sus emulsiones respectivas. La cantidad máxima de la liberación de NYS al final del experimento (% R  $\infty$ ) es relativamente bajo; formulaciones NYS-ELI 1 y 3 tenían aproximadamente las mismas tasas de liberación, seguido de NYS-ELI 2 y por último NYS-ELI 4. Este patrón podría explicarse por la composición de la formulación, debido a NYS es un fármaco anfílico se espera que sufra una partición entre las gota de emulsión y la solución del receptor.



*Figura 80. Perfil de liberación de las formulaciones NYS-ELI a 37 °C*

Formulaciones 1 y 3 tienen Solutol Hs15 a una concentración de 2%, por lo que el coeficiente de partición debe ser más bajo que las formulaciones 2 y 4 (con un 4% de

Solutol Hs15 en su composición), promoviendo la liberación de NYS al medio receptor. En contraste, la mayor concentración de surfactante prolongaría el tiempo de residencia NYS en las gotas de la emulsión y por lo tanto disminuye la velocidad de liberación del fármaco.

En la sección 7.6.2, se ha demostrado que el aumento de la fase oleosa a un 30% en la formulación 4, causó un dramático aumento en su estabilidad y que podría tener un efecto sinérgico con el aumento del agente emulgente que contribuye a una afinidad cada vez mayor de NYS para las gotas de emulsión. Estos diferentes comportamientos de partición de NYS en las formulaciones podrían explicar las diferentes velocidades de liberación, que se encontraron en este experimento.

Para determinar el mecanismo de liberación del fármaco de las emulsiones formuladas, se ajustaron cinco modelos cinéticos a los datos experimentales: de orden cero ecuación (Ec. 1), ecuación de primer orden (Ec. 2), ecuación de Higuchi, raíz cuadrada del tiempo (Ec. 3), la ecuación de Weibull (Ec. 4) y Korsmeyer-Peppas ecuación (Ec. 5).

El modelo de orden cero describe una liberación del fármaco de la forma de dosificación lineal en el tiempo, es una liberación constante, es decir se libera la misma cantidad de fármaco a cada tiempo experimental. Es un modelo típicamente seguido por algunos parches transdérmicos, formas recubiertas, sistemas osmóticos etc.

La ecuación de orden uno deriva de la primera ley de Fick, en la que la liberación del fármaco de la formulación es directamente proporcional a la cantidad de fármaco remanente en la misma. Explica la liberación como un proceso de difusión en la que las moléculas del fármaco se mueven en función del gradiente de concentración entre la forma de dosificación y el medio de disolución.

Como se ha comentado anteriormente, la ecuación de Weibull es una ecuación empírica, muy flexible, que describe muchos procesos de liberación gracias al exponente beta o factor de forma, ya que en función del valor de este exponente se puede adaptar a perfiles sigmoideos (cuando  $\beta > 1$ ), exponenciales ( $\beta = 1$ ) o

parabólicos ( $b < 1$ ). Otro parámetro característico en esta ecuación es  $T_d$  que representa el tiempo que tarda en liberarse el 63.2% de la dosis. Debido a que es una ecuación empírica no es capaz de describir el proceso de liberación del fármaco en términos mecanísticos.

La ecuación de Higuchi fue originariamente utilizado para explicar la liberación de fármacos suspendidos en matrices semisólidas. Posteriormente se ha comprobado que es también aplicable a otros sistemas de liberación de fármacos. Esta ecuación explica la liberación del fármaco mediante un proceso de difusión basado en la ley de fick de forma dependiente a la raíz cuadrada del tiempo.

Por ultimo Korsmeyer-Peppas elabora una sencilla ecuación en la que se relaciona la liberación del fármaco de forma exponencial con el tiempo. Esta ecuación puede ser únicamente aplicada para el primer 60% de fármaco liberado. La ventaja de esta ecuación es que permite dilucidar el mecanismo de liberación seguido por el fármaco en función del valor del exponente  $n$  obtenido, tal y como sigue a continuación.

El modelo cinético fue seleccionado con base en el valor más bajo del Criterio de Información de Akaike (AIC). También se tuvieron en cuenta, la precisión de los parámetros biofarmacéuticos expresados como %CV y la distribución de los residuos.

La Tabla 51 muestra los parámetros de liberación de las emulsiones preparadas. El modelo de liberación de NYS para NYS-ELI 1 sigue la ecuación de Weibull, tal y como se ha comentado anteriormente, esta es una ecuación empírica que no permite explicar el mecanismo de liberación del fármaco, sin embargo, Papadoupoulo y Cols han propuesto recientemente la correlación del exponente  $b$  con el mecanismo de liberación de la difusión<sup>206</sup>. El valor de 1,36 corresponde a una curva tipo sigmoidea, y según estos autores, es indicativo de un mecanismo de liberación complejo. Se observa también, que el exponente  $n$  de la ecuación Korsmeyer-Peppas tiene un valor de 0,67 (osciló entre  $0,43 < n < 0,85$ ) lo cual es indicativo de un transporte anómalo.

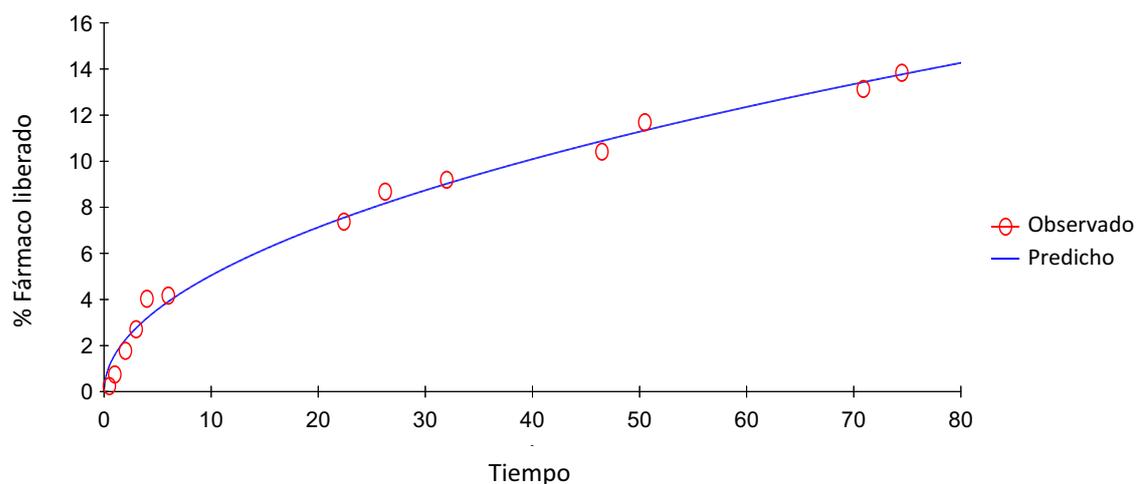
| Formulación | Modelo              | AIC          | Parámetro | Unidades           | Valores(%CV)    |
|-------------|---------------------|--------------|-----------|--------------------|-----------------|
| NYS-ELI 1   | Orden Cero          | 66.92        | K0        | % h <sup>-1</sup>  | 0.409(8.8%)     |
|             | Primer orden        | 38.34        | K1        | h <sup>-1</sup>    | 0.026(12.53%)   |
|             |                     |              | R∞        | %                  | 33.09(6.17%)    |
|             | <b>Weibull</b>      | <b>21.22</b> | β         | —                  | 1.36 (5.57%)    |
|             | Higuchi             | 75.60        | td        | h                  | 28.54 (4.07%)   |
|             |                     |              | R∞        | %                  | 28.42 (2.21%)   |
|             |                     |              | Kh        | %h <sup>-1/2</sup> | 2.50 (10.63%)   |
|             | Korsmeyer-Peppas    | 56.14        | Kk-p      | h <sup>-n</sup>    | 1.65 (27.86%)   |
| n           |                     |              | —         | 0.67 (10.42%)      |                 |
| NYS-ELI 2   | Orden Cero          | 46.03        | K0        | % h <sup>-1</sup>  | 0.258 (6.29%)   |
|             | <b>Primer orden</b> | <b>15.19</b> | K1        | h <sup>-1</sup>    | 0.021 (9.11%)   |
|             |                     |              | R∞        | %                  | 23.23 (5.01%)   |
|             | Weibull             | 17.07        | β         | —                  | 0.97 (7.84%)    |
|             | Higuchi             | 44.90        | td        | h                  | 48.94 (21.12%)  |
|             |                     |              | R∞        | %                  | 23.93 (11.23%)  |
|             |                     |              | Kh        | %h <sup>-1/2</sup> | 2.05 (3.96%)    |
|             | Korsmeyer-Peppas    | 28.71        | Kk-p      | h <sup>-n</sup>    | 1.01 (15.49%)   |
| n           |                     |              | —         | 0.68 (5.70%)       |                 |
| NYS-ELI 3   | Orden Cero          | 53.72        | K0        | % h <sup>-1</sup>  | 0.420 (6.66%)   |
|             | <b>Primer orden</b> | <b>40.25</b> | K1        | h <sup>-1</sup>    | 0.018 (19.99%)  |
|             |                     |              | R∞        | %                  | 41.12 (12.01%)  |
|             | Weibull             | 41.90        | β         | —                  | 0.92 (17.51%)   |
|             | Higuchi             | 70.39        | td        | h                  | 70.92 (70.94%)  |
|             |                     |              | R∞        | %                  | 47.03 (39.65%)  |
|             |                     |              | Kh        | %h <sup>-1/2</sup> | 2.41 (11.35%)   |
|             | Korsmeyer-Peppas    | 42.69        | Kk-p      | h <sup>-n</sup>    | 43 (21.34%)     |
| n           |                     |              | —         | 0.71 (7.48%)       |                 |
| NYS-ELI 4   | Orden Cero          | 43.58        | K0        | % h <sup>-1</sup>  | 0.17 (8.72%)    |
|             | Primer orden        | 34.59        | K1        | h <sup>-1</sup>    | 0.040 (18.97%)  |
|             |                     |              | R∞        | %                  | 13.54 (7.18%)   |
|             | Weibull             | 19.20        | β         | —                  | 0.60 (12.95%)   |
|             | Higuchi             | 17.46        | td        | h                  | 122.40 (91.05%) |
|             |                     |              | R∞        | %                  | 25.82 (49.87%)  |
|             |                     |              | Kh        | %h <sup>-1/2</sup> | 1.59 (1.78%)    |
|             | Korsmeyer-Peppas    | 19.41        | Kk-p      | h <sup>-n</sup>    | 1.56 (10.21%)   |
| n           |                     |              | —         | 0.50 (5.23%)       |                 |

**Tabla 51. Parámetros de Liberación después de ajustar el modelo.**

Las formulaciones 2 y 3 mostraron una cinética de liberación de primer orden con una liberación lenta de 0,021 y 0,018 h<sup>-1</sup>, respectivamente, pero esta diferencia no resultó ser significativa ( $p > 0,05$ ). La liberación de primer orden significa que la liberación del fármaco de la emulsión ha seguido un patrón de gradiente de concentración, basado en la primera ley de Fick, donde las cantidades liberadas son directamente proporcionales a las cantidades remanentes en la forma de dosificación, ofreciendo una liberación sostenida del fármaco. Del mismo modo que con la formulación 1, se observa que el exponente  $n$  de la ecuación Korsmeyer-Peppas (0.68 para NYS-ELI 2 y 0,71 para NYS-ELI3) indicaba un transporte anómalo. El transporte anómalo ha sido clásicamente atribuido a una combinación de difusión y erosión en matrices sólidas<sup>207</sup>, pero se sabe poco en el caso de las emulsiones. La mayoría de los autores han atribuido el transporte anómalo a las transiciones de fase del emulgente, como la formación de fases lamelares o cúbicas<sup>208,209</sup>.

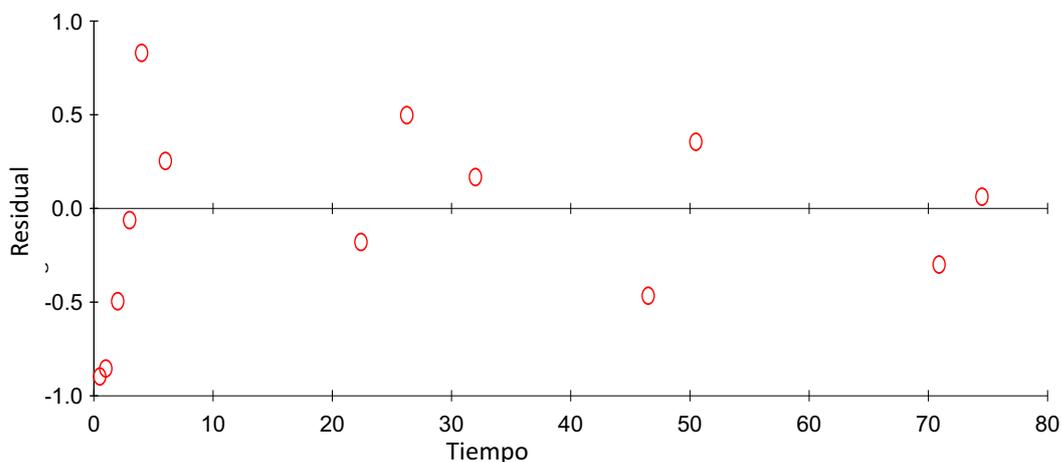
Finalmente, la formulación NYS-ELI 4 exhibe una cinética de liberación de Higuchi, que se asume una difusión de estado estacionario de los sistemas no degradables cuando el fármaco se dispersa uniformemente por toda la matriz, lo que fue confirmado por el exponente  $n$  de la ecuación Korsmeyer-Peppas. En este punto, cuando  $n$  es igual a 0,5 la ecuación Korsmeyer-Peppas es igual a la ecuación de Higuchi (raíz cuadrada del tiempo, véase la ecuación 5 y 3, respectivamente) y es indicativo de una liberación controlada por difusión<sup>207</sup>.

Las figuras 81 y 82 muestran los gráficos de bondad de ajustado de NYS-ELI 4 en función de Higuchi. La figura 81 muestra los datos experimentales medios obtenidos ( $n=3$ ) representado mediante circunferencias, y su solapamiento con la función predicha por el modelo, representado mediante la línea continua. El alto grado de solapamiento de ambas, muestra que el modelo matemático (ecuación de Higuchi) explica adecuadamente los datos experimentales.



**Figura 81. Ajustado de la media de los datos para NYS-ELI 4. Predicción del modelo Higuchi.**

En la figura 82 se puede observar, los residuales (o diferencia entre los valores observados y predichos) a cada tiempo experimental. Como puede verse el rango de los residuales es bajo y se encuentran aleatoriamente distribuidos alrededor del cero, lo cual también es indicativo de un adecuado ajuste del modelo a los datos experimentales.



**Figura 82. Gráfico de ajustado de los residuales para NYS-ELI 4. Predicción del modelo Higuchi.**

Por lo tanto, sólo NYS-ELI 4 mostro una liberación controlada de fármaco, descrita por la ecuación de Higuchi. Esta formulación también es la que demostró una mayor estabilidad.

## 7.9. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

Se ha estudiado la eficacia antifúngica de la Nistatina vehiculizada en las emulsiones elaboradas y se han comparado con Nistatina base, debido a que desafortunadamente, aun no existe en el mercado, ninguna formulación intravenosa que contenga Nistatina, con la que pudiera ser utilizada como referencia para la comparación.

En este estudio se ha utilizado el parámetro MIC o Concentración mínima inhibitoria. MIC ha sido clásicamente utilizada, para la evaluación de la potencia antifúngica de formulaciones y compuestos, al igual que, para la evaluación de resistencias microbianas a fármacos en muestras clínicas. Este parámetro expresa la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras. Este parámetro también ha sido utilizado por numerosos autores para evaluar la eficacia de sus formulaciones<sup>210-212</sup>.

En este caso, se ha evaluado la actividad antifúngica in vitro de NYS-ELI contra, *Candida Albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus Fumigatus* ATCC 9197 por el método de microdilución. Este método permite determinar la sensibilidad frente a este tipo de microorganismos y obtener la concentración mínima inhibitoria (MIC) del antifúngico analizado.

Por otro lado, se realizó un estudio cinético de la muerte del microorganismo o estudio de eficacia de la formulación, con el fin de evaluar el la acción antifúngica de las formulaciones. Ambos estudios se realizaron como se ha descrito en la sección 6.5.

### 7.9.1. Resultados del test de susceptibilidad *in vitro* para *Candida Albicans* ATCC 10231

Siguiendo el protocolo EUCAST, se realizó una dilución seriada de las formulaciones en el medio de cultivo SDA, como fue descrito en la sección 6.5.1.4. Tras la siembra del inóculo, las placas se incubaron a 30°C en presencia de oxígeno. Las lecturas se realizan a tiempo cero y a 24h en un espectrofotómetro para placas Microtiter a 595nm.

### 7.9.1.1. Resultados a tiempo cero

La tabla 52 muestra las lecturas de la absorbancia a 595 nm de las muestras a tiempo cero, de este modo se tiene el punto de partida para identificar las variaciones en función del crecimiento fúngico.

| Muestra   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| NYS-ELI 1 | 2,890 | 2,869 | 2,623 | 2,35  | 1,423 | 0,585 | 0,699 | 0,445 | 0,245 | 0,195 | 0,085 | 0,08  |
| ELI 1     | 2,638 | 2,483 | 2,124 | 0,574 | 0,497 | 0,379 | 0,200 | 0,1   | 0,088 | 0,071 | 0,064 | 0,062 |
| NYS-ELI 2 | OUT   | 2,849 | 2,647 | 2,43  | 1,962 | 1,068 | 0,593 | 0,438 | 0,285 | 0,148 | 0,109 | 0,085 |
| ELI 2     | OUT   | 2,613 | 2,354 | 2,036 | 1,731 | 0,513 | 0,555 | 0,140 | 0,140 | 0,096 | 0,078 | 0,071 |
| NYS-ELI 3 | 2,799 | 2,791 | 2,537 | 2,25  | 1,958 | 1,318 | 0,678 | 0,33  | 0,226 | 0,138 | 0,099 | 0,08  |
| ELI 3     | OUT   | 2,583 | 2,54  | 2,274 | 1,922 | 1,057 | 0,783 | 0,407 | 0,256 | 0,142 | 0,109 | 0,085 |
| NYS-ELI 4 | 2,763 | 2,438 | 2,359 | 2,191 | 1,895 | 0,775 | 0,579 | 0,248 | 0,201 | 0,125 | 0,096 | 0,076 |
| ELI 4     | 2,926 | 2,519 | 2,494 | 2,297 | 2,021 | 0,89  | 0,691 | 0,413 | 0,28  | 0,149 | 0,098 | 0,083 |

| Muestra   | 13    | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| NYS-ELI 1 | 0,067 | 0,062 | 0,058 | 0,057 | 0,074 | 0,055 | 0,074 |
| ELI 1     | 0,058 | 0,056 | 0,055 | 0,056 | 0,075 | 0,06  | 0,076 |
| NYS-ELI 2 | 0,070 | 0,062 | 0,062 | 0,054 | 0,074 | 0,057 | 0,075 |
| ELI 2     | 0,060 | 0,059 | 0,059 | 0,058 | 0,074 | 0,057 | 0,074 |
| NYS-ELI 3 | 0,069 | 0,062 | 0,060 | 0,059 | 0,076 | 0,057 | 0,074 |
| ELI 3     | 0,069 | 0,065 | 0,060 | 0,060 | 0,107 | 0,058 | 0,077 |
| NYS-ELI 4 | 0,064 | 0,060 | 0,063 | 0,060 | 0,082 | 0,062 | 0,084 |
| ELI 4     | 0,068 | 0,062 | 0,059 | 0,056 | 0,075 | 0,058 | 0,072 |

|                    |  |
|--------------------|--|
| Control del Medio  |  |
| Control de Muestra |  |
| Inoculo            |  |

Tabla 52. Lecturas de absorbancia de las placas Microtiter a tiempo cero.

Las lecturas muestran que las columnas 1 al 4 tienen una turbidez un poco alta y va disminuyendo a medida que las muestras se van diluyendo, esto se debe a la naturaleza de la formulación blanca lechosa.

### 7.9.1.2. Resultados a las 24h de incubación

La tabla 53 muestra las lecturas de la absorbancia a 595 nm de las muestras 24 horas después de su siembra. Se puede observar que hay variaciones en la turbidez de las muestras, sobre todo de las emulsiones sin Nistatina.

| Muestra   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| NYS-ELI 1 | 2,762 | 2,635 | 2,418 | 1,748 | 0,969 | 0,219 | 0,333 | 0,327 | 0,263 | 0,269 | 0,908 | 0,654 |
| ELI 1     | 2,468 | 2,125 | 1,496 | 0,347 | 0,728 | 0,821 | 0,605 | 0,515 | 0,588 | 0,598 | 0,619 | 0,549 |
| NYS-ELI 2 | 2,954 | 2,711 | 2,497 | 2,144 | 1,386 | 1,013 | 0,554 | 0,446 | 0,303 | 0,197 | 0,291 | 0,773 |
| ELI 2     | 2,895 | 2,252 | 2,005 | 1,619 | 1,442 | 0,537 | 0,591 | 0,37  | 0,476 | 0,718 | 0,803 | 0,592 |
| NYS-ELI 3 | 2,741 | 2,575 | 2,376 | 1,999 | 1,53  | 1,304 | 0,645 | 0,336 | 0,233 | 0,162 | 0,527 | 0,562 |
| ELI 3     | 2,957 | 2,371 | 2,409 | 2,213 | 1,843 | 1,136 | 1,24  | 1,026 | 0,77  | 0,725 | 0,785 | 0,637 |
| NYS-ELI 4 | 2,691 | 2,353 | 2,17  | 1,858 | 1,425 | 0,809 | 0,568 | 0,251 | 0,207 | 0,182 | 0,274 | 0,741 |
| ELI 4     | 2,729 | 2,323 | 2,300 | 2,096 | 1,809 | 1,375 | 1,054 | 0,787 | 0,736 | 0,681 | 0,721 | 0,799 |

| Muestra   | 13    | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    |                     |                    |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------------|--------------------|
| NYS-ELI 1 | 0,607 | 0,578 | 0,594 | 0,626 | 0,072 | 0,055 | 0,075 | Control del Medio   |                    |
| ELI 1     | 0,558 | 0,616 | 0,632 | 0,61  | 0,076 | 0,606 | 0,076 |                     | Control de Muestra |
| NYS-ELI 2 | 0,636 | 0,579 | 0,581 | 0,586 | 0,082 | 0,579 | 0,075 |                     |                    |
| ELI 2     | 0,573 | 0,558 | 0,539 | 0,573 | 0,077 | 0,549 | 0,074 |                     | Inoculo            |
| NYS-ELI 3 | 0,602 | 0,565 | 0,566 | 0,562 | 0,083 | 0,537 | 0,074 |                     |                    |
| ELI 3     | 0,591 | 0,566 | 0,513 | 0,547 | 0,079 | 0,519 | 0,075 | Crecimiento fúngico |                    |
| NYS-ELI 4 | 0,609 | 0,573 | 0,54  | 0,564 | 0,086 | 0,549 | 0,083 |                     |                    |
| ELI 4     | 0,646 | 0,579 | 0,543 | 0,546 | 0,084 | 0,556 | 0,072 |                     |                    |

Tabla 53. Lecturas de absorbancia de las placas Microtiter 24 h después de la siembra.

En el caso de las emulsiones con fármaco, se mantiene las lecturas iniciales hasta las celdas 11, a partir de allí se observa un incremento de la turbidez, en este caso se debe, al crecimiento fúngico. Mientras que en las emulsiones sin fármaco, el crecimiento fúngico comienza en la columna 5.

En la tabla 54 se muestra la primera celda donde se ha observado crecimiento fúngico y su correspondiente concentración de Nistatina, por lo que MIC es la celda inmediatamente anterior sin crecimiento fúngico.

| Muestra    | 1ra celda crecida | [NISTATINAµg/ml]    | MIC    |
|------------|-------------------|---------------------|--------|
| NYS-ELI 1  | 11                | 0,1941              | 0,3882 |
| ELI 1      | 5                 | Crecimiento fúngico |        |
| NYS-ELI 2  | 12                | 0,1220              | 0.2441 |
| ELI 2      | 9                 | Crecimiento fúngico |        |
| NYS-ELI 3  | 12                | 0,1941              | 0,3882 |
| ELI 3      | 9                 | Crecimiento fúngico |        |
| NYS-ELI 4  | 12                | 0,1220              | 0.2441 |
| ELI 4      | 7                 | Crecimiento fúngico |        |
| NYS patrón | 11                | 0,1953              | 0,3906 |

Tabla 54. Resultados MICS para C. Albicans 24h después de la siembra.

Los resultados muestran que en el caso de *C. albicans*, NYS-ELI 1 y 3 mostraron valores de MIC ligeramente superiores, pero la diferencia no es significativa si se compara con NYS patrón. Por otro lado, NYS-ELI 2 y 4 mostraron un valor MIC inferior (casi a la mitad), cuando se compararon con NYS patrón. Estas emulsiones tienen una mayor proporción de Solutol HS 15 (4%), en contraste con ELI 1 y 3 (con sólo un 2%). Como se dijo anteriormente, Solutol HS 15 es un co-emulgente, que además de mejorar la estabilidad de la formulación, podría permitir una mejor interacción con la membrana de las levaduras, lo que disminuye el valor de la MIC y el aumento de la potencia del fármaco. La reducción de casi dos veces MIC está de acuerdo con el estudio publicado por Semis et al<sup>17</sup>.

En ningún caso, los excipientes de la emulsión lipídica mostraron efecto inhibitorio sobre la levadura cultivada, demostrando que el excipiente no era tóxico, ni interfería en el ensayo. Los valores MIC de NYS-ELI fueron más bajos que los de la NYS patrón, estos valores sugieren que la emulsión lipídica aumentó la actividad antimicrobiana del NYS y mejoró su eficacia.

### **7.9.2. Resultados del test de susceptibilidad *in vitro* para *Aspergillus Fumigatus* ATCC 9197**

A diferencia de las levaduras que su crecimiento es rápido y se pueden obtener resultados a las 24h de su siembra, el *Aspergillus* se deben incubar mínimo por 48h para poder determinar su crecimiento.

Para este test se utilizó el protocolo NCCLS M38-A para hongos, descrito en la sección 6.5.2. Se realizó una dilución seriada de las formulaciones en el medio de cultivo SDA, como fue descrito en la sección 6.5.2.4. Tras la siembra del inóculo, las placas se incubaron a 30°C en presencia de oxígeno.

Las lecturas se realizan a tiempo cero, a 24h y a 48h en un espectrofotómetro para placas Microtiter a 595nm. En este caso no se analizan las emulsiones sin fármaco pues ya se ha demostrado que el excipiente no es tóxico, ni interfiere en el ensayo.

### 7.9.2.1. Resultados a tiempo cero

La tabla 55 muestra las lecturas de la absorbancia a 595 nm de las muestras a tiempo cero, de este modo se tiene el punto de partida para identificar las variaciones en función del crecimiento fúngico.

| Muestra    | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| NYS Patrón | 0,092 | 0,092 | 0,095 | 0,091 | 0,094 | 0,096 | 0,098 | 0,099 | 0,099 | 0,096 | 0,099 | 0,097 |
| NYS-ELI 1  | OUT   | 2,825 | 2,559 | 2,285 | 1,802 | 0,889 | 0,573 | 0,34  | 0,232 | 0,172 | 0,135 | 0,119 |
| NYS-ELI 2  | 2,995 | 2,788 | 2,589 | 2,274 | 1,824 | 0,842 | 0,585 | 0,395 | 0,241 | 0,179 | 0,145 | 0,121 |
| NYS-ELI 3  | 2,847 | 2,724 | 2,493 | 2,219 | 1,906 | 1,330 | 0,655 | 0,424 | 0,246 | 0,2   | 0,153 | 0,128 |
| NYS-ELI 4  | OUT   | 2,905 | 2,714 | 2,471 | 2,131 | 1,504 | 0,823 | 0,558 | 0,28  | 0,225 | 0,165 | 0,141 |

| Muestra    | 13    | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    |                    |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------|
| NYS Patrón | 0,091 | 0,093 | 0,099 | 0,094 | 0,078 | 0,105 | 0,077 | Control del Medio  |
| NYS-ELI 1  | 0,11  | 0,103 | 0,099 | 0,097 | 0,079 | 0,096 | 0,079 | Control de Muestra |
| NYS-ELI 2  | 0,105 | 0,104 | 0,105 | 0,097 | 0,078 | 0,098 | 0,077 | Inoculo            |
| NYS-ELI 3  | 0,121 | 0,112 | 0,097 | 0,105 | 0,082 | 0,099 | 0,079 |                    |
| NYS-ELI 4  | 0,127 | 0,121 | 0,104 | 0,097 | 0,08  | 0,094 | 0,081 |                    |

Tabla 55. Lecturas de absorbancia de las placas Microtiter a tiempo cero.

Las muestras NYS-ELI presentan una turbidez alta comparadas con la turbidez del medio de cultivo solo y con NYS patrón, a medida que se diluyen las muestras van quedando más transparentes y disminuye su densidad óptica.

### 7.9.2.2. Resultados a las 24h de incubación

La tabla 56 muestra las lecturas de la absorbancia a 595 nm de las muestras 24 horas después de su siembra.

| Muestra    | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| NYS Patrón | 0,094 | 0,071 | 0,107 | 0,078 | 0,091 | 0,109 | 0,107 | 0,145 | 0,094 | 0,137 | 0,097 | 0,186 |
| NYS-ELI 1  | 2,917 | 2,649 | 2,398 | 1,95  | 0,814 | 0,382 | 0,496 | 0,268 | 0,213 | 0,157 | 0,129 | 0,118 |
| NYS-ELI 2  | 2,901 | 2,646 | 2,407 | 1,944 | 0,762 | 0,176 | 0,553 | 0,271 | 0,23  | 0,168 | 0,134 | 0,128 |
| NYS-ELI 3  | 2,77  | 2,622 | 2,31  | 2,032 | 1,584 | 0,867 | 0,701 | 0,387 | 0,213 | 0,174 | 0,147 | 0,124 |
| NYS-ELI 4  | 2,993 | 2,828 | 2,584 | 2,252 | 1,78  | 0,343 | 0,357 | 0,561 | 0,264 | 0,214 | 0,16  | 0,139 |

| Muestra | 13    | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    |                     |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------------|
| NYS     | 0,179 | 0,219 | 0,210 | 0,221 | 0,079 | 0,149 | 0,078 | Control del Medio   |
| NYS-ELI | 0,118 | 0,19  | 0,186 | 0,206 | 0,087 | 0,092 | 0,08  | Control de Muestra  |
| NYS-ELI | 0,141 | 0,164 | 0,151 | 0,165 | 0,091 | 0,094 | 0,078 | Inoculo             |
| NYS-ELI | 0,106 | 0,114 | 0,192 | 0,128 | 0,097 | 0,121 | 0,08  | crecimiento fúngico |
| NYS-ELI | 0,117 | 0,101 | 0,123 | 0,145 | 0,097 | 0,091 | 0,087 |                     |

Tabla 56. Lecturas de absorbancia de las placas Microtiter 24 h después de la siembra.

A las 24h de incubación, la turbidez de las celdas ha variado un poco. Se observa, que NYS patrón tiene la inflexión en la celda 6, con un claro crecimiento fúngico, mientras que las muestras de emulsión con fármaco tienen la inflexión en la columna 12, donde además se observa un ligero crecimiento fúngico.

### 7.9.2.3. Resultados a las 48h de incubación

La tabla 57 muestra las lecturas de la absorbancia a 595 nm de las muestras 48 horas después de su siembra. A las 48h de incubación se puede apreciar que el hongo ha completado su crecimiento y se puede determinar con precisión la MIC, de allí que no se determine en la lectura a las 24h.

| Muestra    | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| NYS Patrón | 0,099 | 0,07  | 0,112 | 0,095 | 0,105 | 0,134 | 0,132 | 0,255 | 0,11  | 0,272 | 0,134 | 0,352 |
| NYS-ELI 1  | 2,881 | 2,592 | 2,316 | 1,765 | 0,605 | 0,469 | 0,357 | 0,146 | 0,27  | 0,196 | 0,141 | 0,136 |
| NYS-ELI 2  | 2,877 | 2,604 | 2,34  | 1,783 | 0,646 | 0,519 | 0,285 | 0,167 | 0,277 | 0,297 | 0,158 | 0,15  |
| NYS-ELI 3  | 2,737 | 2,595 | 2,22  | 1,945 | 0,709 | 0,691 | 0,362 | 1,147 | 0,257 | 0,26  | 0,33  | 0,143 |
| NYS-ELI 4  | 2,970 | 2,803 | 2,535 | 2,149 | 1,225 | 0,248 | 0,336 | 0,568 | 0,301 | 0,273 | 0,385 | 0,157 |

| Muestra    | 13    | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    |                     |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------------|
| NYS Patrón | 0,443 | 0,537 | 0,496 | 0,548 | 0,079 | 0,305 | 0,078 | Control de Medio    |
| NYS-ELI 1  | 0,161 | 0,43  | 0,411 | 0,503 | 0,089 | 0,133 | 0,081 | Control de Muestra  |
| NYS-ELI 2  | 0,255 | 0,362 | 0,339 | 0,354 | 0,092 | 0,123 | 0,078 | Inoculo             |
| NYS-ELI 3  | 0,122 | 0,199 | 0,454 | 0,24  | 0,097 | 0,214 | 0,08  | crecimiento fúngico |
| NYS-ELI 4  | 0,136 | 0,115 | 0,243 | 0,317 | 0,099 | 0,123 | 0,082 |                     |

**Tabla 57. Lecturas de absorbancia de las placas Microtiter 48 h después de la siembra.**

La tabla 58 muestra la primera celda donde se ha observado crecimiento fúngico y su correspondiente concentración de Nistatina, por lo que MIC es la celda inmediatamente anterior sin crecimiento fúngico.

| Muestras          | 1ra celda crecida | [NISTATINAµg/ml] | MIC   |
|-------------------|-------------------|------------------|-------|
| <b>NYS Patrón</b> | 5                 | 3.125            | 6,250 |
| <b>NYS-ELI 1</b>  | 9                 | 1,953            | 3,906 |
| <b>NYS-ELI 2</b>  | 9                 | 1,953            | 3,906 |
| <b>NYS-ELI 3</b>  | 9                 | 1,953            | 3,906 |
| <b>NYS-ELI 4</b>  | 9                 | 1,953            | 3,906 |

**Tabla 58. Resultados MICS para A. Fumigatus 48h después de la siembra.**

Cuando se ensayaron las muestras de NYS-ELI contra *A. Fumigatus*, se observó un aumento de la eficacia del fármaco. Los valores MIC de *Aspergillus* fueron de aproximadamente un 40% menor cuando NYS se introdujo dentro de la emulsión en comparación con NYS patrón. En este caso no hubo diferencias entre los diferentes emulsiones, por lo tanto, la proporción de Solutol HS15 no parecen tener una relación directa con la eficacia ELI.

Los valores de MIC obtenidos son difíciles de ser comparados con los resultados reportados por otros autores debido a la varianza de los protocolos, las cepas y medio de cultivo utilizado, lo que podría dar lugar a las diferencias en los valores de MIC. Aun así, la potenciación de la actividad antifúngica del NYS cuando se vehiculizó en una formulación a base de lípidos, en comparación con NYS patrón, se había informado anteriormente por otros investigadores<sup>17,89,116</sup>, lo que confirma la necesidad de formular NYS en el sistema a base de lípidos con el fin de mejorar su eficacia y probablemente reducir los efectos adversos. Este enfoque podría ser también aceptable para otro fármaco con baja solubilidad de agua.

### **7.9.3. RESULTADOS DEL ENSAYO DE EFICACIA DE LAS FORMULACIONES NYS-ELI**

El ensayo de eficacia permite evaluar la acción antifúngica de las diferentes formulaciones NYS-ELI frente a *Candida Albicans* y *Aspergillus fumigatus* en función del tiempo. Este ensayo permite tener una visión más amplia del alcance de la formulación siendo un resultado orientativo de lo que se podría esperar in vivo.

#### **7.9.3.1. Resultados del ensayo de eficacia para *Candida Albicans* ATCC 10231**

Se realizó un cultivo en placa de la cepa de *C. Albicans*, de la cual se obtuvo un inóculo con una carga microbiana de 2 en la escala de McFarland descrito en la sección 6.5.3.3.1. Este inóculo se mezcló con 1ml de cada una de las formulaciones a ensayar y se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en el medio de cultivo SDA en placa, por triplicado (sección 6.5.3.3.2). Las placas se incubaron a 37°C en presencia de

oxígeno. Las lecturas se realizaron a tiempo cero, a 2, 4 y 24h en una cámara de Neubauer.

Las tablas 59 a la 62 muestra el recuento de colonias presentes en el ensayo durante el tiempo de exposición de la levadura a las distintas formulaciones con Nistatina.

#### 7.9.3.1.1. Resultados de la formulación NYS-ELI 1 contra *C. Albicans*

| Diluciones       | µg/ml Nys | TIEMPO DE CONTACTO LEVADURA- NYS-ELI 1 |      |      |       |
|------------------|-----------|----------------------------------------|------|------|-------|
|                  |           | t 0h                                   | t 2h | t 4h | t 24h |
| Sin diluir       | 1000      | NC                                     | NC   | NC   | NC    |
| 10 <sup>-1</sup> | 100       | NC                                     | NC   | NC   | NC    |
| 10 <sup>-2</sup> | 10        | NC                                     | NC   | NC   | NC    |
| 10 <sup>-3</sup> | 1         | CC                                     | NC   | NC   | NC    |
| 10 <sup>-4</sup> | 0,1       | CC                                     | NC   | NC   | NC    |

Tabla 59. Recuento de *C. Albicans* expuestas a NYS-ELI 1. NC: no crece; CC: Crecimiento.

#### 7.9.3.1.2. Resultados de la formulación NYS-ELI 2 contra *C. Albicans*

| Diluciones       | TIEMPO DE CONTACTO LEVADURA- NYS-ELI 2 |      |      |       |
|------------------|----------------------------------------|------|------|-------|
|                  | t 0h                                   | t 2h | t 4h | t 24h |
| Sin diluir       | NC                                     | NC   | NC   | NC    |
| 10 <sup>-1</sup> | NC                                     | NC   | NC   | NC    |
| 10 <sup>-2</sup> | CC                                     | NC   | NC   | NC    |
| 10 <sup>-3</sup> | CC                                     | NC   | NC   | NC    |
| 10 <sup>-4</sup> | CC                                     | NC   | NC   | NC    |

Tabla 60. Recuento de *C. Albicans* expuestas a NYS-ELI 2 NC: no crece; CC: Crecimiento.

#### 7.9.3.1.3. Resultados de la formulación NYS-ELI 3 contra *C. Albicans*

| Diluciones       | TIEMPO DE CONTACTO LEVADURA- NYS-ELI 3 |      |      |       |
|------------------|----------------------------------------|------|------|-------|
|                  | t 0h                                   | t 2h | t 4h | t 24h |
| Sin diluir       | NC                                     | NC   | NC   | NC    |
| 10 <sup>-1</sup> | NC                                     | NC   | NC   | NC    |
| 10 <sup>-2</sup> | CC                                     | NC   | NC   | NC    |
| 10 <sup>-3</sup> | CC                                     | NC   | NC   | NC    |
| 10 <sup>-4</sup> | CC                                     | NC   | NC   | NC    |

Tabla 61. Recuento de *C. Albicans* expuestas a NYS-ELI 3. NC: no crece; CC: Crecimiento.

#### 7.9.3.1.4. Resultados de la formulación NYS-ELI 4 contra *C. Albicans*

| Diluciones       | TIEMPO DE CONTACTO LEVADURA- NYS-ELI 4 |      |      |       |
|------------------|----------------------------------------|------|------|-------|
|                  | t 0h                                   | t 2h | t 4h | t 24h |
| Sin diluir       | NC                                     | NC   | NC   | NC    |
| 10 <sup>-1</sup> | NC                                     | NC   | NC   | NC    |
| 10 <sup>-2</sup> | CC                                     | NC   | NC   | NC    |
| 10 <sup>-3</sup> | CC                                     | NC   | NC   | NC    |
| 10 <sup>-4</sup> | CC                                     | NC   | NC   | NC    |

**Tabla 62. Recuento de *C. Albicans* expuestas a NYS-ELI 4. NC: no crece; CC: Crecimiento.**

A tiempo cero, el crecimiento de la levadura puede contarse perfectamente y corresponde a la carga inicial introducida. Se observa que, la concentración de Nistatina de la formulación sin diluir y la dilución 10<sup>-1</sup>, es suficiente para inhibir totalmente el desarrollo de la levadura. Mientras que las demás diluciones presentan formaciones de colonias que van en aumento a medida que la muestra es más diluida.

A partir de 2h de contacto de la levadura con las diferentes formulaciones de Nistatina, la carga microbiana introducida queda totalmente eliminada, independientemente de la dilución. Esto implica que, la concentración más baja de la formulación de Nistatina ensayada, que en este caso es 0,1µg/ml es suficiente para eliminar la totalidad de la carga fúngica presente en el ensayo y que solo requiere dos horas para ello. Demostrando tener un efecto fungicida con una buena eficacia pues no se observó crecimiento alguno durante el tiempo restante del ensayo.

Aunque los dos ensayos microbiológicos utilizados en este estudio para determinar la eficacia de las formulaciones de Nistatinas elaboradas frente a *Candida Albicans* no son comparables entre sí, este resultado está en congruencia con el expresado en la sección 7.8.1.2 donde se expresa que los resultados de MIC oscilan entre 0,24 y 0,38 µg/ml para estas mismas formulaciones.

### 7.9.3.2. Resultados del ensayo de eficacia para *Aspergillus Fumigatus* ATCC 9197

Se realizó un cultivo en placa de la cepa de *A. Fumigatus*, de la cual se obtuvo un inóculo con una carga microbiana de 2 en la escala de McFarland descrito en la sección 6.5.3.4.1. Este inóculo se mezcló con 1ml de cada una de las formulaciones a ensayar y se realizaron dos diluciones que se sembraron individualmente en placas de Petri con el medio de cultivo SDA, por duplicado (sección 6.5.3.4.2). Las placas se incubaron a 30°C en presencia de oxígeno. Las lecturas se realizaron a tiempo cero, a 3, 24 y 48h en una cámara de Neubauer.

#### 7.9.3.2.1. Resultados de la formulación NYS-ELI 1 contra *A. Fumigatus*.

|                  |           | Tiempo de contacto hongo- NYS-ELI 1 |      |       |       |
|------------------|-----------|-------------------------------------|------|-------|-------|
| Diluciones       | µg/ml Nys | t 0h                                | t 3h | t 24h | t 48h |
| Sin diluir       | 1000      | NC                                  | NC   | NC    | NC    |
| 10 <sup>-1</sup> | 100       | NC                                  | NC   | NC    | CC    |
| 10 <sup>-2</sup> | 10        | NC                                  | NC   | NC    | CC    |

Tabla 63. Recuento de *A. Fumigatus* expuestas a NYS-ELI 1. NC: no crece; CC: Crecimiento.

#### 7.9.3.2.2. Resultados de la formulación NYS-ELI 2 contra *A. Fumigatus*.

|                  |  | Tiempo de contacto hongo- NYS-ELI 2 |      |       |       |
|------------------|--|-------------------------------------|------|-------|-------|
| Diluciones       |  | t 0h                                | t 3h | t 24h | t 48h |
| Sin diluir       |  | NC                                  | NC   | NC    | NC    |
| 10 <sup>-1</sup> |  | NC                                  | NC   | NC    | CC    |
| 10 <sup>-2</sup> |  | NC                                  | NC   | NC    | CC    |

Tabla 64. Recuento de *A. Fumigatus* expuestas a NYS-ELI 2. NC: no crece; CC: Crecimiento.

#### 7.9.3.2.3. Resultados de la formulación NYS-ELI 3 contra *A. Fumigatus*.

|                  |  | Tiempo de contacto hongo- NYS-ELI 3 |      |       |       |
|------------------|--|-------------------------------------|------|-------|-------|
| Diluciones       |  | t 0h                                | t 3h | t 24h | t 48h |
| Sin diluir       |  | NC                                  | NC   | NC    | NC    |
| 10 <sup>-1</sup> |  | NC                                  | NC   | NC    | CC    |
| 10 <sup>-2</sup> |  | NC                                  | NC   | NC    | CC    |

Tabla 65. Recuento de *A. Fumigatus* expuestas a NYS-ELI 3. NC: no crece; CC: Crecimiento.

#### 7.9.3.2.4. Resultados de la formulación NYS-ELI 4 contra *A. Fumigatus*.

| Diluciones       | Tiempo de contacto hongo- NYS-ELI 4 |      |       |       |
|------------------|-------------------------------------|------|-------|-------|
|                  | t 0h                                | t 3h | t 24h | t 48h |
| Sin diluir       | NC                                  | NC   | NC    | NC    |
| 10 <sup>-1</sup> | NC                                  | NC   | NC    | CC    |
| 10 <sup>-2</sup> | NC                                  | NC   | NC    | CC    |

Tabla 66. Recuento de *A. Fumigatus* expuestas a NYS-ELI 4. NC: no crece; CC: Crecimiento.

#### 7.9.3.2.5. Resultados de la Nistatina Patrón contra *A. Fumigatus*.

| Diluciones       | µg/ml NYS | Tiempo de contacto hongo- Nistatina Patrón |      |       |       |
|------------------|-----------|--------------------------------------------|------|-------|-------|
|                  |           | t 0h                                       | t 3h | t 24h | t 48h |
| Sin diluir       | 1600      | NC                                         | NC   | NC    | NC    |
| 10 <sup>-1</sup> | 160       | NC                                         | NC   | NC    | NC    |
| 10 <sup>-2</sup> | 60        | NC                                         | NC   | NC    | NC    |

Tabla 67. Recuento de colonias de *A. Fumigatus* expuesta a Nistatina patrón. NC: no crece.

Las tablas 63 a la 67 muestra el recuento de colonias presentes en el ensayo durante el tiempo de exposición del hongo a las distintas formulaciones con Nistatina y a la Nistatina patrón. En las primeras 24 horas de cultivo, no se observa crecimiento en ninguna de las placas estudiadas.

A partir de las 48h se observó que, la concentración de Nistatina de las formulaciones sin diluir, era suficiente para inhibir totalmente el desarrollo del hongo. Por lo que se puede decir que estas formulaciones NYS-ELI sin diluir tienen un efecto fungicida.

Mientras que las muestras diluidas de cada formulación presentaron formaciones de colonias a las 48h de sembradas, se observó que el crecimiento de estas colonias no era homogéneo a lo largo de la superficie de las placas de Petri, o bien se concentraba en el centro o bien crecía en el contorno de la placa. Además se distinguió un crecimiento anómalo, pues las colonias aparecían defectuosas y sin pigmentación. Es evidente que el antifúngico tuvo un efecto inhibitor, aunque no el suficiente, por lo

que el hongo ha crecido en la zona de la placa donde la concentración del antifúngico ha quedado más baja.

En cuanto a la Nistatina patrón se observa una inhibición total durante las 48 horas de lectura, tanto de la solución inicial como de sus diluciones. En parte se debe, a que la concentración de esta solución patrón era mayor (1600µg/ml NYS), que las ensayadas en las formulaciones NYS-ELI. Esto sugiere que entre 1000 y 1600 µg/ml estaría la dosis adecuada para un hongo como *Aspergillus*.

# CONCLUSIONES

---

## 8. Conclusiones

---

1. El sistema de circuito cerrado diseñado permitió elaborar lotes de 250ml ELI para su administración por vía parenteral a través de la técnica de ultrasonido como única fuente de energía para la emulsificación y homogenización del sistema, obteniéndose resultados satisfactorios desde el punto de vista de estabilidad fisicoquímica de las emulsiones obtenidas.
2. Se optimizaron las condiciones de fabricación de ELI, mediante un diseño multifactorial, teniendo en cuenta los parámetros críticos tales como tiempo de sonicación, potencia de sonicación y neutralización durante la elaboración. Estas emulsiones no necesitan refrigerarse y resisten perfectamente el proceso de esterilización por autoclavado, algo importante en preparados para uso parenteral.
3. La neutralización de los ácidos grasos libres procedentes de los triglicéridos del aceite de soja durante la elaboración de las emulsiones, permitió mejorar en gran medida la estabilidad física de estos preparados, pasando de 5 semanas en las condiciones preliminares a 12 meses en el estudio de optimización. La emulsión se seleccionó por presentar los mejores parámetros fisicoquímicos. (Zave:  $229 \pm 1$ nm; PI:  $173 \pm 4$ ; LD<sub>99</sub>:  $639 \pm 6$ nm; pH:  $7,5 \pm 0,3$  y PZ:  $-45 \pm 2$  mV)
4. Eli obtenida a pequeña escala en este estudio es equivalente desde el punto fisicoquímico y de estabilidad al preparado comercial Intralipid® 20% elaborado a escala industrial.
5. Se obtiene una emulsión lipídica inyectable de 1mg/ml de Nistatina ( $98 \pm 1,5\%$  de riqueza). Este principio activo es poco soluble en medio acuoso y hasta el momento no se había utilizado por vía intravenosa debido a su agregación y toxicidad, pero puede ser muy útil en el tratamiento parenteral de infecciones

fúngicas invasivas. La incorporación del NYS en la emulsión O/A se logró con la adición de Solutol<sup>®</sup> HS 15 al 4% y un 30% de fase oleosa en el vehículo de emulsión. Este preparado es estable durante 30 días, con un tamaño de gota y una polidispersidad inferior al vehículo sin fármaco.

6. El registro fotográfico de NYS-ELI, obtenido a través de microscopía electrónica de Barrido (SEM), 30 días después de su elaboración, muestra una morfología regular y bien definida, así como, una distribución y tamaño medio de gota submicrométricos corroborando los resultados del estudios de estabilidad.
7. El perfil de liberación de la Nistatina en la formulación seleccionada, sigue un mecanismo de liberación controlado por difusión descrito por la ecuación clásica de Higuchi, con un valor de pendiente  $K_h$  de  $1,59\%/h^{1/2}$ .
8. Los estudios de eficacia microbiológica *in vitro* muestran que la incorporación del NYS en la formulación a base de emulsión lipídica mejora la eficacia antifúngica, por la reducción del valor de MIC en *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* en comparación con el fármaco libre.
9. Esta formulación de Nistatina tiene un perfil tecnológico y biofarmacéutico adecuado para su administración por vía parenteral, al ser un sistema de dosificación de NYS eficiente y de bajo costo, que se puede preparar en servicios de farmacia hospitalaria para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas.

# BIBLIOGRAFÍA

---

# BIBLIOGRAFIA

---

1. Driscoll DF, Ling P-R, Bistran BR. Physical stability of 20% lipid injectable emulsions via simulated syringe infusion: effects of glass vs plastic product packaging. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2007 Apr;31(2):148–53.
2. Pranker RJ, Stella VJ. The use of oil-in-water emulsions as a vehicle for parenteral drug administration. *J Parenter Sci Technol Publ Parenter Drug Assoc.* 1990 Jun;44(3):139–49.
3. Turner-Lawrence DE, Kerns li W. Intravenous fat emulsion: a potential novel antidote. *J Med Toxicol Off J Am Coll Med Toxicol.* 2008 Jun;4(2):109–14.
4. Su M, Zhao M, Luo Y, Lin X, Xu L, He H, et al. Evaluation of the efficacy, toxicity and safety of vinorelbine incorporated in a lipid emulsion. *Int J Pharm.* 2011 Jun 15;411(1-2):188–96.
5. Semis R, Nili SS, Munitz A, Zaslavsky Z, Polacheck I, Segal E. Pharmacokinetics, tissue distribution and immunomodulatory effect of intralipid formulation of nystatin in mice. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Jul;67(7):1716–21.
6. Vahabzadeh M, Moshiri M, Mohammadpour AH, Hosseinzadeh H. Promising Effects of Intravenous Lipid Emulsion as an Antidote in Acute Tramadol Poisoning. *Reg Anesth Pain Med.* 2013 Aug 8;
7. Bartos M, Knudsen K. Use of intravenous lipid emulsion in the resuscitation of a patient with cardiovascular collapse after a severe overdose of quetiapine. *Clin Toxicol Phila Pa.* 2013 Jul;51(6):501–4.
8. Christian MR, Pallasch EM, Wahl M, Mycyk MB. Lipid Rescue 911: Are Poison Centers Recommending Intravenous Fat Emulsion Therapy for Severe Poisoning? *J Med Toxicol Off J Am Coll Med Toxicol.* 2013 May 10;
9. Gil H-W, Park J-S, Park S-H, Hong S-Y. Effect of intravenous lipid emulsion in patients with acute glyphosate intoxication. *Clin Toxicol Phila Pa.* 2013 Jul 19;
10. Shi S, Chen H, Lin X, Tang X. Pharmacokinetics, tissue distribution and safety of cinnarizine delivered in lipid emulsion. *Int J Pharm.* 2010 Enero;383(1–2):264–70.
11. Han J, Davis SS, Washington C. Physical properties and stability of two emulsion formulations of propofol. *Int J Pharm.* 2001 Mar 14;215(1-2):207–20.
12. Medina J, Salvadó A, del Pozo A. Use of ultrasound to prepare lipid emulsions of lorazepam for intravenous injection. *Int J Pharm.* 2001 Mar 23;216(1-2):1–8.

13. Zhao Y-X, Liu D-X, Liang W-Q, Ye Z-W. In-vivo pharmacokinetics, tissue distribution and anti-tumour effect of hydroxycamptothecin delivered in oil-in-water submicron emulsions. *J Pharm Pharmacol*. 2012 Jun;64(6):783–91.
14. Calder PC, Jensen GL, Koletzko BV, Singer P, Wanten GJA. Lipid emulsions in parenteral nutrition of intensive care patients: current thinking and future directions. *Intensive Care Med*. 2010 May;36(5):735–49.
15. Braga M, Ljungqvist O, Soeters P, Fearon K, Weimann A, Bozzetti F, et al. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: surgery. *Clin Nutr Edinb Scotl*. 2009 Aug;28(4):378–86.
16. Hippalgaonkar K, Majumdar S, Kansara V. Injectable lipid emulsions-advancements, opportunities and challenges. *AAPS PharmSciTech*. 2010 Dec;11(4):1526–40.
17. Semis R, Polacheck I, Segal E. Nystatin-intralipid preparation: characterization and in vitro activity against yeasts and molds. *Mycopathologia*. 2010 May;169(5):333–41.
18. Globule Size Distribution in Lipid Injectable Emulsions. (Chapter <729>). Proposed chapter. In-process revision. *Pharm. Forum*. 2005; 31:1448-1453.;
19. Driscoll DF. Lipid injectable emulsions: Pharmacopeial and safety issues. *Pharm Res*. 2006 Sep;23(9):1959–69.
20. Wirtitsch M, Wessner B, Spittler A, Roth E, Volk T, Bachmann L, et al. Effect of different lipid emulsions on the immunological function in humans: a systematic review with meta-analysis. *Clin Nutr Edinb Scotl*. 2007 Jun;26(3):302–13.
21. Waitzberg DL, Torrinhas RS, Jacintho TM. New parenteral lipid emulsions for clinical use. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2006 Aug;30(4):351–67.
22. MacFie J. The development of fat emulsions. *Nutr Burbank Los Angeles Cty Calif*. 1999 Aug;15(7-8):641, 643–5.
23. Adolph M, Heller AR, Koch T, Koletzko B, Kreymann KG, Krohn K, et al. Lipid emulsions - Guidelines on Parenteral Nutrition, Chapter 6. *Ger Med Sci GMS E-J*. 2009;7:Doc22.
24. Singer P, Berger MM, Van den Berghe G, Biolo G, Calder P, Forbes A, et al. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: intensive care. *Clin Nutr Edinb Scotl*. 2009 Aug;28(4):387–400.
25. Wanten GJA, Calder PC. Immune modulation by parenteral lipid emulsions. *Am J Clin Nutr*. 2007 May;85(5):1171–84.

26. Kruijmel JW, Naber TH, van der Vliet JA, Carneheim C, Katan MB, Jansen JB. Parenteral structured triglyceride emulsion improves nitrogen balance and is cleared faster from the blood in moderately catabolic patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2001 Oct;25(5):237–44.
27. Jiang ZM, Zhang SY, Wang XR, Yang NF, Zhu Y, Wilmore D. A comparison of medium-chain and long-chain triglycerides in surgical patients. *Ann Surg.* 1993 Feb;217(2):175–84.
28. Dennison AR, Ball M, Crowe PJ, White K, Hands L, Watkins RM, et al. The metabolic consequences of infusing emulsions containing medium chain triglycerides for parenteral nutrition: a comparative study with conventional lipid. *Ann R Coll Surg Engl.* 1986 May;68(3):119–21.
29. Chambrier C, Lauverjat M, Bouletreau P. Structured triglyceride emulsions in parenteral nutrition. *Nutr Clin Pr Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr.* 2006 Aug;21(4):342–50.
30. Piper SN, Röhm KD, Boldt J, Odermatt B, Maleck WH, Suttner SW. Hepatocellular integrity in patients requiring parenteral nutrition: comparison of structured MCT/LCT vs. a standard MCT/LCT emulsion and a LCT emulsion. *Eur J Anaesthesiol.* 2008 Jul;25(7):557–65.
31. Zhou Y, Wu X-T, Li N, Zhuang W, Liu G, Wu T, et al. Structured triglyceride for parenteral nutrition: meta-analysis of randomized controlled trials. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2006;15(3):406–11.
32. Sala-Vila A, Barbosa VM, Calder PC. Olive oil in parenteral nutrition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007 Mar;10(2):165–74.
33. Garcia-de-Lorenzo A. Monounsaturated fatty acid-based lipid emulsions in critically ill patients are associated with fewer complications. *Br J Nutr.* 2006 May;95(5):1029.
34. Pontes-Arruda A, Dos Santos MCFC, Martins LF, González ERR, Kliger RG, Maia M, et al. Influence of parenteral nutrition delivery system on the development of bloodstream infections in critically ill patients: an international, multicenter, prospective, open-label, controlled study--EPICOS study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2012 Sep;36(5):574–86.
35. Waitzberg DL, Torrinhas RS. Fish oil lipid emulsions and immune response: what clinicians need to know. *Nutr Clin Pr Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr.* 2009 Sep;24(4):487–99.
36. Grimble R. Fatty acid profile of modern lipid emulsions: Scientific considerations for creating the ideal composition. *Clin Nutr Suppl.* 2005;1(3):9–15.

37. Fritsche K. Fatty acids as modulators of the immune response. *Annu Rev Nutr.* 2006;26:45–73.
38. Wei C, Hua J, Bin C, Klassen K. Impact of lipid emulsion containing fish oil on outcomes of surgical patients: systematic review of randomized controlled trials from Europe and Asia. *Nutr Burbank Los Angeles Cty Calif.* 2010 May;26(5):474–81.
39. Heller AR, Rössler S, Litz RJ, Stehr SN, Heller SC, Koch R, et al. Omega-3 fatty acids improve the diagnosis-related clinical outcome. *Crit Care Med.* 2006 Apr;34(4):972–9.
40. Meijer VE de, Gura KM, Le HD, Meisel JA, Puder M. Fish Oil–Based Lipid Emulsions Prevent and Reverse Parenteral Nutrition–Associated Liver Disease: The Boston Experience. *J Parenter Enter Nutr.* 2009 Sep 1;33(5):541–7.
41. Manzoni Jacintho T, Gotho H, Gidlund M, García Marques C, Torrinhas R, Mirtes Sales M, et al. Anti-inflammatory effect of parenteral fish oil lipid emulsion on human activated mononuclear leukocytes. *Nutr Hosp.* 2009 Jun;24(3):288–96.
42. Barbosa VM, Miles EA, Calhau C, Lafuente E, Calder PC. Effects of a fish oil containing lipid emulsion on plasma phospholipid fatty acids, inflammatory markers, and clinical outcomes in septic patients: a randomized, controlled clinical trial. *Crit Care Lond Engl.* 2010;14(1):R5.
43. Dent DL. Still searching for the magic food. *Crit Care Med.* 2007 Mar;35(3):951.
44. Wichmann MW, Thul P, Czarnetzki H-D, Morlion BJ, Kemen M, Jauch K-W. Evaluation of clinical safety and beneficial effects of a fish oil containing lipid emulsion (Lipoplus, MLF541): data from a prospective, randomized, multicenter trial. *Crit Care Med.* 2007 Mar;35(3):700–6.
45. Grimm H. A balanced lipid emulsion—A new concept in parenteral nutrition. *Clin Nutr Suppl.* 2005;1(3):25–30.
46. Us Pharmacopeial Convention Usp. USP 36/NF 31, General Requirements / Injections. 1833-1835: U.S. PHARMACOPEIAL CONV.; 2012.
47. European Pharmacopoeia. 7th ed. Strasbourg, France: Council of Europe.; 2013.
48. Us Pharmacopeial Convention Usp. USP 36/NF 31, Official Monographs: Lecithin. 2781: U.S. PHARMACOPEIAL CONV.; 2012.
49. Yamaguchi T, Nishizaki K, Itai S, Hayashi H, Ohshima H. Physicochemical characterization of parenteral lipid emulsion: influence of cosurfactants on flocculation and coalescence. *Pharm Res.* 1995 Sep;12(9):1273–8.

50. Wei L, Li G, Yan Y-D, Pradhan R, Kim JO, Quan Q. Lipid emulsion as a drug delivery system for breviscapine: formulation development and optimization. *Arch Pharm Res.* 2012 Jun;35(6):1037–43.
51. Jumaa M, Müller BW. Parenteral emulsions stabilized with a mixture of phospholipids and PEG-660-12-hydroxy-stearate: evaluation of accelerated and long-term stability. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV.* 2002 Sep;54(2):207–12.
52. Bravo González RC, Huwyler J, Boess F, Walter I, Bittner B. In vitro investigation on the impact of the surface-active excipients Cremophor EL, Tween 80 and Solutol HS 15 on the metabolism of midazolam. *Biopharm Drug Dispos.* 2004 Jan;25(1):37–49.
53. Uchegbu IF. Parenteral drug delivery: 2. *Pharm J.* 1999 Sep 4;263(7061):355–60.
54. Kolliphor® P 188 Sigma-Aldrich Prod. Cat.  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/15759?lang=es&region=ES>
55. Kolliphor® HS 15 [http://aurora-pharma.com/en/products\\_catalogue/excipients/emulsifiers\\_solubilizers/kolliphor\\_hs\\_15.htm](http://aurora-pharma.com/en/products_catalogue/excipients/emulsifiers_solubilizers/kolliphor_hs_15.htm)
56. Wade A, Weller, Paul. Handbook of pharmaceutical excipients: Polyoxyethylene Sorbitan Fatty Acid Esters. Third. Washington, D.C.: American Pharmaceutical Association; 2000.
57. Tween 80 by LC-MS <http://www.wcaslab.com/tech/Tween80.htm>
58. Sweetman S. Martindale: the complete drug reference. London: Pharmaceutical Press; 2006.
59. Benita S, Levy MY. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. *J Pharm Sci.* 1993 Nov;82(11):1069–79.
60. Surh J, Vladislavljevi Cacute GT, Mun S, McClements DJ. Preparation and characterization of water/oil and water/oil/water emulsions containing biopolymer-gelled water droplets. *J Agric Food Chem.* 2007 Jan 10;55(1):175–84.
61. Homogenizing valve - Wikipedia, the free encyclopedia [Internet]. Available from: [http://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Homogenizing\\_valve.svg](http://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Homogenizing_valve.svg)
62. Kawaguchi E, Shimokawa K, Ishii F. Physicochemical properties of structured phosphatidylcholine in drug carrier lipid emulsions for drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2008 Mar 15;62(1):130–5.

63. Maan AA, Schroën K, Boom R. Spontaneous droplet formation techniques for monodisperse emulsions preparation – Perspectives for food applications. *J Food Eng.* 2011 Dec;107(3–4):334–46.
64. Lidgate D FR, Fleitman J. Using a microfluidizer to manufacture parenteral emulsions. *Pharm Technol.* 1990;30–3.
65. PharmTech. [http://www.pharmtech.ru/eng\\_microfluidics.htm](http://www.pharmtech.ru/eng_microfluidics.htm)
66. Jill M, Kirsten E. Ultrasonic preparation of pharmaceutical emulsions. Droplet size measurements by quasi-elastic light scattering. *Int J Pharma.* 1984;19:48–52.
67. Salager J-L, Forgiarini A, Márquez L, Peña A, Pizzino A, Rodriguez MP, et al. Using emulsion inversion in industrial processes. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004 May 20;108-109:259–72.
68. Sagitani, H, S.E. Friberg, Lindman, B. Phase-Inversion and D-Phase Emulsification, en: “Organized Solutions.” New York: Editores, Marcel Dekker; 1992.
69. Salager J-L. Emulsion Phase Inversion Phenomena. In: Sjøvoldblom J, editor. *Emuls Emuls Stab.* CRC Press; 2005. p. 185–226.
70. Márquez R, Bullón J, Márquez L, Cárdenas A, Briceño MI, Forgiarini A. Rheological Changes of Parenteral Emulsions During Phase-Inversion Emulsification. *J Dispers Sci Technol.* 2008;29(4):621–7.
71. Shinoda K, Saito H. The effect of temperature on the phase equilibria and the types of dispersions of the ternary system composed of water, cyclohexane, and nonionic surfactant. *J Colloid Interface Sci.* 1968 Jan;26(1):70–4.
72. Solans C, Solé I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2012 Oct;17(5):246–54.
73. Jahanzad F, Crombie G, Innes R, Sajjadi S. Catastrophic phase inversion via formation of multiple emulsions: A prerequisite for formation of fine emulsions. *Chem Eng Res Des.* 2009 Apr;87(4):492–8.
74. Saw LK, Brooks BW, Carpenter KJ, Keight DV. Catastrophic phase inversion in region II of an ionomeric polymer-water system. *J Colloid Interface Sci.* 2004 Nov 1;279(1):235–43.
75. Rondon-Gonzalez M, Sadtler V, Marchal P, Choplin L, Salager J-L. Emulsion Catastrophic Inversion from Abnormal to Normal Morphology. 7. Emulsion Evolution Produced by Continuous Stirring To Generate a Very High Internal Phase Ratio Emulsion. *Ind Eng Chem Res.* 2008 Apr 1;47(7):2314–9.

76. Thakur RK, Villette C, Aubry JM, Delaplace G. Dynamic emulsification and catastrophic phase inversion of lecithin-based emulsions. *Colloids Surfaces Physicochem Eng Asp.* 2008 Feb 15;315(1–3):285–93.
77. Dunstan TS, Fletcher PDI, Mashinchi S. High Internal Phase Emulsions: Catastrophic Phase Inversion, Stability, and Triggered Destabilization. *Langmuir.* 2012 Jan 10;28(1):339–49.
78. Salager JL, Miñana-Pérez M, Pérez-Sánchez M, Ramfrez-Gouveia M, Rojas CI. SORFACTANT-OIL-WATER SYSTEMS NEAR THE AFFINITY INVERSION Part III: THE TWO KINDS OF EMULSION INVERSION. *J Dispers Sci Technol.* 1983;4(3):313–29.
79. Saw LK, Brooks BW, Carpenter KJ, Keight DV. Different dispersion regions during the phase inversion of an ionomeric polymer-water system. *J Colloid Interface Sci.* 2003 Jan 1;257(1):163–72.
80. Ostertag F, Weiss J, McClements DJ. Low-energy formation of edible nanoemulsions: factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *J Colloid Interface Sci.* 2012 Dec 15;388(1):95–102.
81. Volpon L, Lancelin J-M. Solution NMR structure of five representative glycosylated polyene macrolide antibiotics with a sterol-dependent antifungal activity. *Eur J Biochem FEBS.* 2002 Sep;269(18):4533–41.
82. Espinel-Ingroff A. *Medical Mycology and Training in the United States: A Historical Analysis (1894-1996).* Springer; 2003.
83. Elizabeth Lee Hazen and Rachel Fuller Brown | Chemical Heritage Foundation [Internet]. Available from: <http://www.chemheritage.org/discover/online-resources/chemistry-in-history/themes/pharmaceuticals/preventing-and-treating-infectious-diseases/hazen-and-brown.aspx>
84. EGEBERG RO, GRAHAM JH, NEWCOMER VD, STERNBERG TH, WIER RH, WRIGHT ET. Evaluation of nystatin in the treatment of coccidioidomycosis in man; a preliminary report. *Antibiot Annu.* 1955 1956;3:831–6.
85. Schäfer-Korting M, Blechschmidt J, Korting HC. Clinical use of oral nystatin in the prevention of systemic candidosis in patients at particular risk. *Mycoses.* 1996 Oct;39(9-10):329–39.
86. Oehling A, Giron M, Subira ML. Aerosol chemotherapy in bronchopulmonary candidiasis. *Respir Int Rev Thorac Dis.* 1975;32(2):179–84.
87. Sinclair AJ, Rossof AH, Coltman CA Jr. Recognition and successful management in pulmonary aspergillosis in leukemia. *Cancer.* 1978 Oct;42(4):2019–24.

88. Than KM, Naing KS, Min M. Otomycosis in Burma, and its treatment. *Am J Trop Med Hyg.* 1980 Jul;29(4):620–3.
89. 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.
90. Croy SR, Kwon GS. The effects of Pluronic block copolymers on the aggregation state of nystatin. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2004 Mar 5;95(2):161–71.
91. Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontol Soc Nippon Dent Univ.* 2010 Feb;98(1):15–25.
92. Kaur IP, Kakkar S. Topical delivery of antifungal agents. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010 Nov;7(11):1303–27.
93. Sakeer K, Al-Zein H, Hassan I, Desai S, Nokhodchi A. Enhancement of dissolution of nystatin from buccoadhesive tablets containing various surfactants and a solid dispersion formulation. *Arch Pharm Res.* 2010 Nov;33(11):1771–9.
94. Hombach J, Palmberger TF, Bernkop-Schnürch A. Development and in vitro evaluation of a mucoadhesive vaginal delivery system for nystatin. *J Pharm Sci.* 2009 Feb;98(2):555–64.
95. Groll AH, Mickiene D, Werner K, Petraitiene R, Petraitis V, Calendario M, et al. Compartmental pharmacokinetics and tissue distribution of multilamellar liposomal nystatin in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Apr;44(4):950–7.
96. Groll AH, Mickiene D, Petraitis V, Petraitiene R, Alfaro RM, King C, et al. Comparative drug disposition, urinary pharmacokinetics, and renal effects of multilamellar liposomal nystatin and amphotericin B deoxycholate in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Dec;47(12):3917–25.
97. Woo KY, Sibbald RG, Ayello EA, Coutts PM, Garde DE. Peristomal skin complications and management. *Adv Skin Wound Care.* 2009 Nov;22(11):522–532; quiz 533–534.
98. Ellepola AN, Samaranayake LP. The in vitro post-antifungal effect of nystatin on *Candida* species of oral origin. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol.* 1999 Mar;28(3):112–6.
99. Ellepola AN, Panagoda GJ, Samaranayake LP. Adhesion of oral *Candida* species to human buccal epithelial cells following brief exposure to nystatin. *Oral Microbiol Immunol.* 1999 Dec;14(6):358–63.

100. Wu T, Samaranayake LP, Cao BY, Wang J. In-vitro proteinase production by oral *Candida albicans* isolates from individuals with and without HIV infection and its attenuation by antimycotic agents. *J Med Microbiol.* 1996 Apr;44(4):311–6.
101. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. AEMPS - Centro de Información online de Medicamentos de la AEMPS (CIMA) [Internet]. Inf. Prospect. Nistatina. 2012. Available from: 123. <http://www.aemps.gob.es/cima/especialidad.do?metodo=verFichaWordPdf&codigo=28262&formato=pdf&formulario=FICHAS&file=ficha.pdf>
102. Manzoni P, Galletto P, Rizzollo S, Franco C, Gallo E, Antonucci R, et al. Liposomal amphotericin B does not induce nephrotoxicity or renal function impairment in premature neonates. *Early Hum Dev.* 2012 May;88 Suppl 2:S86–91.
103. NYSTATIN: BNF for Children [Internet]. Available from: [http://www.medicinescomplete.com/mc/bnfc/current/PHP15237-nystatin.htm?q=nystatin&t=search&ss=text&p=3#\\_hit](http://www.medicinescomplete.com/mc/bnfc/current/PHP15237-nystatin.htm?q=nystatin&t=search&ss=text&p=3#_hit)
104. Austin N, Darlow BA, McGuire W. Prophylactic oral/topical non-absorbed antifungal agents to prevent invasive fungal infection in very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;3:CD003478.
105. Nystatin (Topical): AHFS Drug Information [Internet]. Available from: [http://www.medicinescomplete.com/mc/ahfs/current/a382758.htm?q=nystatin&t=search&ss=text&p=1#\\_hit](http://www.medicinescomplete.com/mc/ahfs/current/a382758.htm?q=nystatin&t=search&ss=text&p=1#_hit)
106. Kovac M, Mitic G, Kovac Z. Miconazole and nystatin used as topical antifungal drugs interact equally strongly with warfarin. *J Clin Pharm Ther.* 2012 Feb;37(1):45–8.
107. Us Pharmacopeial Convention Usp. USP 36/NF 31, Official Monographs: Nystatin. 4549-50: U.S. PHARMACOPEIAL CONV.; 2012.
108. Paddock Laboratories, Inc. Nystop® (nystatin) topical powder, USP prescribing information. Minneapolis, MN. May 2003 Bristol-Myers Squibb. Mycostatin® (nystatin) cream, suspension and topical powder prescribing information. Princeton, NJ. April 2006.
109. El-Ridy MS, Abdelbary A, Essam T, Abd EL-Salam RM, Aly Kassem AA. Niosomes as a potential drug delivery system for increasing the efficacy and safety of nystatin. *Drug Dev Ind Pharm.* 2011 Dec;37(12):1491–508.
110. Arikan S, Rex JH. Nystatin LF (Aronex/Abbott). *Curr Opin Investig Drugs Lond Engl* 2000. 2001 Apr;2(4):488–95.

111. Ng AWK, Wasan KM, Lopez-Berestein G. Development of liposomal polyene antibiotics: an historical perspective. *J Pharm Pharm Sci Publ Can Soc Pharm Sci Société Can Sci Pharm*. 2003 Apr;6(1):67–83.
112. Aksungur P, Sungur A, Unal S, Iskit AB, Squier CA, Senel S. Chitosan delivery systems for the treatment of oral mucositis: in vitro and in vivo studies. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2004 Aug 11;98(2):269–79.
113. De Aguiar MMGB, de Albuquerque RP, Marinho DS, Braga BRS, Dornelas CB, Oliveira A, et al. Oral sustained release nystatin tablets for the treatment of oral candidiasis: formulation development and validation of UV spectrophotometric analytical methodology for content determination. *Drug Dev Ind Pharm*. 2010 May;36(5):594–600.
114. Llabot JM, Palma SD, Manzo RH, Allemandi DA. Design of novel antifungal mucoadhesive films. Part II. Formulation and in vitro biopharmaceutical evaluation. *Int J Pharm*. 2007 May 24;336(2):263–8.
115. Sakeer K, Al-Zein H, Hassan I, Martin GP, Nokhodchi A. Use of xanthan and its binary blends with synthetic polymers to design controlled release formulations of buccoadhesive nystatin tablets. *Pharm Dev Technol*. 2010 Aug;15(4):360–8.
116. 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: ultrastructural effects and release studies. *J Pharm Sci*. 2012 Oct;101(10):3739–52.
117. Figueiras A, Hombach J, Veiga F, Bernkop-Schnürch A. In vitro evaluation of natural and methylated cyclodextrins as buccal permeation enhancing system for omeprazole delivery. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV*. 2009 Feb;71(2):339–45.
118. Neofytos D, Horn D, Anaissie E, Steinbach W, Olyaei A, Fishman J, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2009 Feb 1;48(3):265–73.
119. Garcia-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. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2008 Oct 15;47(8):1041–50.
120. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*. 2003 Nov;3(11):685–702.

121. Wenzel RP, Gennings C. Bloodstream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2005 Sep 15;41 Suppl 6:S389–393.
122. Pemán J, Salavert M. General epidemiology of invasive fungal disease. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2012 Feb;30(2):90–8.
123. Garcia-Vidal C, Carratalà J. Patogenia de la infección fúngica invasora. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2012 Mar;30(3):151–8.
124. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2009 Jun 15;48(12):1695–703.
125. Wingard JR, Leather H. A new era of antifungal therapy. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2004 Feb;10(2):73–90.
126. Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4358–66.
127. Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*. 2005 Apr;43(4):1829–35.
128. Picazo JJ, González-Romo F, Candel FJ. Candidemia in the critically ill patient. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Nov;32, Supplement 2:S83–S85.
129. Marr KA, Seidel K, White TC, Bowden RA. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. *J Infect Dis*. 2000 Jan;181(1):309–16.
130. Jordà-Marcos R, Alvarez-Lerma F, Jurado M, Palomar M, Nolla-Salas J, León MA, et al. Risk factors for candidaemia in critically ill patients: a prospective surveillance study. *Mycoses*. 2007 Jul;50(4):302–10.
131. Segal BH. Aspergillosis. *N Engl J Med*. 2009 Apr 30;360(18):1870–84.
132. Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Jul 1;22(3):447–65.
133. Barnes PD, Marr KA. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infect Dis Clin North Am*. 2006 Sep;20(3):545–561, vi.

134. Figueras Nadal C, Díaz de Heredia Rubio C, Navarro Gómez ML, Roselló Mayans E, Álvez González F. Infección fúngica invasiva (IFI): actualización. *Protoc Diagnóstico-Ter AEP Infectología Pediátrica*. Tercera. 2011. p. 135–47.
135. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2008 Jun 15;46(12):1813–21.
136. Siwek GT, Pfaller MA, Polgreen PM, Cobb S, Hoth P, Magalheas-Silverman M, et al. Incidence of invasive aspergillosis among allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients receiving voriconazole prophylaxis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006 Jul;55(3):209–12.
137. Singh N, Avery RK, Munoz P, Pruett TL, Alexander B, Jacobs R, et al. Trends in risk profiles for and mortality associated with invasive aspergillosis among liver transplant recipients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2003 Jan 1;36(1):46–52.
138. Nihtinen A, Anttila V-J, Richardson M, Meri T, Volin L, Ruutu T. The utility of intensified environmental surveillance for pathogenic moulds in a stem cell transplantation ward during construction work to monitor the efficacy of HEPA filtration. *Bone Marrow Transplant*. 2007 Sep;40(5):457–60.
139. Vonberg R-P, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J Hosp Infect*. 2006 Jul;63(3):246–54.
140. Alangaden GJ. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. *Infect Dis Clin North Am*. 2011 Mar;25(1):201–25.
141. Neofytos D, Fishman JA, Horn D, Anaissie E, Chang C-H, Olyaei A, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc*. 2010 Jun;12(3):220–9.
142. Pons V, Greenspan D, Lozada-Nur F, McPhail L, Gallant JE, Tunkel A, et al. Oropharyngeal candidiasis in patients with AIDS: randomized comparison of fluconazole versus nystatin oral suspensions. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1997 Jun;24(6):1204–7.
143. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2004 Aug 1;39(3):309–17.
144. Kauffman CA. Fungal infections. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3(1):35–40.

145. Denning DW, Warn P. Dose Range Evaluation of Liposomal Nystatin and Comparisons with Amphotericin B and Amphotericin B Lipid Complex in Temporarily Neutropenic Mice Infected with an Isolate of *Aspergillus fumigatus* with Reduced Susceptibility to Amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Nov;43(11):2592–9.
146. Johnson EM, Ojwang JO, Szekely A, Wallace TL, Warnock DW. Comparison of In Vitro Antifungal Activities of Free and Liposome-Encapsulated Nystatin with Those of Four Amphotericin B Formulations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Jun;42(6):1412–6.
147. Zager RA. Polyene antibiotics: relative degrees of in vitro cytotoxicity and potential effects on tubule phospholipid and ceramide content. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2000 Aug;36(2):238–49.
148. Asmundsdóttir LR, Erlendsdóttir H, Haraldsson G, Guo H, Xu J, Gottfredsson M. Molecular epidemiology of candidemia: evidence of clusters of smoldering nosocomial infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2008 Jul 15;47(2):e17–24.
149. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998 May;31(1):327–32.
150. Washington C. The stability of intravenous fat emulsions in total parenteral nutrition mixtures. *Int J Pharm.* 1990 Dec 1;66(1–3):1–21.
151. Pharma Ingredients & Services BASF | Solubilizer | Kolliphor® range | Kolliphor® HS 15 [Internet]. Available from: [http://www.pharma-ingredients.basf.com/solubilizer/kolliphor\\_range/kolliphor\\_HS15.aspx](http://www.pharma-ingredients.basf.com/solubilizer/kolliphor_range/kolliphor_HS15.aspx)
152. Instruction Manual Sonifier® model 250/450. Branson Ultrasonic Corporation. EEUU, 1989:1-17.
153. Quality Guidelines : ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability testing of new drug substances and products (Q1A(R2)). [Internet]. Available from: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>
154. Alison G, Sunil S. Inyectable emulsions and suspensions. Pharmaceutical dosage forms: disperse systems. 2ª ed. New York, 261-318: Dekker Inc; 1996.
155. Valls O, Castillo B del, Garcia B del C. Técnicas instrumentales en farmacia y ciencias de la salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco; 2003.

156. Malvern. Particle Size Analysis, Zeta Potential Measurement, Rheology, SEC/GPC [Internet]. Malvern. Available from: <http://www.malvern.com/>
157. Estelrich J, Pons M. La espectroscopia de correlación fotónica y sus aplicaciones. *Ind Farm Equipos Procesos Tecnol.* 1991;(4):81–6.
158. Müller RH, Heinemann S. Fat emulsions for parenteral nutrition. I: Evaluation of microscopic and laser light scattering methods for the determination of the physical stability. *Clin Nutr Edinb Scotl.* 1992 Aug;11(4):223–36.
159. Beckman Coulter, Inc.:  
[https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsrportal.portal?\\_nfpb=true&\\_windowLabel=UCM\\_RENDERER&\\_urlType=render&wlpUCM\\_RENDERER\\_path=%2Fwsr%2Fcountry-selector%2Findex.htm&\\_WRpath=%2Fwsr%2Findex.htm&intBp=true](https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsrportal.portal?_nfpb=true&_windowLabel=UCM_RENDERER&_urlType=render&wlpUCM_RENDERER_path=%2Fwsr%2Fcountry-selector%2Findex.htm&_WRpath=%2Fwsr%2Findex.htm&intBp=true)
160. Washington C. The electrokinetic properties of phospholipid stabilized fat emulsions VI. Zeta potentials of Intralipid 20% in TPN mixtures. *Int J Pharm.* 1992 Nov 10;87(1–3):167–74.
161. Zeta Potential Using Laser Doppler Electrophoresis - Malvern.com  
[http://www.malvern.com/labeng/technology/zeta\\_potential/zeta\\_potential\\_idem.htm](http://www.malvern.com/labeng/technology/zeta_potential/zeta_potential_idem.htm)
162. Simplifying the measurement of zeta potential using M3-PALS. December 2003  
<http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000411?opendocumen>
163. Liu J, Huang X, Lu L, Li M, Xu J, Deng H. Turbiscan Lab<sup>®</sup> Expert analysis of the biological demulsification of a water-in-oil emulsion by two biodemulsifiers. *J Hazard Mater.* 2011 Jun 15;190(1-3):214–21.
164. 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 Apr;28(4):843–6.
165. 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 Sep 13;50(2):445–56.
166. Turbiscan LAB: Stability analysis of emulsions, suspensions and foams - Particle size analysis and concentration change [Internet]. Available from: <http://www.formulaction.com/stability-turbiscan-lab.html>
167. HPLC image - Analytical Methods | Linde Gases Division [http://hiq.linde-gas.com/international/web/lg/spg/like35lgspg.nsf/docbyalias/image\\_hplc](http://hiq.linde-gas.com/international/web/lg/spg/like35lgspg.nsf/docbyalias/image_hplc)

168. Franz TJ. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol*. 1975 Mar;64(3):190–5.
169. PermeGear Flow Type Franz Cells [Internet]. Available from: <http://www.permegear.com/franzflow.htm>
170. Davis SS, Hadgraft J, Palin JK. Medical and Pharmaceutical application of emulsions. In: *Encyclopedia of Emulsion Technology*. Marcel Dekker. New York; 1985.
171. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 2001 May;13(2):123–33.
172. Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1978 Apr;6(2):165–75.
173. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2008 Apr;14(4):398–405.
174. Motyl M, Dorso K, Barrett J, Giacobbe R. Basic microbiological techniques used in antibacterial drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol Editor Board SJ Enna Ed--Chief AI*. 2006 Jan;Chapter 13:Unit13A.3.
175. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, and Tenover FC, Tenover RH. *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 2003.
176. Rex JH, Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard M38-A2. Wayne, PA: NCCLS, Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
177. Akkar A, Müller RH. Formulation of intravenous carbamazepine emulsions by SolEmuls technology. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV*. 2003 May;55(3):305–12.
178. Bolard J, Legrand P, Heitz F, Cybulska B. One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium. *Biochemistry (Mosc)*. 1991 Jun 11;30(23):5707–15.
179. Coutinho A, Prieto M. Self-association of the polyene antibiotic nystatin in dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles: a time-resolved fluorescence study. *Biophys J*. 1995 Dec;69(6):2541–57.

180. Croy SR, Kwon GS. Polysorbate 80 and Cremophor EL micelles deaggregate and solubilize nystatin at the core-corona interface. *J Pharm Sci.* 2005 Nov;94(11):2345–54.
181. Van Zuylen L, Verweij J, Sparreboom A. Role of formulation vehicles in taxane pharmacology. *Invest New Drugs.* 2001 May;19(2):125–41.
182. Singla AK, Garg A, Aggarwal D. Paclitaxel and its formulations. *Int J Pharm.* 2002 Mar 20;235(1-2):179–92.
183. Colombo T, Parisi I, Zucchetti M, Sessa C, Goldhirsch A, D’Incalci M. Pharmacokinetic interactions of paclitaxel, docetaxel and their vehicles with doxorubicin. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 1999 Apr;10(4):391–5.
184. Dorr RT. Pharmacology and toxicology of Cremophor EL diluent. *Ann Pharmacother.* 1994 May;28(5 Suppl):S11–14.
185. Zordan-Nudo T, Ling V, Liu Z, Georges E. Effects of nonionic detergents on P-glycoprotein drug binding and reversal of multidrug resistance. *Cancer Res.* 1993 Dec 15;53(24):5994–6000.
186. Van Zuylen L, Karlsson MO, Verweij J, Brouwer E, de Bruijn P, Nooter K, et al. Pharmacokinetic modeling of paclitaxel encapsulation in Cremophor EL micelles. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001 Apr;47(4):309–18.
187. Knemeyer I, Wientjes MG, Au JL. Cremophor reduces paclitaxel penetration into bladder wall during intravesical treatment. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999;44(3):241–8.
188. Ellis AG, Crinis NA, Webster LK. Inhibition of etoposide elimination in the isolated perfused rat liver by Cremophor EL and Tween 80. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1996;38(1):81–7.
189. Van Tellingen O, Beijnen JH, Verweij J, Scherrenburg EJ, Nooijen WJ, Sparreboom A. Rapid esterase-sensitive breakdown of polysorbate 80 and its impact on the plasma pharmacokinetics of docetaxel and metabolites in mice. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1999 Oct;5(10):2918–24.
190. Kongshaug M, Cheng LS, Moan J, Rimington C. Interaction of cremophor EL with human plasma. *Int J Biochem.* 1991;23(4):473–8.
191. Cummings J, Forrest GJ, Cunningham D, Gilchrist NL, Soukop M. Influence of polysorbate 80 (Tween 80) and etoposide (VP-16-213) on the pharmacokinetics and urinary excretion of adriamycin and its metabolites in cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1986;17(1):80–4.

192. Ten Tije AJ, Verweij J, Loos WJ, Sparreboom A. Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemotherapy. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(7):665–85.
193. Woodburn K, Sykes E, Kessel D. Interactions of Solutol HS 15 and Cremophor EL with plasma lipoproteins. *Int J Biochem Cell Biol*. 1995 Jul;27(7):693–9.
194. Bittner B, González RCB, Walter I, Kapps M, Huwyler J. Impact of Solutol HS 15 on the pharmacokinetic behaviour of colchicine upon intravenous administration to male Wistar rats. *Biopharm Drug Dispos*. 2003 May;24(4):173–81.
195. Bittner B, González RCB, Isel H, Flament C. Impact of Solutol HS 15 on the pharmacokinetic behavior of midazolam upon intravenous administration to male Wistar rats. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV*. 2003 Jul;56(1):143–6.
196. Garcion E, Lamprecht A, Heurtault B, Paillard A, Aubert-Pouessel A, Denizot B, et al. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol Cancer Ther*. 2006 Jul;5(7):1710–22.
197. O’Leary B. Personal communication, BASF Corporation. 2003.
198. Stokes AH, Kemp DC, Faiola B, Jordan HL, Merrill CL, Hailey JR, et al. Effects of Solutol (Kolliphor) and cremophor in polyethylene glycol 400 vehicle formulations in Sprague-Dawley rats and Beagle dogs. *Int J Toxicol*. 2013 Jun;32(3):189–97.
199. Kirchherr A-K, Briel A, Mäder K. Stabilization of indocyanine green by encapsulation within micellar systems. *Mol Pharm*. 2009 Apr;6(2):480–91.
200. Reintjer T. Solubility enhancement whit BASF Pharma polymers. Solubilizer compendium. BASF SE. Pharma Ingredients & services. [http://www.pharma-ingredients.basf.com/Documents/ENP/Brochure/EN/b\\_03\\_110921e\\_Solubility\\_Enhance\\_Compndium.pdf](http://www.pharma-ingredients.basf.com/Documents/ENP/Brochure/EN/b_03_110921e_Solubility_Enhance_Compndium.pdf). 2011.
201. Strickley RG. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm Res*. 2004 Feb;21(2):201–30.
202. Bittner B, Mountfield RJ. Intravenous administration of poorly soluble new drug entities in early drug discovery: the potential impact of formulation on pharmacokinetic parameters. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2002 Jan;5(1):59–71.
203. Moribe K, Maruyama K, Iwatsuru M. Spectroscopic investigation of the molecular state of nystatin encapsulated in liposomes. *Int J Pharm*. 2000 May 15;201(1):37–49.

204. Celia C, Trapasso E, Cosco D, Paolino D, Fresta M. Turbiscan lab expert analysis of the stability of ethosomes and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2009 Aug 1;72(1):155–60.
205. Moreno D, Zalba S, Colom H, Trocóniz IF, Tros de Ilduya C, Garrido MJ. Biopharmaceutic and pharmacodynamic modeling of the in vitro antiproliferative effect of new controlled delivery systems of cisplatin. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 2009 Jun 28;37(3-4):341–50.
206. Papadopoulou V, Kosmidis K, Vlachou M, Macheras P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *Int J Pharm*. 2006 Feb 17;309(1-2):44–50.
207. Lao LL, Peppas NA, Boey FYC, Venkatraman SS. Modeling of drug release from bulk-degrading polymers. *Int J Pharm*. 2011 Oct 10;418(1):28–41.
208. Costa-Balogh FO, Sparr E, Sousa JJS, Pais AC. Drug release from lipid liquid crystalline phases: relation with phase behavior. *Drug Dev Ind Pharm*. 2010 Apr;36(4):470–81.
209. Singh SK, Verma PRP, Razdan B. Development and characterization of a carvedilol-loaded self-microemulsifying delivery system. *Clin Res Regul Aff*. 2009;26(3):50–64.
210. Al-Salahi R, Marzouk M, Awad G, Al-Omar M, Ezzeldin E. Antimicrobial activity of newly synthesized methylsulfanyl-triazoloquinazoline derivatives. *J Pharm Pharmacol*. 2013 Jun;65(6):790–7.
211. Ayati A, Falahati M, Irannejad H, Emami S. Synthesis, in vitro antifungal evaluation and in silico study of 3-azolyl-4-chromanone phenylhydrazones. *Daru J Fac Pharm Tehran Univ Med Sci*. 2012;20(1):46.
212. Hassanzadeh F, Jafari E, Hakimelahi GH, Khajouei MR, Jalali M, Khodarahmi GA. Antibacterial, antifungal and cytotoxic evaluation of some new quinazolinone derivatives. *Res Pharm Sci*. 2012 Apr;7(2):87–94.

# Índice de Tablas

---

|                                                                                                                                                              |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <i>Tabla 1. Efecto del equipo de emulsificación en el tamaño de gota promedio de las emulsiones elaboradas por estos metodos .....</i>                       | <i>13</i>  |
| <i>Tabla2. Composición de ácidos grasos presentes en el aceite de soja.....</i>                                                                              | <i>35</i>  |
| <i>Tabla 3. Características fisicoquímicas del aceite de soja .....</i>                                                                                      | <i>36</i>  |
| <i>Tabla 4. Certificado de calidad del aceite de soja Karlshmann .....</i>                                                                                   | <i>36</i>  |
| <i>Tabla 5. Características fisicoquímicas de la lecitina de soja .....</i>                                                                                  | <i>38</i>  |
| <i>Tabla 6. Certificado de calidad de la lecitina de soja (Phospholipon® 90).....</i>                                                                        | <i>39</i>  |
| <i>Tabla 7. Características fisicoquímicas del Solutol Hs15 .....</i>                                                                                        | <i>40</i>  |
| <i>Tabla 8. Certificado de calidad del Solutol Hs15 .....</i>                                                                                                | <i>41</i>  |
| <i>Tabla 9. Certificado de calidad de la Nistatina (ref: KEUR-78017).....</i>                                                                                | <i>42</i>  |
| <i>Tabla 10. Formula de Emulsión lipídica inyectable utilizada en este estudio. ....</i>                                                                     | <i>46</i>  |
| <i>Tabla 12. Composición NYS-ELI. Aceite: aceite de soja; co-emulgente: Solutol HS15....</i>                                                                 | <i>55</i>  |
| <i>Tabla 13. Condiciones cromatográficas utilizadas para cuantificar NYS-ELI. MeOH:<br/>Metanol, DMF: dimetilformamida .....</i>                             | <i>67</i>  |
| <i>Tabla 14. Diseño multifactorial. Factores y niveles .....</i>                                                                                             | <i>71</i>  |
| <i>Tabla 15. M-ANOVA entre NYS-ELI y ELI libre. Factores y nivel.....</i>                                                                                    | <i>72</i>  |
| <i>Tabla 16. Composición del medio de cultivo .....</i>                                                                                                      | <i>79</i>  |
| <i>Tabla 17. Distribución de las muestras analizadas en placa de microtiter. Inóculo:<br/>Candida Albicans .....</i>                                         | <i>81</i>  |
| <i>Tabla 18. Distribución de las diluciones en la placa 1 para el test contra Candida<br/>Albicans.....</i>                                                  | <i>81</i>  |
| <i>Tabla 19. Distribución de las diluciones en la placa 2 para el test contra Candida<br/>Albicans. MX2: Medio doblemente concentrado. ....</i>              | <i>81</i>  |
| <i>Tabla 20. Distribución de las muestras analizadas en la placa Microtiter® para el test<br/>contra Aspergillus Fumigatus. ....</i>                         | <i>83</i>  |
| <i>Tabla 21. Distribución de las diluciones en la placa 1, para el test contra Aspergillus<br/>Fumigatus .....</i>                                           | <i>84</i>  |
| <i>Tabla 22. Distribución de las diluciones en la placa 2 para el test contra Aspergillus<br/>Fumigatus. MX2: Medio doblemente concentrado.....</i>          | <i>84</i>  |
| <i>Tabla 24. Valores de temperatura de mezclado ensayados para la elaboración de<br/>emulsiones tipo ELI. ....</i>                                           | <i>93</i>  |
| <i>Tabla 25. Emulsiones elaboradas en función de los parámetros de elaboración<br/>ensayados. R: rápido, L: lento, C: con potencia, S: sin potencia.....</i> | <i>97</i>  |
| <i>Tabla 26. Resultados de los análisis realizados a las emulsiones 1 hora después de su<br/>elaboración. ....</i>                                           | <i>98</i>  |
| <i>Tabla 27. Resultados de los análisis realizados a las emulsiones autoclavadas. Correcto<br/>(blanco, homogéneo y opaco) .....</i>                         | <i>100</i> |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <i>Tabla 28. Resultados del análisis de estabilidad térmica (primera semana). Ob: observación, PI: polidispersidad, Zave: tamaños de gota en nanómetros.....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                    | <i>102</i> |
| <i>Tabla 29. Resultados del análisis de estabilidad térmica (segunda semana). Ob: observación, PI: polidispersidad, Zave: tamaños de gota en nanómetros.....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                    | <i>103</i> |
| <i>Tabla 30. Resultados del análisis de estabilidad térmica (tercera semana). Ob: observación, PI: polidispersidad, Zave: tamaños de gota en nanómetros.....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                    | <i>104</i> |
| <i>Tabla 31. Resultados del análisis de estabilidad térmica (a t= 4, 5 y 9 semanas). T: tiempo en semanas, M: muestra, Ob: observación, PI: polidispersidad, Z(nm): tamaños de gota en nanómetros. ....</i>                                                                                                                                                                                                                         | <i>105</i> |
| <i>Tabla 32. Caracterización de ELI a t<sub>0</sub> (n=3). TS: tiempo de sonicación, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD<sub>99</sub>: difracción laser diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, S/N: no neutralización, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración.....</i>                                                                     | <i>110</i> |
| <i>Tabla 33. Caracterización de ELI a t<sub>0</sub> (n=3). TS: tiempo de sonicación, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD<sub>99</sub>: difracción laser diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, S/N: no neutralización, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración.....</i>                                                                     | <i>112</i> |
| <i>Tabla 34. Resultados de las muestras de ELIs almacenadas 4°C a t3 meses. TS: tiempo de sonicación, P: potencia, A: autoclavado, S/A: sin autoclavar, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD<sub>99</sub>: difracción laser diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, S/N: no neutralización, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración.....</i>  | <i>115</i> |
| <i>Tabla 35. Resultados de las muestras de ELIs almacenadas 30°C a t3 meses. TS: tiempo de sonicación, P: potencia, A: autoclavado, S/A: sin autoclavar, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD<sub>99</sub>: difracción laser diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, S/N: no neutralización, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración.....</i> | <i>116</i> |
| <i>Tabla 36. Resultados de las muestras de ELIs almacenadas 4°C a t6 meses. TS: tiempo de sonicación, P: potencia, A: autoclavado, S/A: sin autoclavar, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD<sub>99</sub>: difracción laser diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración.....</i>                          | <i>119</i> |
| <i>Tabla 37. Resultados de las muestras de ELIs almacenadas 30°C a t6 meses. TS: tiempo de sonicación, P: potencia, A: autoclavado, S/A: sin autoclavar, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD<sub>99</sub>: difracción laser diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración.....</i>                         | <i>119</i> |

- Tabla 38. Resultados de las muestras de ELIs almacenadas 4°C a t6 meses. TS: tiempo de sonicación, P: potencia, A: autoclavado, S/A: sin autoclavar, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD99: difracción laser diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración..... 121*
- Tabla 39. Resultados de las muestras de ELIs almacenadas 30°C a t6 meses. TS: tiempo de sonicación, P: potencia, A: autoclavado, S/A: sin autoclavar, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD99: difracción laser diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración..... 122*
- Tabla 40. Resultados de las muestras de ELIs almacenadas 4± 1°C a t12 meses. TS: tiempo de sonicación, P: potencia, A: autoclavado, S/A: sin autoclavar, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD99: difracción laser diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, NDE: neutralización durante elaboración. .... 124*
- Tabla 41. Resultados de las muestras de ELIs almacenadas 30°C a t6 meses. TS: tiempo de sonicación, P: potencia, A: autoclavado, S/A: sin autoclavar, N: neutralización, Zave: tamaño medio de gota, PI: polidispersidad, LD99: difracción laser diámetro de volumen 99%, ZP: potencial zeta, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración..... 124*
- Tabla 42. Planteamiento del diseño experimental para optimizar ELI..... 125*
- Tabla 43. Análisis de varianza para Zave - Suma de cuadrados de Tipo III. Estabilidad física a largo plazo (24 horas, 3 meses, 6 meses 9 meses), tiempo de sonicación (30 min, 50 min), potencia (80W, 120W), autoclave (sí/no), neutralización (sin neutralización, neutralización durante la elaboración, neutralización después de la elaboración), almacenamiento (30 y 4°C)..... 125*
- Tabla 44. Análisis de varianza para PI - Suma de cuadrados de Tipo III. Estabilidad física a largo plazo (24 horas, 3 meses, 6 meses 9 meses), tiempo de sonicación (30 min, 50 min), potencia (80W, 120W), autoclave (sí/no), neutralización (sin neutralización, neutralización durante la elaboración, neutralización después de la elaboración), almacenamiento (30 y 4°C)..... 127*
- Tabla 45. Análisis de varianza para LD99- Suma de cuadrados de Tipo III. Estabilidad física a largo plazo (24 horas, 3 meses, 6 meses 9 meses), tiempo de sonicación (30 min, 50 min), potencia (80W, 120W), autoclave (sí/no), neutralización (sin neutralización, neutralización durante la elaboración, neutralización después de la elaboración), almacenamiento (30 y 4°C)..... 128*
- Tabla 46. Condiciones operativas optimizadas ..... 133*
- Tabla 47. Cambios en el tamaño medio de gota (z-ave) y el índice de polidispersidad (PI) de ELI (C2) e Intralípid®. La columna p-valor indica la significancia de PI y Zave*

|                                                                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>para cada punto en el tiempo, respectivamente. La fila p-valor indica cuan diferentes son los valores de PI y Zave en función del tiempo y temperaturas ensayadas.</i> | 134 |
| <i>Tabla 48. Ejemplos de formulaciones que incluyen los co-emulgentes seleccionados</i>                                                                                   | 139 |
| <i>Tabla 49. Cambios en el tamaño medio de gota (z-ave) de ELI (C2) y de las 4 formulaciones de NYS-ELI almacenadas a 30 y 4°C</i>                                        | 142 |
| <i>Tabla 50. Cambios en el índice de polidispersidad (PI) de ELI (C2) y de las 4 formulaciones de NYS-ELI almacenadas a 30 y 4°C.</i>                                     | 142 |
| <i>Tabla 51. Parámetros de Liberación después de ajustar el modelo.</i>                                                                                                   | 158 |
| <i>Tabla 52. Lecturas de absorbancia de las placas Microtiter a tiempo cero.</i>                                                                                          | 162 |
| <i>Tabla 53. Lecturas de absorbancia de las placas Microtiter 24 h después de la siembra.</i>                                                                             | 163 |
| <i>Tabla 54. Resultados MICS para C. Albicans 24h después de la siembra.</i>                                                                                              | 163 |
| <i>Tabla 55. Lecturas de absorbancia de las placas Microtiter a tiempo cero.</i>                                                                                          | 165 |
| <i>Tabla 56. Lecturas de absorbancia de las placas Microtiter 24 h después de la siembra.</i>                                                                             | 165 |
| <i>Tabla 57. Lecturas de absorbancia de las placas Microtiter 48 h después de la siembra.</i>                                                                             | 166 |
| <i>Tabla 58. Resultados MICS para A. Fumigatus 48h después de la siembra.</i>                                                                                             | 166 |
| <i>Tabla 59. Recuento de colonias de C. Albicans expuestas a NYS-ELI 1. NC: no crece; CC: Crecimiento.</i>                                                                | 168 |
| <i>Tabla 60. Recuento de colonias de C. Albicans expuestas a NYS-ELI 2 NC: no crece; CC: Crecimiento.</i>                                                                 | 168 |
| <i>Tabla 61. Recuento de colonias de C. Albicans expuestas a NYS-ELI 3. NC: no crece; CC: Crecimiento.</i>                                                                | 168 |
| <i>Tabla 62. Recuento de colonias de C. Albicans expuestas a NYS-ELI 4. NC: no crece; CC: Crecimiento.</i>                                                                | 169 |
| <i>Tabla 63. Recuento de colonias de A. Fumigatus expuestas a NYS-ELI 1. NC: no crece; CC: Crecimiento.</i>                                                               | 170 |
| <i>Tabla 64. Recuento de colonias de A. Fumigatus expuestas a NYS-ELI 2. NC: no crece; CC: Crecimiento.</i>                                                               | 170 |
| <i>Tabla 65. Recuento de colonias de A. Fumigatus expuestas a NYS-ELI 3. NC: no crece; CC: Crecimiento.</i>                                                               | 170 |
| <i>Tabla 66. Recuento de colonias de A. Fumigatus expuestas a NYS-ELI 4. NC: no crece; CC: Crecimiento.</i>                                                               | 171 |
| <i>Tabla 67. Recuento de colonias de A. Fumigatus expuesta a Nistatina patrón. NC: no crece.</i>                                                                          | 171 |

# Índice de Figuras

---

|                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Estructura del Poloxamer 188 .....                                                                                                                  | 11 |
| Figura 2. Estructura del Solutol Hs15 (Kolliphor Hs15).....                                                                                                   | 11 |
| Figura 3. Estructura del polisorbato 80 (Tween 80). .....                                                                                                     | 12 |
| Figura 4. Estructura química del Macrogol-glicerol ricinoleato (Cremophor® EL).<br>Constituyente primario con $x + y + z \sim 35$ .....                       | 12 |
| Figura 5. Esquema del homogeneizador de válvula .....                                                                                                         | 14 |
| Figura 6. Esquema del homogeneizador de alta presión .....                                                                                                    | 14 |
| Figura 7. Esquema del homogeneizador Microfluidizer .....                                                                                                     | 15 |
| Figura 8. Esquema de homogenización por Ultrasonido.....                                                                                                      | 15 |
| Figura 9. Representación grafica de un proceso de inversión de fases.....                                                                                     | 16 |
| Figura 10. Representación grafica del método de temperatura de inversión de fases<br>(PIT).....                                                               | 17 |
| Figura 11. Esquema de inversión de fase, para un sistema tensiactivo/aceite/agua<br>(SOW). Se ilustra la inversión de fase de transición y catastrófica ..... | 18 |
| Figura 12. Estructura de la Nistatina A1.....                                                                                                                 | 19 |
| Figura 13. Estructura química de las lecitinas $14\alpha$ -Fosfatidilcolina. R1 y R2 son ácidos<br>grasos que pueden ser iguales o diferentes. ....           | 37 |
| Figura 14. Fotografía del equipo de ultrasonidos.....                                                                                                         | 44 |
| Figura 15. Equipo Malvern Zetasizer .....                                                                                                                     | 58 |
| Figura 16. Equipo Beckman Coulter LS 13 320 .....                                                                                                             | 60 |
| Figura 17. Celda de inmersión para PZ.....                                                                                                                    | 63 |
| Figura 18. Equipo TurbiScan© LabR.....                                                                                                                        | 64 |
| Figura 19. Esquema del HPLC .....                                                                                                                             | 66 |
| Figura 20. Esquema del Microscopio Electrónico de Barrido .....                                                                                               | 68 |
| Figura 21. Celda de Franz .....                                                                                                                               | 74 |
| Figura 22. Diagrama del cultivo en placa y la correspondiente dilución del inoculo. ....                                                                      | 85 |
| Figura 23. Esquema de la siembra de las diferentes diluciones del inoculo. D: directo .                                                                       | 86 |
| Figura 24. Esquema del plan de trabajo.....                                                                                                                   | 89 |
| Figura 25. Esquema del circuito cerrado .....                                                                                                                 | 90 |
| Figura 26. Fotografía del circuito cerrado. ....                                                                                                              | 91 |
| Figura 27. Receptáculo de vidrio que contiene la sonda de ultrasonidos. ....                                                                                  | 91 |
| Figura 28. Distancia de la sonda de ultrasonidos en el receptáculo de vidrio. ....                                                                            | 92 |
| Figura 29. Representación gráfica de los resultados de la cinética de enfriamiento a<br>10°C .....                                                            | 94 |
| Figura 30. Representación gráfica de los resultados de la cinética de enfriamiento a<br>15°C .....                                                            | 95 |

|                                                                                                                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Figura 31. Representación gráfica de los resultados de la cinética de enfriamiento a 25°C</i> .....                                                                                                     | 95  |
| <i>Figura 32. Representación gráfica de los resultados de la cinética de enfriamiento con hielo</i> .....                                                                                                  | 96  |
| <i>Figura 33. Esquema de trabajo del estudio preliminar</i> .....                                                                                                                                          | 97  |
| <i>Figura 34. Representación gráfica de los valores de tamaño de gota de las diferentes emulsiones elaboradas. (24h después de su elaboración)</i> .....                                                   | 99  |
| <i>Figura 35. Representación gráfica de los valores de polidispersidad de las diferentes emulsiones elaboradas. Lectura realizada 1h después de finalizado el acondicionamiento de las muestras.</i> ..... | 99  |
| <i>Figura 36. Comparación gráfica entre los valores de pH de las emulsiones no esterilizadas (fracción A) en relación a las esterilizadas (fracción B).</i> .....                                          | 100 |
| <i>Figura 37. Representación gráfica de los valores de polidispersidad de las emulsiones autoclavadas.</i> .....                                                                                           | 101 |
| <i>Figura 38. Representación gráfica de la polidispersidad (PI) en función de las condiciones de almacenamiento durante la primera semana.</i> .....                                                       | 102 |
| <i>Figura 39. Representación gráfica de la polidispersidad (PI) en función de las condiciones de almacenamiento durante la segunda semana.</i> .....                                                       | 103 |
| <i>Figura 40. Representación gráfica de la polidispersidad (PI) en función de las condiciones de almacenamiento durante la tercera semana.</i> .....                                                       | 104 |
| <i>Figura 41. Representación gráfica de polidispersidad (PI) en función de las condiciones de almacenamiento durante la cuarta semana.</i> .....                                                           | 106 |
| <i>Figura 42. Representación gráfica de la polidispersión (PI) en función del tiempo (fracción B).</i> .....                                                                                               | 106 |
| <i>Figura 43. Diagrama de flujo del proceso de optimización del excipiente</i> .....                                                                                                                       | 108 |
| <i>Figura 44. Efecto de la neutralización en la polidispersidad de ELI elaboradas a t0...</i>                                                                                                              | 111 |
| <i>Figura 45. Efecto del pH en la neutralización de las ELI elaboradas a t0.</i> .....                                                                                                                     | 111 |
| <i>Figura 46. Efecto de la neutralización en el potencial Z de las ELI elaboradas a t0.</i> ....                                                                                                           | 112 |
| <i>Figura 47. Efecto de la neutralización en el pH de las ELI elaboradas a t0. Comparativa con la fracción autoclavada.</i> .....                                                                          | 113 |
| <i>Figura 48. Efecto de la neutralización en PI de las ELI elaboradas a t0. Comparativa con la fracción autoclavada</i> .....                                                                              | 114 |
| <i>Figura 49. Efecto de la neutralización en LD99 de las ELI elaboradas a t0 meses. Comparativa con la fracción autoclavada.</i> .....                                                                     | 114 |
| <i>Figura 50. Efecto del almacenamiento en la polidispersidad de las ELIs elaboradas a t3 meses. Comparativa de la fracción almacenada a 4 y a 30°C.</i> .....                                             | 117 |
| <i>Figura 51. Efecto del almacenamiento en LD99 de las ELIs elaboradas a t3 meses. Comparativa de la fracción almacenada en nevera y a 30°C.</i> .....                                                     | 117 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <i>Figura 52. Comparativa de los valores de pH y pZ de las emulsiones almacenadas a 30°C a t3 meses. ....</i>                                                                                                                                                                                                               | <i>118</i> |
| <i>Figura 53. Comparativa de los valores de PI de ELI a 4 y 30°C a t6 meses.....</i>                                                                                                                                                                                                                                        | <i>120</i> |
| <i>Figura 54. Comparativa de los valores de LD99 de las ELI a 4 y 30°C a t6 meses.....</i>                                                                                                                                                                                                                                  | <i>121</i> |
| <i>Figura 55. Comparativa de los valores de PI de las ELI almacenada a 4 y 30°C a t9 meses.....</i>                                                                                                                                                                                                                         | <i>122</i> |
| <i>Figura 56. Comparativa de los valores de LD99 de las ELI almacenada a 4 y 30°C t9 meses.....</i>                                                                                                                                                                                                                         | <i>123</i> |
| <i>Figura 57. Comparativa de los valores de pH y ZP de las ELI almacenada a 4°C t9 meses.....</i>                                                                                                                                                                                                                           | <i>123</i> |
| <i>Figura 58. Efecto de la neutralización en el tamaño de gota (Zave) de las emulsiones objeto de estudio. S/N: no neutralización, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración.....</i>                                                                                          | <i>126</i> |
| <i>Figura 59. Análisis de varianza. Efecto de la neutralización en PI de ELI objeto de estudio. S/N: no neutralización, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración. ....</i>                                                                                                    | <i>128</i> |
| <i>Figura 60. Análisis de varianza. Efecto del almacenamiento en LD99 de ELI después de 9 meses de estudio. ....</i>                                                                                                                                                                                                        | <i>129</i> |
| <i>Figura 61. Análisis de varianza. Efecto de la neutralización en el LD99 de ELI objeto de estudio. S/N: no neutralización, NDE: neutralización durante elaboración, NAE: neutralización después de la elaboración. ....</i>                                                                                               | <i>129</i> |
| <i>Figura 62. Análisis de varianza. Efecto del tiempo de sonicación en LD99 de ELI objeto de estudio. ....</i>                                                                                                                                                                                                              | <i>130</i> |
| <i>Figura 63. Comparación de PI de ELI B2 y C2 con sus fracciones autoclavadas almacenadas a 4 y 30°C .....</i>                                                                                                                                                                                                             | <i>131</i> |
| <i>Figura 64. Comparación de LD99 de ELI B2 y C2 con sus fracciones autoclavadas almacenadas a 4 y 30°C .....</i>                                                                                                                                                                                                           | <i>131</i> |
| <i>Figura 65. Comparación de ZP de ELI B2 y C2 con sus fracciones autoclavadas almacenadas a 4 y 30°C .....</i>                                                                                                                                                                                                             | <i>132</i> |
| <i>Figura 66. Comparación de pH de ELI B2 y C2 con sus fracciones autoclavadas almacenadas a 4 y 30°C .....</i>                                                                                                                                                                                                             | <i>132</i> |
| <i>Figura 67. Comparación de ELI e Intralipid®. a) Comparación de PI de las muestras almacenadas a 30°C, b) Comparación de PI de las muestras almacenadas a 4°C, c) Comparación de Zave de las muestras almacenadas a 30°C, d) Comparación de Zave de las muestras almacenadas a 4°C. Datos tomados de la tabla51. ....</i> | <i>135</i> |
| <i>Figura 68. Diagrama de flujo de la formulación de NYS-ELI.....</i>                                                                                                                                                                                                                                                       | <i>141</i> |
| <i>Figura 69. Comparación de ELI y las 4 formulaciones de NYS-ELI. a), Comparación de Zave de las muestras almacenadas a 30°C, b) Comparación de Zave de las muestras almacenadas a 4°C, c) Comparación de PI de las muestras almacenadas a 30°C. d) Comparación de PI de las muestras almacenadas a 4°C. ....</i>          | <i>143</i> |

|                                                                                                                                                                                            |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <i>Figura 70. M-ANOVA de Zave (nm) para formulaciones NYS-ELI y ELI sin fármaco. Las formulaciones: (1) NYS-ELI 1, (2) NYS-ELI 2, (3) NYS-ELI 3, (4) NYS-ELI 4, (5) ELI..</i>              | <i>144</i> |
| <i>Figura 71. Dispersión de tamaño medio de gota (Zave) por código de nivel en diferentes tiempos de almacenamiento (1, 15 30 y día 60).</i>                                               | <i>145</i> |
| <i>Figura 72. Influencia de las diferentes formulaciones ensayadas en Zave.</i>                                                                                                            | <i>146</i> |
| <i>Figura 73. M-ANOVA de la polidispersidad (PI) para formulaciones NYS-ELI y ELI sin fármaco. Las formulaciones: (1) NYS-ELI 1, (2) NYS-ELI 2, (3) NYS-ELI 3, (4) NYS-ELI 4, (5) ELI.</i> | <i>146</i> |
| <i>Figura 74. Dispersión de los datos de polidispersidad (PI) por código de nivel de las diferentes formulaciones estudiadas.</i>                                                          | <i>147</i> |
| <i>Figura 75. Influencia de la estabilidad física a largo plazo (1, 15 30 y 60 días) en la polidispersidad (PI).</i>                                                                       | <i>148</i> |
| <i>Figura 76. Análisis Turbiscan® de las formulaciones NYS-ELI a temperatura ambiente. a): NYS-ELI1; b) NYS-ELI2; c) NYS ELI3; d) NYS-ELI4.</i>                                            | <i>149</i> |
| <i>Figura 77. Porcentaje de Nistatina presente en las formulaciones NYS-ELI 24h después de su elaboración.</i>                                                                             | <i>151</i> |
| <i>Figura 78. Porcentaje de Nistatina presente en las formulaciones NYS-ELI 30 días después de su elaboración.</i>                                                                         | <i>152</i> |
| <i>Figura 79. Escaneo de la criofractura de NYS-ELI 4 analizada por SEM, 30 días después de su elaboración (test a largo plazo). Bar: 10 µm</i>                                            | <i>153</i> |
| <i>Figura 80. Perfil de liberación de las formulaciones NYS-ELI a 37 ° C.</i>                                                                                                              | <i>155</i> |
| <i>Figura 81. Gráfico de ajustado de la media de los datos para NYS-ELI 4. Predicción del modelo Higuchi.</i>                                                                              | <i>160</i> |
| <i>Figura 82. Gráfico de ajustado de los residuales para NYS-ELI 4. Predicción del modelo Higuchi.</i>                                                                                     | <i>160</i> |

# ANEXOS

---

# Formulation Design and Optimization for the Improvement of Nystatin-Loaded Lipid Intravenous Emulsion

DEIRY MARÍN-QUINTERO,<sup>1</sup> FRANCISCO FERNÁNDEZ-CAMPOS,<sup>1</sup> ANA C. CALPENA-CAMPANY,<sup>1</sup> MARÍA J. MONTES-LÓPEZ,<sup>2</sup> BEATRIZ CLARES-NAVEROS,<sup>3</sup> ALFONSO DEL POZO-CARRASCOSA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain

Received 26 June 2013; revised 26 July 2013; accepted 29 July 2013

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jps.23711

**ABSTRACT:** Nystatin (NYS) is a polyene macrolide with broad antifungal spectrum restricted to topical use owing to its toxicity upon systemic administration. The aims of this work were the design, development, and optimization of NYS-loaded lipid emulsion for intravenous administration. A closed circuit system was designed to apply ultrasound during the elaboration of the lipid intravenous emulsions (LIEs). Additionally, a comparison with the commercially available Intralipid® 20% was also performed. Manufacturing conditions were optimized by factorial design. Formulations were evaluated in terms of physicochemical parameters, stability, release profile, and antimicrobial activity. The average droplet size, polydispersity index, zeta-potential, pH, and volume distribution values ranged between 192.5 and 143.0 nm, 0.170 and 0.135, –46 and –44 mV, 7.11 and 7.53, 580 and 670 nm, respectively. The selected NYS-loaded LIE (NYS-LIE54) consisted of soybean oil (30%), soybean lecithin (2%), solutol HS® 15 (4%), and glycerol (2.25%) was stable for at least 60 days. *In vitro* drug release studies of this formulation suggested a sustained-release profile. Equally, NYS-LIE54 showed the best antimicrobial activity being higher than the free drug. Thus, it could be a promising drug delivery system to treat systemic fungal infections. © 2013 Wiley Periodicals, Inc. and the American Pharmacists Association J Pharm Sci

**Keywords:** drug design; nystatin; lipids; emulsion; injectables; surfactants; *candida*; *aspergillus*; mathematical model

## INTRODUCTION

Many patients under aggressive treatments (cancer, critically ill patients, major surgery, etc.), or severely immunocompromised (e.g., after organ or bone marrow transplantation), could develop opportunistic invasive fungal infections,<sup>1</sup> among them *Candida* and *Aspergillus sp* are the most common pathogens involved.<sup>2</sup> The management of these invasive infections is still problematic because most of the antifungals present resistances or high toxicity profiles, so renal and/or hepatic functions could be impaired<sup>3</sup> and therefore a likely increase in mortality rates.<sup>4</sup> Thus, user needs can be the starting point for developing, improving, and/or designing new more effective antifungal agents. In this way, the development of new formulations able to treat these infections reducing or avoiding the negative effects with affordable costs justifies that an increasingly area of pharmaceutical research is focused on this field.

Nystatin (NYS) is a polyene antifungal antibiotic, one of the oldest antifungal drugs, produced by *Streptomyces noursei* strains,<sup>5</sup> commonly used for the prophylaxis and treatment of candidiasis. It acts by interfering with the fungal cell membrane of the antibiotic-sensitive organism by binding to sterols, chiefly ergosterol, and the formation of barrel-like membrane-spanning channels.<sup>6</sup> NYS plays an essential role in antifungal chemotherapy.

Nystatin possesses a broad antifungal spectrum; it has been reported to be effective against azole-resistant strains of *Candida* and, in some cases, amphotericin B-resistant strains of *Candida albicans*.<sup>7</sup> NYS exhibits concentration-dependent activity, so at low concentration it shows fungistatic effect, whereas at high concentration, it exhibits rapid fungicidal activity. This fungicidal effect is a key factor because a rapid onset of action is quite important for a successful treatment. Moreover, NYS shows a long post-antifungal effect (PAFE), which allows the reduction in the frequency of administration.<sup>8</sup>

The structure of NYS reveals formulation challenges, because it is characterized by the presence of a large lactone ring containing several double bonds conferring an amphiphilic and amphoteric nature, which in turn contributes to its low solubility in aqueous media and poor bioavailability. For this reason, the controlled-release delivery of this drug is a complex task. To overcome this problem, several approaches have been reported. NYS has been formulated in micellar gels,<sup>9</sup> mucoadhesive devices for topical use,<sup>10,11</sup> liposomes,<sup>12</sup> nanoemulsions,<sup>13,14</sup> intralipids,<sup>15</sup> niosomes,<sup>16</sup> microparticles,<sup>17</sup> and pellets.<sup>18</sup> Liposomal NYS is a promising therapy,<sup>19</sup> but this formulation is expensive and not yet commercially available in all countries.

Lipid intravenous emulsions (LIEs) were first used for parenteral nutrition. Advantages such as reduction of irritation and/or toxicity of the drug loaded, high drug loading capacity, possibility of sustained release, targeting drug delivery to specific organs and industrial productivity make them appropriate drug carriers for poorly water soluble drugs.<sup>20</sup> The usefulness as drug delivery systems for drugs as propofol or lorazepam has been reported.<sup>21,22</sup>

Correspondence to: Beatriz Clares (Telephone: +34-958-243904; Fax: +34-958-248958; E-mail: beatrizclares@ugr.es)

This article contains supplementary material available from the authors upon request or via the Internet at <http://onlinelibrary.wiley.com/>.

Journal of Pharmaceutical Sciences

© 2013 Wiley Periodicals, Inc. and the American Pharmacists Association

All these excellent properties of LIEs make them an appropriate carrier for the intravenous administration of NYS. Unfortunately, emulsions are intrinsically unstable formulations and normally experience changes in droplet size and distribution. For this reason, the main factors associated with the obtaining LIEs with adequate physical stability are appropriate elaboration method and parameters related to the emulsification process.

Among emulsification techniques used in the elaboration of LIEs, sonication enables not only complete dispersion of the active ingredient in the emulsion, homogenization, and stabilization, but also direct emulsification, in which ultrasounds act as single source of energy.<sup>22</sup> This method could be used in a hospital pharmacy, because it is easy to elaborate, fast, cheap and it does not require a large investment in facilities.

To our knowledge, only a formulation reported by Semis et al.<sup>15</sup> incorporated NYS in a commercial LIE at a final concentration of 0.8 mg/mL using dimethyl sulfoxide (DMSO) as organic solvent. In this work, we avoid the use of DMSO because of its well-known toxicity after intravenous administration, and the potential allergic reactions because of egg lecithin. The amount of NYS loaded was also increased (1 mg/mL) improving its antifungal activity.

On the basis of these considerations, the major aim of the present study was the development, optimization, characterization, and evaluation of a new NYS-loaded LIE (NYS-LIE) formulation without DMSO for the treatment of systemic fungal infections.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Nystatin was purchased from Fagron Iberica (Barcelona, Spain). Purified and ultrarefined soybean oil for intravenous use (AarhusKarlshamn<sup>®</sup>) was kindly supplied by IMCD (Madrid, Spain). Purified soybean lecithin (Phospholipon<sup>®</sup> 90) was also a kind gift from Phospholipid GMBH (Köln, Germany). Bi-distilled glycerin for intravenous use was provided by Acofarma (Barcelona, Spain). Polyoxyethylene-660-12-hydroxy stearate (solutol HS<sup>®</sup> 15) was obtained from BASF (Tarragona, Spain). Milli-Q water for injection was self-produced (Millipore Iberica S.A.U., Madrid, Spain). High-performance liquid chromatography (HPLC)-grade methanol, N-dimethylformamide (DMF), acetonitrile, and DMSO were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Cellulose membranes (MWCO 12 Kda) were purchased from Iberlabo (Madrid, Spain). Synthetic medium RPMI-1640, obtained from Invitrogen (Madrid, Spain), and buffer 3-(*N*-morpholino)-propanesulphonic acid, obtained from Sigma–Aldrich (Madrid, Spain), were also utilized.

### Preparation of LIE

The soybean oil (oily phase) and the lecithin (surfactant) were heated under stirring (700 rpm) up to 90°C and the lecithin was dissolved. Independently, the aqueous phase, Milli-Q water, and glycerin were also heated up to 90°C. The aqueous phase was added to the oil phase, and after stabilizing at 90 ± 2°C, the mixture was submitted to successive cycles in a circuit system powered by a peristaltic pump (250 mL/min flow rate) and sonicated with a Branson sonifier 250 (Branson Ultrasonic Company, Danbury, Connecticut) at 75 ± 2°C. The mixture was ex-

**Table 1.** Independent Variables and Their Levels, the Lower (−1) and Upper (+1) Values for Each Variable

| Factors                                | Level             |                  |
|----------------------------------------|-------------------|------------------|
|                                        | Low Level (−1)    | High Level (+1)  |
| X <sub>1</sub> : Sonication time (min) | 30                | 50               |
| X <sub>2</sub> : Potency (W)           | 80                | 120              |
| X <sub>3</sub> : Neutralization        | During production | After production |

posed to different power levels and periods of time to evaluate the influence of these parameters.

For NYS-LIEs manufacturing process, accurately weighed NYS at a concentration of 1 mg/mL was mixed with solutol<sup>®</sup> HS 15 at two different rates, 2% and 4%, and homogenized in an Ultra-Turrax<sup>®</sup> T 25 Basic (IKA Werke, Staufen, Germany) at 3000 rpm for 15 min at 25°C. Then, it was added to 100 mL of optimized LIE and maintained in Ultra-Turrax again for 15 min at the same speed. The resulting volume was added to the rest of the sample up to 250 mL in the reactor and sonicated for 1 h at 80 W. Formulations were then labeled and equilibrated for 24 h to detect possible precipitation risk of drug before their use in subsequent studies.

### Optimization of LIE: Experimental Design

Three different factors and their influence on the LIE elaboration process were evaluated using two<sup>3</sup> full factorial design, composed of three variables set at two levels. The independent variables were: sonication time (X<sub>1</sub>), potency of sonication (X<sub>2</sub>), and neutralization (X<sub>3</sub>) with NaOH 0.1 M (final pH 7.5 ± 0.2). Mean droplet size (Z-ave), polydispersity index (PI), zeta potential (ZP), and distribution parameter LD<sub>99</sub> (laser diffraction volume diameter 99%) were the dependent variables. This design required a total of eight experiments performed in triplicate. For each factor, the lower and higher values of the lower and upper levels were represented by a (−1) and a (+1) sign, respectively, as summarized in Table 1. These were chosen on the basis of the tested lower and upper values for each variable according to preliminary experiments and literature research. A factorial design approach was applied to maximize the experimental efficiency requiring a minimum of experiments to optimize the LIE. To identify the significance of the effects and interactions among them, analysis of variance (M-ANOVA) was performed for each parameter. A value *p* < 0.05 was considered to be statistically significant. Data were analyzed using Statgraphics software version 5.1 (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, Virginia).

### Physicochemical Characterization

Physicochemical characterization of LIEs was carried out in terms of Z-ave and PI by photon correlation spectroscopy (PCS) with a Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, United Kingdom) after dilution in ultrapurified water to reduce opalescence at 25°C. ZP was also determined with the same device. It allows determining the electrophoretic mobility to assess the surface electrical charge of droplets after dilution in ultrapurified water by adjusting electrical conductivity (50 μS/cm) with sodium chloride solution (0.9%, w/v) at 25°C. pH values were also tested (without dilution) by a pH-meter Micro pH 2000 (Crison Instruments S.A., Barcelona,

Spain) to check the suitability for intravenous administration and detect potential hydrolysis of phospholipids.

Additionally, droplet size analysis of LIE formulations was performed by laser diffractometry (LD) using a Coulter LS 13 320 (Beckman Coulter, Fullerton, California) yielding the volume distribution of the droplets. For the LD analysis, the diameter 99% was used. For example, a LD<sub>99</sub> value indicates that 99% (volume distribution) of the measured droplets possess a diameter below the given value. All measurements were analyzed 24 h after preparation (*t*<sub>0</sub>) and subsequently recorded again after 3, 6, and 9 months. Values are reported as the mean of at least three values ± standard deviation (SD).

### Stability Under Storage

Lipid intravenous emulsions that exhibited the best physicochemical properties were selected for sterilization with a microclave P<sup>®</sup> Select (JP Selecta, Barcelona, Spain) 24 h after production, during 30 min at 121°C and 1.2 Kg/cm<sup>2</sup>, to determine whether the process affected the stability of the emulsions. Then, selected LIEs and their sterilized fractions were submitted up to 12 months of storage period (three additional months) at 30 ± 1°C and 4 ± 1°C in order to discriminate the best of them. In parallel, Z-ave and PI measurements of the commercial standardized emulsion were carried out. Intralipid<sup>®</sup> 20% (Fresenius Kabi, Uppsala, Sweden) is an intravenous oil-in-water emulsion of soybean oil (20%) emulsified with egg phospholipids (1.2%). The emulsion contains also glycerol as osmotic agent (2.25%) and water for injection.

On the contrary, the physical stability of four NYS-LIEs was determined by measuring the variation of the physicochemical parameters of samples stored at 30 ± 1°C and at 4 ± 1°C, for 1, 15, 30, and 60 days after preparation.

### Optical Characterization of the Stability

The stability of NYS-LIEs was assessed in triplicate by multiple light scattering using the Turbiscan<sup>®</sup> Lab (Formulation Company, L'Union, France). Undiluted samples (35 mL) were placed into cylindrical glass measuring cells that were completely scanned by a reading head. A pattern of the light flux as a function of the sample height was obtained giving a macroscopic fingerprint of the sample at a predetermined time. Measurements were performed after 30 days of storage at room temperature.

### Scanning Electron Microscopy

A JSM-840 Jeol scanning electron microscope with a ZT 1500 Cryo transfer system (Oxford Instruments, Tubney Woods Abingdon, Oxfordshire, UK) was used to characterize the interfacial structure of NYS-LIE 54 formulation. The emulsion samples were cryofixed by immersion in solid nitrogen slush (−210°C) and quickly transferred to a cryo-transfer system (−150°C) under vacuum pressure (1 kPa). The sample was fractured using a small punch precooled at −150°C. The fractured surface of the emulsion was introduced into the chamber of the microscope to be sublimated at −90°C in order to remove excess frost accumulation. Finally, the sample was coated with Au (0.2 kPa and 40 mA). After metallization, it was introduced into the microscope to be observed at 13 kV and working distance of 11 mm.

### Quantification of NYS (HPLC Analysis)

Nystatin was quantified using a HPLC validated previously<sup>14</sup> according international guidelines. Samples were taken from the top, middle, and the bottom of the tubes containing formulations and diluted (1:100) in methanol–DMF–water (55:15:30). Measures were performed in triplicate.

High-performance liquid chromatography assay was performed isocratically at room temperature. The system consisted of a Waters 515 pump (Waters, Milford, Massachusetts) with UV–Vis 2487 detector (Waters) set at 305 nm. A reverse-phase column (Kromasil 100, 5 μm, 15 × 0.46 cm<sup>2</sup>) with a flow rate of 0.8 mL/min was used. The mobile phase consisted of a mixture of 1% glacial acetic acid in acetonitrile–water (40:60, v/v). The injection volume was 50 μL and total run time was 8 min.

### Drug Release Studies

The release studies were performed using vertical Franz diffusion cells (FDC 400; Crown Glass, Somerville, New Jersey) with cellulose membranes (MWCO of 12 KDa) between the donor and the receptor compartment (12 mL), with an effective diffusional area of 2.54 cm<sup>2</sup>. The receptor chamber was filled with methanol–DMF–water (55:15:30, v/v/v), according to previous studies.<sup>13,14</sup> This receptor medium allowed keeping sink conditions in the whole experiment. Amounts of formulations equivalent to 1 mg of NYS were added to the donor compartment. The system was kept at 37 ± 0.5°C to mimic *in vivo* conditions and stirred continuously. Samples (200 μL) were withdrawn at selected time intervals for 76 h and replaced with the same volume of fresh receptor medium.

The concentration of the released drug was measured as described in section *Scanning Electron Microscopy*. Values are reported as the mean ± SD of the six replicates.

### Model Parameters.

Three different kinetic models (first order, Weibull, and Korsmeyer-Peppas) were used to fit the experimental data obtained from the release assay.

$$\%R_t/\%R_\infty = 1 - e^{-K \times t} \quad \text{First order} \quad (1)$$

$$\%R_t/\%R_\infty = 1 - e^{-(t/td)^\beta} \quad \text{Weibull's equation} \quad (2)$$

$$\%R_t/\%R_\infty = k \times t^n \quad \text{Korsmeyer - Peppas's equation} \quad (3)$$

where %*R*<sub>*t*</sub> is the percentage of drug released at time *t*, %*R*<sub>∞</sub> is the total percentage of drug released, %*R*<sub>*t*</sub>/%*R*<sub>∞</sub> is the fraction of drug released at time *t*, *K* is the release rate constant, and *n* is the diffusion release exponent. It could be used to characterize the different release mechanisms, *n* ≤ 0.43 (Fickian diffusion), 0.43 < *n* < 0.85 (anomalous transport), and ≥ 0.85 (case II transport; i.e., zero-order release); *td* is the time in which the 63.2% of the drug is released and β is the shape parameter.<sup>23</sup>

A nonlinear least-squares regression was performed using the WinNonLin<sup>®</sup> software (WinNonlin<sup>®</sup> Professional edition version 3.3; Pharsight Corporation, Sunnyvale, California), and the model parameters calculated. Also the Akaike's information criterion (AIC) was determined for each model as it is an indicator of the model's suitability for a given dataset.<sup>24</sup> The smaller the AIC value, the better the model adjusts the data. For the

model selection, the parameter accuracy, expressed as percentage coefficient of variation (%CV), and the residual distribution plots were also taken into account.

### Antimicrobiological Efficacy

Broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of NYS-LIE and free NYS for yeasts and moulds according to international guidelines.<sup>25,26</sup> *C. albicans* ATCC 10231 was first cultured on Sabouraud's dextrose agar (SDA) plates at 35°C for 24 h before testing. The inoculums were prepared by suspending colonies in sterile distilled water to achieve the desired density equivalent to the 0.5 McFarland standard and counted in a Neubauer chamber ( $1 - 5 \times 10^6$  Colony Forming Unit, CFU/mL). Working suspension was prepared diluting the standardized suspension in sterile distilled water (1:10) to transfer  $1 - 5 \times 10^5$  CFU/mL.

*Aspergillus fumigatus* ATCC 9197 was cultured on SDA at 25°C for 5 days before testing. The spores and mycelium were suspended in 1 mL of sterile 0.85% saline buffer. The resulting suspension was withdrawn, and the heavy particles were allowed to settle for 3–5 min. The upper homogeneous suspension was mixed for 15 s with a vortex mixer. The conidial suspension was adjusted to a concentration of  $2 \times 10^6$  CFU/mL.

A synthetic medium RPMI-1640 2% G (RPMI-1640 with glutamine, pH indicator, without bicarbonate and glucose 2%; w/v) was used as working culture. pH was adjusted to 7.0 with 1 M sodium hydroxide and the final solution filtered through a 0.22- $\mu$ m filter. Because the samples were not sterile, chloramphenicol was incorporated to RPMI (500  $\mu$ g/mL). This antibiotic does not inhibit the yeast or moulds growth.<sup>27</sup> Serial dilutions of RPMI-1640 double strength from 500 to 0.00762  $\mu$ g/mL were prepared for NYS-LIE. Equally, serial LIE without NYS was prepared to verify that the carrier did not interfere with the test. Free NYS solution in DMSO was used as reference antifungal. The final concentration of DMSO comprised less than 1% (v/v) of the total solution concentration used in the experiment.<sup>7</sup> Finally, 100  $\mu$ L of inoculum suspension was added to each well. MIC was determined after 48 h of incubation at 30°C. Readings were performed at  $\lambda = 595$  nm by a microdilution plate reader model 680 (Bio-Rad, Madrid, Spain).

## RESULTS AND DISCUSSION

### LIE Optimization

Lipid intravenous emulsions were optimized varying elaboration parameters based on dependent variables closely related

to the stability and safety after intravenous administration (Z-ave, PI, LD<sub>99</sub>, and ZP). Table 2 shows the observed responses. Three LIE replicates were prepared for each factor level.

Analysis of variance of the effect of factors on Z-ave values showed that neutralization was the only factor showing significant affectance on the droplet size ( $p < 0.0001$ ). The range of Z-ave values was  $237.5 \pm 2.67 - 258.5 \pm 2.98$  nm when neutralization was performed during preparation and  $225.7 \pm 3.29 - 266.1 \pm 2.53$  nm when carried out after processing. However, this variation was not relevant from a technological point of view because all measures are within an appropriate range for intravenous administration.

Polydispersity index is an important parameter in emulsion characterization showing the real difference in droplet size distribution as an evidence of the system stability. As regards to the effect of the assayed factors on PI, only neutralization had a significant effect ( $p < 0.05$ ). The lowest PI values were achieved when neutralization was carried out during preparation and ranged from 0.110 to 0.148.

Laser diffraction volume diameter 99% parameter expresses the droplet's volume distribution, which means that 99% of the measured particles are smaller than the values listed. It is a critical factor when the formulation is administrated intravenously. LD<sub>99</sub> parameter was used for the determination of particle aggregates that could not be detected by PCS. Results of the analysis showed that neutralization ( $p < 0.0001$ ) and time of exposure to ultrasound ( $p < 0.0095$ ) were found to be significant factors on this dependent variable. The lowest LD<sub>99</sub> values were achieved when neutralization was carried out during preparation (586–629 nm) and the exposure time was 50 min (780–825 nm).

The surface charge of the droplet is a parameter that determines the stability, when this charge is sufficiently large, the droplets are prevented from aggregation because of the repulsive electrical forces between approaching droplets. When the ZP is relatively high (25 mV or more, absolute value), the repulsive forces exceed the attractive London forces leading to enhanced stability. Neutralization process had also a significant effect on ZP. LIEs neutralized during the preparation process showed higher ZP values and ranged from  $-50.70$  to  $-45.18$  mV; in this way, neutralization would void free fatty acids and their decrease in pH, thus a potential decrease in ZP and ultimately instability.<sup>28</sup>

Finally, it was observed that ultrasound potency was not a determining factor on dependent variables.

Regarding the stability of LIEs, samples that were macroscopically altered in the course of the 9-month study

**Table 2.** Coded Values and Measured Responses of the Three Factors Depicted in Table 1 for the Eight Experiment LIE Runs

| Run  | ST (min) | Potency (W) | N   | Z-ave (nm) $\pm$ SD | PI $\pm$ SD      | LD <sub>99</sub> (nm) $\pm$ SD | ZP (mV) $\pm$ SD  |
|------|----------|-------------|-----|---------------------|------------------|--------------------------------|-------------------|
| LIE1 | 30       | 80          | NDE | 257.3 $\pm$ 2.95    | 0.112 $\pm$ 0.04 | 565.3 $\pm$ 5.27               | -50.70 $\pm$ 1.42 |
| LIE2 | 30       | 80          | NAE | 245.1 $\pm$ 3.13    | 0.206 $\pm$ 0.01 | 857.3 $\pm$ 7.54               | -46.45 $\pm$ 1.82 |
| LIE3 | 30       | 120         | NDE | 258.5 $\pm$ 2.98    | 0.176 $\pm$ 0.04 | 623.4 $\pm$ 1.86               | -45.18 $\pm$ 2.02 |
| LIE4 | 30       | 120         | NAE | 246.7 $\pm$ 2.98    | 0.189 $\pm$ 0.03 | 685.1 $\pm$ 1.87               | -40.89 $\pm$ 0.92 |
| LIE5 | 50       | 80          | NDE | 237.5 $\pm$ 2.67    | 0.110 $\pm$ 0.05 | 567.8 $\pm$ 4.09               | -46.77 $\pm$ 1.71 |
| LIE6 | 50       | 80          | NAE | 225.7 $\pm$ 3.29    | 0.265 $\pm$ 0.02 | 734.2 $\pm$ 3.91               | -41.39 $\pm$ 3.32 |
| LIE7 | 50       | 120         | NDE | 245.6 $\pm$ 1.86    | 0.148 $\pm$ 0.01 | 562.5 $\pm$ 2.01               | -46.44 $\pm$ 1.20 |
| LIE8 | 50       | 120         | NAE | 266.1 $\pm$ 2.53    | 0.255 $\pm$ 0.05 | 786.8 $\pm$ 1.98               | -44.76 $\pm$ 3.51 |

Values are reported as the mean ( $n = 3$ )  $\pm$  SD.

ST, sonication time; N, neutralization; NDE, neutralization during elaboration; NAE, neutralization after elaboration; Z-ave, mean droplet size; PI, polydispersity index; LD<sub>99</sub>, laser diffraction volume diameter 99%; and ZP, zeta potential.

**Table 3.** Physicochemical Results of the LIEs Stored for 12 Months at  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 

| Run  | $T$ ( $^\circ\text{C}$ ) | AC  | Z-ave (nm)       | PI               | LD <sub>99</sub> (nm) | pH              | ZP (mV)           |
|------|--------------------------|-----|------------------|------------------|-----------------------|-----------------|-------------------|
| LIE3 | 4                        | No  | 230.0 $\pm$ 2.32 | 0.213 $\pm$ 0.03 | 898.2 $\pm$ 1.09      | 6.57 $\pm$ 0.11 | -39.57 $\pm$ 3.32 |
| LIE3 | 4                        | Yes | 229.2 $\pm$ 1.86 | 0.206 $\pm$ 0.01 | 877.5 $\pm$ 3.91      | 6.46 $\pm$ 0.14 | -37.98 $\pm$ 1.24 |
| LIE5 | 4                        | No  | 223.3 $\pm$ 1.87 | 0.173 $\pm$ 0.01 | 651.2 $\pm$ 1.86      | 7.50 $\pm$ 0.15 | -45.19 $\pm$ 1.20 |
| LIE5 | 4                        | Yes | 231.2 $\pm$ 3.90 | 0.176 $\pm$ 0.02 | 642.8 $\pm$ 2.01      | 7.41 $\pm$ 0.23 | -44.24 $\pm$ 3.51 |
| LIE3 | 30                       | No  | 237.9 $\pm$ 3.29 | 0.199 $\pm$ 0.01 | 738.5 $\pm$ 1.86      | 6.62 $\pm$ 0.13 | -39.65 $\pm$ 2.71 |
| LIE3 | 30                       | Yes | 239.6 $\pm$ 1.66 | 0.205 $\pm$ 0.03 | 695.5 $\pm$ 2.01      | 6.40 $\pm$ 0.24 | -38.46 $\pm$ 1.36 |
| LIE5 | 30                       | No  | 229.0 $\pm$ 2.72 | 0.175 $\pm$ 0.11 | 654.3 $\pm$ 1.98      | 7.37 $\pm$ 0.05 | -45.18 $\pm$ 1.80 |
| LIE5 | 30                       | Yes | 234.6 $\pm$ 1.45 | 0.179 $\pm$ 0.02 | 639.1 $\pm$ 2.98      | 7.34 $\pm$ 0.1  | -44.37 $\pm$ 2.75 |

Values are reported as the mean ( $n = 3$ )  $\pm$  SD.

AC, autoclaved; Z-ave, mean droplet size; PI, polydispersity index; LD<sub>99</sub>, laser diffraction volume diameter 99%; and ZP, zeta potential.

(e.g., broken or cremated emulsions) were discarded. In this way, samples that were neutralized during elaboration process showed in general better stability properties. Statistically significant differences were found for PI values throughout the study, increasing as time progressed among samples neutralized after elaboration (LIE2, LIE4, LIE6, and LIE8). On the contrary, samples neutralized during elaboration showed PI values in acceptable limits for parenteral use  $\leq 0.250$ .<sup>29</sup> As results demonstrated, neutralization methodology is a critical factor affecting LIE stability.

Furthermore, statistically significant differences were observed in LD<sub>99</sub> values among assayed LIEs, but none of the samples at the end of 9 months exceeded the given limit value and ranged between 729 and 938 nm. The maximum LD<sub>99</sub> value was set at 1  $\mu\text{m}$ ; this guaranteed that the volume of the droplets was even small enough to prevent any potential vascular injury.

Lipid intravenous emulsion 3 and LIE5 were the formulations that showed the best physicochemical results and thus were selected for further stability studies. In this way, as it is shown in Table 3, both formulations (sterilized and nonsterilized) were submitted to a 12-month stability study at two temperatures, from which LIE5 was finally selected as the best formulation for further stages, based on its stability results scarcely but better than LIE 3.

Intralipid<sup>®</sup> 20% emulsion is normally used for parenteral nutrition and its composition is very similar to LIE5 (20% soybean oil, 2% soybean phospholipids, 2.25% glycerin, and water for injection). Both vehicles were characterized in terms of Z-ave and PI for 12-month storage at two temperatures. Table 4 shows the

results of the paired  $t$ -test used to compare those parameters. No significant differences were found between commercial and novel vehicle in terms of time or temperature. Hence, it can be observed that the replacement of egg lecithin for soy lecithin did not modify the physical stability of the formulations. This substitution could be interesting as lecithin derived from egg yolk could cause allergic reactions in some patients.

#### NYS-Loaded LIEs

Four different formulations were prepared by adding 1 mg/mL of NYS to LIE5. Compositions of these NYS-LIEs are reported in Table 5. To facilitate the incorporation of the drug, a predispersion of NYS in solutol HS<sup>®</sup> 15 was performed at final concentration of 2% and 4%. Solutol HS<sup>®</sup> 15 is an amphiphilic, nonionic surfactant, with potent emulsifying ability and was chosen because of its physiological compatibility with intravenous application. According to the procedure reported by Semis et al.,<sup>15</sup> the NYS-loading process into the emulsion required DMSO and a prolonged agitation period. We have managed to overcome these drawbacks by incorporating solutol HS<sup>®</sup> 15, allowing a rapid NYS inclusion at higher concentration (1 mg/mL). Moreover and because of the poor water solubility of NYS, LIE5 was prepared at 20% and 30% of oily phase (soybean oil).

After 24 h and 60 days after preparation, pH values of the unloaded LIEs and NYS-LIE formulations ranged from 7.11 to 7.53; ZP values from -46 to -44 mV; and LD<sub>99</sub> values between 580 and 670 nm. These parameters remained almost constant for 60 days (data not shown). M-ANOVA demonstrated

**Table 4.** Changes in Z-ave and Mean PI of the Developed LIE and the Commercially Available Intralipid<sup>®</sup> 20%

| Time       | $T$ ( $^\circ\text{C}$ ) | LIE5             |                  | Intralipid <sup>®</sup> 20% |                  | PI $p$ Value | Z-ave $p$ Value |
|------------|--------------------------|------------------|------------------|-----------------------------|------------------|--------------|-----------------|
|            |                          | Z-ave (nm)       | PI               | Z-ave (nm)                  | PI               |              |                 |
| 24 h       | 30                       | 237.5 $\pm$ 2.11 | 0.108 $\pm$ 0.08 | 213.3 $\pm$ 2.98            | 0.105 $\pm$ 0.02 | 0.561        | 0.557           |
| 3 Months   | 30                       | 220.2 $\pm$ 3.30 | 0.116 $\pm$ 0.04 | 229.6 $\pm$ 2.53            | 0.124 $\pm$ 0.03 | 0.476        | 0.554           |
| 6 Months   | 30                       | 236.0 $\pm$ 3.77 | 0.136 $\pm$ 0.01 | 222.2 $\pm$ 1.92            | 0.153 $\pm$ 0.08 | 0.256        | 0.604           |
| 9 Months   | 30                       | 215.4 $\pm$ 4.00 | 0.162 $\pm$ 0.04 | 243.7 $\pm$ 5.27            | 0.157 $\pm$ 0.02 | 0.414        | 0.390           |
| 12 Months  | 30                       | 234.4 $\pm$ 3.29 | 0.169 $\pm$ 0.05 | 240.3 $\pm$ 7.54            | 0.171 $\pm$ 0.04 | 0.748        | 0.579           |
| 3 Months   | 4                        | 228.5 $\pm$ 2.35 | 0.116 $\pm$ 0.01 | 237.9 $\pm$ 3.90            | 0.119 $\pm$ 0.01 | 0.561        | 0.527           |
| 6 Months   | 4                        | 239.1 $\pm$ 3.54 | 0.139 $\pm$ 0.02 | 241.0 $\pm$ 4.09            | 0.143 $\pm$ 0.04 | 0.369        | 0.478           |
| 9 Months   | 4                        | 229.4 $\pm$ 2.32 | 0.157 $\pm$ 0.01 | 247.5 $\pm$ 3.91            | 0.164 $\pm$ 0.02 | 0.144        | 0.375           |
| 12 Months  | 4                        | 226.0 $\pm$ 1.86 | 0.170 $\pm$ 0.02 | 239.6 $\pm$ 1.86            | 0.169 $\pm$ 0.07 | 0.711        | 0.698           |
| $p$ Values |                          | 0.735            | 0.410            | 0.168                       | 0.533            |              |                 |

Column  $p$  value indicates the significance of the PI and Z-ave, mean droplet size differences for each time point, respectively. File  $p$  value indicates the significance of the PI and Z-ave differences within all time points and temperatures.

**Table 5.** Nystatin-Loaded Lipid Intravenous Emulsions Composition (% w/v)

| Formulation | Nystatin | Solutol HS® 15 | Soybean Oil | Soybean Lecithin | Glycerol | Water |
|-------------|----------|----------------|-------------|------------------|----------|-------|
| NYS-LIE51   | 0.1      | 2              | 20          | 2                | 2.25     | 73.65 |
| NYS-LIE52   | 0.1      | 4              | 20          | 2                | 2.25     | 71.65 |
| NYS-LIE53   | 0.1      | 2              | 30          | 2                | 2.25     | 63.65 |
| NYS-LIE54   | 0.1      | 4              | 30          | 2                | 2.25     | 61.65 |

**Table 6.** Changes in Z-ave and PI of Unloaded LIE and NYS-LIE

| Formulation  | Storage (Days) | T (°C)       | Z-ave (nm)   | PI           |
|--------------|----------------|--------------|--------------|--------------|
| Unloaded LIE | 0              | 30           | 236.0 ± 1.25 | 0.108 ± 0.06 |
|              |                | 30           | 220.5 ± 1.92 | 0.105 ± 0.08 |
|              | 15             | 4            | 209.8 ± 2.32 | 0.115 ± 0.03 |
|              |                | 30           | 226.0 ± 5.27 | 0.130 ± 0.02 |
|              | 30             | 4            | 220.5 ± 1.86 | 0.124 ± 0.03 |
|              |                | 30           | 225.4 ± 7.54 | 0.128 ± 0.04 |
| NYS-LIE51    | 0              | 30           | 192.5 ± 2.32 | 0.170 ± 0.03 |
|              |                | 30           | 203.5 ± 3.64 | 0.186 ± 0.05 |
|              | 15             | 4            | 187.7 ± 3.90 | 0.136 ± 0.06 |
|              |                | 30           | 201.9 ± 2.95 | 0.178 ± 0.02 |
|              | 30             | 4            | 177.1 ± 4.09 | 0.215 ± 0.01 |
|              |                | 30           | 212.0 ± 3.13 | 0.215 ± 0.07 |
| NYS-LIE52    | 0              | 30           | 181.0 ± 1.47 | 0.158 ± 0.03 |
|              |                | 30           | 183.5 ± 1.86 | 0.149 ± 0.04 |
|              | 15             | 4            | 182.3 ± 2.43 | 0.143 ± 0.04 |
|              |                | 30           | 179.7 ± 2.01 | 0.140 ± 0.05 |
|              | 30             | 4            | 177.3 ± 2.98 | 0.134 ± 0.05 |
|              |                | 30           | 201.7 ± 1.98 | 0.193 ± 0.02 |
| NYS-LIE53    | 0              | 30           | 158.2 ± 1.62 | 0.149 ± 0.05 |
|              |                | 30           | 160.8 ± 2.60 | 0.134 ± 0.02 |
|              | 15             | 4            | 162.7 ± 3.29 | 0.148 ± 0.01 |
|              |                | 30           | 215.7 ± 2.67 | 0.204 ± 0.02 |
|              | 30             | 4            | 164.0 ± 1.86 | 0.151 ± 0.04 |
|              |                | 30           | 161.1 ± 3.29 | 0.203 ± 0.07 |
| NYS-LIE54    | 0              | 30           | 143.0 ± 1.50 | 0.135 ± 0.02 |
|              |                | 30           | 163.4 ± 2.98 | 0.150 ± 0.03 |
|              | 15             | 4            | 144.6 ± 2.11 | 0.147 ± 0.04 |
|              |                | 30           | 169.4 ± 3.65 | 0.147 ± 0.02 |
|              | 30             | 4            | 145.0 ± 2.35 | 0.144 ± 0.02 |
|              |                | 30           | 133.7 ± 5.86 | 0.158 ± 0.05 |
| 60           | 4              | 141.1 ± 3.30 | 0.158 ± 0.08 |              |

Values are reported as the mean ( $n = 3$ ) ± SD.

that formulation composition ( $p < 0.01$ ) and the storage time ( $p = 0.0152$ ) had significant effect on Z-ave. Despite these significant differences between 24 h and 60 days, these were small among NYS-LIEs, as can be seen in Table 6. The incorporation of NYS in solutol HS® 15 decreased Z-ave significantly. It has been hypothesized that apart from the emulsion structure and composition, the incorporated drug participates in the microstructure of the system and may influence it because of molecular interactions, especially if the drug possesses amphiphilic and/or mesogenic properties.<sup>30</sup>

But NYS was incorporated by means of the cosurfactant solutol HS® 15; the effect of this addition on Z-ave is clear. When NYS-LIEs was compared with the same percentage of oil phase (e.g., NYS-LIE51 and NYS-LIE52 or NYS-LIE53 and

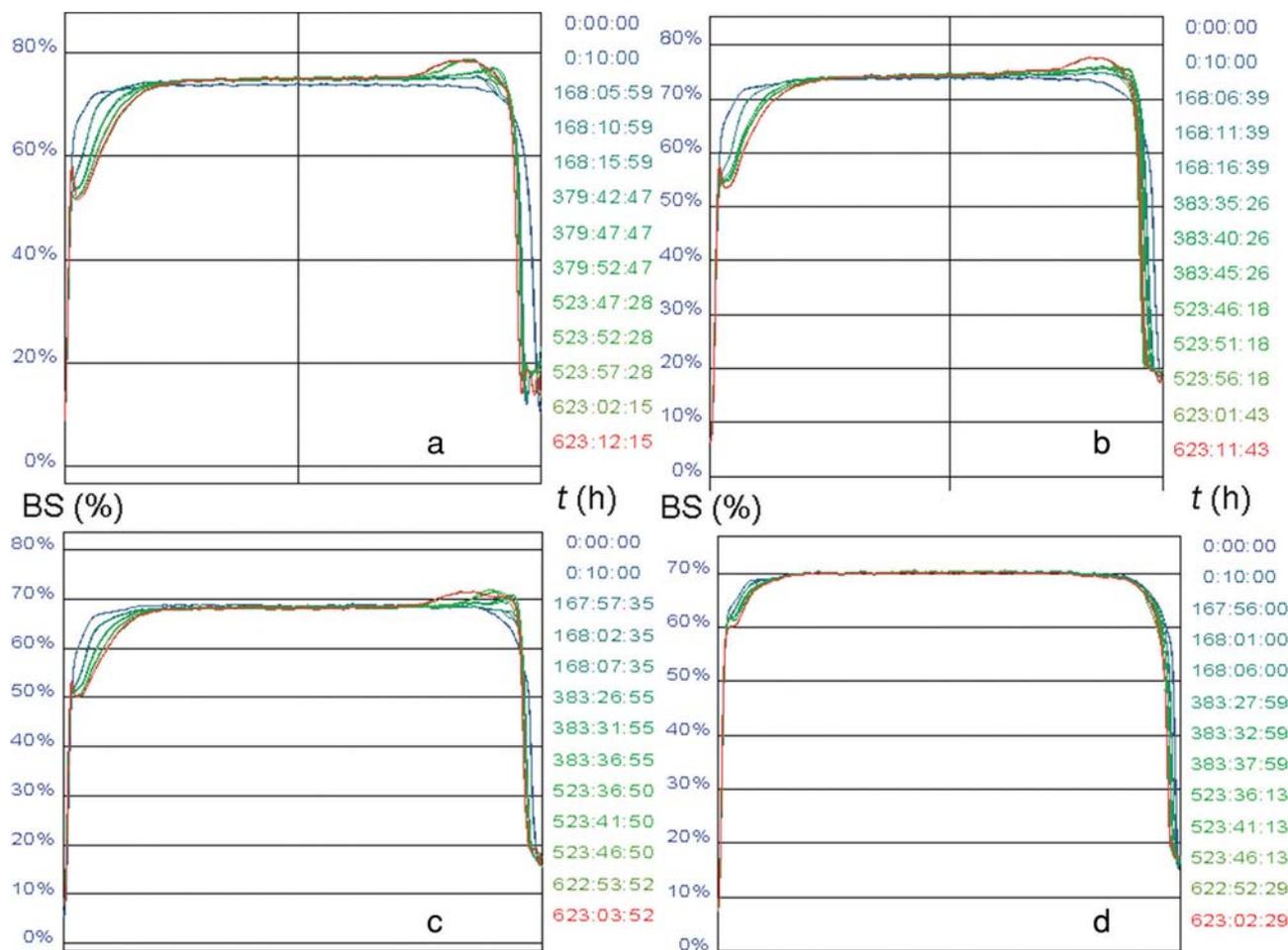
NYS-LIE54), the increase of solutol HS® 15 content implied a decrease of Z-ave.

Polydispersity index values remained between 0.105 and 0.215 in the course of the study. NYS-LIE54 and unloaded-LIE exhibited lower data dispersion than the rest of formulations, and thus more uniform droplet size distribution, highly recommended for emulsions development indicating good stability. Although the storage temperature was found to be a significant factor affecting the PI ( $p = 0.0117$ ), differences were small, ranging from 0.14 to 0.16, for 4°C and 30°C, respectively. Finally, significant differences of PI were also observed when storage time was compared ( $p = 0.0026$ ), a slight increase in PI was observed over time. As in the case of storage temperature, differences found in different days were within the preestablished threshold for PI ( $\leq 0.25$ ).

#### Optical Stability Assays for NYS-LIE

Turbiscan® Lab is considered as a device that predicts the stability, being able to detect the sample destabilization faster than other conventional techniques (microscopy, spectroscopy, turbidity, and particle size analysis). Moreover, it provides real-time information on the destabilization process. When sedimentation process is produced, a backscattering increase versus time at the bottom of the sample is observed. When the sample suffers a creaming process, an increase of backscattering versus time on the top of the vial is observed. If the destabilization phenomenon occurs because of particle aggregation, a backscattering increase versus time can be observed over the whole height of the sample.<sup>31</sup> If backscattering profiles have a deviation of at least ±2%, it can be considered that there are no significant variations on particle size. Variations up to ±10% indicate instable formulations.

Figure 1 shows the backscattering profiles of the four NYS-LIEs, corresponding to the measurements on different days: 1, 7, 15, 21, and 26 after production. 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 of the vial. As time passed, a decrease in backscattering at the bottom of the vial and an increase at the top of the vial could be observed, corresponding to an incipient creaming process. Moreover, a little backscattering peak appeared at the bottom. When the vial was observed at naked eye after 24 h, it could be seen a little yellow sediment easy to disperse, which could correspond to NYS sedimentation. This sediment was observed in NYS-LIE51, NYS-LIE 52, and NYS-LIE53. It was inexistent in NYS-LIE54. In our study, a predispersion of solutol HS® 15 and NYS was performed, obtaining a nistatin suspension, which was resistant to drug precipitation. When the predispersion was incorporated to the final emulsion (NYS-LIE54), it allowed NYS to be dissolved in the resulted emulsion. The precipitate was separated and analyzed for NYS quantification, Z-ave, PI, and LD<sub>99</sub>. Results showed that NYS percentages were  $35.48 \pm 3.95\%$ ,  $31.25 \pm 3.73\%$ , and  $14.61 \pm 4.02\%$ ,



**Figure 1.** Turbiscan analysis of nystatin-loaded lipid intravenous emulsions (NYS-LIEs) at room temperature. Backscattering (BS), %, versus time ( $t$ ), h. Panel a: NYS-LIE51; panel b: NYS-LIE52; panel c: NYS-LIE53; and panel d: NYS-LIE54.

respectively. These values decreased as the oily phase increased. Z-ave values ranged from  $104.7 \pm 2.63$  to  $115.18 \pm 5.78$  nm, PI ranged from  $0.107 \pm 0.01$  to  $0.118 \pm 0.04$ , and  $LD_{99}$  ranged from  $325 \pm 6.29$  to  $376 \pm 2.43$  nm, indicating smaller drop sizes and a decrease of size distribution.

On the contrary, NYS-LIE54 (30% oil phase and 4% cosurfactant) was proposed to be the most stable confirming the results obtained in section *NYS-loaded LIEs*. Its Z-ave and PI remained almost constant along the study and no evidence of creaming or NYS precipitation were detected.

#### Morphological Analysis

After 30 days of storage, the freeze fracture–scanning electron microscopy images of NYS-LIE 54 revealed almost spherical-shaped droplets in the submicron size range, with the narrowest droplet size distribution. The macroscopic appearance and consistency suggested that emulsion remained stable. Microphotograph is available in the Supporting Information.

#### Quantification of NYS Within LIE

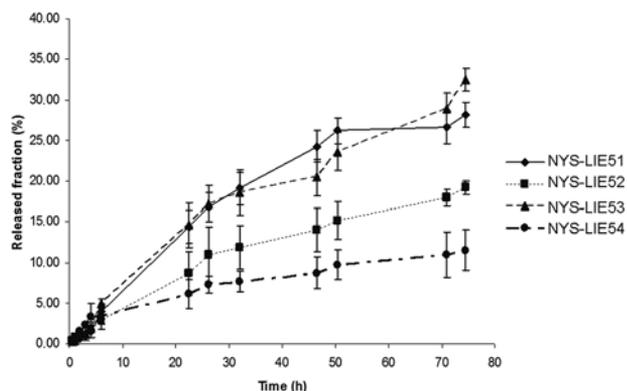
In all cases, the drug content, 24 h after preparation, was at least  $98 \pm 1.5\%$ . One month after NYS-LIE51–53 elaboration, the drug content at the top of the container decreased (range 68%–81%). On the contrary, the drug content at the bottom increased (range 123%–142%), confirming the results observed

in optical analysis. Drug content in emulsion NYS-LIE 54 remained almost constant along the vial up to the end of the study.

#### Release Studies

In the designing of colloidal drug-carrier formulations, the study of the rate at which the drug is released from the vehicle is particularly important, because it can be used as quality control data to predict *in vivo* behavior, or to study the structure and release mechanism of the system. Previous studies<sup>13,14</sup> demonstrated the ability of the mixture methanol–DMF–water (55:15:30, v/v/v) to maintain sink conditions in NYS release experiments and excellent compatibility with cellulose membranes. Figure 2 shows NYS release profiles from their respective emulsions ( $n = 6$ ) at  $37^\circ\text{C}$  for 76 h. The maximum amount of NYS release at the end of the experiment ( $\%R_\infty$ ) is relatively small; NYS-LIE51 and 53 exhibited similar release rates, followed by NYS-LIE52, and finally NYS-LIE54.

This pattern could be explained by the formulation ingredients. Solutol HS<sup>®</sup> 15 was at concentration of 2% in NYS-LIE51 and 53, and 4% in NYS-LIE52 and 54. Higher surfactant concentration would prolong the NYS residence time in the emulsion droplets, decreasing the drug release rate. According to results reported above, it has been demonstrated that an increase of the oil phase up to 30% in NYS-LIE54 enhanced its



**Figure 2.** Release profiles of NYS-LIEs ( $n = 6$ ) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 76 h.

stability and could have a synergic effect with the augmentation of surfactant.

In order to ascertain the drug release mechanism from the elaborated emulsions, three kinetic models were fitted to experimental data: first-order equation (Eq. 1, Weibull's equation (Eq. 2, and Korsmeyer-Peppas equation (Eq. 3. The best model was selected based on the lowest AIC value. The precision of the biopharmaceutical parameters was expressed as %CV and the distribution of the residuals were also taken into account. The release parameters of the prepared emulsions are depicted in the Supporting Information. NYS release from LIE51 followed the Weibull's equation; it has been typically considered as an empirical equation, in which the value of the exponent  $\beta$  has been proposed as indicator of the mechanism of diffusion release.<sup>32</sup> The value 1.36 corresponds to a sigmoid curve-like indicative of a complex release mechanism. This fact was confirmed by the release exponent  $n$  of the Korsmeyer-Peppas's equation with a value of 0.67, being indicative of anomalous transport. NYS-LIE52 and 53 exhibited a first-order kinetic release with slow release constants, 0.021 and 0.018  $\text{h}^{-1}$ , respectively; but this difference did not result as significant ( $p > 0.05$ ). First-order model means that drug release from emulsion followed a concentration gradient pattern, based on the first Fick's law, where the released amounts are directly proportional to the amounts remaining in the dosage form offering sustained release of drug. As in the case of NYS-LIE51, when release exponent  $n$  of Korsmeyer-Peppas's equation was calculated, the anomalous transport could be responsible of NYS release in both cases. Anomalous transport has been classically attributed to a combination of diffusion and erosion in solid matrixes,<sup>33</sup> but little is known in emulsions. Most authors have attributed the anomalous transport to surfactant phase transitions, such as the formation of lamellar or cubic phases.<sup>34</sup> Finally, NYS-LIE54 exhibited a release exponent  $n$  equal to 0.5. At this point, the Korsmeyer-Peppas's equation is equivalent to Higuchi's square root of time equation and is indicative of a diffusion-controlled release.<sup>33</sup> Higuchi release model assumes a steady-state diffusion of nondegradable systems when the drug is uniformly dispersed throughout the matrix. Therefore, a controlled release was only achieved by NYS-LIE54, which was also the formulation that exhibited the best stability.

### Microbiological Studies

The broth microdilution method was used to assess the *in vitro* antifungal activity of NYS-LIEs against strain of yeast

*C. albicans* ATCC 10231 and *A. fumigatus* ATCC 9197. Lipid emulsion excipients showed no inhibitory effect on the yeast grown, proving that the excipients did not interfere the test. MIC values of NYS-LIEs were lower than free NYS (0.3906  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); these values suggested that lipid emulsion enhanced the antimicrobial activity of NYS and its efficacy. In the case of *C. albicans*, NYS-LIE51 and 53 showed slightly lower MIC values (0.3882  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , both) but were not statistically significant compared with free NYS. On the contrary, NYS-LIE52 and 54 showed approximately two-fold lower MIC values than free NYS (0.2441  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , both). These emulsions contained greater proportion of solutol HS<sup>®</sup> 15 (4%) in contrast to other two formulations (containing 2%). As stated previously, solutol HS<sup>®</sup> 15 is a cotensoactive, which apart from the stability improvement of the formulation might allow the system to provide better interaction with the fungi membrane, and thus decrease the MIC value and increase the potency of the drug. The two-fold MIC reduction is in agreement with the study reported by Semis et al.<sup>15</sup>

When *A. fumigatus* was tested, a strong efficacy increase was observed. According to results, the MIC value for *Aspergillus* was approximately two times lower when NYS was introduced within the emulsion (3.906  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , all) compared with free NYS (6.250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). In this case, there were no significant differences among different emulsions, and thus the proportion of solutol HS<sup>®</sup> 15 does not seem to have a direct relationship with the LIE efficacy.

A comparison between MIC values obtained in this study with those reported by other authors was difficult, because of the variance of protocols, strains, and culture medium used, which could lead to MIC values modification.

The pronounced MIC reduction found in *Aspergillus*, in contrast to *Candida*, could be because of the different ergosterol content in these microorganisms. According to NYS antifungal mechanism (by binding to membrane ergosterol), the results obtained in this study could be attributed to the higher ergosterol content in *Aspergillus* membranes.

The enhancement of antifungal activity of NYS, when vehiculated in a lipid-based formulation, compared with free NYS, was previously reported,<sup>13–15</sup> confirming the necessity to formulate NYS in lipid-based system to improve its efficacy.

### CONCLUSIONS

A stable LIE was successfully developed. This formulation exhibited a small Z-ave and PI when neutralized during the emulsification process. LD<sub>99</sub> values showed no aggregation, being appropriate for intravenous administration. The in-house low-scale production gave equivalent results to the commercially available emulsion Intralipid<sup>®</sup> 20%. The incorporation of NYS in the emulsion was successfully achieved by the addition of Solutol HS<sup>®</sup> 15 at 4% and the increase of the oil phase to 30%, resulting in a stable formulation with Z-ave and PI values lower than unloaded emulsion. The drug release followed a controlled-diffusion mechanism according to Higuchi's equation. The incorporation of NYS in the lipid-based formulation improved the antifungal efficacy by the reduction of MIC value of *C. albicans* and *A. fumigatus*. This vehicle had an adequate technological and biopharmaceutical profile, being a promising, low-cost NYS delivery system for invasive fungal infection treatments.

## ACKNOWLEDGEMENT

Authors are thankful to Dr. María Elena Mercadé and Dr. Nuria Bozal for their support in antimicrobial studies.

## REFERENCES

- Pemán J, Salavert M. 2012. General epidemiology of invasive fungal disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 30:90–98.
- Pfaller MA, Diekema DJ. 2010. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 36:1–53.
- Zhang AY, Camp WL, Elewski BE. 2007. Advances in topical and systemic antifungals. *Dermatol Clin* 25:165–183.
- Asmundsdóttir LR, Erlendsdóttir H, Haraldsson G, Guo H, Xu J, Gottfredsson M. 2008. Molecular epidemiology of candidemia: Evidence of clusters of smoldering nosocomial infections. *Clin Infect Dis* 47:17–24.
- Kaur IP, Kakkar S. 2010. Topical delivery of antifungal agents. *Expert Opin Drug Deliv* 7:1303–1327.
- Coutinho A, Prieto M. 2003. Cooperative partition model of nystatin interaction with phospholipid vesicles. *Biophys J* 84:3061–3078.
- Ellepola AN, Samaranyake LP. 1999. The *in vitro* post-antifungal effect of nystatin on *Candida* species of oral origin. *J Oral Pathol Med* 28:112–116.
- Gunderson SM, Hoffman H, Ernst EJ, Pfaller MA, Klepser ME. 2000. *In vitro* pharmacodynamic characteristics of nystatin including time-kill and postantifungal effect. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2887–2890.
- Croy SR, Kwon GS. 2004. The effects of Pluronic block copolymers on the aggregation state of nystatin. *J Control Release* 95:161–171.
- Llabot JM, Manzo RH, Allemandi DA. 2002. Double-layered mucoadhesive tablets containing nystatin. *AAPS PharmSciTech* 3:E22.
- Sakeer K, Al-Zein H, Hassan I, Desai S, Nokhodchi A. 2010. Enhancement of dissolution of nystatin from buccoadhesive tablets containing various surfactants and a solid dispersion formulation. *Arch Pharm Res* 33:1771–1779.
- Ng AW, Wasan KM, Lopez-Berestein G. 2003. Development of liposomal polyene antibiotics: An historical perspective. *J Pharm Pharm Sci* 6:67–83.
- Fernández Campos F, Calpena Campmany AC, Rodríguez Delgado G, López Serrano O, Clares Naveros B. 2012. Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: Ultrastructural effects and release studies. *J Pharm Sci* 101:3739–3752.
- Fernández-Campos F, Clares Naveros B, López Serrano O, Alonso Merino C, Calpena Campmany AC. 2012. Evaluation of novel nystatin nanoemulsion for skin candidosis infections. *Mycoses* 56:70–81.
- Semis R, Polacheck I, Segal E. 2010. Nystatin-intralipid preparation: Characterization and *in vitro* activity against yeasts and molds. *Mycopathologia* 169:333–341.
- El-Ridy MS, Abdelbary A, Essam T, El-Salam RM, Kassem AA. 2011. Niosomes as a potential drug delivery system for increasing the efficacy and safety of nystatin. *Drug Dev Ind Pharm* 37:1491–1508.
- Martín-Villena MJ, Fernández-Campos F, Calpena-Campmany AC, Bozal-de Febrer N, Ruiz-Martínez MA, Clares-Naveros B. 2013. Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: Development and characterization. *Carbohydr Polym* 94:1–11.
- Pál S, Nagy S, Bozó T, Kocsis B, Dévay A. 2013. Technological and biopharmaceutical optimization of nystatin release from a multi-particulate based bioadhesive drug delivery system. *Eur J Pharm Sci* 49:258–264.
- Arikan S, Ostrosky-Zeichner L, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Gordon D, Wallace T, Rex JH. 2002. *In vitro* activity of nystatin compared with those of liposomal nystatin, amphotericin B, and fluconazole against clinical candida isolates. *J Clin Microbiol* 40:1406–1412.
- Shi S, Chen H, Lin X, Tang X. 2010. Pharmacokinetics, tissue distribution and safety of cinnarizine delivered in lipid emulsion. *Int J Pharm* 383:264–270.
- Han J, Davis SS, Washington C. 2001. Physical properties and stability of two emulsion formulations of propofol. *Int J Pharm* 215:207–220.
- Medina J, Salvadó A, del Pozo A. 2001. Use of ultrasound to prepare lipid emulsions of Lorazepam for intravenous injection. *Int J Pharm* 216:1–8.
- Costa P, Sousa JM. 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci* 13:123–133.
- Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. 1978. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J Pharmacokinetic Biopharm* 6:165–175.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards—NCCLS. 1998. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-P. Wayne, Pennsylvania: NCCLS.
- Rodríguez-Tudela JL, Arendrup MC, Barchiesi F, Bille J, Chrysanthou E, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Denning DW, Donnelly JP, Dromer F, Fegeler W, Lass-Flörl C, Moore C, Richardson M, Sandven P, Velegriaki A, Verweij P. 2008. EUCAST definitive document EDef 7.1: Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 14:398–405.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White