


ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
DISULFIRAM COMO AGENTE ANTIMICROBIANO
DE USO TÓPICO

TESIS DOCTORAL

Maria Lajarin Reinares

Departament de Genètica i de Microbiologia
Universitat Autònoma de Barcelona
2023

Tesis doctoral

**EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
DISULFIRAM COMO AGENTE ANTIMICROBIANO
DE USO TÓPICO**

Memoria de Tesis presentada por

Maria Lajarin Reinares

Para optar al Grado de

Doctora en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Tesis realizada bajo la dirección de

Dr. Francisco
Fernández Campos

Dra. Montserrat
Llagostera i Casas

Dra. M^a dels Àngels
Calvo Torras

Tutora académica
Dra. Assumpció Bosch Merino

Este proyecto de investigación se ha elaborado en colaboración con la empresa Laboratorios Reig Jofre en el plan de doctorados industriales, convocatoria DI2020.



Generalitat de Catalunya
Departament d'Empresa i Coneixement
Secretaria d'Universitats i Recerca

Responsable del proyecto en la empresa: Elisabet Rosell



*Para mis padres, por apoyarme en todo siempre.
Para Ademir; eres la luz que se cuele entre las grietas.*

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Esta tesis doctoral se ha realizado gracias al financiamiento de las siguientes instituciones y empresas:

- Beca de Doctorat Industrial concedida por la Agencia de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) del Departament d'Empresa i Coneixament de la Generalitat de Catalunya (2020 DI 97).
- Departament d'Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya.
- La empresa Laboratorios Reig Jofre, Sant Joan Despí, Barcelona.
- Y a la Universitat Autònoma de Barcelona.

Juntamente con la colaboración de muchas personas que han hecho que esta tesis llegara donde ha llegado.

No sabéis lo difícil que me resulta escribir estas líneas porque significa que esto se acaba y no sé si sabré poner punto final. La realización de esta tesis no ha sido un camino lineal, incluso a veces con demasiadas curvas, pero se llega al final con una mochila llena de aprendizajes y recuerdos con personas que hasta el final van contigo.

Quería empezar dando las gracias a todos los que han hecho posible el desarrollo de este proyecto de doctorado industrial entre los laboratorios Reig Jofre y la Universitat Autònoma de Barcelona.

La primera vez que entré en contacto con la galénica fue en el 2020, con el trabajo de final de máster, donde con la ayuda del Dr. Eloy Pena Rodríguez y el Dr. Francisco Fernández Campos, entendí la base de esta extensa disciplina y cómo de importante era su aplicación en el día a día de una empresa farmacéutica. Gracias de corazón a ambos por transmitirme vuestros conocimientos y empujarme a encontrar las fuerzas necesarias para realizar esta tesis.

Al Dr. Francisco Fernández, te quiero agradecer muy especialmente la oportunidad que me diste para empezar este proyecto. Muchas gracias por todo la ayuda que me has brindado, comprensión y paciencia. Gracias por todo lo que me has enseñado en biofarmacia y farmacocinética y, sobre todo, gracias por confiar en mí.

A la Dra. Montserrat Llagostera y Dra. Maria dels Àngels Calvo, muchas gracias por vuestro apoyo en el desarrollo de la tesis, por introducirme en el mundo de la microbiología y darme la oportunidad de conocer mejor esta disciplina. Habéis hecho fácil que pudiera conciliar las tareas entre la universidad y la empresa, aún con todas las dificultades que esto conlleva.

A todos los compañeros de Reig Jofre o que han formado parte del laboratorio durante estos últimos 3 años y con los que he tenido la oportunidad de trabajar y compartir

grandes momentos. Ha sido una suerte coincidir con gente tan bonita que me han ayudado tanto, no solo a nivel laboral sino personal, apoyándome y aconsejándome cuando lo he necesitado. Gracias Mari, Jordi, Toni, Iria, Eloy, Mónica, Elia, Javi, Víctor, Laia, Meri, Mariona, Eli y Marta. Gracias de corazón por todo lo que me habéis enseñado, por las eternas risas y por proporcionarme las herramientas necesarias para afrontar cualquier nuevo reto.

Esta etapa me ha permitido conocer a muchas personas, pero en especial a una. Francesc Navarro i Pujol, si no fuera por ti no estaría escribiendo estas líneas. Hemos pasado mucho los dos juntos y has sido un gran apoyo en Reig en la etapa más difícil. Gracias por ser mi paño de lágrimas, por la pasión con la que me has transmitido tus conocimientos y por ayudarme a poner el filtro cuando debía hacerlo.

También quería agradecer a todas las personas del departamento de Genética y de Microbiología de la Facultad de Biomedicina y del departamento de Anatomía y Salud Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona por su apoyo en el ámbito más académico. Gracias Pilar, Susana, Aida y Leo.

Alba, Ines, Josep, Sara y Tefi, habéis sido mi alegría de los fines. Desde que nos conocimos ya hace 10 años, y ya sé que lo digo pocas veces, nuestras cenas, escapadas de finde, viajes, bailes hasta las mil, amaneceres y atardeceres, han sido un gran apoyo. Desde la carrera hasta el doctorado, sin vosotros todo hubiera sido mucho más duro y por supuesto, menos divertido. Sois familia. ¡Muchas gracias!

Además, quería hacer una mención especial a vosotras, Inés, Sara y Tefi, mi núcleo. Gracias por no juzgar, entender mis fallos, por abrir ventanas cuando necesitaba respirar y por ser mi mejor verano. Pero, sobre todo, gracias por esperar con la intención de cogerme la mano e impulsarme. Vosotras me habéis ayudado a que confíe más en mí. Se que estos últimos años, hemos tenido momentos de estar más unidas y menos, pero nunca nos han faltado las ganas de estar juntas, compartir dramas, ayudarnos a desconectar o querer arreglar el mundo. Sois mi mejor paracaídas. Gracias, os quiero cada día.

Por último, quería agradecer a mi familia todo el apoyo que me han dado durante la realización de este proyecto. Gracias a mi hermano Joan, por estar siempre y por decirme verdades cuando hacen falta. A mi abuela Herme, por el cariño y tiempo que has compartido este año con nosotros. A Keyla y Delia por ser mis refunfunas preferidas que, a pesar de todo, siguen estando ahí.

A mis yayos, sé que no podréis leer esto, pero igualmente os quería dar las gracias por todos los años que pasamos juntos. Especialmente a ti yayo, por transmitirme el amor y jovialidad que sentías por la vida y enseñarme que se puede perdonar sin dañar a los demás. Estoy segura de que os hubiera encantado acompañarme durante esta difícil

etapa. Os quiero, hasta siempre.

Padres, no tengo palabras para expresar la gratitud que siento por todo lo que habéis hecho por mí. Se que la vida no os lo ha puesto nada fácil, pero aun así siempre os habéis sacrificado para que nunca me faltara nada. Gracias por estar siempre, empujarme a seguir adelante, confiar en mí y nunca dejarme sola. Gracias a vosotros he tenido la disciplina adecuada para saltar los obstáculos y la paciencia necesaria para esperar el momento adecuado. Soy inmensamente afortunada de teneros. Eskerrik asko!

Por último, Ade, eres sin duda la persona que más ha sufrido todas las etapas de esta tesis, con todos sus días y largas noches. Muchas gracias por quedarte y amanecer conmigo, con mis problemas y con mi intensidad, conmigo y con mis victorias, y siempre tener un abrazo que cura. Te lo he dicho muchas veces, pero esta tesis no hubiera sido posible sin ti. Te quiero, siempre.

Muchas gracias a todos,

Maria

LISTA DE ABREVIATURAS

Lista de abreviaturas y símbolos

ABCS	<i>ATPS-Binding Cassette</i>	Transportadores dependientes de ATP
ALDH	<i>Aldehyde Dehydrogenase</i>	Aldehído deshidrogenasa
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>	Análisis de la varianza
ARM	<i>Antimicrobial Resistance</i>	Resistencia antimicrobiana
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	Colección americana de cultivos tipo
BB	<i>Benzyl Benzoate</i>	Bencil Benzoato
BV	<i>Bacterial Vaginosis</i>	Vaginosis bacteriana
CADD	<i>Computer-Aided Drug Design</i>	Diseño de fármacos mediante sistemas computacional
Cd	<i>Drug concentración</i>	Concentración de fármaco
∫DNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>	Ácido desoxirribonucleico complementario
CI	<i>Coefficient Interval</i>	Intervalo de confianza
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>	El Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio
CV	<i>Coefficient variation</i>	Coeficiente de variación
D	<i>Disulfiram</i>	Disulfiram
DBH	<i>Dopamine Beta-Hydroxylase</i>	Dopamina beta-hidroxilasa
ddH₂O	<i>Distilled water</i>	Agua destilada
Dif.	<i>Difussion coefficient</i>	Coeficiente de difusión
DMSO	<i>Dimethylsulfoxide</i>	Dimetilsulfóxido
DN_{asa}	<i>Deoxyribonuclease</i>	Desoxirribonucleasa
dQ	<i>Permeated amount differential</i>	Cantidad diferencial permeada
dT	<i>Time differential</i>	Diferencial de tiempo
EMA	<i>European Medicines Agency</i>	Agencia europea del medicamento
EP	<i>European Pharmacopoeia</i>	Farmacopea Europea
EPS	<i>Extracelular Polymeric Substances</i>	Sustancias poliméricas extracelulares
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>	Comité Europeo de evaluación de la sensibilidad antimicrobiana
f	<i>Response factor</i>	Factor respuesta
F	<i>Fraction of drug released</i>	Fracción de fármaco liberada
F₁	<i>Fluorescein seeded</i>	Fluoresceína sembrada
F₂	<i>Fluorescein released</i>	Fluoresceína liberada
F₃	<i>Fluorescein remaining</i>	Fluoresceína remanente
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>	Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación
FC	<i>Fold change</i>	Cambio de pliegue
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
F_{max}	<i>Maximum fraction of drug released</i>	Fracción máximo de fármaco liberada
g	<i>Gravity</i>	Gravedad
G'	<i>Storage modulus</i>	Módulo de almacenamiento

G''	<i>Loss modulus</i>	Módulo de pérdida
gDNA	<i>Genomic Deoxyribonucleic Acid</i>	Ácido desoxirribonucleico genómico
hEGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>	Factor de crecimiento epidérmico
HEK	<i>Human Epidermal Keratinocyte</i>	Queratinocitos epidérmicos humanos
HPCD	<i>Hidroxypropyl Beta Cyclodextrine</i>	Hidroxiopropil beta ciclodextrina
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	Cromatografía líquida
HTS	<i>High-Throughput Screening</i>	Cribado de alto rendimiento
ICH	<i>The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>	Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos de los Productos Farmacéuticos para Uso Humano
IDIBAPS	<i>Institute of Biomedical Research August Pi i Sunyer</i>	Instituto de Investigación Biomédica August Pi i Sunyer
IVPT	<i>In vitro Permeation Test</i>	Estudio de permeación <i>in vitro</i>
IVRT	<i>In vitro Release Test</i>	Estudio de liberación <i>in vitro</i>
J	<i>Transdermal Flux</i>	Flujo transdérmico
k₁	<i>First-order constant</i>	Constante de primer orden
k_H	<i>Higuchi constant</i>	Constante de Higuchi
k_{KP}	<i>Korsmeyer-Peppas constant</i>	Constante de Korsmeyer-Peppas
K_p	<i>Permeability coefficient</i>	Coefficiente de permeabilidad
L	<i>Luminescence</i>	Luminiscencia
LOQ	<i>Limit Of Quantification</i>	Límite de cuantificación
LVR	<i>Linear Viscoelastic Region</i>	Región viscoelástica lineal
M₁	<i>Skin weight</i>	Peso piel
M₂	<i>Flask with water weight</i>	Peso del frasco con agua
M₃	<i>Flask with water and skin weight</i>	Peso del frasco con agua y piel
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>	Desorción/ionización láser asistida por matriz
MARSA	<i>Methicillin-Resistant S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> resistente a metilicina
MHB	<i>Mueller Hinton Broth</i>	Caldo Mueller Hinton
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>	Concentración mínima inhibitoria
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>	Ácido ribonucleico mensajero
MSSA	<i>Methicillin-Sensitive S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> sensible a metilicina
MT	<i>Metallothionein</i>	Metalotioneines
NAD	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>	Dinucleótido de nicotinamida adenina
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido
NEG.	<i>Negative control</i>	Control negativo
OECD	<i>Organization for Economic cooperation and Development</i>	Organización para la cooperación y el desarrollo económicos
OMSA	<i>World Organization for Animal Health</i>	Organización mundial de salud animal
P	<i>Partitioning parameter</i>	Parámetro de partición
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. ovis</i>	<i>Psoroptes ovis</i>	<i>Psoroptes ovis</i>

PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>	Tampón fosfato salino
POS.	<i>Positive control</i>	Control positivo
r	<i>Coefficient of corelation</i>	Coeficiente de correlación
R	<i>Recovery</i>	Recuperación
R&D	<i>Research and Development</i>	Investigación y Desarrollo
Ref	<i>Referential theoretical value</i>	Valor referencial del modelo
RH	<i>Relative Humidity</i>	Humedad relativa
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>	Ácido ribonucleico
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>	Reactivas de oxígeno
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	Instituto conmemorativo de Roswell Park
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i>	Desviación estándar relativa
S	<i>Standard Deviation</i>	Desviación estándar
S	<i>Membrane difusion surfarce</i>	Superficie de difusión de la membrana
S	<i>Surface agar hidrogel</i>	Superficie hidrogel de agar
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
S/N	<i>Signal and Noise relation</i>	Relación señal-ruido
SC	<i>Stratum Corneum</i>	Estrato córneo
SD	<i>Standard Deviation</i>	Desviación estándar
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>	Dodecilsulfato sódico
SmPC	<i>Summary of Product characteristics</i>	Resumen de las características del producto
STD	<i>Sexual Transmitted Disease</i>	Infecciones de transmisión sexual
SVF	<i>Simuled Vaginal Fluid</i>	Fluido vaginal simulado
t	<i>Time</i>	Tiempo
T_d	<i>Time of 63.2% released</i>	Time hasta liberación del 63,2%
TEWL	<i>Transepidermal Water Loss</i>	Pérdida de agua transepidérmica
tlag	<i>Lag Time</i>	Tiempo latencia
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>	Farmacopea de Estados Unidos
VVC	<i>Vulvovaginal candidiasis</i>	Candidiasis vulvovaginal
W₁	<i>Water weight</i>	Peso del agua
WHO	<i>World Health Organization</i>	Organización Mundial de la Salud
X_m	<i>Calculated value</i>	Valor calculado
Z₁	<i>Mean of the experimental value</i>	Media del valor experimental
μ	<i>Theoretical value</i>	Valor teórico
β	<i>Weibull shape parameter</i>	Parámetro de Weibull
γ	<i>Shear rate</i>	Velocidad de corte
δ	<i>Phase angle</i>	Ángulo de fase
η	<i>Viscosity</i>	Viscosidad
η*	<i>Complex viscosity</i>	Viscosidad compleja
σ	<i>Tensile stress</i>	Esfuerzo de tracción
τ	<i>Shear stress</i>	Esfuerzo cortante
n	<i>Diffusional exponent</i>	Exponente de difusión

RESUMEN

Resumen

Actualmente, la resistencia antimicrobiana se considera una pandemia silenciosa y una de las mayores amenazas para la salud a las que se enfrenta la humanidad. En este contexto, la situación se agrava por la falta de descubrimiento de nuevas moléculas activas. Además, en los últimos años, hay un creciente interés por los trastornos infectivos de la piel y mucosas, por su alta prevalencia y morbilidad. Por lo que, es urgente reactivar la investigación y el desarrollo de nuevas alternativas en estas áreas que permitan hacer frente a la farmacoresistencia y superar las complejas características intrínsecas a la aplicación de fármacos en estos tejidos.

En la presente Tesis Doctoral, el objetivo es evaluar y caracterizar la acción antimicrobiana de disulfiram en tres formulaciones de uso tópico para abordar el problema de la resistencia antimicrobiana desde diferentes perspectivas.

En un primer estudio, se ha determinado la absorción transdérmica y la eficacia *in vitro* contra sarna y piojos de una combinación de bencil benzoato y disulfiram (Tenutex®), un producto comercial de uso geográficamente restringido que podría ser una alternativa a los insecticidas estándares. Se empleó piel humana dermatomizada para evaluar la absorción dérmica mediante un método validado de cromatografía líquida de alto rendimiento y se utilizaron queratinocitos HEK001 para evaluar la citotoxicidad. Sólo uno de los activos, el bencil benzoato, pudo permear la piel, pero no mostró citotoxicidad en ninguna de las concentraciones probadas. La eficacia del producto se ensayó frente a *Psoroptes ovis* a diferentes tiempos de contacto y frente a cepas resistentes a permetrina/malatió de adultos y huevos de *Pediculus humanis capitis*. El estudio contra sarna demostró que la exposición durante 6 o 24 h al producto erradicaba completamente el parásito y, respecto la actividad pediculicida, mostró una eficacia superior a la del tratamiento estándar en piojos resistentes.

En el siguiente estudio, se evaluó el reposicionamiento de disulfiram como agente antibacteriano para tratar infecciones de la piel. Este estudio tuvo como objetivo determinar las características biofarmacéuticas del fármaco y los efectos derivados de su aplicación tópica. Las pruebas de susceptibilidad mostraron actividad antibacteriana contra las bacterias grampositivas *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. La absorción dérmica no reveló permeación en la piel de cerdo y la cuantificación del fármaco retenido en tejido demostró concentraciones en el estrato córneo y epidermis suficientes para tratar las infecciones. Además, se realizaron análisis de micromatrices y citotoxicidad *in vitro* para comprender mejor el mecanismo de acción del fármaco. Estos estudios revelaron la importancia de disulfiram como quelante de iones metálicos.

En el tercer estudio, además de proponer el reposicionamiento de disulfiram como agente antifúngico, se desarrolló y optimizó formulaciones alternativas para mejorar la

eficacia de los tratamientos administrados por vía vaginal. En este caso, se elaboraron geles mucoadhesivos para la administración local del fármaco. Dichas formulaciones estaban compuestas de polietilenglicol y carragenato para mejorar las propiedades mucoadhesivas y prolongar el tiempo de residencia en la cavidad vaginal. Las pruebas de susceptibilidad mostraron que disulfiram tiene actividad contra *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*). Se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas de los geles y se estudiaron los perfiles de liberación y permeación *in vitro* con celdas de Franz. Además, se demostró que la cantidad de fármaco retenido en el epitelio vaginal de cerdo era suficiente para tratar la infección.

Dada la situación de emergencia de resistencia a los antimicrobianos existente, los resultados obtenidos en las tres publicaciones científicas ponen de manifiesto el potencial uso de disulfiram como agente antimicrobiano, demostrando que las formulaciones propuestas son una alternativa interesante para el tratamiento en infecciones cutáneas y vaginales.

Summary

Currently, antimicrobial resistance is considered a silent pandemic and one of the greatest health threats facing humanity. In this context, the situation is aggravated by the lack of discovery of new active molecules. In addition, there is a growing interest in infective disorders of the skin and mucous membranes, due to their high prevalence and morbidity. Therefore, it is urgent to reactivate research and development of new alternatives in these areas that allow us to address drug resistance and overcome the complex intrinsic characteristics to the application of drugs in these tissues.

In this Doctoral Thesis, the objective is to evaluate and characterize the antimicrobial action of disulfiram in three formulations for topical use to address the problem of antimicrobial resistance from different perspectives.

In a first study, the transdermal absorption and in vitro efficacy against scabies and lice of a combination of benzyl benzoate and disulfiram (Tenutex®), a commercial product of geographically restricted use that could be an alternative to standard insecticides, has been determined. Dermatomed human skin was used to assess dermal absorption using a validated high-performance liquid chromatography method and HEK001 keratinocytes were used to evaluate cytotoxicity. Only one of the actives, benzyl benzoate, was able to permeate the skin, but it did not show cytotoxicity at any of the tested concentrations. The efficacy of the product was tested on *Psoroptes ovis* at different contact times and against adult permethrin/malathion resistant strains and eggs of *Pediculus humanis capitis*. The anti-scabies study demonstrated that exposure for 6 or 24 h of the product completely eradicated the parasite and, with respect to pediculicidal activity, it exhibited superior efficacy to the standard treatment in resistant lice.

In the second study, the repositioning of disulfiram as an antibacterial agent to treat skin infections was evaluated. This study aimed to determine the biopharmaceutical characteristics of the drug and the effects arising from its topical application. Susceptibility tests showed antibacterial activity against the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. Dermal absorption revealed no permeation in pig skin and the quantification of the drug retained in tissue demonstrated concentrations in the stratum corneum and epidermis, enough to treat infections. In addition, micro-array and in vitro cytotoxicity analyses were performed to better understand the mechanism of action of the drug. These studies revealed the importance of disulfiram as a of metal ion chelator.

In the third study, in addition to the repositioning of disulfiram as an antifungal agent, alternative formulations were developed and optimized to improve the efficacy of vaginally administered treatments. In this case, mucoadhesive gels were developed for local administration of the drug. These formulations were composed of polyethylene

glycol and carrageenan to improve mucoadhesive properties and to prolong the residence time in the vaginal cavity. Susceptibility tests showed that disulfiram has activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*). The physicochemical properties of the gels were characterized, and the release and permeation profiles were studied in vitro with Franz cells. In addition, it was shown that the amount of drug retained in the pig vaginal epithelium was sufficient to treat the infection.

Given the emergency of antimicrobial resistance, the results obtained in the three publications highlight the potential use of disulfiram as an antimicrobial agent, demonstrating that the proposed formulations are an interesting alternative for the treatment of skin and vaginal infections.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Índice de contenido

Resumen	25
Summary.....	27
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	39
1. Antecedentes	41
2. Piel: estructura y características	43
2.1 Estructura de la piel	43
2.1.1 Epidermis	44
2.1.2 Dermis	46
2.1.3 Hipodermis	47
2.2 Características generales de la administración de fármacos a través de la piel ..	47
2.2.1 Vías de penetración cutánea.....	47
3. Vagina: estructura y características	48
3.1 Estructura interna de la vagina	48
3.2 Fisiología vaginal	49
3.3 Defensas vaginales.....	50
3.3.1 Epitelio vaginal	50
3.3.2 Microbiota	51
3.3.3 pH.....	51
3.4 Características generales de la administración vaginal	52
3.4.1 Ventajas, desventajas y desafíos	52
3.4.2 Permeabilidad y absorción	53
3.4.3 Uso clínico y potencial de la vía vaginal	53
4. Evaluación farmacéutica de medicamentos de administración tópica	54
4.1 Ensayos <i>in vitro</i> de liberación y permeación	54
4.1.1 Estudio de liberación <i>in vitro</i> (IVRT).....	55
4.1.2 Estudios de permeación <i>in vitro</i> (IVPT).....	56
4.2 Técnicas para determinar la retención de fármaco en el tejido	57
4.2.1 Técnicas cuantitativas	57
4.2.2 Técnicas cualitativas.....	58
4.2.3 Toxicidad y seguridad.....	59

4.2.4	Otros estudios	60
5.	Antimicrobianos	61
5.1	Definición	61
5.2	Clase de antimicrobianos	62
5.3	Resistencia microbiana.....	64
5.3.1	Tipos de resistencia	64
5.3.2	Mecanismo de resistencia a los antimicrobianos	65
5.3.3	Factores potenciadores de la ARM	66
5.3.4	Posibles soluciones.....	67
5.4	Situación actual en tratamiento tópicos.....	68
5.4.1	Farmacorresistencia en bacterias.....	68
5.4.2	Farmacorresistencia en parásitos.....	69
5.4.3	Farmacorresistencia en hongos.....	69
5.4.4	Farmacorresistencia en virus	70
6.	Descubrimiento y desarrollo de medicamentos	70
6.1	Fuentes naturales.....	72
6.2	Bibliotecas de moléculas pequeñas y <i>High-Throughput Screening</i> (HTS)	72
6.3	Métodos de diseño de fármacos computacionales	73
6.4	Origen biológico	74
6.5	Reposicionamiento	74
7.	Tenutex®.....	76
8.	Disulfiram	78
8.1	Mecanismo de acción	78
8.2	Características farmacocinéticas	79
8.3	Potenciales usos clínicos	80
8.3.1	Trastorno por consumo de alcohol	80
8.3.2	Adicción a la cocaína	81
8.3.3	Cáncer.....	81
8.3.4	Infecciones.....	82
8.3.5	Otros usos	83
CAPÍTULO II: OBJETIVOS		85
CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS		89

1. Ácaros y piojos	91
2. Cepas microbianas y condiciones de cultivo.....	91
3. Técnicas cromatográficas	92
3.1 Validación de la metodología analítica	93
3.1.1 Linealidad	93
3.1.2 Especificidad	94
3.1.3 Precisión intermedia	95
3.1.4 Exactitud	96
3.1.5 Límite de cuantificación	96
3.1.6 Estabilidad de las muestras	97
4. Preparación de las formulaciones de estudio.....	97
4.1 Emulsión con 2 % disulfiram.....	97
4.2 Geles mucoadhesivos con disulfiram	98
5. Caracterización fisicoquímica de las formulaciones	100
5.1 Preparación del fluido vaginal simulado.....	100
5.2 Fuerza adhesiva de los geles	100
5.3 Propiedades mucoadhesivas	101
5.4 Propiedades reológicas	102
5.4.1 Cribado de la fórmula final.....	103
5.4.2 Caracterización de la fórmula final	103
5.5 Jeringabilidad.....	108
6. Métodos de difusión en celdas de Franz	108
6.1 Estudios de liberación <i>in vitro</i>	108
6.2 Estudios de permeación <i>in vitro</i>	110
6.3 Estudios de retención de D en el tejido	111
7. Evaluación de la citotoxicidad <i>in vitro</i>	113
7.1 Cultivo de células	113
7.2 Ensayo celular	113
8. Técnicas de Biología Molecular.....	115
8.1 Extracción y purificación de ácido ribonucleico (RNA)	115
8.2 Síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA)	115
8.3 Microarrays y análisis de datos	116

9. Estudios de eficacia frente a piojos, ácaros y microorganismos	116
9.1 Eficacia <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i> frente a sarna	116
9.1.1 Preparación del modelo.....	116
9.1.2 Estudio <i>in vitro</i>	116
9.1.3 Estudio <i>ex vivo</i>	117
9.2 Eficacia <i>in vitro</i> frente a piojo y huevos resistentes a permetrina	117
9.3 Eficacia <i>in vitro</i> frente a bacterias y levaduras.....	118
CAPÍTULO IV: Eficacia y propiedades biofarmacéuticas de una combinación a dosis fija de D y BB.....	121
Presentación	125
1. Introduction.....	127
2. Results and Discussion	129
3. Materials and Methods	137
4. Conclusions.....	140
References	140
CAPÍTULO V: Reposicionamiento de D como agente antimicrobiano en infecciones tópicas.....	143
Presentación	147
1. Introduction.....	149
2. Results and Discussion	151
3. Materials and Methods	158
4. Conclusions.....	160
References	161
CAPÍTULO VI: Reposicionamiento de D como agente antifúngico. Desarrollo de un nuevo gel mucoadhesivo vaginal de D	163
Presentación	167
1. Introduction.....	169
2. Materials and Methods	170
3. Results and Discussion	176
4. Conclusions.....	186
References	187
CAPÍTULO VII: DISCUSION GENERAL	191

1. Reevaluación del producto comercial Tenutex®	194
2. Reposicionamiento de D como agente antibacteriano y antifúngico.....	195
2.1 Selección de D como candidato final	195
2.2 Eficacia antimicrobiana	197
2.3 Caracterización de las fórmulas propuestas	200
2.4 Estudios en celdas de Franz.....	202
2.4.1 Estudios de liberación <i>in vitro</i>	202
2.4.2 Ensayos de permeación <i>in vitro</i>	202
2.5 Ensayos celulares	204
3. Técnicas para la caracterización de un producto farmacéutico	205
4. Perspectivas de futuro	206
CAPÍTULO VIII: CONCLUSIONES.....	209
CAPÍTULO IX: REFERENCIAS.....	213

Índice de Figuras

Figura 1: Concepto One health	35
Figura 2: Esquema de la estructura de la piel humana en sección transversal	44
Figura 3: Vías de penetración celular (se muestra el estrato córneo): a) ruta a través de apéndices, b) ruta transcelular, c) ruta intercelular	47
Figura 4: Esquema que representa las capas de la pared vaginal	48
Figura 5: Representación esquemática de la Celda de Franz.....	55
Figura 6: Representación esquemática de la técnica <i>tape stripping</i>	53
Figura 7: Transferencia genética en bacterias	61
Figura 8: Etapas principales en el desarrollo clásico de un medicamento..	67
Figura 9: Estructura química de bencil benzoato.....	73
Figura 10: Estructura química de disulfiram.	74
Figura 11: Estructura química de dietiltiocarbamato	75
Figura 12: Metabolismo del alcohol y mecanismo de acción del disulfiram	77
Figura 13: : Esquema de los dispositivos utilizados para evaluación de la fuerza adhesiva, para esfuerzo de tracción (A1) y esfuerzo cortante (A2)	6
Figura 14: Esquema del funcionamiento del ensayo rotacional.....	100
Figura 15: Clasificación de fluidos newtonianos y no newtonianos	101
Figura 16: Esquema del funcionamiento del ensayo oscilatorio.....	103
Figura 17: Desfase entre el esfuerzo (τ) y la deformación (γ), ángulo de desfase (δ) en un ensayo dinámico.....	103
Figura 18: Diseño de placa con las concentraciones testadas de cada uno de los compuestos (D y BB).....	109
Figura 19: Reacción de la luciferina a oxiluciferina que tiene lugar tras poner a las células en contacto con el reactivo CellTiter-Glo®.....	110
Figura 20: Resumen gráfico: Reposicionamiento de D como agente antimicrobiano en infecciones tópicas.	141
Figura 21: Resumen gráfico del reposicionamiento del disulfiram como agente antifúngico: desarrollo de un nuevo gel mucoadhesivo vaginal de disulfiram.....	161

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes

La resistencia antimicrobiana (ARM) se define como la capacidad de un microorganismo dado a multiplicarse o sobrevivir en presencia de un agente antimicrobiano, en comparación con los de su misma especie que son susceptibles. La generación de resistencias es un fenómeno natural propio de los microorganismos que se produce por mutaciones espontáneas o bien por la adquisición de genes de resistencia. Ahora bien, el uso excesivo de antimicrobianos en medicina humana y ganadería, junto con el control deficiente de infecciones, contaminación ambiental, inadecuada manipulación de alimentos y movimientos geográficos de humanos y animales infectados, han ejercido una presión positiva en la selección de estos genes, promoviendo la rápida propagación de microorganismos resistentes a nivel mundial (Gil-Gil et al. 2019, da Silva Dantas 2022).

Esta rápida propagación de los microorganismos resistentes a múltiples clases de antimicrobianos ha sido declarada una gran amenaza para la salud pública (Aslam et al. 2021). Por lo que, para contrarrestar la resistencia al tratamiento, es necesaria la búsqueda de nuevas estrategias, mejorar la administración de fármacos con vías o formulaciones alternativas y desarrollar enfoques más novedosos.

Respecto a las nuevas estrategias y dado que la resistencia a los antimicrobianos es un problema ecológico que se caracteriza por interacciones complejas entre diversas poblaciones microbianas, tiene sentido abordar el problema utilizando un enfoque coordinado y multisectorial, como es *One health* (Salud única) (Gil-Gil et al. 2019).

One health se define como “el esfuerzo colaborativo de múltiples profesiones de las ciencias de la salud, junto con sus disciplinas e instituciones relacionadas, que trabajan a nivel local, nacional y mundial, para lograr una salud óptima para las personas, los animales domésticos, la vida silvestre, las plantas y nuestro medio ambiente” (Adisasmito et al. 2022). Lo que propone es un abordaje conjunto y global entre tres ámbitos interrelacionados y estrechamente vinculados: la salud humana, la salud animal y el medio ambiente (Figura 1). *One health* abarca la colaboración entre sectores y disciplinas que contribuyen a proteger la salud, abordar desafíos sanitarios como la aparición de enfermedades infecciosas, la resistencia a los antimicrobianos y la seguridad alimentaria, además de promover la salud y la integridad de nuestros ecosistemas (Aslam et al. 2021; Gil-Gil et al. 2019).

Afrontar la resistencia antimicrobiana solo desde la investigación y desarrollo de moléculas activas y/o formulaciones nuevas, no es suficiente para combatir el problema. La colaboración entre entidades y el abordaje global es esencial para encontrar soluciones que se mantengan en el tiempo.

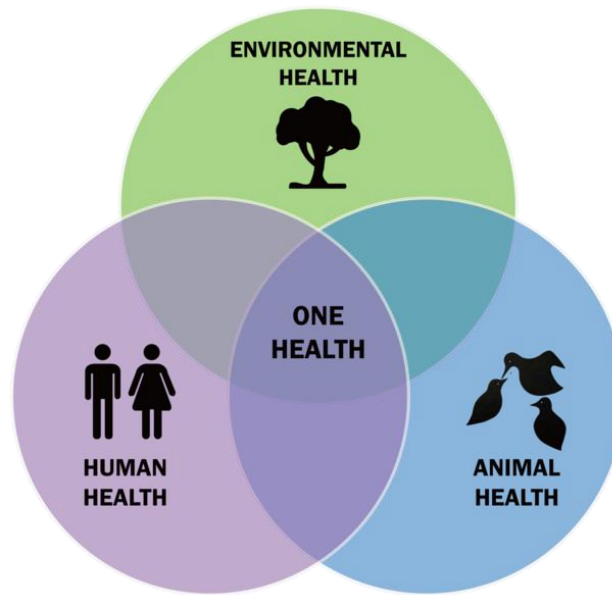


Figura 1: Concepto *One health*. *Wikimedia Commons*, licencia de dominio público.

En cuanto a la mejora de la administración de fármacos, los avances en tecnología farmacéutica han alentado a explorar y mejorar las rutas alternativas (no orales), como es el caso de la vía tópica, con el objetivo de mejorar la liberación de los principios activos en su lugar de acción. Este hecho, es especialmente importante en áreas como la dermatología y ginecología, donde los antimicrobianos son el pilar de la terapia para el tratamiento de las infecciones de la piel, los tejidos blandos y las mucosas. Los sistemas de administración tópica se basan en la aplicación de la formulación en áreas superficiales tales como la piel y/o mucosas (ojos, nariz, boca o vagina), para el tratamiento de enfermedades locales (Maciej Serda et al. 2000). Entre sus principales ventajas, se encuentran (Torin Huzil et al. 2011; Singh Malik, Mital, and Kaur 2016):

- Mejor cumplimiento y aceptación por parte del paciente.
- Fácil aplicación.
- Administración indolora y no invasiva.
- Mínima toxicidad sistémica y exposición a tejidos no diana.

Dadas las ventajas comentadas, la administración tópica se usa ampliamente desde hace décadas para administrar diferentes agentes terapéuticos. En el caso de los antimicrobianos, los productos semisólidos han sido comúnmente empleados, destacando su uso a nivel cutáneo para infecciones no complicadas (impétigo, abrasiones, quemaduras, cortes o foliculitis) y a nivel vaginal para el tratamiento de infecciones del tracto genital inferior (vaginitis o vaginosis) (Frey Tirri 2011; Spann, Taylor, and Weinberg 2004).

El desarrollo de un sistema de administración tópico es un gran reto que requiere de una cuidadosa selección, no solo del principio activo, sino también del vehículo en el

que es administrado, debido a que las barreras asociadas a esta ruta pueden limitar considerablemente la disponibilidad del principio activo en el lugar de acción. Por ejemplo, el estrato córneo es la principal barrera para el acceso de fármacos en la piel. En cambio, en el caso de la administración vaginal, la efectividad de las formulaciones se ve limitada por su corto tiempo de residencia y su distribución inadecuada sobre el tejido (Singh Malik, Mital, and Kaur 2016; Wong, Dhanawat, and Rathbone 2014).

Además, en los últimos años, hay un creciente interés en las infecciones de la piel y mucosas ya que afectan a millones de personas diariamente y ocasionan importantes problemas de morbilidad a nivel mundial. Estos se categorizan principalmente como bacterianos (por ejemplo, impétigo, celulitis y vaginosis bacteriana), fúngicos (como la esporotricosis, cronicosis, blastomicosis y candidiasis), virales (herpes simple, eczema, entre otros) y parasitarios (destacando la sarna y piojos) (Singh Malik, Mital, and Kaur 2016; Dawson, Dellavalle, and Elston 2012).

Las barreras que puede presentar la vía tópica en cuanto a la llegada del principio activo al lugar de acción, junto con el creciente interés en las infecciones de estas vías, impulsan la necesidad de una extensa investigación para desarrollar nuevos sistemas de administración tópica en esta línea terapéutica. Además, para la evaluación de la eficacia, son necesarios estudios precisos y robustos de permeación y biodistribución en el tejido objetivo. Por lo que, el conocimiento de la vía es esencial para un correcto desarrollo del producto.

En este primer capítulo se muestra una descripción de las vías de administración de interés en el estudio, destacando las técnicas de evaluación para los medicamentos destinados a estas vías durante la etapa de desarrollo del producto, describiendo los desafíos que enfrenta la resistencia antimicrobiana y proponiendo medidas para abordar la nueva amenaza.

2. Piel: estructura y características

2.1 Estructura de la piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, representa el 10 % de la masa corporal total y cubre, aproximadamente, unos 2 m² de superficie corporal (Dragicevic-curic and Maibach 2015). Está formada por epitelio estratificado de estructura compleja, cada capa del cual consta de varios tipos celulares con funciones bien diferenciadas. La piel puede dividirse en 3 capas principales: la epidermis, la dermis y la hipodermis (Figura 2).

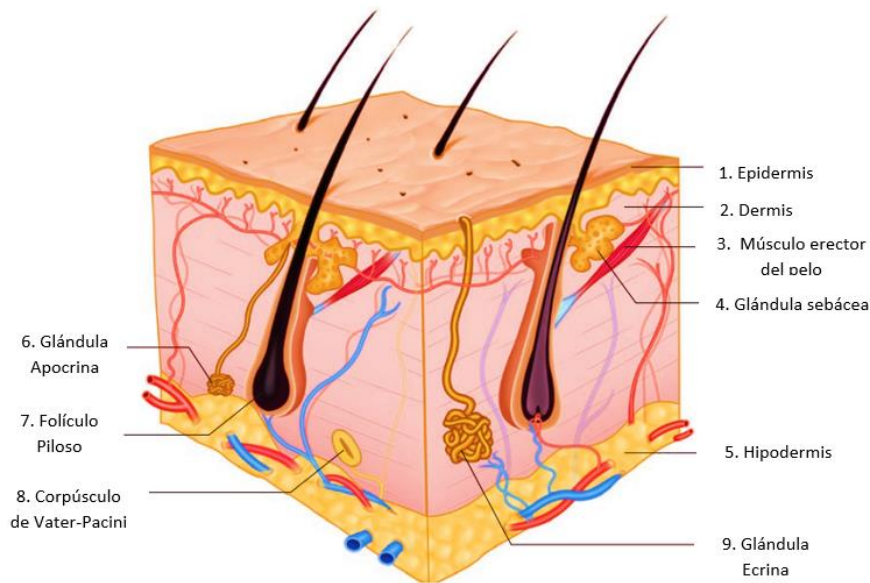


Figura 2: Esquema de la estructura de la piel humana en sección transversal. Vestita, Tedeschi, and Bonamonte 2022.

2.1.1 Epidermis

La epidermis es una capa de epitelio escamoso compuesta principalmente por dos tipos de células: queratinocitos y células dendríticas, siendo las primeras el tipo celular predominante (95 %) (Zaidi and Lanigan 2010). Además, alberga otras poblaciones celulares como son los melanocitos, las células de Langerhans y las de Merkel (Nicol 2005). No contiene vasos sanguíneos, los nutrientes se obtiene por difusión a partir de la dermis (Zaidi and Lanigan 2010).

La epidermis comúnmente se divide en dos capas que vienen definidas por los cambios morfológicos y de posición que sufren los queratinocitos a medida que se van diferenciando en células córneas. Estas capas son el estrato córneo (SC) y la epidermis viable.

2.1.1.1 Estrato córneo

Es la capa más externa de la piel y está formado por células córneas o cornificadas. Es la encargada de brindar protección mecánica a la epidermis subyacente y hacer de barrera para evitar la pérdida de agua y la invasión de sustancias extrañas, como pueden ser los fármacos. Estas propiedades son debidas a su compleja estructura lipídica. Las células córneas se caracterizan por ser células grandes, ricas en proteínas y bajas en lípidos, planas y poliédrica, que han perdido el núcleo durante la diferenciación terminal (Nicol 2005). Forman una matriz de 10 a 20 μm de espesor que está incrustada en una capa lipídica altamente ordenada. Alteraciones en su estructura están relacionados con la aparición de enfermedades como la dermatitis atópica, la psoriasis o trastornos congénitos como la ictiosis (Goyal et al. 2015).

El SC es una barrera física para la entrada de microorganismos patógenos del medio ambiente. La continua descamación junto con la capacidad de la dermis de producir sustancias químicas como las defensinas (péptidos), protegen a la piel de la entrada de microorganismos (Cardoso et al. 2017).

Además, el SC alberga la mayor parte de la microbiota cutánea, la cual es necesaria para la homeostasis y el mantenimiento de una piel sana, desempeñando un papel importante en el desarrollo y regulación del sistema inmunitario. En la dermis, también se encuentra parte de la microbiota, pero esta, es menos susceptible a los factores ambientales, por lo que cuando se habla de microbiota cutánea y patologías de la piel asociadas se hace referencia al SC (Sinha, Lin, and Ferenczi 2021).

La densidad de microbiota por centímetro cuadrado de piel es de alrededor de 10^7 , pero hay una gran variabilidad en la densidad y el tipo de bacterias presentes según la edad, ubicación anatómica, pH, topografía del área (presencia de pelo, glándulas sudoríparas y humedad) y factores externos (cuidado de la piel, exposición solar, clima y vestimenta) (Sinha, Lin, and Ferenczi 2021).

Las actinobacterias comprenden aproximadamente la mitad (36-51 %) de las bacterias de la piel (*Cutibacterium* y *Corynebacterium*), las cuales pueden llegar a ser patógenas en condiciones favorables cuando ciertos filotipos están presentes. El siguiente filo de bacterias más común es Firmicutes (24-34 %), como *Staphylococcus* y *Streptococcus*, siendo la especie *Staphylococcus epidermidis* la bacteria aerobia más abundante (90 % aproximadamente). En general, *S. epidermidis* es una especie comensal, pero se ha asociado cada vez más a infecciones adquiridas en el ámbito hospitalario (prótesis quirúrgicas y catéteres). En menor porcentaje encontramos los filos, *Proteobacteria* (11-16 %) y *Bacteroidetes* (6-9 %). Además de las bacterias, el microbioma de la piel también alberga organismos fúngicos, siendo la especie *Malassezia* la más dominante (Sinha, Lin, and Ferenczi 2021; Byrd, Belkaid, and Segre 2018; Carmona-Cruz, Orozco-Covarrubias, and Sáez-de-Ocariz 2022).

Por otra parte, el SC puede albergar transitoriamente distintos patógenos de naturaleza fúngica, bacteriana o parasitaria, los cuales, si los mecanismos de barrera anteriores fallan, pueden acabar afectando a las capas inferiores de la piel produciendo enfermedades. Destacan los siguientes patógenos e infecciones (Cardoso et al. 2017; Carmona-Cruz, Orozco-Covarrubias, and Sáez-de-Ocariz 2022):

- **Hongos:** infección por dermatofitos (tiña), dermatitis por *Candida* y pitiriasis versicolor.
- **Bacterias:** eritrasma y queratólisis, producidas por corinebacterias y en el segundo caso, también por *Dermatophylus congolensis* y *Kytococcus (Micrococcus) sedentarius*. Destacan las infecciones por *Staphylococcus aureus*,

Enterococcus spp., *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*.

- **Parásitos:** importancia de la sarna por su alta prevalencia a nivel mundial. Esta producida por el ácaro *Sarcoptes scabiei*, el cual produce surcos en el estrato córneo que acaban afectando a la epidermis.

2.1.1.2 Epidermis viable

Generalmente presenta un grosor de 60 a 800 μm de espesor, dependiendo de la parte del cuerpo. Se encuentra inmediatamente debajo del estrato córneo y representa la primera capa de células vivas. Consta de 3 subcapas formadas por fibroblastos y queratinocitos (Goyal et al. 2015). Estas subcapas incluyen la capa de células basales (estrato germinativo), la de células escamosas (estrato espinoso) y la de células granulares (estrato granuloso) (Nicol 2005).

2.1.2 Dermis

La dermis es una capa de tejido conjuntivo intercalada entre la epidermis y el tejido subcutáneo. Es una estructura fibrosa compuesta de colágeno, tejido elástico y otros componentes extracelulares que incluyen redes nerviosas y vasculares, folículos pilosos y diferentes glándulas. Los componentes de esta matriz, incluidos el colágeno y el tejido conjuntivo elástico, experimentan renovación y remodelación constante, además, la cantidad y sus características varían dependiendo de la profundidad a la que se encuentren. Los fibroblastos son las células principales dentro de la dermis, pero los histiocitos, los mastocitos y los adipocitos también juegan un papel importante en el mantenimiento de su estructura y funcionamiento normal (Brown and Krishnamurthy 2022). Generalmente, esta capa presenta un grosor de 30 a 500 μm (Goyal et al. 2015).

La dermis comprende la mayor parte de la piel y es la que proporciona flexibilidad, elasticidad y resistencia a la tracción. Protege el cuerpo de lesiones mecánicas, ayuda en la regulación térmica y contiene receptores a estímulos sensoriales. La dermis es la encargada de interactuar con la epidermis manteniendo las propiedades de ambos tejidos (Nicol 2005).

El componente principal de la dermis es el colágeno, una familia fibrosa de proteínas con al menos 15 tipos genéticamente distintos. Concretamente, el colágeno tipo I y tipo II son los que se encuentran en abundancia y juegan un importante papel en la resistencia al estrés mecánico de la piel. Las fibras elásticas, están compuestas por microfibrillas de elastina y fibrilina. A diferencia del colágeno, la estructura de la elastina permite el deslizamiento, estiramiento y retroceso de las fibras (Brown and Krishnamurthy 2022).

2.1.3 Hipodermis

El tejido subcutáneo o hipodermis es la capa que se encuentra inmediatamente debajo de la dermis. Está formada por lóbulos de lipocitos separados por tabiques fibrosos compuestos de colágeno y grandes vasos sanguíneos. A medida que varía el grosor de la epidermis y la dermis, también lo hace el tejido subcutáneo (Vestita, Tedeschi, and Bonamonte 2022).

2.2 Características generales de la administración de fármacos a través de la piel

2.2.1 Vías de penetración cutánea

La absorción cutánea consiste en el paso de diferentes compuestos a través de la piel. Puede constar de cuatro pasos principales, en función de si el efecto es local o sistémico, (1) liberación del principio activo de la fórmula, (2) entrada o penetración del compuesto en la piel, (3) permeación que consiste en el transporte de una membrana a otra y (4) reabsorción que es la captación del compuesto en el sistema vascular (este paso solo tiene lugar si hay efecto sistémico).

En cuanto a los mecanismos de penetración a través de la piel, se puede dividir en dos tipos diferentes (Figura 3):

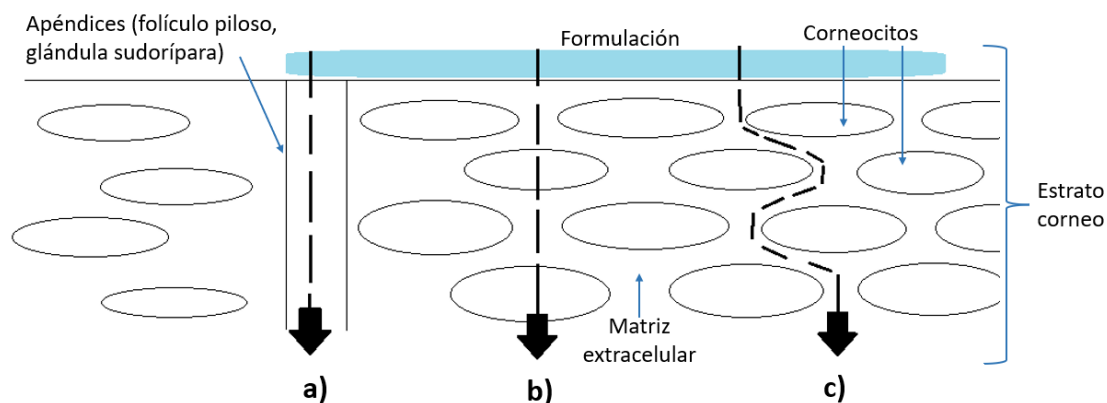


Figura 3: Vías de penetración celular (se muestra el estrato córneo): a) ruta a través de apéndices, b) ruta transcelular, c) ruta intercelular.

a) Ruta a través de los apéndices

Esta vía abarca la permeación a través de los folículos pilosos, también conocida como vía transfolicular, y/o a través de las glándulas sudoríparas (Figura 3a). Estas estructuras forman un poro que permite a las moléculas superar la barrera del SC con mayor facilidad. Anteriormente esta ruta había sido ignorada debido a la contribución insignificante respecto al total de la superficie de la piel, ahora bien, actualmente se ha demostrado que esta vía es eficiente y puede tener una gran implicación en la penetración de fármacos (Dragicevic-curic and Maibach 2015).

b) Ruta transepidermal

En la vía transepidérmica, el fármaco atraviesa los espacios intracelulares y/o extracelulares, desde la epidermis hasta la dermis e hipodermis. Puede hacerlo de dos maneras diferentes (Dragicevic-curic and Maibach 2015):

- **Transcelular:** requiere que el fármaco atraviese las capas alternas de células y matriz extracelular (Figura 3b). Generalmente el interior de las células es más hidrofílico que la matriz extracelular por lo que esta ruta es predominante en moléculas hidrofílicas pequeñas.
- **Intercelular:** En este caso, el fármaco cruza a través de la matriz extracelular sin traspasar por las células (Figura 3b). Ruta habitual para moléculas lipofílicas.

3. Vagina: estructura y características

3.1 Estructura interna de la vagina

La vagina es una estructura tubular fibromuscular de una longitud de 6 a 12 cm que se extiende entre la vulva y el cuello uterino (Graziottin and Gambini 2015). La pared vaginal consta de 4 capas histológicamente distintas (Figura 4) (Alexander et al. 2004; Mohammed et al. 2022; Lara Bohórquez et al. 2011; Haylen et al. 2022):

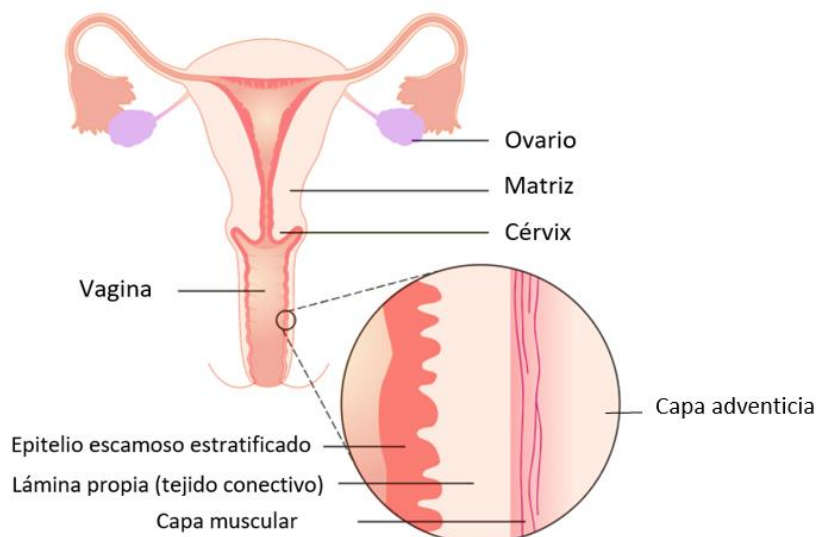


Figura 4: Esquema que representa las capas de la pared vaginal. *Cancer Research UK* vía *Wikimedia Commons*, licencia de dominio público.

- a) **Mucosa:** está formada por dos subcapas:
- i. **Epitelio escamoso estratificado:** capa no queratinizada y no secretora que tapiza la mucosa. Se divide en varias capas en base a la apariencia que adoptan las células en las extensiones citológicas; la capa basal que está constituida por una capa simple de células columnares, la capa

parabasal constituida de 2 a 5 capas celulares cuboidales y la capa intermedia y superficial que son de espesor variable.

ii. **Lámina propia:** también es conocida como estroma, se localiza justo debajo del epitelio y se caracteriza por contener tejido conectivo elástico y denso, donde los nervios y la vascularización se concentran. Está compuesta principalmente de colágeno y elastina.

b) **Capa muscular:** formada por fibras musculares lisas situadas tanto de forma circular (capa interna) como en dirección longitudinal (capa externa).

c) **Capa adventicia:** capa interna de tejido conectivo denso que parte del tejido conectivo pélvico y contiene vasos linfáticos, plexos venosos y fascículos nerviosos. La capa externa está formada por tejido conectivo laxo que proporciona soporte y un abundante suministro de sangre.

3.2 Fisiología vaginal

La vagina actúa como receptáculo durante el coito, salida para la sangre menstrual y como canal de parto. La fisiología de la vagina está influenciada por la edad, el estado hormonal, el embarazo y el pH. Para mujeres sanas en edad reproductiva, el pH vaginal se encuentra entre 3,8-4,2; este ambiente ligeramente ácido es debido a la producción de ácido láctico por la microbiota vaginal (Alexander et al. 2004; Mohammed et al. 2022).

A pesar de no poseer glándulas secretoras, la vagina está continuamente irrigada por secreciones con un papel fisiológico importante (Mohammed et al. 2022). Los fluidos vaginales se originan a partir de diversas fuentes. El líquido es principalmente trasudado de la vagina y células cervicales del cuello uterino y del útero, que a través de un proceso de transducción en el epitelio vaginal ingresan en la vagina. Además, contiene secreciones de las glándulas sebáceas de la vulva, de las sudoríparas y de las de Bartolino y de Skene; moco cervical; fluidos endometriales y oviductales; y productos metabólicos de diferentes microorganismos (Alexander et al. 2004; Geonnotti and Katz 2010). Se producen entre 2 y 8 ml de flujo vaginal al día, viéndose afectada esta cantidad y la propia composición de las secreciones por los cambios hormonales del ciclo menstrual, grado de excitación o las propias diferencias entre individuos. En un mismo momento, se puede producir, aproximadamente, un volumen total de entre 0,5 a 0,75 ml (Geonnotti and Katz 2010; Wong, Dhanawat, and Rathbone 2014).

Las secreciones juegan un papel fundamental como barrera de difusión para fármacos y parásitos, además de unirse a bacterias, ralentizar la invasión de patógenos y ayudar a mantener la eubiosis de la compleja microbiota vaginal (Mohammed et al. 2022). Los componentes comunes incluyen: líquido cervical, urea, glucosa, ácido acético y láctico,

proteínas, por ejemplo, inmunoglobulina A secretora, mucina, células epiteliales inmunitarias y exfoliadas (Gold and Shrimanker 2022).

3.3 Defensas vaginales

3.3.1 Epitelio vaginal

El epitelio vaginal actúa como una barrera física contra las infecciones. Ahora bien, otros factores como son el moco cervical, las secreciones vaginales y la microbiota bacteriana local también contribuyen a su protección. Además, este epitelio se desprende constantemente, lo que dificulta que los microorganismos invadan o accedan a la membrana basal (Alexander et al. 2004). Es un tejido dinámico, cuyo grosor y grado de maduración de las células superficiales cambian considerablemente bajo la influencia de los estrógenos durante el ciclo menstrual en las mujeres premenopáusicas (Mohammed et al. 2022).

Se caracteriza por ser un tejido altamente permeable a las moléculas pequeñas y tener una gran superficie de $72 \pm 21 \text{ cm}^2$ (rango: 34-164 cm^2), con alta vascularización, lo cual permite la absorción transepitelial de algunos medicamentos. Además, su no queratinización permite la fácil permeabilidad al agua, proteínas solubles, microbios y mediadores del sistema inmunitario (Gold and Shrimanker 2022; Luo et al. 2016).

Esta gran superficie, se debe en parte a la presencia de rugosidades. Estas rugosidades, se concentran en el tercio inferior de la vagina y actúan como entornos ricos en glucógeno que permiten el crecimiento de diferentes especies de lactobacilos. Este aumento de la superficie efectiva puede favorecer la absorción tópica de fármacos administrados por esta vía, cuando se busca una acción sistémica. Sin embargo, una vez más, la presencia y el grado de estas rugosidades, depende tanto de la edad como de la presencia de estrógenos. Tras la menopausia, estas arrugas pueden incluso desaparecer por completo (Mohammed et al. 2022).

Destaca el papel del exfoliado de las células epiteliales, ya que cuando se descaman hacia al lumen y se descomponen, tiene lugar la despolimerización del glucógeno a glucosa proporcionando así, una fuente de energía para los lactobacilos que dominan la mucosa. Además, el glucógeno puede formar geles con la mucina que funcionan eficazmente como una barrera protectora adicional (Alexander et al. 2004; Mohammed et al. 2022).

La mucina es la principal proteína estructural en el fluido vaginal con capacidad de formar geles intermoleculares. Son proteínas N-glucosiladas y fuertemente O-glucosiladas que polimerizan por enlaces disulfuro a través de sus regiones amino y carboxilo-terminales para formar polímeros largos. Se caracterizan por su gran peso molecular, alta densidad (aproximadamente 1,4 g/ml) y gran contenido en hidratos de

carbono altamente glicosilados (50-80 % por peso). Además pueden formar fibras proteicas entrecruzadas y enredadas de 10-40 MDa que se glicosilan por los residuos de prolina, treonina y/o serina (Gipson 2001).

3.3.2 Microbiota

Las especies de *Lactobacillus* son bacterias anaerobias aerotolerantes o microaerófilas, dominantes en la microbiota vaginal. Son bacterias grampositivas que pueden adherirse a las células epiteliales vaginales. Se caracterizan por tener la capacidad de formar biopelículas a través del epitelio que una vez madurada, producen sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que ayudan a la colonización de más lactobacilos y actúan como mecanismo protector. En cantidad suficiente, estas bacterias superan a otras compitiendo por los nutrientes y como consecuencia, disminuyendo la presencia de patógenos (Mohammed et al. 2022).

Además, el carácter protector de los *Lactobacillus* se ve facilitado por la producción de ácido láctico y peróxido de hidrógeno, aunque no todas las cepas son capaces de producir este último compuesto. Así, regulan el crecimiento de otros microorganismos en el epitelio vaginal, haciendo que el ambiente sea menos hospitalario para otros organismos como por ejemplo, *Escherichia coli* y *Streptococcus* del Grupo B (Alexander et al. 2004).

La disbiosis vaginal hace referencia al desajuste del equilibrio de la microbiota normal, debido a cambios cuantitativos o cualitativos de su composición, cambios en su funcionamiento o actividades metabólicas, o bien, a cambios en su distribución, que se asocia frecuentemente con enfermedades ginecológicas. Múltiples estudios han demostrado la asociación entre la disbiosis vaginal y el aumento de las infecciones vaginales, como la vaginosis bacteriana (BV), la candidiasis vulvovaginal (VVC) o las infecciones de transmisión sexual (STD) como la tricomoniasis y las debidas a los virus del papiloma humano, de la inmunodeficiencia humana o del herpes genital y también a la infección causada por la bacteria *Chlamydia trachomatis* (Chee, Chew, and Than 2020; Hussain and Ahsan 2005).

Una de las características más destacadas de la disbiosis vaginal son los cambios en el pH. Cuando ocurre una disbiosis, los patógenos oportunistas desplazan la presencia de las diferentes especies de *Lactobacillus*, lo cual provoca un aumento significativo del pH al disminuir la concentración de lactato, alcanzándose valores de 6-7. Mantener el equilibrio de la microbiota vaginal es crucial para promover un ecosistema vaginal saludable y evitar estados patológicos (Chee, Chew, and Than 2020).

3.3.3 pH

El pH ácido del epitelio vaginal (3,8-4,2) es de gran importancia en prevención de

infecciones por patógenos oportunistas. Los factores que pueden producir aumento en los valores de pH son: los niveles de estrógenos (perimenopausia, posmenopausia, menstruación), posparto, duchas vaginales, el semen o la colonización por otras bacterias (Alexander et al. 2004; Mohammed et al. 2022; Hussain and Ahsan 2005).

3.4 Características generales de la administración vaginal

3.4.1 Ventajas, desventajas y desafíos

La administración de fármacos por vía vaginal tiene como objetivo principal proporcionar un efecto local. Ahora bien, debido a las características del propio tejido, también ha sido empleada como ruta para la absorción sistémica de fármacos con niveles terapéuticos sostenidos. La administración vaginal permite el uso de regímenes de dosificación prolongados, dosis diarias más bajas y liberación lenta de medicamentos (Alexander et al. 2004). Las principales características son las siguientes (Mohammed et al. 2022):

- Evita el efecto de primer paso hepático: es una ventaja clave de la administración vaginal, al igual que con otros fármacos de administración tópica.
- Tratamiento directo y localizado que permite reducir la presencia de efectos adversos.
- Sin dolor, evita el daño tisular y reduce la posibilidad de infección en comparación con la vía parenteral.
- Es posible la autoadministración discreta.
- Niveles de fármaco en plasma consistentes y constantes.
- Alta permeabilidad para fármacos de bajo peso molecular, tanto de naturaleza hidrofílica como hidrofóbica.
- La microbiota tiene la capacidad de biotransformar algunos fármacos, esto podría activar moléculas o desactivarlas.
- Mala retención de fármacos debido a la autolimpieza vaginal y al gradiente de flujo hacia el exterior por gravedad.
- Influencia hormonal del tejido y secreciones que alteran el espesor epitelial y volumen/viscosidad de las secreciones.
- El moco cervical puede representar una barrera de difusión adicional para los fármacos.
- Degradación enzimática: aunque el epitelio vaginal muestra una actividad enzimática baja, los estratos viables contienen enzimas como las aminopeptidasas, dipeptidil peptidasas y dipeptidil carboxipeptidasas que pueden tener un impacto en la absorción de productos de tipo biológico.

3.4.2 Permeabilidad y absorción

Aunque en los tratamientos de acción local no se desea que haya absorción al torrente sanguíneo, hay que tener en cuenta que este fenómeno puede ocurrir y producir efectos sistémicos. En general, la administración de fármaco por vía vaginal requiere de tres pasos principales (Mohammed et al. 2022; Cox Gad 2007):

1. Liberación del fármaco del sistema de administración (pomada, gel, crema...).
2. Disolución en el fluido vaginal.
3. Permeación a través de la mucosa vaginal. El mecanismo de transporte de la mayoría de las sustancias absorbidas es por difusión simple. Ahora bien, la ruta de transporte puede ser a través de las siguientes vías:
 - Transcelular o vía intracelular: principal vía para las sustancias lipofílicas.
 - Paracelular o vía intercelular: a través de la difusión entre las uniones estrechas de las células epiteliales o a través de los poros acuosos presentes en la mucosa vaginal. Es el principal mecanismo para las sustancias hidrófilas.
 - Transporte vesicular o mediado por receptores.

La magnitud de flujo del fármaco a través de la mucosa vaginal se relaciona principalmente con su tamaño molecular e hidrofobicidad. En general, los compuestos con una masa molecular superior a 300 Da tienen velocidades de flujo reducidas, mientras que las propiedades hidrófobas suelen aumentar la permeación. No obstante, se debe tener en cuenta que un grado mínimo de solubilidad acuosa siempre se requiere para asegurar que el fármaco se disuelva en el fluido vaginal ($\log P < 5$). Además, el pH, la viscosidad y el volumen de este fluido puede influir en la disolución del fármaco. Por ejemplo, el pH influye en el grado de ionización del fármaco y, por tanto, en su solubilidad final (Cox Gad 2007).

Tanto las propiedades fisicoquímicas de las sustancias químicas (naturaleza química, grado de ionización, peso y tamaño molecular, conformación y coeficiente de partición octanol/agua) como la naturaleza biofisicoquímica del tejido, son conocimientos importantes que considerar en el desarrollo de un producto farmacéutico de uso vaginal.

3.4.3 Uso clínico y potencial de la vía vaginal

Numerosas patologías pueden ser tratadas localmente a través de la vía vaginal. Entre ellas, cabe destacar la vaginitis por su alta prevalencia a nivel global. Esta enfermedad es una inflamación de la mucosa vaginal de origen infeccioso causada por bacterias, levaduras, o protozoos. Numerosos fármacos frente a bacterias (clindamicina y metronidazol), hongos (nistatina, azoles, y ácido bórico) y protozoos (metronidazol) se

encuentran disponibles en el mercado para su tratamiento local (Cox Gad 2007).

Actualmente, la investigación en antimicrobianos se centra en hallar sistemas de administración de dosis únicas que puedan mejorar la retención del tratamiento en la zona de aplicación y lograr un mejor cumplimiento por parte de las pacientes. Además de encontrar principios activos alternativos que sean eficaces para combatir posibles resistencias a los tratamientos convencionales.

4. Evaluación farmacéutica de medicamentos de administración tópica

Los medicamentos de administración tópica, generalmente, están diseñados para ejercer un efecto local sobre la piel o la mucosa tras su aplicación superficial. El objetivo es maximizar la concentración de fármaco en el lugar de acción con una mínima absorción sistémica. La evaluación de la biodisponibilidad tópica es esencial para valorar su toxicidad y eficacia.

4.1 Ensayos *in vitro* de liberación y permeación

Para los productos semisólidos, la principal técnica para estudiar la difusión y la permeación son las celdas de Franz. La celda se caracteriza por tener dos compartimentos: un compartimento donador donde se localiza la formulación a estudiar, y el compartimento receptor que contiene el medio bajo agitación magnética constante.

El medio receptor puede variar en función de las características fisicoquímicas del fármaco y las características del tejido empleado en el estudio, pero debe imitar el medio tisular o el líquido intracelular del tejido. Además, el medio debe garantizar el cumplimiento de las condiciones *sink*, que es aquella condición en la que el máximo de concentración de la sustancia activa en el medio receptor alcanzada durante el experimento no supera el 30 % de su máxima solubilidad en el medio receptor, lo cual normalmente ocurre en un volumen de medio que es al menos 3-10 veces superior al volumen de saturación (Hopf et al. 2020; EMA 2018).

Este sistema se encuentra acoplado a una camisa termostaticada conectada a un circuito de agua o aire que permite controlar la temperatura del ensayo. Las celdas están hechas de materiales que reaccionan mínimamente con muchas sustancias químicas (vidrio o teflón) para minimizar las interferencias con la sustancia de estudio (Hopf et al. 2020).

La zona entre ambos compartimentos es donde se localiza, en función del objetivo de estudio, la membrana, la piel o la mucosa. Las muestras se retiran a través del brazo de muestreo a diferentes intervalos de tiempo según la tasa de liberación/permeación de la sustancia de interés (siendo lo recomendable 6 a 12 puntos durante 24 horas) y se

analizan, generalmente, por cromatografía líquida (HPLC) (Hopf et al. 2020). La representación esquemática de las diferentes partes mencionadas se ilustra en la Figura 5.

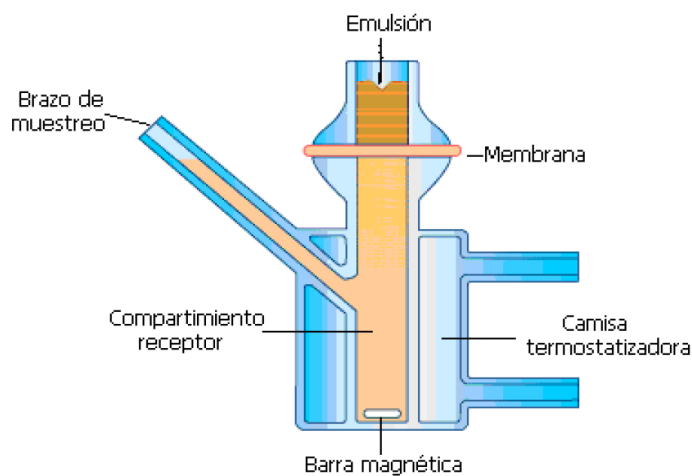


Figura 5: Representación esquemática de la celda de Franz. Debandi, François, and Daraio 2011.

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD, GD28, GN156, TGD428), la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) han publicado diferentes guías donde proporcionan algunas pautas para la evaluación de productos tópicos en estudios de liberación *in vitro* (IVRT) y estudios de permeación *in vitro* (IVPT) (Zsikó et al. 2019; EMA 2018; Hopf et al. 2020; Semisolid 1997).

Además, con los valores obtenidos en ambos estudios (IVPT y IVRT) se pueden utilizar varios modelos matemáticos para describir la cinética de absorción y liberación del fármaco. El objetivo de estos modelos es poder representar los procesos asociados con la absorción/liberación con precisión, ser capaz de describir y resumir datos experimentales con ecuaciones paramétricas y predecir la cinética en condiciones variables (Elmas et al. 2020). En el Capítulo III (sección 6) se describen algunos de los modelos habitualmente empleados.

4.1.1 Estudio de liberación *in vitro* (IVRT)

El IVRT se ha convertido en una herramienta importante para el desarrollo de formas farmacéuticas semisólidas. Este estudio permite evaluar la velocidad y el grado de liberación de una sustancia activa en la formulación propuesta y así poder determinar la cantidad disponible que es capaz de acceder a la piel y/o mucosa (Siepmann and Peppas 2001).

Para su realización, se utilizan membranas sintéticas que pueden ser modelos basados en lípidos o no. La combinación del medio receptor y membrana escogida debe ser compatible tanto con la formulación como con las sustancias activas del estudio,

evitando cualquier degradación significativa o fenómenos de unión durante la duración del ensayo (Zsikó et al. 2019).

La liberación del activo esta influenciada por diferentes factores, como el tamaño de partícula, la solubilidad del fármaco o la reología de la fórmula; también es una buena indicadora de la influencia combinada de las características de composición y microestructura de las formas farmacéuticas semisólidas. Además, los métodos y procesos de fabricación pueden cambiar los atributos de la formulación, afectando así a la tasa de liberación y biodisponibilidad del fármaco. Por todo ello, el IVRT tiene aplicabilidad en la fase de desarrollo, en estudios de estabilidad o en el análisis de cambios y variaciones del proceso de fabricación de un medicamento (Zsikó et al. 2019).

Por otra parte, la versión actual del borrador de directriz de la EMA sobre equivalencia de productos tópicos, indica que se requiere el IVRT para respaldar el concepto de equivalencia farmacéutica ampliada y las guías SUPAC-SS de la FDA recomienda los estudios IVRT para mostrar la similitud de Q3 (disposición de la microestructura) entre un genético y su producto semisólido de referencia cuando son similares en Q1 (composición cualitativa) y Q2 (composición cuantitativa), resaltando así la importancia del IVRT en los productos semisólidos (Zsikó et al. 2019; EMA 2018; Raney 2016; Semisolid 1997).

4.1.2 Estudios de permeación *in vitro* (IVPT)

Los objetivos de IVPT pueden ser diferentes, desde estudiar qué cantidad de fármaco permea la piel o mucosa y llega a circulación sistémica hasta evaluar la cantidad de fármaco retenida en el tejido y/o determinar su distribución en las diferentes capas de este. Tanto la EMA como OECD han elaborado directrices aceptadas internacionalmente para la realización de este tipo de ensayos (Hopf et al. 2020; EMA 2018).

En este caso, ambas directrices recomiendan la utilización de tejido humano. Ahora bien, los modelos animales son ampliamente aceptados durante las etapas de investigación y desarrollo, donde la piel de cerdo se ha sugerido como alternativa debido a sus características fisiológicas similares. El grosor recomendado es de hasta 1000 μm para piel de espesor completo y de 200 a 500 μm para piel dermatomizada mediante un dermatomo. Antes de la realización del estudio, se requiere comprobar la integridad de la piel. Los métodos aceptados incluyen la resistencia eléctrica a una corriente alterna (aplicada hasta 2V), TEWL y el agua tritiada (Hopf et al. 2020; EMA 2018).

La permeabilidad puede realizarse a dosis finitas o infinitas, ya que dependiendo de las limitaciones analíticas puede requerirse velocidades de flujo más bajas que produzcan concentraciones más grandes o intervalos de tiempo más largos. La selección de la dosis también condiciona el distinto tratamiento de datos de las muestras obtenidas durante el estudio y también la utilidad de los datos. En las dosis infinitas, se pone en el

compartimento donador una dosis muy alta de fármaco/formulación, de tal forma que al final del experimento de permeación, el gradiente de concentración entre compartimentos todavía es máximo y constante. En el caso de las dosis finitas, se suele dispensar una dosis de formulación similar a la que se usa en clínica (1-5 mg/cm² de piel), de tal forma que la depleción de fármaco de la formulación hace que el gradiente de concentración entre compartimentos vaya cambiando a lo largo del estudio. En general, las pautas recomiendan exponer el tejido sin oclusión, ya que se corresponde a los escenarios más comunes. Ahora bien, puede ser necesario trabajar bajo oclusión en algunos casos como por ejemplo, cuando la sustancia de estudio es volátil o para imitar un escenario donde la piel está contaminada y/o cubierta (Hopf et al. 2020).

4.2 Técnicas para determinar la retención de fármaco en el tejido

Determinar el fármaco retenido en las diferentes capas de la piel o las mucosas es especialmente importante cuando el objetivo es una acción local, ya que permite evaluar si se consiguen concentraciones suficientemente eficaces en la diana terapéutica. Existen numerosas técnicas, tanto cualitativas como cuantitativas, para su determinación.

4.2.1 Técnicas cuantitativas

Una de las técnicas utilizadas habitualmente es el *tape stripping* que consiste en estimar la cantidad de fármaco retenido en el SC de la piel mediante la aplicación de una cinta adhesiva sobre ella, el empleo de una ligera presión para asegurar un buen contacto con la piel y la posterior eliminación secuencial de fracciones horizontales de piel (0,5-1 mm) a intervalos crecientes de tiempo (Figura 6). Las tiras se someten a una posterior extracción para recuperar el fármaco retenido. La técnica se puede aplicar *in vitro* e *in vivo*, en piel humana o animal. Además, la estimación de fármaco en el SC permite extrapolar por diferencia la cantidad retenida en el resto de las capas de la piel o bien, por determinación del contenido en cada capa se puede establecer el balance de masas y comprobar la idoneidad del ensayo (EMA 2018; Supe and Takudage 2021; Escobar-Chávez et al. 2008; Zsikó et al. 2019).

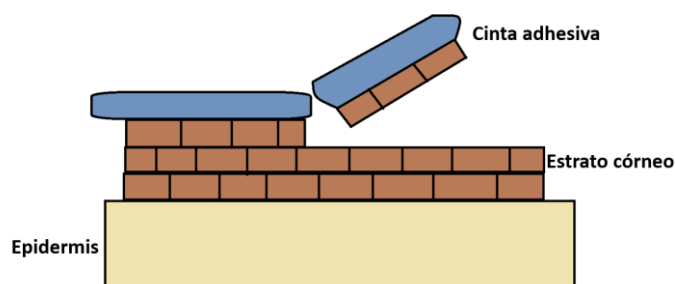


Figura 6: Representación esquemática de la técnica *tape stripping*.

Otras técnicas disponibles para cuantificar el fármaco retenido son (1) la homogenización del tejido y posterior extracción y cuantificación del fármaco o (2) la

realización de cortes micrométricos específicos del tejido horizontal utilizando un criostato y posterior análisis por técnicas de imagen como microscopía confocal Raman o espectroscopía de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF) (Bonnell et al. 2018; Franzen et al. 2013).

La homogenización es una técnica rápida y sencilla que permite detectar bajos niveles de penetración del fármaco. Sin embargo, no proporciona datos de la localización específica de este. En cambio, la técnica de cortes específicos es compleja y lenta, pero permite conocer la profundidad de la penetración del fármaco. Ahora bien, es posible refinar la técnica de homogenización realizando la extracción por separado en la dermis y epidermis. Existen diferentes métodos de separación dermoepidérmica, incluyendo la separación química (ácido acético, amoníaco, hidróxido de potasio, sales neutras o ditiotreitól), digestión enzimática (por ejemplo, tripsina y pancreatina), separación térmica y mecánica (estiramiento o succión) (Touitou, Meidan, and Horwitz 1998; Zou and Maibach 2018).

4.2.2 Técnicas cualitativas

Las técnicas cualitativas permiten determinar la biodistribución de activos y excipientes en las diferentes regiones de la piel y mucosas. No solo es importante determinar cuánto se retiene sino también donde se está reteniendo. La mayoría de estas técnicas consisten en un primer paso de corte del tejido en diferentes secciones, marcaje y posterior análisis mediante técnicas espectroscópicas como son la microscopía fluorescente o la inmunofluorescencia.

4.2.2.1 Espectroscopía fluorescente

Depende del análisis de la luz remitida que se detecta después de pasar por un segundo monocromador. Es decir, sólo se detecta una longitud de onda de emisión específica. Existen dos variantes de esta técnica, la directa que implica la detección de la luz remitida de un fármaco autofluorescente y la indirecta que mide la disminución de la fluorescencia del tejido provocada por un fármaco que absorbe la luz. En el caso de la segunda variante, se requiere el marcaje fluorescente del tejido con un agente como el cloruro de dansilo antes de la aplicación del fármaco de interés. En algunos casos, por comparación con escalas de referencia, se puede obtener cierto grado de cuantificación de sustancias fluorescentes en el tejido. Sin embargo, esta cuantificación es mucho menos precisa que los métodos espectroscópicos anteriormente comentados, confocal Raman o MALDI-TOF (Rhodes and Diffey 1997; Touitou, Meidan, and Horwitz 1998).

4.2.2.2 Inmunofluorescencia

Se basa en el análisis de secciones de tejido marcadas con anticuerpos específicos. En dermatología, los anticuerpos se utilizan ampliamente para reconocer células

estructurales específicas, proteínas y principios activos o excipientes que han sido permeados previamente para determinar su biodistribución. Incluye técnicas directas, en la que se utiliza anticuerpos marcados con un fluorocromo que se unen directamente al antígeno de interés, y técnicas indirectas mediante la utilización de dos anticuerpos, donde el anticuerpo secundario que está marcado con fluorescencia se une al primario. La inmunofluorescencia indirecta permite amplificar la intensidad de la señal, mejorando la precisión de la técnica (Odell and Cook 2013; Chhabra, Minz, and Saikia 2012).

4.2.3 Toxicidad y seguridad

La evaluación de los efectos locales debe realizarse con el fin de conocer el impacto sobre el tejido diana, antes de la aprobación de un nuevo producto. En el caso de la administración tópica, uno de los efectos adversos más comunes es la irritación. Tradicionalmente, el potencial de causar irritación/corrosión cutánea de una sustancia se ha evaluado mediante pruebas *in vivo* en piel y mucosas de animales, principalmente en conejos. También, se han descrito alternativas *in vivo* para identificar el riesgo de irritación en voluntarios humanos mediante la prueba *Patch*, donde se evalúa la irritación a las 24, 48 y 72 horas tras la retirada del parche con el producto de interés (Basketter et al. 2004; J. H. Draize 1944).

Los ensayos *in vivo* pueden causar dolor e incomodidad y, además, los resultados en animales pueden no ser predictivos para los encontrados en humanos. Con el fin de disminuir la experimentación animal y mejorar la predicción del efecto irritante, se han desarrollado sistemas alternativos de ensayos *in vitro* que son de gran utilidad durante las etapas iniciales del desarrollo (Welss, Basketter, and Schröder 2004).

En el caso de la piel, los modelos *in vitro* que utilizan queratinocitos y fibroblastos se consideran buenos modelos para determinar la irritación, especialmente los basados en queratinocitos dado que juegan un papel importante en la iniciación, modulación y regulación de la irritación cutánea. El parámetro más utilizado es la viabilidad celular mediante estudios de citotoxicidad. También existen otros marcadores de irritación, como son las interleucinas (1 alfa, 6, 8, 10), el metabolito del ácido araquidónico o el calcio (Praça et al. 2018). Ahora bien, estos modelos difieren de la piel humana en algunas características y son solo una aproximación para estimar el posible potencial irritativo.

Por otro lado, en los últimos años se han desarrollado varios modelos de piel humana artificial como por ejemplo EpiSkin®, SkinEthic® y EpiDerm®, los cuales se acercan a la piel humana en algunos aspectos, tales como la estructura general, composición y aspectos bioquímicos pero que presentan algunas desventajas importantes como son la mayor permeabilidad y las limitaciones en la función barrera aun relativamente débil (Netzlaff et al. 2005).

4.2.4 Otros estudios

Según la farmacopea de Estado Unidos (USP, (3) *Topical and transdermal drug products-product quality test*), la Europea (EP, *0132 Semi-solid preparations for cutaneous application*) y las guías internacionales (ICH, Q6) a las formas farmacéuticas semisólidas de aplicación tópica se les debería realizar los siguientes ensayos generales para controlar y garantizar la calidad del producto final (USP 2013; EP 2005; EMA 2000):

- **Descripción**

Información cualitativa de la forma farmacéutica (por ejemplo, tamaño, color y forma). Los criterios de aceptación deben incluir la apariencia final aceptable y si esta cambia de color durante la estabilidad.

- **Identificación**

Las pruebas de identificación deben establecer la identidad del fármaco en el nuevo medicamento y deben ser capaz de discriminar entre compuestos de estructura estrechamente relacionada. Las pruebas de identificación deben ser específicas, por ejemplo, espectroscopia infrarroja. La identificación por solo el tiempo de retención cromatográfico, por ejemplo, no se considera específico. Sin embargo, el uso de dos procedimientos cromatográficos, donde la separación se basa en principios diferentes, o combinación de pruebas en un solo procedimiento, como matriz de diodos HPLC/UV, HPLC/MS, o GC/MS, es aceptable para la correcta identificación.

- **Riqueza e impurezas**

Se debe realizar pruebas específicas e indicadoras de riqueza para determinar el contenido de sustancia activa durante la vida del producto. También deben reportarse las impurezas orgánicas e inorgánicas (productos de degradación) y disolventes residuales que pueden estar presentes en el principio activo y los excipientes utilizados en la fabricación del producto farmacéutico. Los límites de impurezas aceptados vienen definidos en la guía ICH Q3B: *Impurities in New Drug Products*.

- **Propiedades fisicoquímicas**

Entre las propiedades fisicoquímicas que generalmente se controlan en los productos semisólidos, destacan las siguientes:

- a) pH

Debe controlarse el pH en el momento de la liberación del lote y durante la estabilidad. En algunos casos donde las cantidades de agua o fase acuosa son bajas, no corresponde su determinación.

b) Viscosidad

La reología se define como el estudio de flujo y deformación de los materiales en respuesta a fuerzas o tensiones aplicadas durante un tiempo determinado. Las propiedades de los materiales que describen la forma específica en que se produce los comportamientos de deformación o flujo son las llamadas propiedades reológicas y estas se corresponden a la viscosidad, plasticidad y elasticidad. Estas propiedades son importantes para el desarrollo de nuevos productos, la estimación de su vida útil y la evaluación sensorial (Siska et al. 2018; Rawat et al. 2019). Por ello, las diferentes guías (EP, USP, ICH) recomiendan el control de la viscosidad en este tipo de productos.

La viscosidad puede influir al proceso de fabricación, la difusión del fármaco, la estabilidad, la homogeneidad del activo incorporado, la precisión de la dosificación, la adhesión al lugar de acción y, por tanto, a su efecto terapéutico. Además, la viscosidad está influenciada por la estructura física y química inherente del producto, técnica de muestreo, temperatura de la muestra, tamaño y forma del contenedor, y metodología empleada en la medida de la viscosidad. Por lo que su correcto control es crítico para asegurar la calidad del producto.

- **Control microbiológico**

El control microbiológico de los productos no estériles se realiza siguiendo los ensayos descritos en la monografía de EP 5.1.4, *Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical preparations and substances for pharmaceutical use* y siguiendo la metodología descrita en las siguientes monografías; 2.6.12 *Microbiological examination of non-sterile products: microbial enumeration tests* y 2.6.13 *Microbiological examination of non-sterile products: test for specified microorganisms*.

Generalmente, en este tipo de productos se realiza el recuento total de aerobios y anaerobios y la determinación de microorganismos específicos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y/o *Candida albicans*). Los microorganismos específicos por determinar dependen de la ruta de administración del producto (oral, cutáneo, vaginal...).

5. Antimicrobianos

5.1 Definición

Los antimicrobianos son sustancias quimioterapéuticas utilizadas para prevenir o tratar infecciones en humanos, animales y plantas. Incluyen antibacterianos, antivirales, antifúngicos y antiparasitarios. Pueden ser sustancias naturales (antibióticos), semisintéticas y sintéticas que tienen la capacidad de matar microorganismos y/o impedir su crecimiento al afectar pasos clave en el metabolismo celular, como por

ejemplo, la síntesis de macromoléculas biológicas, la actividad de enzimas o las estructuras celulares como la pared o la membrana celular (WHO 2017; European Commission. 2017; Di Martino 2022). Los antimicrobianos son probablemente una de las formas de quimioterapia más exitosas en la historia de la medicina.

La introducción de los antimicrobianos en la práctica clínica marcó el inicio de la medicina moderna, conocida como “era antibiótica”, término que se suele asociar a Paul Ehrlich (1854-1915) y Alexander Fleming (1881-1955). El primero, aportó el concepto de “bala mágica” refiriéndose a aquellas sustancias que se dirigen selectivamente a los microbios que producen enfermedad y no al huésped, además de descubrir y comercializar el primer fármaco para la sífilis, Salvarsan. En cambio, Fleming, fue el descubridor de la penicilina mediante la observación fortuita de la actividad antimicrobiana de *Penicillium* (Tan and Tatsumura 2015; Aminov 2010).

Estos dos hechos, establecieron el paradigma para futuras investigaciones en el descubrimiento de antimicrobianos, siendo la década entre 1950 y 1970 la era dorada en el hallazgo de nuevos antibióticos (Aminov 2010).

5.2 Clase de antimicrobianos

Existen varias formas de catalogar los antimicrobianos, pero los esquemas de clasificación más comunes se basan en los siguientes criterios (Calderón and Perdue Sabundayo 2007; Campoy and Adrio 2017; Etebu and Arikekpar 2016; Aparicio et al. 2003; Agut 2022; Pérez, Carranza, and Mateos 2009):

- **Organismo sobre el que actúa:** antibacterianos (bacterias), antifúngicos (hongos y levaduras), antiparasitario (parásitos desde protozoos hasta artrópodos) o antivirales (virus).
- **Estructura química:** los antimicrobianos de una misma clase estructural generalmente muestran un patrón similar de eficacia y toxicidad. Las principales clases de antimicrobianos se presentan en la Tabla 1:

Tabla 1: Clasificación de antimicrobianos según estructura química.

Antibacterianos	Antifúngicos	Antiparasitarios	Antivirales
Beta-lactámicos		Sulfonamidas	
Macrólidos	Azoles	Diaminoperidinas	Análogos nucleósidos
Tetraciclinas	Alilaminas	Diamidinas	Aminas tricíclicas
Quinolonas	Polienos	Tetraciclinas	Análogos pirofosfatos
Aminoglucósidos	Lipopéptidos	Carbamatos	Interferones
Sulfonamidas	Pirimidinas fluoradas	Arsenicales	Análogos ácido-siálicos
Glucopéptidos			
Oxazolidinonas			

En el caso de los antiparasitarios la estructura química es muy similar en todos, se caracterizan por ser estructuras anulares con sustitutos en el anillo como metilos, metoxi, hidroximetil y amino. Por lo que la división por estructura química no está tan definida como para el resto de antimicrobianos.

- **Modo de acción:** Se pueden clasificar según los mecanismos de acción indicados a continuación (Tabla 2):

Tabla 2: Clasificación de los antimicrobianos según el modo de acción sobre el microorganismo.

Antimicrobianos	Mecanismo de acción
Antibacterianos	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibición de la síntesis de la pared celular - Disrupción de la estructura o función de la membrana celular - Inhibición de la estructura y función de los ácidos nucleicos - Inhibición de la síntesis de proteínas - Bloqueo de vías metabólicas clave
Antifúngicos	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibición de la biosíntesis de ergosterol - Disrupción de la membrana fúngica - Alteración en la síntesis de la pared fúngica (inhibidores de β-glucano o quitina) - Alteración en la biosíntesis de esfingolípidos - Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos - Inhibición de la biosíntesis de proteínas o microtúbulos
Antiparasitarios	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibición de la síntesis de cofactores - Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos - Inhibición de encimas y proteínas no enzimáticas - Alteración del sistema neuromuscular
Antivirales	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibición de la penetración viral - Inhibición de la replicación del genoma - Inhibición del ensamblaje, maduración y liberación de las partículas virales

Además, en el caso de los antibacterianos y antifúngicos se pueden clasificar adicionalmente como:

- i. **Bactericida y fungicida:** Sustancia que tienen la capacidad de matar bacterias y hongos respectivamente.
- ii. **Bacteriostático y fungistático:** Sustancias que inhiben el crecimiento y

multiplicación del microorganismo.

- **Espectro de actividad:** los antimicrobianos pueden tener acción sobre microorganismos de diferentes grupos (amplio espectro) o frente a microorganismos muy concretos (espectro reducido o estrecho).
- **Vía de administración:** inyectable, oral y tópica.

5.3 Resistencia microbiana

La ARM emerge por la presión selectiva que el tratamiento con antimicrobianos ejerce sobre los patógenos. Ello comporta que dichos patógenos dejen de responder al tratamiento, ya que sus variantes resistentes se multiplican sin que el fármaco les afecte, dificultando así el control de la infección e incrementando el riesgo de propagación de dicho patógeno ahora resistente al antimicrobiano (WHO 2017).

Además, también pueden emerger variantes resistentes a todos los antimicrobianos clínicos en uso, lo cual provoca la muerte de los pacientes por no disponer de ningún tratamiento eficaz (WHO 2017). Es la denominada multiresistencia antimicrobiana, definida como la no susceptibilidad a un mínimo de tres clases o familias de antimicrobianos diferentes (Liebana et al. 2013).

La ARM presenta una carga social y económica grave. Es responsable de 25.000 muertes al año solo en la Unión Europea y 700.000 muertes en todo el mundo. Se estima que la inacción puede causar millones de muertes y que para 2050 podría causar incluso más muertes que el cáncer (O'Neill 2016)

5.3.1 Tipos de resistencia

La resistencia a los antimicrobianos puede clasificarse en los siguientes tipos (Christaki, Marcou, and Tofarides 2019; J. H. Lee 2019):

- **Resistencia intrínseca:** Es la resistencia debida a las propiedades inherentes del microorganismo. Por ejemplo, la resistencia que los glucopéptidos exhiben a las bacterias gramnegativas debido a la imposibilidad de estos compuestos a atravesar la membrana externa que presentan estas bacterias.
- **Resistencia adquirida:** es cuando una bacteria previamente sensible adquiere un mecanismo de resistencia por mutación o por adquisición de nuevo material genético de una fuente exógena por un proceso de transferencia horizontal de genes. Esta transferencia puede tener lugar por tres mecanismos diferentes (Figura 7):

- i. **Transformación:** adquisición por una célula receptora de fragmentos libres de DNA procedentes de una bacteria muerta donadora.
- ii. **Transducción:** transferencia de material desde una célula donadora a una célula receptora mediante un bacteriófago.
- iii. **Conjugación:** implica la transferencia de material genético de una célula donadora a otra receptora por contacto físico directo entre ambas células. La información genética de la resistencia está codificada en un plásmido que es el que la transfiere.

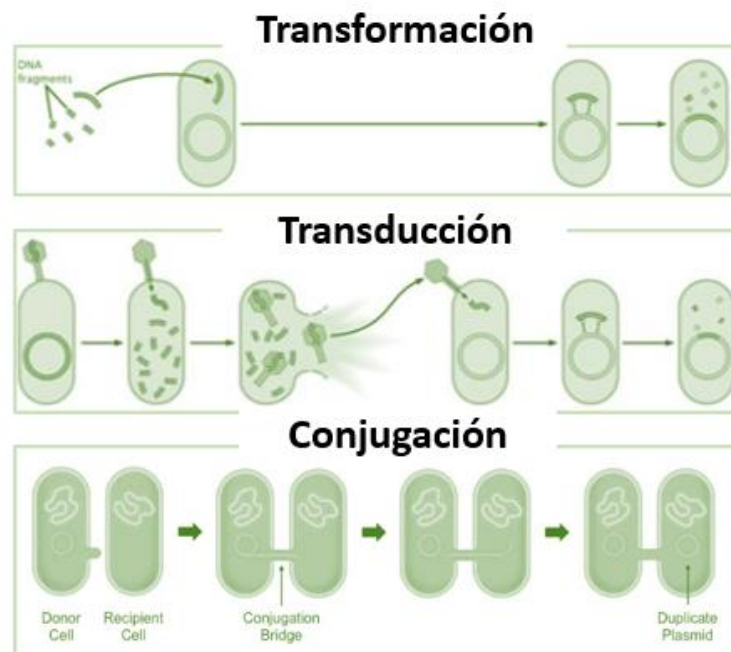


Figura 7: Transferencia genética en bacterias.

Por tanto, la ARM es un fenómeno que ocurre de forma natural por mutación y por transferencia de material genético. Las variantes resistentes suelen encontrarse en una concentración muy baja en las poblaciones microbianas de personas, animales, alimentos, plantas y medio ambiente (agua, suelo y aire) y también en objetos fabricados por el hombre (fómites). Pueden propagarse de persona a persona o entre personas y animales, incluso a través de alimentos de origen animal o vegetal y también desde fómites (WHO 2017).

Ahora bien, una continua presión selectiva sobre estas variantes puede llevar a un incremento muy rápido en la ARM. Es por ello que, actualmente, la ARM se considera una pandemia silenciosa y una de las mayores amenazas para nuestra salud pública (O'Neill 2016).

5.3.2 Mecanismo de resistencia a los antimicrobianos

La resistencia a los antimicrobianos puede tener lugar por diferentes mecanismos,

algunos de los más habituales son los siguientes (Christaki, Marcou, and Tofarides 2019; Ben-Ami and Kontoyiannis 2021; Kimberlin et al. 1995; Secor and Dinh 2006):

- Destrucción del antimicrobiano: el ejemplo más habitual son las β -lactamasas.
- Modificación del antimicrobiano: tiene lugar por enzimas modificadores como por ejemplo la acetilación de cloranfenicol.
- Reemplazo, eliminación o protección de la proteína diana: por ejemplo, proteínas de unión a penicilinas o a los azoles.
- Disminución de la permeabilidad por alteraciones en las membranas microbianas.
- Bombas de eflujo.

5.3.3 Factores potenciadores de la ARM

La ARM ha aumentado exponencialmente en la última década. Se trata de un problema complejo donde varios factores han acelerado la mayor tasa de aparición, entre ellos, destacan los siguientes:

- **Mal o excesivo uso de los antibióticos**

Es la principal causa que ha llevado a la selección más rápida de las variantes resistentes. Como factores a destacar, se encuentran el mal diagnóstico y mala calidad de los antimicrobianos presente en países en vías de desarrollo, errores en la prescripción médica (pautas o selección del medicamento errónea) y la automedicación (WHO 2017; O'Neill 2016).

Por otra parte, cabe destacar, el uso de antimicrobianos en la práctica veterinaria como agentes terapéuticos y profilácticos, además de su uso agrícola en los alimentos como promotores del crecimiento en granjas animales, que ha influido en gran medida en la prevalencia de resistencia (Michael, Dominey-Howes, and Labbate 2014; Dadgostar 2019).

- **Desastres naturales**

El clima influye en la aparición, incidencia y distribución de las enfermedades infecciosas. Las fuertes lluvias y las inundaciones abruman los sistemas de drenaje, propagando microorganismos, mientras que el clima seco favorece la propagación de patógenos transportados por el aire (Byarugaba 2004).

- **Movilidad**

Los continuos movimientos de personas, animales y mercancías han contribuido sustancialmente a la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos en todo el mundo (Castro-Sánchez et al. 2016; Byarugaba 2004).

- **Pobreza económica**

La falta de acceso a agua limpia, saneamiento e higiene tanto para humanos como para animales; escasas medidas de prevención y control de enfermedades e infecciones en los centros de atención de salud y en las explotaciones agrícolas, el acceso deficiente a medicamentos, vacunas y medios de diagnósticos asequibles y de calidad; falta de sensibilización y conocimientos; y el incumplimiento de la legislación son factores que promueven la aparición de ARM (WHO 2017; Planta 2007).

Además, las guerras civiles son responsables del colapso del servicio de salud y han dado como resultado campamento de refugiados donde a menudo, la mala higiene y poco saneamiento ayudan a la propagación de organismos resistentes (Byarugaba 2004).

5.3.4 Posibles soluciones

Los esfuerzos globales para combatir esta gran amenaza incluyen la Declaración política de las Naciones Unidas sobre la ARM de 2016 y el Plan de Acción mundial de la Organización Mundial de la Salud (WHO) de 2015, que posteriormente fue adoptado por la Organización Mundial de Salud Animal (OMSA) y la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (WHO 2017).

En la Asamblea Mundial de la salud del 2015, se adoptó el plan de acción mundial sobre la ARM, con los siguientes 5 objetivos principales (WHO 2017):

1. Mejorar la concienciación y la comprensión a través de la comunicación, educación y formación efectivas.
2. Reforzar los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación.
3. Reducir la incidencia de infecciones con medidas eficaces de saneamiento, higiene y prevención de las infecciones.
4. Optimizar el uso de medicamentos antimicrobianos en salud humana y animal, haciendo un uso racional de ellos.
5. Preparar argumentos económicos a favor de una inversión sostenible que tenga en cuenta las necesidades de todos los países, y aumentar la inversión en nuevos medicamentos, medios de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones.

Como se indica en uno de los cinco objetivos a nivel mundial, la respuesta más repetida y extendida a la resistencia emergente ha sido descubrir nuevos antimicrobianos. Ahora bien, en los últimos años, esta estrategia ha fallado y la resistencia se ha acumulado más rápido que los nuevos antimicrobianos que se han desarrollado (Årdal et al. 2020).

Este estancamiento se ha producido, no solo por las propias dificultades científica del descubrimiento, sino también por la carencia de incentivos financieros para hacerlo. Por lo que es urgente reactivar la investigación y desarrollo de nuevos agentes

antimicrobianos, pero abordando el problema desde un enfoque multidisciplinar (*One health*) considerando también los factores socioeconómicos y buscando y explorando alternativas a los antimicrobianos convencionales.

5.4 Situación actual en tratamiento tópicos

Las infecciones de la piel y mucosas son condiciones comunes que causan considerable morbilidad. Los microorganismos como las bacterias, parásitos y levaduras a menudo contribuyen a estas infecciones. Generalmente, se tratan mediante el uso de antimicrobianos aplicados superficialmente, proporcionando una alta concentración del fármaco en el área deseada con efectos sistémicos limitados o nulos. Pero, desafortunadamente, están apareciendo resistencia a algunos tratamientos.

5.4.1 Farmacorresistencia en bacterias

Fuera del entorno hospitalario, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp, estafilococos coagulasa negativos (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. capitis* y *S. auricularis*), *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* son los patógenos más prevalentes involucrados en infecciones de piel y tejidos blandos (Lio and Kaye 2009). Siendo *S. aureus* la bacteria más común involucrada en infecciones bacterianas agudas de la piel, desde una foliculitis leve y autolimitada hasta una infección necrotizante de tejidos blandos grave (Hatlen and Miller 2021).

Los patrones de sensibilidad conocidos y predecibles de las bacterias anteriores han cambiado considerablemente en los últimos años. La diseminación de los mecanismos de resistencia adquiridos dentro y entre las especies de estafilococos es motivo de preocupación, especialmente para *S. aureus*. Esta bacteria presenta casi un 100 % de resistencia a penicilina debido a la producción de β -lactamasas. Además, la aparición de *S. aureus* resistente a metilina (MRSA) es alta en los hospitales de todo el mundo, con tasas de más del 50 % en América y Asia y entre 25-50 % en la mayoría de los países europeos. Estas tasas tan elevadas son especialmente críticas en las unidades de quemados, los cuales tienen un mayor riesgo de infección por MRSA debido a la pérdida parcial de la barrera de la piel (Perera and Hay 2005; Stefani et al. 2012; Williamson, Carter, and Howden 2017; Pangli and Papp 2019).

El gran inconveniente de MRSA es que se ha demostrado que algunos aislados transfieren resistencia a diferentes clases de antibióticos como mupirocina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, sulfonamidas, cloranfenicol, las cefalosporinas y las quinolonas a otros estafilococos previamente sensibles (Adachi, Akamatsu, and Horio 2002).

A nivel tópico los antibióticos más utilizados son la mupirocina y el ácido fusídico pero el uso generalizado de estos, ha producido un aumento de la resistencia bacteriana, lo

que limita la eficacia potencial de dichos agentes. La prevalencia de resistencia reportada es 0,5-7 % para el ácido fusídico y entre un rango 2-28 % para la mupirocina. A pesar de que la mayoría de los agentes tópicos no se usan sistémicamente, en el caso del ácido fusídico, la resistencia generada por el uso tópico ha impedido el uso sistémico en algunos entornos. Además, existen preocupaciones sobre el posible impacto ecológico nocivo del uso generalizado de antisépticos tópicos, como la clorhexidina y el triclosán (Williamson, Carter, and Howden 2017; McNeil et al. 2011; Hajikhani et al. 2020).

5.4.2 Farmacorresistencia en parásitos

Las enfermedades parasitarias afectan a más de mil millones de personas en todo el mundo y tienen un gran impacto sanitario, social y económico. La carga de estas enfermedades la soportan en gran medida los países subdesarrollados, donde el problema de resistencia a los antimicrobianos incide también en la mayoría de las ramas de la parasitología humana y animal (Muhaj et al. 2022). La larva migratoria cutánea, la sarna, la pediculosis y la tungiasis son las enfermedades epidérmicas parasitarias de la piel más comunes (Feldmeier 2014).

Se ha descrito resistencia a agentes tripanocidas (benznidazol, nifurtimox, melarsoprol), antileishmania (estibogluconato de sodio), antitremátodos (praziquantel) (Muhaj et al. 2022) y a agentes antiectoparásitos como son la sarna y los piojos (permetrina) (Gunning, Kiraly, and Pippitt 2019).

5.4.3 Farmacorresistencia en hongos

Entre las infecciones fúngicas, las micosis superficiales son las formas de infección más frecuentes y afectan al 20-25 % de la población mundial. Estas incluyen dermatofitosis o tiña, candidiasis superficial o infecciones por *Malassezia*. En las cuales, la evolución de las resistencias a los antifúngicos ha aumentado significativamente en la última década. El tratamiento se basa en 3 clases de fármacos principalmente: azoles, alilaminas y polienos. Considerando la cantidad limitada de medicamentos fúngicos existente, la resistencia a una clase deja pocas opciones de tratamiento y se asocia con resultados clínicos deficientes, especialmente en huéspedes vulnerables (inmunocomprometidos), y con mayores costos de atención médica (Muhaj et al. 2022; Pai, Ganavalli, and Kikkeri 2018).

Destaca la resistencia de los azoles (itraconazol, fluconazol y clotrimazol) ya que son la primera línea terapéutica para tratar micosis superficiales. Por ejemplo, en los dermatofitos la tasa de resistencias es del 19 %. Los dermatofitos que afectan a los humanos pertenecen a tres géneros principales: *Trichophyton*, destacando *T. rubrum*, *Microsporum* o *Epidermophyton* (Hay 2000; Gupta and Venkataraman 2022).

En el caso de las candidiasis, se tratan de infecciones producidas por levaduras del género *Candida* concretamente por las especies *C. albicans*, *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*, siendo *C. albicans* la principal causa de candidiasis en la mayoría de los entornos clínicos (80 %). La propagación de la resistencia a los azoles es muy común en estas levaduras, se han descrito farmacorresistencia primaria a fluconazol en todas las cepas anteriores, siendo la tasa de prevalencia muy diferente según el país. Además, los recientes brotes de *C. auris* en varios países se considera una grave amenaza para la salud mundial puesto que es un patógeno emergente que puede causar infecciones invasivas con alta mortalidad. Se trata de una levadura resistente a múltiples fármacos, entre ellos los azoles, la anfotericina B y la caspofungina. Por ejemplo, un estudio de 2017 informó que el 93 % de los aislamientos de *C. auris* eran resistentes al fluconazol (Pristov and Ghannoum 2019; Cui et al. 2022; Ben-Ami and Kontoyiannis 2021).

Por otra parte, para especies de mohos no dermatofitos (*Aspergillus*) que pueden dar lugar a infecciones oportunistas también se han reportado resistencias a azoles, incluido a los nuevos antifúngicos triazoles (voriconazol) (Gupta and Venkataraman 2022). Este hecho se ha relacionado con el uso de azoles en la agricultura desde la década de 1960 (Marquez and Quave 2020).

5.4.4 Farmacorresistencia en virus

Dada la emergencia de nuevas infecciones virales en humanos y el incremento de persona inmunocomprometidas, cada vez hay un mayor uso de los medicamentos antivirales. Estos tratamientos generalmente van dirigidos a los mecanismos de replicación viral. Si el tratamiento es efectivo y la capacidad de multiplicación viral se deteriora lo suficiente, no se producirán genomas virales que se repliquen con éxito, pero si el tratamiento no es tan eficaz y algunos genomas se replican, puede producirse una presión selectiva en rápida adaptación hacia la resistencia antimicrobiana. Esto se ve agravado por la alta tasa de mutación que caracteriza, en particular, a virus de RNA (Hayden and De Jong 2011).

En el caso de enfermedades tóxicas, el tratamiento habitualmente empleado es el aciclovir. La resistencia a este fármaco es rara entre las personas inmunocompetentes, con tasas reportadas por debajo del 1 %. Por el contrario, se ha notificado altas tasas de virus herpes simple resistente en pacientes con uveítis o queratitis que oscilan entre 40 y 50 % (Chaplin 2016).

6. Descubrimiento y desarrollo de medicamentos

El descubrimiento de fármacos es un proceso costoso que, en promedio, lleva más de una década, desde la etapa inicial de descubrimiento hasta la aprobación y su comercialización final (Figura 8). La FDA, divide el proceso de comercialización de un

nuevo fármaco en 5 etapas principales (R. Shukla, Handa, and Pardhi 2020; Narayan 2011; FDA 2018):

1. **Descubrimiento y desarrollo:** identificación de candidatos potenciales y desarrollo de estos en medicamento, en base a estudios de farmacocinética, mecanismos de acción y características galénicas.
2. **Evaluación preclínica:** antes de testar los fármacos en humanos, estos deben ser evaluados mediante pruebas *in vitro* e *in vivo* (animales) y así detectar el potencial de causar daño o toxicidad. Los estudios preclínicos incluyen estudios de seguridad en animales, de toxicidad a dosis repetida, de carcinogénesis, de metabolismo y de escalado de dosis.
3. **Investigación clínica:** fase en la que el fármaco es ensayado en humanos. Hay diferentes etapas en función del objetivo evaluado y el número de participantes:
 - **Fase I:** Pequeños ensayos con bajo número de voluntarios, generalmente entre 20-100. El objetivo es estudiar la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética (absorción, metabolismo y excreción) y farmacodinamia del fármaco.
 - **Fase II:** son ensayos más grandes que los de Fase I, donde el número de pacientes oscila entre 100 y 300. En esta etapa se estudia la eficacia del fármaco y se obtiene información preliminar sobre los efectos adversos. Además, se evalúan varias dosis para establecer el rango óptimo dosis-respuesta.
 - **Fase III:** El número de pacientes se encuentra en un rango de 300 a 1000 para seguir estudiando la eficacia y los efectos adversos del medicamento en una población mayor.
4. **Evaluación y aprobación del dossier:** Las agencias reguladoras evalúan la información aportada y gestionan la autorización de comercialización.
5. **Fase IV:** es la monitorización de la seguridad de los medicamentos una vez comercializados, haciendo un seguimiento de los efectos adversos.

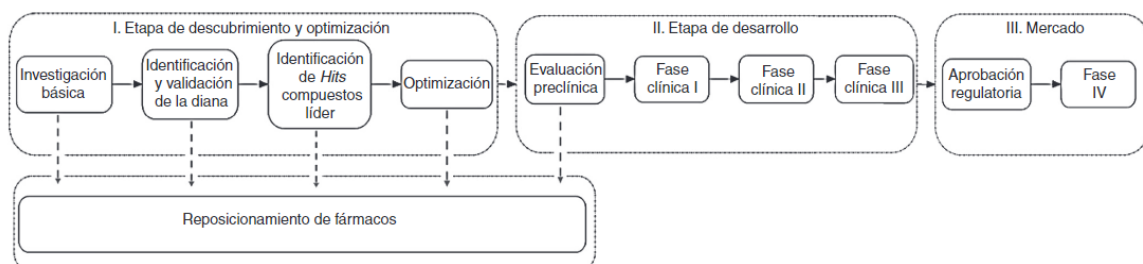


Figura 8: Etapas principales en el desarrollo clásico de un medicamento. Saldívar-González, Prieto-Martínez, and Medina-Franco 2017.

Al tratarse de un proceso largo y costoso, el área industrial de investigación y desarrollo (R&D) busca continuamente nuevas metodologías para acelerar e impulsar el descubrimiento, reduciendo costes y tiempos. Sin embargo, la identificación de un candidato robusto y viable desde la etapa inicial hasta el fármaco final sigue siendo un desafío que la industria farmacéutica está tratando de superar (Berdigaliyev and Aljofan 2020).

Actualmente, existen diferentes estrategias para mejorar el proceso de descubrimiento de candidatos potenciales. Desde la clásica búsqueda de compuestos naturales hasta la utilización de técnicas computacionales, siendo el reposicionamiento de fármacos una estrategia de especial interés.

6.1 Fuentes naturales

Históricamente, el descubrimiento de fármacos se basaba únicamente en productos naturales. Estos productos han influido significativamente en los avances de la biología y han inspirado el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Los fármacos naturales y medicamentos de origen natural son aquellos que contienen ingredientes farmacológicamente activos derivados de procesos biológicos o fuentes minerales, destinados a ser utilizados en el diagnóstico, cura, mitigación o prevención de enfermedades (Berdigaliyev and Aljofan 2020; Chin et al. 2006).

A pesar de sus potenciales, las compañías farmacéuticas parecen reducir su uso debido a los desafíos en la purificación y caracterización que presentan y a los notables avances en síntesis combinatoria y en el cribado de alto rendimiento (HTS) que, en consecuencia, han permitido la generación de una gran cantidad de bibliotecas sintéticas de moléculas pequeñas. Sin embargo, dada las estructuras químicas tan amplias y diversas que presentan estos compuestos, el interés sobre ellos podría resurgir de nuevo para así poder hacer frente a los nuevos desafíos que se presentan en áreas terapéuticas tan importantes y cruciales, como son, las enfermedades metabólicas, la inmunosupresión y los antiinfecciosos (Berdigaliyev and Aljofan 2020; J. T. Baker et al. 1995; Xu et al. 2022).

6.2 Bibliotecas de moléculas pequeñas y *High-Throughput Screening* (HTS)

El avance de la ciencia y la tecnología cambió el enfoque del descubrimiento de fármacos tradicional basado en plantas y microorganismos a la utilización de bibliotecas de moléculas pequeñas (masa molecular inferior a 500 Da) (Berdigaliyev and Aljofan 2020).

Por lo general, un cribado de moléculas pequeñas es un proceso en el que cientos o miles de moléculas son examinadas sistemáticamente frente a un objetivo biológico determinado (diana). Este procedimiento es muy utilizado por la industria farmacéutica,

donde se generan y analizan diferentes bibliotecas en grandes cantidades utilizando HTS. El objetivo es detectar moléculas que modulen un proceso biológico particular y, por lo tanto, puedan convertirse en un posible candidato. Esto permite a la industria producir moléculas a gran escala a un coste muy bajo. HTS es un punto de partida en el descubrimiento, para posteriormente optimizar estas moléculas y convertirlas en el candidato final (J. Larsen et al. 2014; Auld et al. 2018).

Uno de los modelos de cribado HTS más utilizado es el método basado en cultivos celulares, que puede proporcionar una cantidad considerable de información biológica. Este tipo de cribado es ampliamente utilizado para seleccionar fármacos con acción antimicrobiana. Además, la combinación de los cultivos celulares junto con el procesamiento de imágenes y el análisis de datos permite la monitorización de respuestas no solo para la búsqueda de posibles candidatos sino también para la identificación de posibles nuevas dianas terapéuticas (Berdigaliyev and Aljofan 2020; An and Tolliday 2010; Zang et al. 2012).

Ahora bien, la principal desventaja es la limitación en cuanto a dianas que presentan las moléculas pequeñas. Este tipo de moléculas debido a su estructura y propiedades fisicoquímicas puedan interactuar con un bajo número de dianas biológicas.

6.3 Métodos de diseño de fármacos computacionales

El diseño de fármacos mediante sistemas computacionales (CADD) ha acelerado considerablemente el tiempo de descubrimiento reduciendo el costo. Utiliza dos enfoques principales (Joy Macalino et al. 2015; S. Zhang 2011; Leelananda and Lindert 2016):

- i. **Métodos basados en la estructura:** consiste en el análisis de la estructura de la diana biológica y en la identificación de los lugares que son cruciales para las funciones biológicas de esa diana. Entonces, el sistema computacional ayuda a diseñar compuestos capaces de interactuar con la diana objetivo y de afectar su función biológica.
- ii. **Métodos basados en el ligando:** se evalúa las propiedades y actividades fisicoquímicas de ligandos conocidos, y luego se proporciona diferentes diseños de nuevos compuestos con actividades deseadas. Método especialmente útil cuando la información de una diana es limitada o ausente.

Generalmente, CADD utiliza algoritmos que permiten diseñar compuestos novedosos con alta probabilidad de ser altamente activos, fácilmente sintetizables y evitando propiedades indeseables.

6.4 Origen biológico

Los productos biológicos son medicamentos derivados de células vivas o de procesos biológicos. Son moléculas relativamente complejas que, generalmente, consisten en proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos, células o tejidos, o un compuesto complejo formado por varias de estas sustancias. Algunos ejemplos incluyen hormonas, vacunas, hemoderivados, alergénicos, anticuerpos monoclonales, proteínas terapéuticas recombinantes, terapias génicas y celulares, factores de crecimiento, citocinas e insulina, entre otros (Makurvet 2020).

Los medicamentos biológicos son de interés creciente en los últimos años, por delante de las moléculas químicas pequeñas. Las terapias biológicas se han empleado desde hace muchos años, como es el caso de la hormona de crecimiento. Ahora bien, el aumento del conocimiento en genómica y procesos biológicos ha dado como resultado el hallazgo de nuevas dianas biológicas hasta ahora desconocidas.

Las principales desventajas, se basan en la estructura grande y compleja que presentan estos medicamento, su alto precio y su menor estabilidad en comparación con las moléculas químicas (Berdigaliyev and Aljofan 2020; G Lawson 2012).

6.5 Reposicionamiento

El ritmo lento de desarrollo de nuevos fármacos, su alto costo y la alta tasa de fallas en las últimas etapas del proceso (fase preclínica y clínica especialmente) hacen que la reutilización o reposicionamiento de medicamentos “antiguos” sea un enfoque más atractivo y rentable (Berdigaliyev and Aljofan 2020). El término reposicionamiento hace referencia al proceso de búsqueda de nuevas indicaciones terapéuticas a medicamentos ya comercializados. Esta vía es cada vez más común y permite superar las barreras asociados a un nuevo desarrollo, como son el poco apoyo financiero, cronograma largo o restricciones de uso por efectos adversos (Rudrapal, J. Khairnar, and G. Jadhav 2020).

Esta estrategia ofrece varias ventajas sobre el desarrollo de un fármaco completamente nuevo para una determinada indicación. Primero, y quizás lo más importante, el riesgo de fracaso es menor; debido a que ya se ha encontrado que el fármaco reutilizado es lo suficientemente seguro en modelos preclínicos y en humanos. Si se han completado los ensayos en etapa inicial, es menos probable que fracase, al menos desde el punto de vista de la seguridad, en los ensayos de eficacia posteriores. En segundo lugar, el marco de tiempo para el desarrollo de fármacos se puede reducir, porque la mayoría de las pruebas preclínicas, la evaluación de la seguridad y, en algunos casos, el desarrollo de la formulación ya se habrá completado. En tercer lugar, se necesita menos inversión, aunque esto variará mucho según la etapa y el proceso de desarrollo del candidato a reutilización. En definitiva, todos los datos de seguridad, preclínicos y de eficacia están fácilmente disponibles para una molécula reutilizada, lo que permite al investigador

tomar una decisión informada en cada etapa del desarrollo del medicamento (Parvathaneni et al. 2019; Pushpakom et al. 2018).

Históricamente, el reposicionamiento de medicamentos ha sido, en la mayoría de los casos, oportunista y fortuito. Una vez se descubría que un fármaco tenía un efecto fuera del objetivo o un efecto en el objetivo recién reconocido, se seguía adelante para la explotación comercial. Los ejemplos más exitosos de reutilización de medicamentos hasta el momento no han implicado un enfoque sistemático. Estos son, la reutilización del citrato de sildenafil para la disfunción eréctil que se basó en la experiencia clínica retrospectiva, y la reutilización de la talidomida para el eritema nodoso leproso y el mieloma múltiple que fue casualidad (Pushpakom et al. 2018; Rudrapal, J. Khairnar, and G. Jadhav 2020).

Actualmente, la estrategia de reutilización de fármacos consta de tres pasos antes de llevar al candidato a la comercialización final para la nueva indicación (Parvathaneni et al. 2019; Pushpakom et al. 2018; Rudrapal, J. Khairnar, and G. Jadhav 2020):

- i) **Identificación de una molécula candidata** para una indicación determinada. Las nuevas indicaciones pueden identificarse por casualidad, como los ejemplos históricos anteriores, o pueden basarse en hipótesis a través de enfoques racionales. Las estrategias basadas en hipótesis pueden incluir estrategias experimentales y computacionales que tienen un enorme potencial para establecer una mejor comprensión de los mecanismos y vías involucrados en la patogénesis de la enfermedad.
- ii) **Evaluación mecanicista** del efecto del fármaco en modelos preclínicos.
- iii) **Evaluación de la eficacia** en ensayos clínicos de fase II, suponiendo que haya suficientes datos de seguridad de los estudios de fase I realizados como parte de la indicación original.

Hay una serie de barreras legales y de propiedad intelectual para la reutilización de medicamentos. Las dificultades asociadas con patentar una nueva indicación reutilizada y hacer cumplir los derechos de patente, son los obstáculos críticos para incentivar la reutilización de medicamentos, ya que tienen un gran impacto en las ganancias potenciales esperadas del producto reutilizado. Además, existen consideraciones normativas que limitan la exclusividad de mercado de estos medicamentos. Por lo que, el reposicionamiento puede no ser tan atractivo económicamente para las empresas como lo son las demás estrategias (Berdigaliyev and Aljofan 2020; Parvathaneni et al. 2019; Pushpakom et al. 2018).

7. Tenutex®

Tenutex® es una emulsión cutánea que contiene dos principios activos: 22,5 % de bencil benzoato (BB) y 2 % de disulfiram (D). Este medicamento se registró en Suecia en 1982 y en Islandia en 1997 para el tratamiento de sarna y pediculosis (piojos de la cabeza y pubis) tanto en adultos como en niños. Actualmente su uso está restringido a estas áreas geográficas y no se han descrito resistencias (G. Brinck-Lindroth, Lundqvist, and Nilsson 1984; Soerensen et al. 2021).

Además, contiene dos principios activos diferentes, los cuales pueden inhibir al patógeno objetivo por diferentes vías o inhibir objetivos diferentes que acaban dando una sinergia en la respuesta final. Generalmente, la resistencia a monoterapias suele aparecer de manera más rápida que en terapias combinadas (Pokrovskaya and Baasov 2010).

Esta restricción geográfica junto con el hecho de contener dos principios activos diferentes, puede ser una oportunidad para evitar o retrasar la posible resistencia al tratamiento de estas infecciones. Este hecho es especialmente interesante, dada la situación de emergencia actual de farmacoresistencia a algunos tratamientos tópicos como la permetrina (Gunning, Kiraly, and Pippitt 2019).

Sin embargo, aunque Tenutex® es un fármaco bien establecido en Suecia, sus propiedades biofarmacéuticas, como la absorción a través de la piel y sus efectos *in vitro* sobre la sarna no se han descrito en la bibliografía. También cabe mencionar que los efectos *in vitro* sobre los piojos son de principios de la década de 1980. Con lo cual, la información disponible para poder plantear el uso de este medicamento en otros países se encuentra desactualizada (G. Brinck-Lindroth, Lundqvist, and Nilsson 1984).

El BB, activo mayoritario de la crema, es una molécula de éster de benzoato obtenido por la condensación formal del ácido benzoico con alcohol bencílico (Figura 9). Se encuentra en estado natural en el bálsamo del Perú y el bálsamo de Tolu y también en los aceites esenciales de Jasmín y Ylang-ylang. Presenta actividad como escabicida, acaricida y metabolito vegetal ('Benzyl Benzoate | C₁₄H₁₂O₂ - PubChem' 2023).

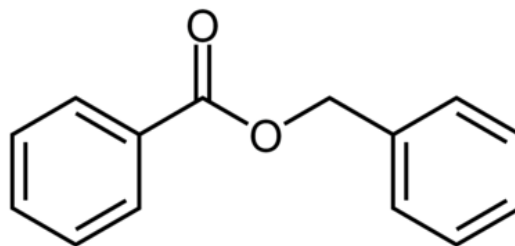


Figura 9: Estructura química de bencil benzoato. *Wikimedia Commons*, licencia de dominio público.

El papel como agente antiparasitario del BB es ampliamente conocido, y se emplea en diferentes países para tratar infecciones por piojos y ácaros de la sarna ya que presenta acción neurotóxica sobre estos organismos. Es uno de los tratamientos recomendados en las guías europeas para el manejo de la sarna (Salavastru, Chosidow, Boffa, et al. 2017). Además, es una sustancia ampliamente utilizada en cosmética como ingrediente de fragancias y como solvente. Se considera un compuesto con un uso seguro en la práctica habitual (Johnson et al. 2017).

El BB también se caracteriza por ser el principal componente de muchos aceites esenciales, algunos de los cuales, tradicionalmente, se relacionaban con propiedades antimicrobianas. Por ejemplo, *Kaempferia rotunda* es una planta medicinal típica en Indonesia a la que se le asocia actividad antioxidante, insecticida, antiinflamatoria, antihelmíntica, antihiperglucémica, antinociceptiva, antimicrobiana y antiandrogénica. El aceite esencial de esta planta está formado por 75 compuesto diferentes, pero el mayoritario es BB (70 %). Tras testar el aceite frente a diferentes bacterias mostró acción antibacteriana moderada para *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Bacillus cereus* (Diastuti, Chasani, and Suwandri 2019).

El posible mecanismo antibacteriano no se ha estudiado en gran detalle y por ahora es desconocido, los compuestos de hidrocarburos cíclicos parecen no tener dianas celulares específicas. Ahora bien, dada su alta lipofilia tienen la capacidad de traspasar la pared celular y la membrana citoplasmática, interrumpiendo la estructura de las diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos, hecho que puede producir la coagulación del citoplasma y dañar los lípidos y proteínas. Esta alteración celular es la que pudiera explicar la actividad antibacteriana hallada (Diastuti, Chasani, and Suwandri 2019).

Por otra parte, el segundo componente de la crema, disulfiram, es un disulfuro orgánico que resulta de la dimerización oxidativa formal del ácido N,N-dietilditiocarbámico (Figura 10). Este ditiocarbamato fue comercializado por primera vez como Antabuse®, un medicamento indicado para el tratamiento del alcoholismo que fue aprobado por la FDA en 1951 y que se ha utilizado ampliamente en clínica durante más de 70 años sin efectos secundarios graves ('Disulfiram | C₁₀H₂₀N₂S₄ - PubChem' 2023).

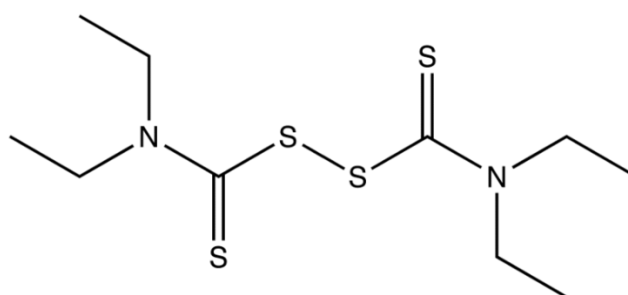


Figura 10: Estructura química de disulfiram. *Wikimedia Commons*, licencia de dominio público.

A principios de la década de 1940, el Dr. Jacobsen junto con el Dr. Jens estudiaron el efecto del D para curar animales domésticos con sarna. Los hallazgos de estos investigadores suecos fueron recibidos con interés en Copenhague, donde la empresa química Medicinalco Inc. estableció la primera producción propia de un ungüento de D para tratar la sarna. Durante 1940-1945, el Dr. Jacobsen y el Dr. Hald, se dieron cuenta que el efecto sobre *Sarcoptes scabiei* del D era debido a su capacidad para absorber cobre y formar quelatos con el metal, ya que en las formas inferiores de vida el oxígeno se transporta por cobre y no por hierro como en el caso de los vertebrados (Raos et al. 2008; Lanz et al. 2023). Dada la estructura química que presenta, D es una molécula especialmente interesante para un potencial reposicionamiento.

8. Disulfiram

El D fue sintetizado por primera vez en 1881 por el químico alemán M. Grodzki, pero en ese momento, recibió poco reconocimiento. Cincuenta años más tarde, el compuesto fue redescubierto como un agente para acelerar la vulcanización del caucho. En 1937, el médico estadounidense EE. Williams observó que los trabajadores de la planta de caucho experimentaban efectos fisiológicos negativos después de la ingestión de alcohol, pero pasaría otra década antes de que este efecto único del D se investigara por primera vez para un uso clínico. Fue entre 1948 y 1953, cuando realmente se estudió el D, sus efectos y su posible utilidad como tratamiento para el trastorno por consumo de alcohol. Siendo en 1951, cuando se convirtió en el primer tratamiento aprobado por la FDA para el alcoholismo en los Estados Unidos (Suh et al. 2006; Lanz et al. 2023).

Desde la introducción de otros tratamientos farmacológicos aprobados por la FDA, como la naltrexona y el acamprosato, el D ha perdido popularidad como tratamiento para el alcoholismo. Sin embargo, siguiendo el razonamiento del reposicionamiento, sigue siendo un fármaco de interés en muchas facetas de la medicina clínica, ya que se siguen descubriendo nuevos mecanismos y posibles nuevos usos (Ehrie et al. 2020).

8.1 Mecanismo de acción

El D es un compuesto electrofílico de amonio cuaternario que se ha demostrado que inhibe potentemente diversas enzimas. Entre ellas, se ha descrito inhibición sobre las siguientes enzimas: aldehído deshidrogenasa (ALDH), metiltransferasa, ureasa y quinasa. Contiene un enlace disulfuro que se reduce fácilmente por los grupos sulfhidrilo libres de las proteínas a través de la reacción de intercambio tiol-disulfuro. Esta reacción irreversible modifica covalentemente los residuos de cisteína de las enzimas anteriores, provocando la inhibición de la función enzimática y dando como resultado la liberación de una molécula de dietilditiocarbamato (DDTC) (Frazier, Moore, and Long 2019; Lin et al. 2018).

El DDTC es la forma reducida de D (Figura 11) y es un poderoso quelante de iones de

metales divalentes de transición, incluidos el cobre y el zinc. A través de la quelación de cofactores esenciales, el DDTC puede afectar la función de las enzimas que contienen metales, incluidas la ALDH, la carboxilesterasa, la colinesterasa, la superóxido dismutasa y la dopamina β -hidroxilasa (DBH) (Lewis et al. 2014; Lanz et al. 2023).

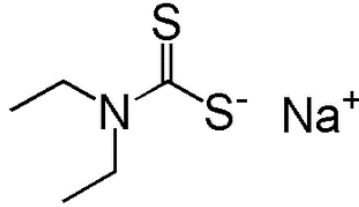


Figura 11: Estructura química de dietiltiocarbamato. *Wikimedia Commons*, licencia de dominio público.

El D también es capaz de alterar el entorno intracelular mediante la manipulación directa o indirecta de la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS son generadas por las células de forma endógena durante el proceso de fosforilación oxidativa o en respuesta a patógenos extraños. Cuando la concentración de ROS supera la respuesta antioxidante de la célula, esta sufre estrés oxidativo que conduce al daño de componentes celulares como el DNA, las proteínas y las membranas lipídicas, que puedan acabar provocando la muerte celular (Ray, Huang, and Tsuji 2012; Peniche et al. 2015).

8.2 Características farmacocinéticas

El D es un fármaco administrado por vía oral con dosis estándar que oscilan entre 250 y 500 mg diarios, donde el 80-90 % de la dosis se absorbe en el tracto gastrointestinal. Debido a su alta solubilidad en lípidos, el D y sus metabolitos se distribuyen ampliamente en el tejido adiposo de todo el cuerpo y cruzan fácilmente la barrera hematoencefálica. La farmacocinética no se conoce bien, hay escasez de datos farmacocinéticos completos debido en parte a las limitaciones de los métodos de detección. En estudios humanos, las vidas medias de D y DDTC se estiman en 7 h y 15 h, respectivamente. Ahora bien, se observa una alta variabilidad entre sujetos y estudios. Aunque no se ha establecido el motivo de esta variabilidad, puede deberse a diferencias en el metabolismo del paciente, el contenido de lípidos, la circulación enterohepática o la capacidad de unión a proteínas en el plasma (Faiman, Jensen, and Lacoursiere 1984; Johansson 1992).

Disulfiram se metaboliza ampliamente *in vivo* y se biotransforma rápidamente en productos metabólicos que son responsables de sus usos clínicos (DDTC). Una vez que se reduce a DDTC, tiene tres destinos metabólicos posibles (Lanz et al. 2023):

- **Degradación espontánea:** el DDTC es ácido-lábil. En un ambiente ácido, se descompone en dietilamina y disulfuro de carbono.
- **Formación de glucurónido:** Se produce mediante la enzima

glucuronosiltransferasa, que se expresa en gran medida en el hígado.

- **Formación de ésteres metílicos:** las enzimas tiol metiltransferasa (microsomal) y tiopurina metiltransferasa (citosólica), que se encuentran en el hígado y otros tejidos, incluido el tracto GI, los pulmones y los riñones, catalizan la metilación de DDTC.

8.3 Potenciales usos clínicos

8.3.1 Trastorno por consumo de alcohol

El D se ha utilizado en el tratamiento de la dependencia del alcohol por su efecto inhibitorio sobre la ALDH. Se trata de una terapia de aversión, en la cual se produce un efecto de rechazo al consumo de alcohol por estímulo eléctrico, químico o conductual del fármaco administrado y que produce un efecto farmacológico muy desagradable si se consume con alcohol. D inhibe irreversiblemente la ALDH al competir con el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) en el residuo de cisteína del lugar activo de la enzima. Es capaz de inhibir todas las isoformas citosólicas y mitocondriales actualmente identificadas. La ALDH es una enzima hepática de la principal vía oxidativa del metabolismo del alcohol, que convierte el acetaldehído en acetato. El consumo de alcohol junto con D, provoca un aumento del acetaldehído sérico, lo que provoca diaforesis, palpitaciones, enrojecimiento facial, náuseas, vértigo, hipotensión y taquicardia (Figura 12). Este conjunto de síntomas se conoce como la reacción disulfiram-alcohol y es lo que desalienta la ingesta de alcohol facilitando su deshabituación (Wright and Moore 1990; Skinner et al. 2014).

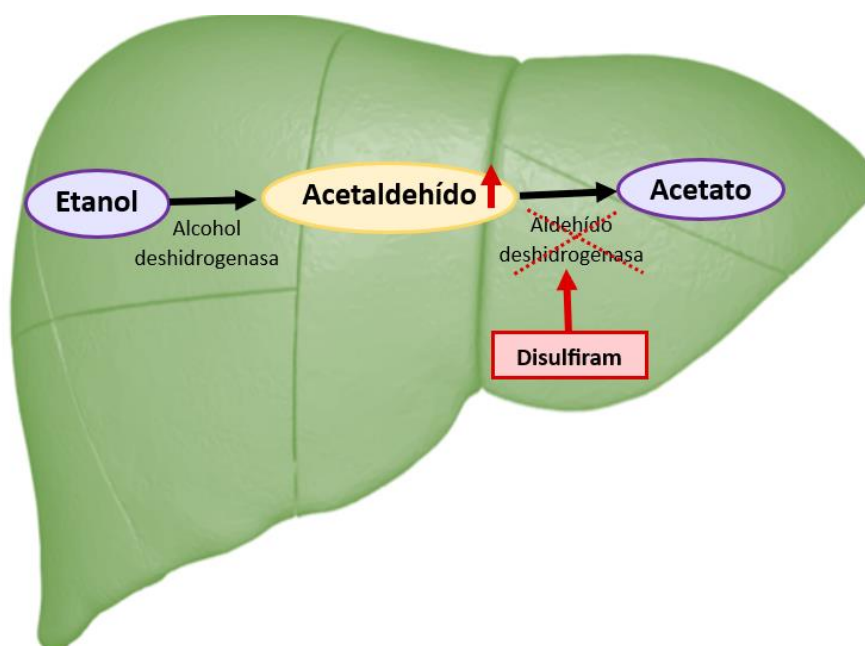


Figura 12: Metabolismo del alcohol y mecanismo de acción de disulfiram.

8.3.2 Adicción a la cocaína

D es capaz de inhibir la DBH, una enzima que convierte la dopamina en noradrenalina, lo que provoca la acumulación de dopamina en el sistema nervioso central corrigiendo el déficit subyacente en pacientes adictos a la cocaína. Por lo general, el uso de cocaína provoca un aumento en la liberación de dopamina en las hendiduras sinápticas dentro del sistema nervioso central, lo que produce una repuesta eufórica. Sin embargo, el uso crónico de cocaína conduce a la tolerancia del sistema dopaminérgico, lo que resulta en una disminución de la capacidad de respuesta de la dopamina a los estímulos. Se cree que la liberación de dopamina inducida por D provoca efectos indeseables con el consumo de cocaína, como ansiedad, depresión y paranoia. Similar a la reacción de disulfiram-alcohol, esta reacción negativa disminuye las ansias y aumenta la abstinencia del consumo de cocaína en los pacientes. Otro estudio encontró que, en lugar de aumentar los efectos indeseables, el D fue eficaz para disminuir los efectos deseables de la cocaína (Gaval-Cruz and Weinshenker 2009; J. R. Baker, Jatlow, and McCance-Katz 2007).

Independientemente del mecanismo de acción, estudios recientes han demostrado una reducción en la frecuencia y la cantidad del consumo de cocaína en pacientes tratados con D, demostrando ser un tratamiento clínico eficaz para el tratamiento de la adicción (Qian and Cantrell 2017; Lanz et al. 2023).

8.3.3 Cáncer

Dada la estructura química de D y su principal metabolito (Figura 10 y 11) puede actuar como quelante de iones metálicos bivalentes como son el zinc o el cobre. Recientemente, D ha destacado como posible terapia contra el cáncer por su citotoxicidad selectiva mediada por cobre. Se ha encontrado en varios cánceres niveles altos de ceruloplasmina sérica, la principal proteína transportada del cobre y asociada a la angiogénesis, hecho que pudiera explicar la citotoxicidad selectiva de D (Lanz et al. 2023).

El cobre es un micronutriente esencial involucrado en los procesos vitales fundamentales de todas las formas de vida, juega un papel crucial en las reacciones redox y desencadena la generación de ROS. El D, quela al cobre formando un complejo con este (D/Cu), que es más fácilmente absorbido por las células y ejerce efectos citotóxicos en una variedad de células cancerosas (Li et al. 2020; Liu et al. 2012).

Por otra parte, en estudios mecanísticos adicionales, se ha demostrado que D en combinación con iones de cobre inhibe o suprime la señalización de NF- κ B, la actividad del proteosoma, la actividad de ALDH y los niveles de antioxidantes, lo que induce la apoptosis celular. El agotamiento de cobre y otros iones metálicos puede inhibir importantes enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, alterando aún más

el equilibrio pro y antioxidante de la célula (Lu et al. 2021; Lanz et al. 2023).

Otro mecanismo potencial para la inducción de la muerte celular es la inhibición de D sobre procesos intracelulares como la vía de la ubiquitina-proteasa, que es responsable de marcar y eliminar las proteínas mal plegadas. La inhibición de este sistema permitiría la acumulación de proteínas citotóxicas o innecesarias que podrían producir estrés celular y finalmente matar a la célula (R. Kona, Buac, and M. Burger 2011).

Actualmente hay 22 ensayos clínicos de fase I-III enumerados en Clinicaltrials.gov en los cuales se está investigando la acción de D para el tratamiento del cáncer, incluyendo cáncer de mama, de próstata, de páncreas, de hígado, de pulmón de células no pequeñas, tumores testiculares de células germinales, mieloma múltiple, sarcoma, melanoma y glioblastoma (Lanz et al. 2023).

8.3.4 Infecciones

Desde la década de 1940, el D se ha investigado como un posible medicamento antiparasitario, antibacteriano, antifúngico y antiviral para infecciones que van desde la tuberculosis multirresistente hasta el nuevo coronavirus SARS-CoV-2. Este interés en el uso de D frente a infecciones es debido a dos razones principales. Primero, la necesidad de nuevos medicamentos que puedan minimizar el riesgo de resistencia a los antimicrobianos. En segundo lugar, el hecho de que utilizar un medicamento existente es más económico y requiere de menor tiempo hasta la comercialización (Lanz et al. 2023; Meneguello et al. 2022).

La capacidad de D para formar enlaces disulfuro con compuestos que tienen tioles le permite unirse y modificar enzimas y cofactores microbianos. Estudios *in vitro* de D y sus metabolitos contra organismos grampositivos han determinado que inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* del grupo A, *Enterococcus faecium* y *Bacillus cereus* (Long 2017; Meneguello et al. 2022).

También hay estudios publicados que muestran la eficacia de D frente a *Mycobacterium tuberculosis* sensible y resistente a múltiples fármacos y frente a la espiroqueta causante de la enfermedad de Lyme, *Borrelia burgdoferi* (Horita et al. 2012; Gao et al. 2020; Potula et al. 2020).

Como se ha indicado en la sección 7, D destacó originalmente por sus propiedades antiparasitarias frente a sarna. Ahora bien, también ha mostrado potencial como posible tratamiento para otras infecciones parasitarias tales como la malaria, por inhibición de las enzimas oxidasas de *Plasmodium falciparum* e infecciones por *Gardia*, por inhibición de la enzima carbamato quinasa necesaria para la síntesis de ATP. También, existe cierta evidencia que D podría ser eficaz frente a trematodos del género *Schistosoma* o protozoos del género *Leishmania* (Lanz et al. 2023).

En cuanto a las infecciones por hongos, mediante el cribado de pequeñas bibliotecas moleculares se ha identificado a D como posible fármaco antifúngico y se ha demostrado su actividad frente a diferentes especies de *Candida* (Hao et al. 2021; Stylianou et al. 2014).

Por otra parte, el zinc desempeña un papel fundamental en las reacciones catalizadas por enzimas en multitud de virus, incluidos el VIH, el virus de la hepatitis C y el arenavirus. Por ello, fármacos como el D que tienen la capacidad de eliminar zinc de estas enzimas virales podrían inhibir la replicación viral y ser candidato potencial para la terapia antiviral. Diferentes estudios frente el VIH y hepatitis C han mostrado la actividad antiviral de D y sus metabolitos (Y. M. Lee et al. 2016; Knights 2017).

Más recientemente, se ha realizado un estudio donde D muestra actividad inhibitoria sobre las proteasas de los virus MERS-CoV y SARS-CoV. Estas proteasas y muchas otras, contienen residuos de cisteínas que son cruciales para la función del enzima. D puede unirse y modificar covalentemente estos residuos, inhibiendo así la actividad del coronavirus (Lin et al. 2018).

8.3.5 Otros usos

Debido a la capacidad de D de inhibir el factor nuclear $\kappa\beta$ se está empezando a estudiar sus efectos antiinflamatorios sobre afectaciones como la endometriosis, pancreatitis y fibrosis. Asimismo, la alta solubilidad en lípidos de D y su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica indica que tiene un potencial interés en enfermedades neurológicas como por ejemplo el Alzheimer (Lanz et al. 2023).

D destaca por sus muchas potenciales aplicaciones y desafíos. Por lo que la investigación adicional es una herramienta fundamental para determinar el potencial clínico completo de esta molécula.

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

La Organización Mundial de la Salud considera que la resistencia antimicrobiana es una de las mayores amenazas globales para la salud pública. Están emergiendo patógenos microbianos más difíciles de tratar y las infecciones se complican aumentando las tasas de morbilidad y mortalidad. En este contexto, la situación se agrava por la falta de desarrollo de nuevas moléculas antimicrobianas.

Como posible estrategia para atenuar este problema se encuentra el reposicionamiento de fármacos, el cual trata de buscar una nueva indicación a fármacos ya aprobados, acortando los costes y tiempos asociados al lanzamiento de un nuevo producto al mercado. Entre estos posibles fármacos detecta disulfiram, molécula administrada tópicamente para el tratamiento de la sarna y la pediculosis que, además, puede presentar actividad frente a otros microorganismos.

Hoy en día, el número de trabajos que buscan nuevas indicaciones a disulfiram ha ido en aumento. Diferentes autores han centrado sus investigaciones, principalmente, en el campo de la oncología, pero también en diferentes áreas de la microbiología. El gran interés que suscita esta molécula reside en su característica estructura fisicoquímica capaz de quelar iones esenciales en el funcionamiento de las células eucariotas y procariotas, lo cual la hace una buena candidata frente a diferentes dianas biológicas. Pese a ser conscientes de las posibles nuevas indicaciones de esta molécula, son escasos o nulos los estudios dirigidos al tratamiento de infecciones superficiales.

Por tanto, el principal objetivo de la presente tesis es evaluar y caracterizar las propiedades biofarmacéuticas de diferentes formulaciones con disulfiram para el tratamiento de infecciones tópicas causadas por microorganismos de diferente naturaleza.

El objetivo principal propuesto se pretende alcanzar por medio de los objetivos específicos que se describen a continuación:

1. Desarrollar y validar un método sensible para la cuantificación del fármaco durante los diferentes ensayos con las formulaciones de interés. Se evalúa la linealidad, especificidad, precisión intermedia, exactitud, límite de cuantificación y estabilidad de las soluciones.
2. Caracterizar el perfil de absorción tópica de las diferentes formulaciones con disulfiram.
3. Estudiar la eficacia *in vitro* de Tenutex® (emulsión que contiene disulfiram y bencil benzoato) frente a sarna y a pediculosis humana resistente a insecticidas comunes.
4. Evaluar la eficacia *in vitro* de disulfiram frente a diferentes bacterias que pueden

causar infecciones superficiales de la piel, tales como; *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*.

5. Examinar el perfil citotóxico de disulfiram y representar el transcriptoma de células tratadas con el fármaco para evaluar los potenciales efectos adversos.
6. Determinar la eficacia *in vitro* de disulfiram frente a diferentes especies de levaduras: *Candida albicans*, *C. parapsilosis* y *Nakaseomyces glabratus* (*C. glabrata*).
7. Diseñar una nueva formulación mucoadhesiva con disulfiram para uso vaginal, en base a diseño de experimentos para la optimización de sus propiedades farmacéuticas.
8. Caracterización de la fórmula mucoadhesiva final y evaluación de su idoneidad para la administración de disulfiram por vía vaginal.
9. Estudiar la penetración cutánea y vaginal de disulfiram tras su aplicación para evaluar la concentración retenida en el tejido.

CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS

1. Ácaros y piojos

El ácaro *Psoroptes ovis* empleado en el estudio de eficacia *in vitro* y *ex vivo* del producto Tenutex® frente a sarna fue adquirido de una oveja donante (Arctech Innovation, Degenham, Reino Unido) y almacenado a temperatura ambiente hasta el momento del ensayo (<24 h).

Para el estudio de eficacia de Tenutex®, se utilizaron piojos de cabeza resistentes a permetrina y malatión (*Pediculus humanus capitis*, cepa BR-HL). Estos piojos fueron originalmente recolectados de niños infestados en Bristol (Arctech Innovation, Degenham, Reino Unido), alojados en trozos de algodón en frascos de plástico ventilados a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ y con un 70–80 % de humedad relativa (RH) que se mantuvieron en crecimiento *in vitro* mediante el dispositivo de transfusión de sangre Hemotek® (Hemotek Ltd., Blackburn, Reino Unido). Este sistema permitió la alimentación de los piojos con sangre de conejo (TCS Biosciences Ltd, Buckingham, Reino Unido) mediante una membrana artificial hasta el momento del ensayo.

Para la obtención de los huevos, se colocaron los piojos BR-HL machos y hembras adultos en mechones de cabello humano (3-400 cabellos de 4 cm de largo) y se dejaron hasta que hubieron puesto aproximadamente 50 huevos por mechón de pelo. Después se retiraron los adultos y se conservaron los huevos hasta el momento del estudio alojados en trozos de algodón en frascos de plástico ventilados a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ y 70–80 % de RH.

2. Cepas microbianas y condiciones de cultivo

Las cepas microbianas fueron obtenidas de la colección americana de cultivos tipo (ATCC®). Las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC® 12344 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 (LGC Standards, S.L.U, Barcelona, España) se emplearon para la determinación de la Mínima concentración inhibitoria (MIC) que es la concentración más baja a la que un antimicrobiano inhibe el crecimiento del microorganismo después de su incubación.

Antes del estudio de MIC, todas las cepas se cultivaron de forma rutinaria en medio sólido durante 16-24 horas siguiendo las indicaciones descritas en las guías del Instituto de estándares para el laboratorio clínico (CLSI). Las condiciones específicas de cada una de las cepas se muestran en la Tabla 3:

Tabla 3: Condiciones de crecimientos para cada una de las cepas bacterianas utilizadas.

Cepa	Medio de crecimiento	Condiciones de incubación
<i>S. aureus</i> (ATCC® 25923)	Müller-Hinton (MH) agar (Condalab, Madrid, España)	35 ± 2°C Aerobiosis 16-20 h
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC® 27853)	Müller-Hinton agar	35 ± 2°C Aerobiosis 16-20 h
<i>S. pyogenes</i> (ATCC® 12344)	Agar chocolate (Condalab, Madrid, España)	35 ± 2°C 20-24 h Aerobiosis con 5 % CO ₂

En el caso de las levaduras, las cepas fueron adquiridas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España). Se utilizaron las cepas *Candida albicans* CECT 1002, *C. parapsilosis* CECT 10434 y *C. glabrata* CECT 1448 (*Nakaseomyces glabratus*) para la prueba de susceptibilidad antifúngica.

Las 3 cepas empleadas en el estudio de MIC fueron cultivadas previamente al estudio siguiendo las indicaciones de las guías CLSI. Se incubaron en agar de Sabouraud dextrosa (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 35± 2°C durante 46-50 h en condiciones de aerobiosis.

A partir de los cultivos sólidos frescos de cada una de las cepas bacterianas y de levaduras se prepararon los inóculos iniciales para la realización de la MIC indicada en la sección 9.3 del presente capítulo.

3. Técnicas cromatográficas

Para la detección y determinación de las concentraciones de D y BB en los diferentes ensayos de evaluación y caracterización realizados, se desarrolló y validó un método de HPLC-UV (Water Alliance 2695, Cerdanyola del Vallès, España) que permite la cuantificación simultánea o individual de ambos principios activos.

Las condiciones de trabajo utilizados se detallan a en la tabla siguiente (Tabla 4):

Tabla 4: Condiciones de trabajo del método de HPLC desarrollado para cuantificación de D y BB.

Columna:	Thermo HyPurity RP C18 3 μ 4,6-150 mm, YMC-Pack ODS-AM C18 3 μ 4,6-150 mm o equivalente
Fase móvil:	Tampón fosfato pH 5,5 / Metanol (30/70) (Scharlab, S.L., Sentmenat, España)
Modo:	Isocrático
Flujo:	1,2 ml/min
Tiempo inyección:	10 o 15 min
Temperatura columna:	30°C
Temperatura muestra:	25°C
Volumen inyección:	40 μ l
Longitud onda:	215

3.1 Validación de la metódica analítica

La validación analítica consiste en la realización de pruebas correctamente documentadas y demostrativas de que el método es suficientemente fiable como para obtener resultados precisos y reproducibles de concentraciones de fármaco realistas en las muestras de trabajo dentro del intervalo definido. En este contexto, varias agencias reguladoras han propuesto varias directrices sobre cómo llevar a cabo la validación, como la EMA y la FDA (Kumar Bhardwaj 2015; Marson et al. 2020). En este caso, el rango de estudio se fijó de 0,080 a 15,85 μ g/ml para D y de 0,899 a 71,97 μ g/ml para BB.

La validación del método se ha llevado a cabo de acuerdo con las directrices ICH, concretamente con la directriz Q2 (EMA 1995). Como principales criterios de validación analítica se utilizaron los siguientes parámetros: linealidad, especificidad, precisión intermedia, exactitud, límite de cuantificación y estabilidad de las soluciones.

3.1.1 Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad (dentro de un rango dado) para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración de analito presente en la muestra (EMA 1995).

Para comprobar la linealidad se tomaron tres réplicas de diferentes niveles de concentración dentro del rango establecido correspondiente a 0,080 μ g/ml, 0,160 μ g/ml, 0,32 μ g/ml, 3,2 μ g/ml, 6,40 μ g/ml, 15,85 μ g/ml para D y a 0,899 μ g/ml, 1,799 μ g/ml, 3,6 μ g/ml, 35,99 μ g/ml, 71,97 μ g/ml para BB. Todas las muestras se analizaron en orden creciente de concentración. Con todos los resultados obtenidos se llevaron a cabo los siguientes cálculos y criterios de aceptación:

i) Recta de regresión por mínimos cuadrados

Se debe determinar el coeficiente de correlación (r), la intersección y y la pendiente de la recta de regresión. Se recomienda un valor de $r \geq 0,990$.

ii) Homogeneidad de varianza

Se aplica la prueba de Levene con significación estadística del 5 %. Las varianzas se consideran iguales con un valor de $p > 0,05$.

iii) Análisis de residuales

Los residuales son la diferencia entre los valores observados y los valores estimados calculados con la ecuación de regresión. El análisis de normalidad de los residuos se realizó gráficamente. Los residuos deben mostrar una distribución normal y no reflejar ninguna tendencia.

iv) Desviación estándar relativa del factor de respuesta

El factor de respuesta (f) expresa la relación entre la respuesta (área D y BB) y la concentración y puede ser una medida de la sensibilidad de calibración. En una calibración lineal, los f deben ser similares al valor de la pendiente.

El valor medio de todos los factores de respuesta y su desviación estándar relativa se calcula de la siguiente manera (Ecuación 1):

$$RSD (\%) = \frac{S}{\bar{f}} * 100 \quad (1)$$

Dónde:

- S = Desviación estándar
- \bar{f} = Media aritmética de los factores de respuesta

La desviación estándar relativa debe ser inferior a 5 %.

v) Análisis de la varianza (ANOVA)

El valor p de la pendiente de la tabla ANOVA debe ser inferior a 0,05, lo que indica que la pendiente es estadísticamente diferente de cero.

El valor p del intercepto en y de la tabla ANOVA debe ser superior a 0,05, lo que indica que el intercepto es estadísticamente igual a cero.

3.1.2 Especificidad

La especificidad es la capacidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se espera que estén presentes en la muestra. Para su evaluación, se analizaron las siguientes muestras (EMA 1995):

- a. Medio receptor como blanco.
- b. Placebo de Tenutex® (Bioglan AB, Malmö, Suecia) diluido en la fase móvil (tampón fosfato pH 5,5 / Metanol en una proporción 30/70).
- c. Placebo de Tenutex® diluido en el medio receptor de las celdas de Franz (15 % (p/p) de hidroxipropil beta ciclodextrina (HPCD) en PBS ajustando el pH a 5,5) (VidraFoc, Barcelona, España).
- d. Estándar de D y BB en fase móvil a una concentración equivalente de 31,7 µg/ml y 356,5 µg/ml respectivamente.

Criterio de aceptación:

El método analítico se considera selectivo cuando no existen picos interferentes procedentes de las soluciones descritas previamente en los tiempos de retención de los analitos de interés.

3.1.3 Precisión intermedia

La medida en que debe establecerse una precisión intermedia depende de las circunstancias en las que se pretende utilizar el método. Se debe establecer los efectos de eventos aleatorios sobre la precisión del procedimiento analítico. Generalmente, las variaciones a estudiar incluyen días, analistas, equipos, laboratorios, entre otras (EMA 1995).

En este caso, la precisión intermedia se realizó estimando la variación en los resultados cuando las mediciones se realizan en un mismo laboratorio. Fue utilizado como un parámetro de la precisión, la cual se define como la proximidad de la concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas a partir de múltiples muestreos de la misma muestra homogénea en las condiciones preestablecidas (EMA 1995).

Para ello, se llevaron a cabo 9 determinaciones que cubrieran el rango especificado, 3 concentraciones diferentes con 3 réplicas de cada una de ellas. Esto fue realizado por dos analistas diferentes en días diferentes.

La precisión intermedia se calculó interpolando los valores de área obtenidos en una curva de calibración preparada con estándares de D y BB desde 15,85 µg/ml hasta 0,080/ml para D y desde 71,97 µg/ml hasta 0,899 µg/ml para BB e inyectándola antes y después de las soluciones de prueba.

Criterio aceptación

El coeficiente de variación (CV) debe ser inferior a 6,71 %.

3.1.4 Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad de la concordancia entre el valor, que se acepta como un valor verdadero convencional o como una referencia aceptada, y el valor encontrado (EMA 1995).

Para su evaluación se emplearon las 9 determinaciones de la precisión intermedia (valores obtenidos para el analista 1 durante el día 1) y se calculó la concentración frente a la misma recta que la empleada en el punto 3.1.1. La exactitud se reportó como el porcentaje medio de recuperación (Ecuación 2):

$$R = \frac{X_m}{\mu} * 100 \quad (2)$$

Dónde:

- R= recuperación (%)
- X_m : valor calculado
- μ : valor teórico

Se aplicó la prueba de Levene con significación estadística del 5 %, de tal manera que las varianzas se consideraron iguales con un p -valor $> 0,05$.

Criterio de aceptación

El porcentaje de recuperación global debe estar entre el intervalo 90,0 – 110,0 %.

3.1.5 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LOQ) es la cantidad mínima de analito que se puede cuantificar con una precisión y exactitud aceptables (EMA 1995). Se puede establecer mediante la relación señal/ruido (S/N) calculada a partir de la Ecuación 3:

$$S / N = \frac{2H}{h} \quad (3)$$

Dónde:

- H = altura del pico correspondiente al componente de interés, en el cromatograma obtenido con la solución de referencia prescrita, medida desde el máximo del pico hasta la línea de base extrapolada de la señal observada sobre una distancia igual a 5 veces el ancho a media altura.
- h = rango del ruido de fondo en un cromatograma obtenido después de la inyección o aplicación de un blanco, observado a una distancia igual a 5 veces el

ancho a la mitad de la altura del pico en el cromatograma obtenido con la solución de referencia prescrita y, si es posible, situado igualmente alrededor del lugar donde se encontraría este pico.

Criterio de aceptación:

Una relación señal/ruido de 10 es aceptable para el límite de cuantificación.

3.1.6 Estabilidad de las muestras

Para determinar la estabilidad de las muestras en el muestreador automático del HPLC, se utilizó una solución de D y BB (STD, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) a una concentración equivalente a 63,25 µg/ml para D y a 711,14 µg/ml para BB. Las soluciones se mantuvieron a 25°C (en el automuestreador) 48 horas y se analizaron a las 0 y 48 horas.

Criterios de aceptación:

La desviación estándar relativa (RSD %) para los valores de área y tiempo de retención obtenidos debe ser inferior al 2 %.

4. Preparación de las formulaciones de estudio

Durante el desarrollo de los diferentes ensayos, se estudiaron 3 formulaciones diferentes: el producto comercial Tenutex® (Bioglan AB, Malmö, Suecia), y dos preparaciones con D; una emulsión para la aplicación sobre la piel y un gel mucoadhesivo de uso vaginal.

4.1 Emulsión con 2 % disulfiram

Se preparó una emulsión con un 2 % de D con el objetivo de obtener un efecto local sobre la piel tras su aplicación tópica. La composición porcentual (p/p) de la formulación fue la siguiente:

Disulfiram	2 %
Manteca de cacao	7 %
Ácido esteárico	6 %
Ácido cetosteárico	1 %
Agua	c.s.p. 100 %

La fórmula se preparó mediante la elaboración de dos fases por separado; una oleosa que contenía la manteca de cacao, el ácido esteárico y el cetosteárico (Bioglan AB, Malmö, Suecia), además del principio activo D (Bioglan AB, Malmö, Suecia); y una segunda fase de naturaleza acuosa, la cual contenía agua. Ambas fases se calentaron a 75°C en un baño térmico y se mezclaron con el homogenizador de alta cizalla (Ultra-Turrax, IKA T-25, Staufen im Breisgau, Alemania) a 11.000 rpm durante 10 min. Los

excipientes y porcentajes escogidos se hicieron en base a la composición de Tenutex® para facilitar la comparación de los resultados obtenidos en los diferentes experimentos. Todos los excipientes escogidos cumplen con la monografía europea correspondiente para ser empleados en medicamentos.

4.2 Geles mucoadhesivos con disulfiram

Se prepararon geles mucoadhesivos para, mediante un diseño de experimentos y posterior optimización, seleccionar la composición final con las propiedades fisicoquímicas más idóneas para su aplicación vaginal. Mediante la herramienta del software Minitab 17, diseño de experimento, se consigue organizar y diseñar una batería de ensayos que permiten conseguir toda la información necesaria para optimizar la configuración de un proceso mediante la realización del menor número de pruebas experimentales posibles. Es un método sistémico que utilizando la estadística aplicada evalúa alternativas posibles en una o varias variables del experimento para encontrar la mejor combinación de factores que afectan a la respuesta o al resultado. Permite reducir los costes del diseño, eliminar complejidades y agilizar resultados. En este caso, esta herramienta se empleó para estudiar el efecto de la concentración de polímeros presentes en la fórmula sobre las características fisicoquímicas de esta (mucoadhesión, mucoadhesión con flujo vaginal simulado (SVF), viscosidad, viscosidad con SVF y porcentaje de fluoresceína adherida).

Los componentes del diseño de experimentos son ('Análisis DOE - Minitab Engage' 2023):

- **Factores o parámetros de entrada:** pueden clasificarse como variables controlables o incontrolables.
 - i) Variables controlables: se refiere a los factores que pueden modificarse o cambiarse en un experimento o un proceso. Por ejemplo, los excipientes utilizados.
 - ii) Variables incontrolables: se refiere a los factores que no pueden modificarse. Por ejemplo, la temperatura ambiente del laboratorio. Hay que reconocerlos para entender cómo pueden afectar a la respuesta.
- **Niveles o ajustes de cada factor:** pertenecen a la cantidad o calidad que se utilizará en el experimento de las variables establecidas. En el ejemplo de los excipientes, los factores serían las concentraciones utilizadas de los polímeros.
- **Respuestas:** se refiere al resultado del proceso que mide el efecto deseado. En el ejemplo anterior, las características fisicoquímicas estudiadas de la fórmula son las respuestas. Están influenciadas por los factores y sus niveles.

El diseño de experimentos es una herramienta muy útil en la industria para comparar alternativas, maximizar o minimizar una determinada respuesta, reducir variaciones o mejorar los procesos.

Por otra parte, los excipientes se seleccionaron teniendo en cuenta las características que debe tener un polímero ideal para un sistema de administración de fármacos bioadhesivo. Entre estas características destacan (Shaikh et al. 2011):

1. El polímero y sus productos de degradación no deben ser tóxicos ni absorbibles.
2. No debe ser irritante.
3. Debería formar un fuerte enlace no covalente con el moco vaginal o la superficie de las células epiteliales vaginales.
4. Adhesión rápida al tejido húmedo y cierta especificidad de sitio.
5. Debe permitir una fácil incorporación del fármaco y no debe obstaculizar su liberación de la formulación.
6. Estable durante el almacenamiento y la vida útil del producto.
7. Coste bajo para permitir que el producto sea competitivo.

En base a estos criterios se seleccionaron dos polímeros diferentes: carragenato (DuPont, Wilmington, DE, USA) y polietilenglicol (PEG-90M, Colorcon Limited, Kent, Inglaterra), y así obtener una mezcla multifuncional. Las formulaciones presentaron la siguiente composición porcentual (p/p):

Hidroxipropilciclodextrina	20 %
Polietilenglicol	0,5-1,5 %
Carragenato	1-2 %
Agua purificada	c.s.p. 100 %

Para la preparación de los geles, el agua se calentó a 50°C junto con la HPCD (Pracofar, S.L., Martorell, España). El PEG-90M se añadió bajo agitación con palas a 750 rpm y después, se redujo la agitación a 150 rpm hasta su completa disolución. Finalmente, el carragenato se añadió a 75 rpm hasta total incorporación.

Una vez seleccionada la composición final, las formulaciones con D (0,5 y 1 %) se fabricaron de la misma forma, añadiendo el compuesto activo en la mezcla de agua con HPCD. Además, durante el cribado de la composición, se prepararon formulaciones con 0,01 % de fluoresceína para poder estudiar las propiedades mucoadhesivas de cada una de ellas.

La selección de la fórmula candidata se realizó mediante un diseño central compuesto, el análisis estadístico del cual se llevó a cabo mediante el software Minitab 17. Con este análisis estadístico se obtuvieron los modelos matemáticos de cada una de las variables estudiadas y como estas, eran influenciadas por las diferentes concentraciones de

polímeros.

Posteriormente, se realizó un ensayo de optimización de las variables estudiadas, para obtener la mucoadhesión más alta y la menor viscosidad, con el fin de obtener la formulación candidata final. Para comprobar la capacidad predictiva de los modelos matemáticos obtenidos se determinó el sesgo del sistema, mediante la Ecuación 4:

$$\% \text{ Bias} = \frac{|Ref - Z_1|}{Ref} \cdot 100 \quad (4)$$

dónde *Ref* es el valor teórico de referencia del modelo y Z_1 es la media del valor experimental obtenido.

5. Caracterización fisicoquímica de las formulaciones

Para la caracterización y evaluación de las fórmulas con D se ha utilizaron las diferentes técnicas que se describen en este apartado.

5.1 Preparación del fluido vaginal simulado

El SVF se preparó según lo descrito por Owen y Katz (Owen and Katz 1999): 0,351 % de cloruro de sodio (NaCl, Quimivita, Barcelona, España), 0,14 % de hidróxido de potasio (KOH, Scharlab, S.L, Sentmenat, España), 0,022 % de hidróxido de calcio (Ca(OH)₂, Scharlab, S.L, Sentmenat, España), 0,0018 % de albúmina de suero bovino (Merck Life Science, S.L. U, Madrid, España), 0,20 % de ácido láctico (Escuder, S.L, Rubi, España), 0,1 % de ácido acético (Scharlab, S.L, Sentmenat, España), 0,016 % de glicerol (Caila & Pares, S.A, Barcelona, España), 0,040 % urea (Quality Chemicals, S.L, Esparraguera, España), 0,50 % de glucosa (Quimidroga, S.A, Barcelona, España) y agua Milli-Q en cantidad suficiente para el 100 %. Las materias se agitaron mecánicamente hasta su completa disolución y posteriormente, el pH de la mezcla se ajustó a 4,3 usando ácido clorhídrico (HCl).

5.2 Fuerza adhesiva de los geles

Los polímeros mucoadhesivos son macromoléculas hidrofílicas que contienen grupos orgánicos como hidroxilos, carboxilos, aminas y amidas capaces de establecer interacciones con la mucosa vaginal, concretamente con la proteína mucina. Esta unión entre el polímero y la mucosa se denomina mucoadhesión. Las fuerzas adhesivas de los geles se evaluaron mediante la modificación de los dispositivos descritos por Mei et al (Mei et al. 2017), los cuales se representa en la Figura 13.

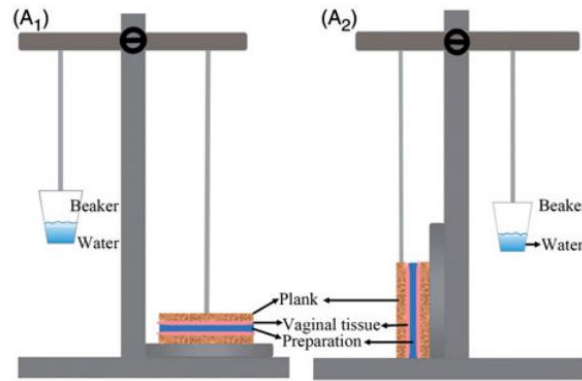


Figura 13: Esquema de los dispositivos utilizados para evaluación de la fuerza adhesiva, para esfuerzo de tracción (A1) y el esfuerzo cortante (A2). Mei et al. 2017.

En nuestro caso, en lugar de utilizar tejido vaginal, se prepararon hidrogeles de agar al 4 % p/p con mucina de cerdo tipo II (Sigma–Aldrich, Missouri, USA) al 0,34 % p/p para simular las propiedades de este tejido. Dos geles de agar se unieron a ambas placas (inferior y superior) respectivamente y 0,5 g de la formulación se colocó encima del gel de la placa inferior. Además, para evaluar el efecto del fluido vaginal en las formulaciones, se aplicó SVF (0,25 ml) a la formulación antes de la unión de las placas. Finalmente, se colocó la placa superior sobre la placa inferior.

Tras la unión, un mililitro de agua se fue añadiendo en el vaso de precipitados (previamente tarado) cada 15 segundos. Una vez las dos placas se separaban, el peso de agua (W_1) se utilizó para calcular el esfuerzo de tracción (σ ; mN/cm²) de acuerdo con la siguiente fórmula (Ecuación 5):

$$\sigma = (W_1 \cdot g)/s \quad (5)$$

Donde g es la gravedad (m/s²) y s es la superficie del hidrogel de agar (cm²) utilizado.

5.3 Propiedades mucoadhesivas

Para los estudios mucoadhesivos se simuló una vagina artificial en condiciones fisiológicas. Para ello, se utilizó un tubo al cual se le añadió una porción de agar (8 × 2 cm) con mucina, anteriormente descrito en la sección 5.2. Encima del agar en la parte superior se colocó 1 g de gel mucoadhesivo con fluoresceína (0,01 % p/p). Los tubos se montaron en un ángulo aproximado de 70° simulando así el ángulo de inclinación de la vagina en condiciones fisiológicas.

Una vez hecho el montaje, se hizo pasar a través del tubo, SVF a un flujo de 0,0133 ml/s (Shenchen Pump YZ1515x, Hebei, China). Los muestreos se adaptaron al caudal de este sistema y se extrajeron muestras a los siguientes intervalos de tiempo: 1,15 min, 2,30 min, 3,45 min y 7,30 min.

Al final del estudio, se determinó la concentración de fluoresceína liberada (F_2) en cada uno de los tiempos muestreados. Antes del análisis de muestra, se preparó una curva de calibración midiendo soluciones de fluoresceína en agua en un rango de concentraciones de $7,6 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{g/ml}$ a $2 \cdot 10^{-5}$ $\mu\text{g/ml}$ ($R_2 = 0,999928$). La fluoresceína es una molécula hidrosoluble la cual tiene un espectro máximo de excitación a unos 490 nm, por ello la lectura se realizó a una longitud de onda de 485 nm utilizando el espectrofotómetro de placas multimodo Victor Nivo (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Tras obtener la recta de concentraciones, se procedió a la lectura de las muestras del experimento.

Una vez cuantificadas las muestras, se determinó la cantidad de fluorescencia remanente en el agar (F_3) calculando la diferencia respecto a la fluoresceína sembrada inicialmente (F_1) siguiendo la Ecuación 6.

$$F_3 = F_2 - F_1 \quad (6)$$

De tal manera que el valor de F_3 se utilizó como parámetro indirecto de la mucoadhesión de la formulación. Es decir, cuanto mayor es el valor de F_3 , más fármaco queda adherido al gel de agar y, por lo tanto, mayor mucoadhesión presenta la fórmula.

5.4 Propiedades reológicas

La reología estudia cómo responde un determinado material a las fuerzas y deformaciones aplicadas. Los conceptos básicos de esfuerzo (fuerza por área) y tensión (deformación relativa) son clave para todas las evaluaciones reológicas. La dirección de la fuerza, con respecto a la superficie impactada, determina el tipo de estrés/esfuerzo (σ). Por ejemplo, si la fuerza es directamente perpendicular a una superficie, se produce un esfuerzo normal y se puede lograr bajo tensión o compresión. Si la fuerza actúa en paralelo a la superficie de la muestra, se experimenta un esfuerzo de cizalla (τ). La tensión es una cantidad adimensional que representa la deformación relativa de un material, donde la dirección de la tensión aplicada con respecto a la superficie del material determina el tipo de deformación. Si el estrés es normal (perpendicular) a una superficie de muestra, el material experimentará una deformación normal (ϵ). Por otro lado, cuando la muestra es sometida a un esfuerzo paralelo la deformación es de cizalla (γ). Por tanto, la velocidad de cizalla ($\dot{\gamma}$), se usa típicamente para cuantificar la tensión durante el flujo del fluido y representa la cantidad de deformación por unidad de tiempo, se expresa con las unidades s^{-1} o Hz (Joyner and Daubert 2017).

Los materiales que se consideran sólidos ideales (por ejemplo, geles de gelatina) obedecen la Ley de Hooke, donde el esfuerzo se relaciona directamente con la deformación a través de un módulo. Por otra parte, los materiales que se consideran fluidos ideales (por ejemplo, agua o miel) obedecen los principios newtonianos, y la proporcionalidad constante se conoce comúnmente como viscosidad, definida como

una resistencia interna del fluido al flujo (μ). Sin embargo, para la mayoría de los líquidos la viscosidad no es constante, sino que cambia en función de la velocidad de cizalla, son los llamados materiales no newtonianos. En este caso, la viscosidad es aparente (η) y depende de la cizalla aplicada (Joyner and Daubert 2017; Aho, Hvidt, and Baldursdottir 2016; Rha 1975).

Para determinar la viscosidad los equipos más empleados son los siguientes (Joyner and Daubert 2017):

- i) **Reómetro:** instrumento que permite medir el comportamiento de un material con la aplicación de diferentes tipos de fuerzas (torsión, compresión o extensión). Permite determinar la viscosidad y otras propiedades reológicas (elasticidad, tixotropía...) tanto de materiales newtonianos como no newtonianos.
- ii) **Viscosímetro rotacional:** permite la medición rápida, fácil y económica de la viscosidad. Ahora bien, es un instrumento empírico y no tan preciso como un reómetro. Mide la viscosidad a una sola velocidad de cizalla, por lo que no son útiles para fluidos no newtonianos.

En este caso, se realizaron dos tipos de estudios reológicos de las formulaciones; uno de ellos con el objetivo de seleccionar la fórmula candidata, en el cual solo se determinó la viscosidad de los posibles candidatos mediante un viscosímetro rotacional (Brookfield, Manassas, VA, USA) y otro; para la caracterización de la candidata final, en el que se estudió el carácter reológico, tixotrópico y viscoelástico de la fórmula final mediante un reómetro (Haake Rheostress®, Thermo Fisher, Karlsruhe, Alemania).

5.4.1 Cribado de la fórmula final

Para seleccionar la fórmula final de los geles mucoadhesivos se determinó la viscosidad de los prototipos mediante un viscosímetro de tipo rotatorio. La viscosidad de las muestras se determinó a las 24 h tras su producción. También se realizó la viscosidad con las mismas fórmulas y SVF, en una proporción 1:6,67 (SVG:gel), con el objetivo de poder determinar si la reticulación del carragenato en presencia de los iones monovalentes del fluido producía alguna modificación de la viscosidad.

Para ello, 10 g de cada una de las formulaciones se añadieron al contenedor del viscosímetro a una temperatura de 25°C, durante 30 min a 10 rpm y utilizando como husillo el tipo SC4-29.

5.4.2 Caracterización de la fórmula final

En este caso, la caracterización se realizó en un reómetro mediante estudios rotacional y oscilatorio para representar gráficamente el comportamiento del material mostrando

la relación entre el esfuerzo y la deformación o velocidad de cizalla:

i) Estudio rotacional

El ensayo rotacional reproduce el comportamiento de la fórmula cuando es sometida a un esfuerzo de cizalla constante, es decir cuando se aplica fuerzas paralelas al plano de deformación del material. El esfuerzo de cizalla se ejerce sobre la muestra por rotación de la parte móvil sobre la fija (Figura 14). La geometría rotacional puede ser de 3 tipos: cilindro concéntrico, como en el caso del viscosímetro utilizado en el cribado, cono y placa, y placas paralelas. Los dos últimos tienen la ventaja de que el esfuerzo y velocidad de cizalla son independientes y permanecen constantes en cualquier ubicación de la muestra (Joyner and Daubert 2017).

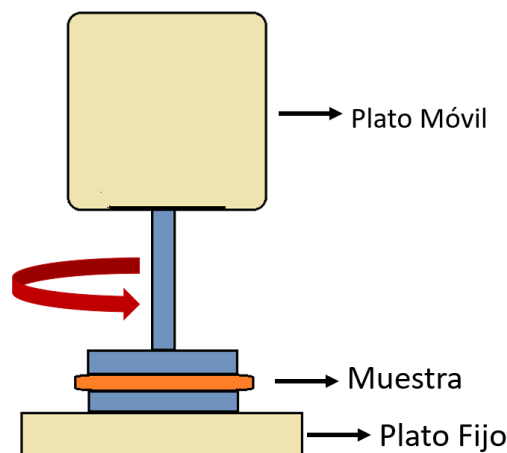


Figura 14: Esquema del funcionamiento del ensayo rotacional.

En este caso, las mediciones se realizaron con una geometría de placa y placa paralela (P35Ti L: 60 mm de diámetro, ángulo de 2°). El esfuerzo cizalla se determinó en función de la velocidad de cizalla. Las curvas de viscosidad ($\eta = f(\dot{\gamma})$) y las curvas de flujo ($\tau = f(\dot{\gamma})$) se registraron a $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$. El programa de rampa de velocidad de corte incluía un período de aumento de 0 a 100 s^{-1} durante 3 minutos, un período de velocidad de corte constante de 1 min a 100 s^{-1} y un período de disminución de 3 min de 100 a 0 s^{-1} . La viscosidad en el estado estacionario (η , Pa·s) se determinó a partir de la sección de cizallamiento constante a 100 s^{-1} . Las gráficas de flujo se emplearon para determinar el comportamiento del fluido (Figura 15) (Joyner and Daubert 2017; Aho, Hvidt, and Baldursdottir 2016):

- **Fluido newtoniano:** el esfuerzo de cizalla versus la velocidad da como resultado una recta que pasa por el origen.
- **Fluidos no newtonianos:** el flujo cambia con la velocidad de cizalla o con el tiempo a una velocidad constante.
 - Independientes del tiempo: Si la viscosidad disminuye cuando la velocidad de cizalla aumenta, el material se conoce como pseudoplástico.

En cambio, si la viscosidad del material aumenta, se denomina dilatante. Si el material muestra un esfuerzo de cedencia es un plástico de Bingham, es decir, se comporta como un sólido hasta que se alcanza el esfuerzo de cedencia (τ_0) o esfuerzo umbral a partir del cual empieza a fluir y luego se comporta similar a un fluido newtoniano.

- Dependientes del tiempo: Los materiales que cambian la viscosidad, se adelgazan o se espesan con el tiempo se conocen como líquidos tixotrópicos y reopécticos, respectivamente. Si además recobran su forma tras eliminar el esfuerzo son viscoelásticos. En este caso, la tixotropía aparente (Pa/s) se estimó como el área del bucle de histéresis.

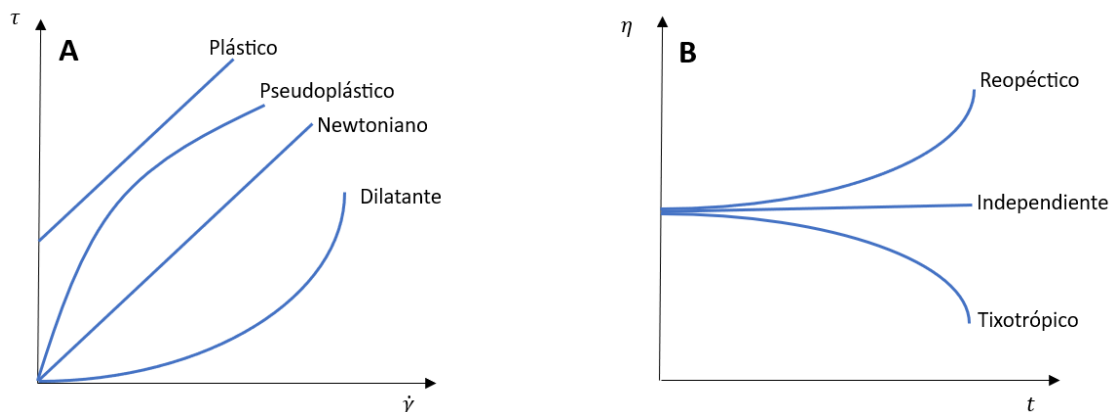


Figura 15: Clasificación de fluidos newtonianos y no newtonianos.

Además, se ajustaron modelos matemáticos representativos a las curvas de flujo obtenidas para buscar el mejor modelo descriptivo (Tabla 5). La selección del modelo que mejor se ajustaba se basó en el coeficiente de correlación (observado frente al previsto) y el valor de chi-cuadrado. Los modelos empleados fueron los siguientes (Tadros 1994; Joyner and Daubert 2017; Aho, Hvidt, and Baldursdottir 2016; Afoakwa et al. 2009):

- **Newton:** solo para fluidos newtonianos. La n no aparece en la ecuación puesto que es igual a 1.
- **Bingham:** A diferencia del anterior tiene en cuenta el límite elástico del fluido o también llamado esfuerzo de cedencia y una viscosidad plástica (η_0). Es adecuado para describir el comportamiento de plásticos ideales.
- **Ostwald–de Waele y Herschel-Bulkley:** sirven para describir el comportamiento de fluidos pseudoplásticos y dilatantes. K y n representan constantes de los materiales llamadas factor de consistencia e índice de comportamiento de flujo, respectivamente. La n proporciona una indicación de si el material es newtoniano o no newtoniano, siendo $n= 1$ fluido Newtoniano, $n<1$ pseudoplástico y $n>1$ dilatante.

- **Casson:** este modelo tiende a dar predicciones realistas del flujo a lo largo de un intervalo amplio de condiciones y es utilizado para materiales que tienden a un flujo newtoniano solo para valores de esfuerzo mucho mayores que el umbral de fluencia del material.
- **Cross:** una de las expresiones más utilizadas para modelizar el comportamiento de fluidos estructurados a alta y baja velocidades de deformación.

Tabla 5: Ecuaciones reológicas utilizadas para evaluar las formulaciones preparadas.

Modelo reológico	Ecuación
<i>Newton</i>	$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma}$
<i>Bingham</i>	$\tau = \tau_0 + (\eta_0 \cdot \dot{\gamma})$
<i>Ostwald–de Waele</i>	$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$
<i>Herschel–Bulkley</i>	$\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n$
<i>Casson</i>	$\tau = \sqrt[n]{\tau_0^n + (\eta_0 \cdot \dot{\gamma})^n}$
<i>Cross</i>	$\tau = \dot{\gamma} \cdot (\eta_\infty + (\eta_0 - \eta_\infty)/(1 + (\dot{\gamma}/\dot{\gamma}_0)^n))$

τ : esfuerzo cizalla (Pa), η : viscosidad (cP or Pa-s), $\dot{\gamma}$: velocidad cizalla (s^{-1}), τ_0 : límite mínimo de fluencia (Pa), η_0 : mínima viscosidad de cizalla (cP or Pa-s), K: factor de consistencia (Pa s^n), η_∞ : viscosidad de cizalla infinita (cP or Pa-s), $\dot{\gamma}_0$: mínima velocidad de cizalla (s^{-1}).

ii) Estudio oscilatorio

Los ensayos oscilatorios, también conocidos como ensayos dinámicos, controlan la respuesta viscoelástica, mientras se ejerce un barrido de frecuencias para la deformación (Figura 16). El término viscoelástico implica que el material exhibe comportamientos de fluidos (viscoso) y de sólidos (elásticos) simultáneamente (Joyner and Daubert 2017).

Si es un líquido ideal el comportamiento sigue la ley de Newton, pero si es un sólido o elástico ideal, cuando se aplica un esfuerzo constante, se obtiene una deformación también constante que se corresponde a una velocidad de cizalla igual cero. Los elásticos ideales se caracterizan por una viscosidad infinita y siguen la ley de Hooke, la cual establece que cuando un material sólido es expuesto a una tensión, este experimenta una cantidad de deformación o tensión proporcional a la magnitud del esfuerzo. Esta constante de proporcionalidad se denomina módulo (G). La respuesta viscoelástica se controla mediante el módulo de almacenamiento a cizalla (G') que se asocia con el almacenamiento de energía y elasticidad del material y módulo de pérdidas (G'') relacionado con las propiedades viscosas y asociado con la pérdida de energía en la muestra durante una deformación oscilatoria. De tal manera que para un líquido

newtoniano ideal $G'=0$, lo que muestra que no se almacena energía en la muestra, para un elástico ideal $G'=G$ y $G''=0$, lo que muestra que no se pierde energía durante la deformación y para materiales viscoelásticos, G' y G'' dependerán en general de la frecuencia angular (Mezger 2020; Aho, Hvidt, and Baldursdottir 2016; Joyner and Daubert 2017).

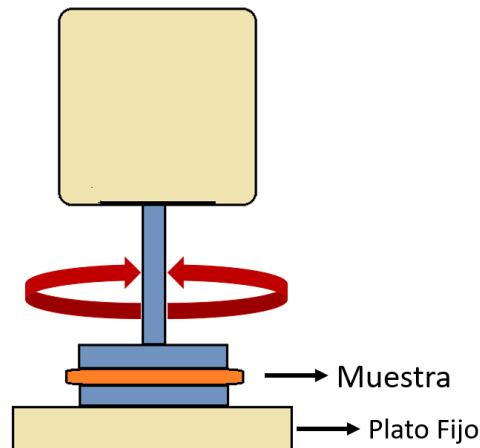


Figura 16: Esquema del funcionamiento del ensayo oscilatorio.

En este caso, el ensayo oscilatorio se realizó con geometría placa-placa paralela (P35Ti L: 60 mm de diámetro, ángulo de 2°). Se realizó una prueba de barrido de deformación con un rango de deformación de 0,01 a 500 Pa y una tasa de oscilación de 1 s^{-1} para determinar la región viscoelástica lineal (LVR) de las muestras. Durante cada prueba de estrés de barrido, los cambios en los módulos de almacenamiento y pérdida y el ángulo de fase (δ) se trazaron en función del esfuerzo de cizalla. El ángulo de fase representa la diferencia entre la señal de entrada de deformación y la respuesta del esfuerzo (Figura 17), de tal manera que cuando el ángulo se acerca a 0° predomina el comportamiento elástico, mientras que valores cercanos a 90° indica que en el fluido predomina un comportamiento viscoso, y cuando se tienen valores intermedios se dice que es viscoelástico (Mezger 2020).

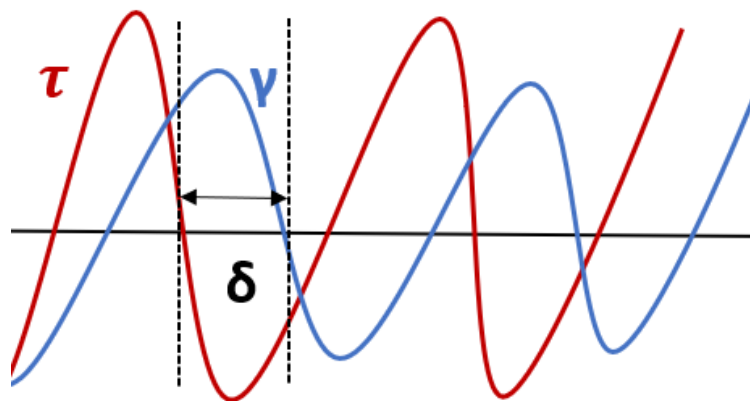


Figura 17: Desfase entre el esfuerzo (τ) y la deformación (γ), ángulo de fase (δ) en un ensayo dinámico.

Posteriormente, se llevó a cabo una prueba de barrido de frecuencia entre 0,1 y 10 s⁻¹ a una velocidad de corte constante dentro del LVR para determinar las variaciones relacionadas en el módulo de almacenamiento, módulo de pérdida y viscosidad compleja (η^*), que se utilizaron para la caracterización de la muestra. La viscosidad compleja describe la resistencia total de un material a la cizalla dinámica (Aho, Hvidt, and Baldursdottir 2016; Mezger 2020).

Todos los datos obtenidos se analizaron con HAAKE RheoWin® Data Manager v. 4.88.

5.5 Jeringabilidad

Para los tratamientos de aplicación local por vía vaginal que se administran mediante cánula, otro de los criterios que ayuda a determinar la idoneidad de la formulación es la jeringabilidad. Este parámetro está ligado a la facilidad o no de la administración del tratamiento, con lo cual es un factor importante para el correcto cumplimiento terapéutico de los pacientes.

En este caso, se determinó la jeringabilidad de los geles mucoadhesivos ya que es un parámetro crítico en este tipo de formulación dado que pueden tener una viscosidad elevada que dificulte la salida de la jeringa y por lo tanto la administración. Para ello, se calculó el tiempo necesario para que 5 g de formulación salieran de la cánula aplicando una fuerza constante de 9,688 N.

6. Métodos de difusión en celdas de Franz

6.1 Estudios de liberación *in vitro*

El estudio de la liberación *in vitro* se realizó utilizando celdas de Franz con un compartimento receptor de 12 ml y un área de difusión efectiva de 1,54 cm². Como medio receptor se empleó una solución al 15 % (p/p) de HPCD en PBS ajustando el pH a 5,5. El sistema se mantuvo a 37°C con agitación a 500 rpm para asegurar el cumplimiento de las condiciones *sink* durante todo el experimento. Las formulaciones se aplicaron sobre el compartimento donador y se utilizó una membrana de 0,45 μ m (Supor PES membrane, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) para el estudio. Se extrajeron alícuotas de 300 μ L a diferentes intervalos de tiempo y se analizaron mediante el método de HPLC previamente descrito (Capítulo III, sección 3).

Con los resultados obtenidos, se llevó a cabo la modelización cinética de los valores a través de DD-solver Excel Add-on (Y. Zhang et al. 2010). El promedio de los valores obtenidos de la curva de liberación fue ajustado a los modelos no lineales indicados en la Tabla 6. Posteriormente los valores individuales se ajustaron acorde al modelo población escogido. La selección del modelo se basó en el valor de AIC obtenido.

Tabla 6: Diferentes modelos cinéticos y ecuaciones probadas.

Modelo cinético	Ecuación	Parámetros
Primer Orden	$F = F_{max} (1 - e^{(-K_1 t)})$	F_{max}, K_1
Higuchi	$F = K_H \cdot t^{1/2}$	K_H
Korsmeyer–Peppas	$F = K_{KP} \cdot t^n$	K_{KP}, n
Weibull	$F = F_{max} \cdot 1 - e^{(-t/T_d)^\beta}$	F_{max}, α, β

En cuanto a los modelos, F corresponde a la fracción de fármaco liberada, t es el tiempo, F_{max} es la fracción máxima de fármaco liberada, K_1 es la constante de primer orden, K_H se corresponde a la constante de Higuchi, K_{KP} es la constante de Korsmeyer-Peppas, n el exponente de difusión, T_d el tiempo en el que 63,2 % de fármaco es liberado y β el parámetro de forma de Weibull.

Los modelos matemáticos de liberación de fármacos permiten describir y predecir el comportamiento que va a tener una molécula al ser liberado de la forma farmacéutica. Las principales características de los modelos empíricos y semiempíricos de la Tabla 6 son las siguientes (Papadopoulou et al. 2006; R 2014; Elmas et al. 2020; Siepmann and Siepmann 2013):

- **Primer orden:** la liberación de fármaco depende de la concentración. La molécula activa se libera de manera proporcional a la cantidad de fármaco remanente en el interior de la forma farmacéutica mediante un fenómeno de disolución.
- **Higuchi:** Takeru Higuchi creó su famosa ecuación que permite la predicción de la liberación de fármacos a partir de películas finas de ungüento. Es un modelo semiempírico que se basa en la segunda ley de Fick considerando las siguientes suposiciones:
 - La concentración inicial de fármaco en la matriz es mucho mayor que la solubilidad del fármaco.
 - La difusión de fármacos tiene lugar sólo en una dimensión.
 - Las partículas del fármaco son mucho más pequeñas que el grosor del sistema.
 - El hinchamiento de la matriz y la disolución son insignificantes.
 - La difusión del fármaco es constante.
 - Las condiciones perfectas de sumidero se pueden alcanzar en el entorno de liberación.

- **Korsmeyer–Peppas:** es una generalización de la ecuación de Higuchi. Se emplea para la liberación desde sistemas poliméricos, cuando el mecanismo es desconocido o cuando hay más de un fenómeno involucrado en el transporte.
- **Weibull:** la ecuación de distribución de Weibull fue adaptada a la cinética de liberación de fármacos desde diferentes formas farmacéuticas, demostrando un ajuste correcto y donde el parámetro β de la ecuación se vincula con los mecanismos de liberación del fármaco.

6.2 Estudios de permeación *in vitro*

Todos los estudios de permeación se llevaron a cabo de la misma manera, únicamente se modificó algunos de los parámetros para adecuar el estudio al tipo de formulación y tejido empleado. Las particularidades con cada una de las formulaciones se recogen en la siguiente tabla (Tabla 7):

Tabla 7: Características del ensayo según el tipo de piel.

Formulación	Tipo de piel	Dosis	rpm
Tenutex	Humana dermatomizada (Condalab, Madrid, España)	3,65 mg/cm ²	700 rpm
Emulsión D	Piel de cerdo abdominal dermatomizada (Matadero local, Barcelona, España)	3,65 mg/cm ²	500 rpm
Geles mucoadhesivos D	Vagina de cerdo (Matadero local, Barcelona, España)	54,5 mg/cm ²	600 rpm

Según ficha técnica de Tenutex[®], es necesario aplicar 60 g de la emulsión para cubrir toda la superficie del cuerpo excepto la cabeza, lo que se corresponde a una superficie corporal de 16340 cm² (SCCS/1602/18 EM 2018). Por ello, la dosis aplicada en piel fue de 3,65 mg/cm² del medicamento. En el caso de la vagina, la dosis escogida se realizó en base a otros productos comerciales como Gine-Canestén[®] del cual se aplica 20 g de crema al día con una concentración de clotrimazol de 20 mg/g (Bayer 2020).

Antes y después del experimento se determinó el TEWL para comprobar la integridad de la piel humana y de cerdo empleada durante el transcurso de los estudios (<15 g/m²h) mediante el VapoMeter (Delfin Technologies, Kuopio, Finlandia). La piel y la mucosa vaginal se colocó entre el compartimento donador y el receptor de las celdas de Franz. Como medio receptor se empleó una solución con un 15 % HPCD (p/p). Se completó el

volumen con la solución receptora, asegurando que no quedaran burbujas para garantizar que durante todo el experimento la superficie de permeación se mantuviera constante.

Las celdas se atemperaron a unos 32°C a través de una camisa calefactora con agitación constante, en el caso que el tejido empleado fuera piel. Las muestras se fueron extrayendo del compartimento receptor a través de la tubuladura lateral a intervalos prefijados de tiempo. Las muestras extraídas (300 µL) se fueron reemplazando con el mismo volumen de medio receptor y se cuantificaron con el método de HPLC previamente descrito (Capítulo III, sección 3). En el caso de los geles mucoadhesivos la temperatura empleada fue de 37°C, temperatura fisiológica de la vagina.

Tras la cuantificación, se calcularon los parámetros de permeación: flujo transdérmico (J , µg/cm²h) (Ecuación 7), coeficiente de permeabilidad (K_p , cm/h) (Ecuación 8), tiempo de latencia (t_{lag} , h) (obtenido por extrapolación lineal del eje x de los puntos en estado estacionario), parámetro de difusión (Dif , 1/h) (Ecuación 9), y parámetro de partición (P , cm/h²) (Ecuación 10):

$$J = \frac{dQ}{(dT \cdot S)} \quad (7)$$

donde J es el flujo transdérmico, dQ es la diferencia de cantidad permeada, dT es la diferencia de tiempo y S es la superficie de difusión de la membrana.

$$K_p = \frac{J}{C_d} \quad (8)$$

C_d (µg/mL) es la concentración del fármaco en el compartimento donante.

$$Dif = \frac{1}{6T_{lag}} \quad (9)$$

$$P = \frac{K_p}{Dif} \quad (10)$$

6.3 Estudios de retención de D en el tejido

Al finalizar las pruebas de permeación con D, se procedió a eliminar los restos de las formulaciones en los trozos de tejido empleado, limpiándolos con un hisopo. Además, en el caso de la piel, antes de determinar la concentración de fármaco retenida en el

tejido, también se determinó la concentración retenida en el estrato córneo mediante la técnica de *tape-Stripping*. Para ello, se fue aplicando tiras adhesivas (Tesa® 4101 PV2, Shanghai, China) sobre la piel secuencialmente, aplicando una fuerza constante mediante el uso de un peso fijo (345 g) durante 10 seg. Una vez retiradas, las cintas se añadieron en tubos Falcon que contenían fase móvil, se agitaron, se sonicaron durante 10 minutos y finalmente, se cuantificaron con el método de HPLC previamente descrito (Capítulo III, sección 3). Previamente se determinó el porcentaje de recuperación del fármaco tras la extracción para conocer el efecto matriz. Para ello se dispensó 50 µl de una solución madre de D a una concentración conocida (550 µg/ml) sobre las tiras adhesivas y se sometió al mismo proceso de extracción. La diferencia entre la cantidad sembrada y la cantidad extraída (% recuperación) se aplicó a las cantidades obtenidas tras el experimento de *tape-stripping* realizado sobre el tejido.

Posteriormente, el tejido se cortó en trozos más pequeños que se introdujeron en los tubos del equipo de homogeneizador de tejido Magna Lyser (Roche, Sant Cugat del Valles, España) con la fase móvil PBS pH 5.5 / Metanol (30:70). Las muestras se agitaron durante 5 ciclos de 90 seg a 6500 rpm. Finalmente, se determinó el contenido de fármaco en las soluciones resultantes utilizando el mismo método de HPLC. También en este caso, previo al inicio del estudio se determinó el porcentaje de recuperación del fármaco tras el proceso de homogeneización, para conocer el efecto matriz. Para ello se realizó una homogeneización del tejido “blanco”, es decir sin haber sido sometido a ningún experimento, donde 50 µl de una solución de fármaco a una concentración de 95 µg/ml se mezcló con este homogeneizado. Tras simular las condiciones experimentales de extracción, se determinó la cantidad de fármaco extraída de esta solución de concentración inicial conocida. Mediante la diferencia de la cantidad dispensada y la extraída se obtuvo el % de recuperación que se aplicó posteriormente a los experimentos con la formulación.

Para expresar la cantidad obtenida como una concentración y así poder relacionar el valor obtenido con la MIC resultante en los diferentes microorganismos estudiados, se determinó la densidad de la piel de 3 réplicas no tratadas. Para ello, se realizó la determinación del volumen que ocupaban empleando la Ecuación 11:

$$\text{Volumen} = \frac{M_1 + M_2 - M_3}{\rho} \quad (11)$$

Siendo M_1 el peso de piel, M_2 el peso del frasco con agua, M_3 el peso del frasco con agua y piel, y ρ la densidad del agua (1 g/cm³).

7. Evaluación de la citotoxicidad *in vitro*

7.1 Cultivo de células

Se utilizó la línea celular de queratinocitos HEK001, obtenida de la colección ATCC®, concretamente la CRL2404™ (Manassas, VA, USA). Antes del inicio del ensayo se generó un banco celular que se mantuvo en nitrógeno líquido y se fue testando la ausencia de micoplasma y otros microorganismos para controlar la idoneidad del sistema.

Se obtuvo una monocapa de células sobre un soporte sólido, a 37°C en atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ en incubador (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) y utilizando el medio específico para queratinocitos, suplementado con 2mM de L-glutamina y 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (hEGF, Thermo Fisher Scientific, Barcelona, España).

7.2 Ensayo celular

Veinticuatro horas antes del ensayo (*under starvation*, sin hEGF), se sembraron las microplacas con una concentración de 10.000 células/pocillo con 50 µl de medio suplementado con 2mM de L-glutamina e incubados a 37°C en atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Solo se usaron para el ensayo los 60 pocillos centrales de las placas. El resto de los pozos se llenaron con PBS.

Después de la incubación, las células se trataron con diferentes concentraciones de cada producto en evaluación, utilizando 1 placa para cada condición. Las concentraciones ensayadas para BB fueron 5.000, 2.500, 1.250, 625, 312,5, 156,25, 78,125, 39,063, 19,531, 9,766, 4,883, 2,441, 1,221,0,610, 0,305 µM mientras que las concentraciones para D fueron 33,36, 22,24, 14,83, 9,88, 6,59, 4,39, 2,93, 1,95 y 0,20 µM. Los stocks iniciales se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO), a una concentración de 1000 µM para BB y a 100 µM para D. Las diferentes diluciones se realizaron en medio específico para HEK001 y se cargaron en las placas por sextuplicado (n=6), usando el mismo volumen que para sembrar las células, haciendo así una dilución ½ en la placa final. La concentración residual de DMSO en la placa era inferior al 1 %.

Controles con medio (control negativo), DMSO (Sigma- Aldrich, Burlington, MA, USA) (control del solvente residual del fármaco) y dodecilsulfato sódico (SDS, Sigma- Aldrich, Burlington, MA, USA) (control positivo de mortalidad) se llevaron a cabo (Figura 18). El tiempo total de exposición al fármaco fue de 72 h.

1	2	3	4	5	6	7	8	Control DMSO	Control SDS
1	2	3	4	5	6	7	8	Control DMSO	Control SDS
1	2	3	4	5	6	7	8	Control DMSO	Control SDS
9	10	11	12	13	14	15	Control cells	Control DMSO	MEDIO
9	10	11	12	13	14	15	Control cells	Control DMSO	MEDIO
9	10	11	12	13	14	15	Control cells	Control DMSO	MEDIO

[D] en la placa (μM)		[] en la placa (μM)	
dil 1	33,36	dil 1	5000
dil 2	22,24	dil 2	2500
dil 3	14,83	dil 3	1250
dil 4	9,88	dil 4	625
dil 5	6,59	dil 5	312,500
dil 6	4,39	dil 6	156,250
dil 7	2,93	dil 7	78,125
dil 8	1,95	dil 8	39,063
dil 9	0,20	dil 9	19,531
		dil 10	9,766
		dil 11	4,883
		dil 12	2,441
		dil 13	1,221
		dil 14	0,610
		dil 15	0,305

Figura 18: Diseño de placa con las concentraciones testadas de cada uno de los compuestos (D y BB).

Tras la exposición, la citotoxicidad fue evaluada aplicando el reactivo CellTiter-Glo® (Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD, USA) directamente sobre la placa, incubándolo durante 10 min y haciendo la posterior lectura de luminiscencia (L) mediante el luminómetro Victor X3 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Se representó la curva de citotoxicidad y se obtuvo el valor de IC₅₀ respectivo.

Para calcular el % de supervivencia celular se consideró el 100 % de viabilidad a las células no tratadas (control negativo) y el 100 % de mortalidad a los controles positivos de mortalidad (SDS). El porcentaje de viabilidad se calculó mediante la Ecuación 12:

$$\frac{(L_{\text{Control Negativo}} - L_{\text{Muestra}})}{(L_{\text{Control Negativo}} - L_{\text{Control Positivo}})} \cdot 100 \quad (12)$$

El mecanismo de acción del reactivo CellTiter-Glo® se basa en la metabolización de Luciferina a Oxiluciferina (Figura 19), un compuesto emisor de luz. Esta metabolización es dependiente de la presencia de ATP en la muestra, compuesto relacionado directamente con el número de células viables. Por lo que una mayor luminiscencia se relaciona con mayor viabilidad celular:

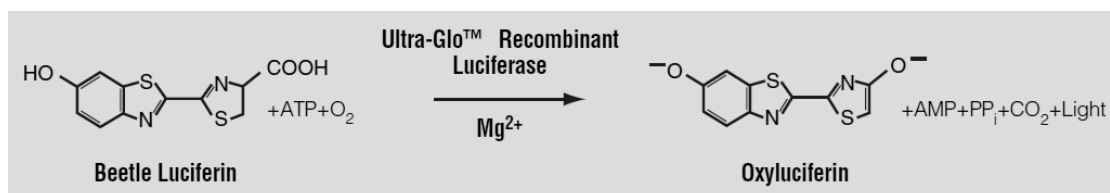


Figura 19: Reacción de la luciferina a oxiluciferina que tiene lugar tras poner a las células en contacto con el reactivo CellTiter-Glo®.

8. Técnicas de Biología Molecular

Con el objetivo de entender los mecanismos de citotoxicidad del fármaco, se llevó a cabo el análisis de la expresión genética de las células HEK001 tras ser expuestas al tratamiento a través del análisis de micromatrices transcriptómicas. Para ello, las células HEK001 se sembraron en una placa de 6 pocillos a una concentración de 250.000 células por pocillo con 2 ml de medio (medio para queratinocitos libre de suero y L-glutamina (99:1)). Las células fueron incubadas durante un periodo de 24 h y posteriormente tratadas con el compuesto de interés. Se escogió una concentración no letal de D pero que fuera suficientemente alta poder evaluar el cambio genómico. La concentración escogida fue de 6,59 μM . El tratamiento fue probado por duplicado y las células expuestas al medio sin fármaco fueron utilizadas como control (n=3). El periodo de exposición fue de 24 h.

8.1 Extracción y purificación del ácido ribonucleico (RNA)

Tras la exposición, el RNA total de cada una de las muestras se extrajo y purificó usando el kit RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Este kit permitió la purificación eficiente sin la necesidad de aplicar una digestión adicional con desoxirribonucleasa (DN_{asa}).

Las muestras biológicas primero se lisaron y homogenizaron con un tampón de isotiocianato de guanidina altamente desnaturante, el cual inmediatamente inactiva las RN_{asa} para asegurar el aislamiento del RNA intacto. Una vez homogenizado, el lisado se pasó a través de una columna de centrifugación de ácido desoxirribonucleico genómico (gDNA). De estas dos maneras, se permite la eliminación eficiente del gDNA .

Tras la eliminación del gDNA , se añadió etanol a la muestra y se introdujo en una columna giratoria de RNeasy donde el RNA total se unió a la membrana. Finalmente, se realizó la extracción del material con agua.

La concentración total de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) se determinó espectroscópicamente realizando la lectura con una ratio de absorbancia de 260:280 nm con el nano-espectrofotómetro, NanoDrop™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) y así lograr una concentración final de 500 ng en 5 μl .

8.2 Síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA)

Una vez obtenido el mRNA , se sintetizó cDNA mediante el empleo del reactivo de termociclador-PCR, PxE Thermal Cycle (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Para ello, se añadió la mezcla de transcripción inversa sobre la muestra, asegurando una correcta homogenización, pipeteando arriba y abajo varias veces, y se incubó en el termociclador durante 20 min a 46°C.

8.3 Microarrays y análisis de datos

Las muestras de cDNA se entregaron a las instalaciones centrales de Genómica del *Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer* (IDIBAPS) para el análisis del transcriptoma utilizando *Clariom_S_Human transcriptomic* mediante la evaluación de 21.448 conjuntos de sondas.

Los datos y el procesado de ellos se realizaron mediante el software Affymetrix. Los resultados de expresión génica fueron comparados utilizando una prueba T unidireccional y un criterio de transcripciones estricto con cambio de pliegue (FC) > 1,5 y valor de $p \leq 0,05$.

9. Estudios de eficacia frente a piojos, ácaros y microorganismos

Los componentes y/ o formulaciones fueron testados frente a diferente organismo que causan patologías a nivel tópico como son: *Sarcoptes scabiei*, *Pediculus humanis capitis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y diferentes especies de *Candida*.

9.1 Eficacia *in vitro* y *ex vivo* frente a sarna

9.1.1 Preparación del modelo

La eficacia *in vitro/ex vivo* de Tenutex® fue testada frente a sarna, mediante el modelo de sarna en oveja (*Psoroptes ovis*), dado que por razones éticas no es posible el uso del modelo humano.

Corderos de origen escocés (mule) de un año de vida (n = 3) fueron infestados con el ácaro *P. ovis* y alojados por un período de seis semanas en instalaciones acondicionadas para ello. Pasado ese tiempo, los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de anestesia. Los ácaros *P. ovis* fueron obtenidos como se describen en la sección 1 del presente capítulo.

Se tomaron secciones de piel (5 cm x 5 cm) con bisturí y se depositaron en una placa de Petri (Fisherscientific, Hampton, VA, USA) a temperatura ambiente para cultivar ácaros vivos móviles. Una vez obtenidos, los ácaros se lavaron con agua purificada con un filtro de 63 µm, se secaron con papel secante y se almacenaron en un Eppendorf hasta el momento del estudio (< 2 horas).

9.1.2 Estudio *in vitro*

Las placas de Petri se recubrieron con una capa delgada o gruesa del tratamiento y otras con el placebo. Los ácaros recolectados se colocaron en las placas correspondientes (20–

30 ácaros por replicado). Se llevaron a cabo 3 réplicas diferentes que se incubaron a 28°C y 75 % de RH durante 1, 8 y 24 h. Tras este período, la actividad acaricida se evaluó mediante el examen de los ácaros a través de un microscopio estereoscópico (Nikon, Copenhague, Dinamarca). Se consideraban que los ácaros eran viables, si se observaba algún movimiento.

Para evaluar la eficacia *in vitro* contra la sarna, se realizó un análisis de los datos de curva utilizando STATA (versión 15.1) con una prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox) aplicada para comparar las curvas de supervivencia.

9.1.3 Estudio *ex vivo*

Se sacrificó una oveja no tratada y se le extirparon con bisturí secciones de piel (4 cm x 4 cm) que se colocaron en placas de Petri. Se seleccionaron ácaros de hembras adultas recogidos como se han descrito anteriormente en el estudio *in vitro*. Alrededor de 50 ácaros *P. ovis* fueron inmediatamente aplicados a las secciones de piel *ex vivo*. Se realizó control positivo y negativo, además de las muestras, y se incubó todo a 28°C con un 75 % RH. Se utilizaron dos controles positivos: producto en placa Petri (sin lavar) con los ácaros aplicados directamente al producto, y el producto sobre la piel (sin lavado) con los ácaros aplicados directamente sobre la piel.

Como control negativo se utilizó la piel sin producto y los ácaros aplicados directamente sobre ella. En el caso de las muestras, se aplicó una capa delgada de emulsión sobre la piel y se lavó con agua purificada tras 10 min, 1 h y 6 h después de la exposición al tratamiento. La actividad acaricida se evaluó mediante examen microscópico después de 1, 8 y 24 horas.

Para probar la eficacia *ex vivo*, se realizó una prueba de Chi-cuadrado (o prueba exacta de Fisher) en R studio y así comparar la proporción media del control negativo frente a cada tratamiento son sus intervalos diferentes de lavado después de realizar una prueba de homogeneidad entre los replicados.

9.2 Eficacia *in vitro* frente a piojo y huevos resistentes a permetrina

Para evaluar la eficacia de Tenutex® contra piojos adultos y huevos, se utilizaron piojos resistentes a permetrina y malatión (*Pediculus humanis capitis*, cepa BR-HL).

Adultos alimentados con sangre (capítulo III, sección 1), medio o completamente dilatados tras la alimentación (n= 10; 5 machos y 5 hembras), fueron transferidos a mechones de pelo. Cinco mililitros del tratamiento o agua destilada (utilizada como control negativo) se frotaron suavemente durante 60 seg y se incubaron a temperatura ambiente durante 8 h. Luego, el pelo se lavó con un champú comercial (Johnson's baby) diluido al 5 % (p/p) en agua destilada, durante 60 seg para eliminar el exceso de producto

y posteriormente se enjuagó cuidadosamente con agua destilada para no despegar los piojos adultos.

Finalmente, se dejó secar el cabello sobre papel de filtro y se examinó la viabilidad de los piojos en diferentes momentos. Se realizaron un total de cinco repeticiones para cada condición. Los piojos se clasificaron como:

- 1: piojos vivos sin cambios en la actividad o el comportamiento.
- 2: piojos con cambios menores en los signos vitales.
- 3: piojos con cambios importantes en los signos vitales, es decir, que no pueden desplazarse, pero sí se detecta movimiento en la barriga, las patas y/o o movimiento de antenas.
- 4: ningún signo vital.

Para demostrar que los piojos eran resistentes a la permetrina, se realizó el mismo estudio con un producto comercial con permetrina al 1 % (Nix[®], Arctech Innovation, Degenham, Reino Unido) y se observaron hasta 23 h.

Los huevos se obtuvieron de hembras adultas colocadas en mechones de cabello humano, las cuales se dejaron ahí hasta que pusieran aproximadamente 50 huevos por mechón. Luego se retiraron los adultos. Se aplicó el tratamiento o el agua destilada (5 ml) como se ha descrito previamente en el experimento con adultos. La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente en una campana oscura durante 1, 8, y 24 h. Luego, el mechón de cabello con los huevos se lavó y se enjuagó siguiendo los mismos pasos descritos anteriormente. Los mechones secos con los huevos se colocaron en una placa de Petri y se incubaron a 31°C con 70-80 % de RH. Se evaluó la viabilidad del huevo (% de eclosión) durante 11 días, según la Ecuación 13. Se realizó un total de tres repeticiones.

$$\% \text{ Eclosión} = \text{Número de huevos eclosionados} / \text{total de huevos ovipositados} \cdot 100 \quad (13)$$

9.3 Eficacia *in vitro* frente a bacterias y levaduras

Para evaluar la eficacia frente a bacterias y levaduras se realizó la determinación de la MIC. La MIC es un parámetro importante tanto para confirmar resistencias a los antibióticos comunes como para evaluar la actividad de nuevos agentes.

Inicialmente pocos laboratorios realizaban pruebas de sensibilidad o si lo hacían la metodología empleada era muy variada. Por ello, se crearon organizaciones como el CLSI o El Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST), cuyo objetivo es armonizar y estandarizar la metodología a utilizar para este tipo de pruebas.

En este caso, la MIC se determinó siguiendo los estándares de las directrices de CLSI,

utilizando el método de microdilución en medio líquido. Para ello un cultivo en placa de agar sólido durante toda la noche (capítulo III, sección 2) se ajustó a 0,5 en la escala de McFarland, se diluyó en el medio líquido específico para cada microorganismo y se aplicó y trató sobre la placa con diluciones seriada del principio activo.

Controles positivos y negativos de crecimiento se llevaron a cabo, siguiendo el esquema de la Tabla 8. Los controles negativos se realizaron con el medio de cultivo respectivo y como control positivo se utilizó el microorganismo en el medio sin tratamiento.

Adicionalmente también se realizó un segundo control positivo con antimicrobianos (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) de referencia para comprobar la sensibilidad de las cepas utilizadas en el estudio. Se empleó gentamicina (512-0,125 µg/ml) para *S. aureus* y *P. aeruginosa*, clindamicina (512-0,125 µg/ml) para *S. pyogenes* y anfotericina B (32-0,002 µg/ml) para las diferentes especies de *Candida*.

Tabla 8: Diseño de placa con las concentraciones testadas de D.

<>	D µg/ml	D µg/ml
A	64	0,25
B	32	0,125
C	16	0,06
D	8	-
E	4	-
F	2	C-
G	1	C-
H	0,5	C+

Los medios y las condiciones específicas utilizados para testar la MIC de D en cada una de las cepas se detallan en las siguientes tablas (Tabla 9 y 10):

Tabla 9: Medios y condiciones de cultivo para los estudios de MIC en las bacterias testadas.

Microorganismo	Medio	Condiciones de cultivo
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATTC® 25923)	Müeller-Hinton liquido (MHB)	35 ± 2°C, 16-20 h Aerobiosis
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATTC® 12344)	MHB	35 ± 2°C, 16-20 h Aerobiosis
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATTC® 27853)	MHB con 2,5-5 % (v/v) de sangre de caballo lisada (Themo Fisher, Landsmeer, Países Bajos)	35 ± 2°C, 20-24 h Aerobiosis (5 % CO ₂)

Tabla 10: Medios y condiciones de cultivo para los estudios de MIC en las levaduras testadas.

Microorganismo	Medio	Condiciones de cultivo
<i>Candida albicans</i> (CECT 1002)	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640 con tampón ácido 3- (N - morfolino)propanosulfónico (MOPS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	35°C, 42-48 h Aerobiosis
<i>Candida parapsilosis</i> (CECT 10434)		
<i>Candida glabrata</i> (<i>Nakaseomyces glabratus</i>) (CECT 1448)		

Tras incubar las placas a las condiciones específicas de cada microorganismo se procedió con una primera lectura visual de ellas para comprobar el primer pocillo donde no había crecimiento (valor de MIC) y una posterior confirmación de la MIC observada mediante la lectura en el espectrofotómetro a 600 nm de longitud de onda.

CAPÍTULO IV: Eficacia y propiedades biofarmacéuticas de una combinación a dosis fija de D y BB

The Efficacy and Biopharmaceutical Properties of a Fixed-Dose Combination of Disulfiram and Benzyl Benzoate

Maria Lajarin-Reinares, Elia Martinez-Esteve, Eloy Pena-Rodríguez, Mariona Cañellas Santos, Sanja Bulut, Kostas Karabelas, Adam Clauss, Carles Nieto, Mireia Mallandrich and Francisco Fernandez-Campos*

* Corresponding author

Internacional Journal of Molecular Sciences | MPDI | 2022

Lajarin-Reinares M, Martinez-Esteve E, Pena-Rodríguez E, Cañellas-Santos M, Bulut S, Karabelas K, Clauss A, Nieto C, Mallandrich M, Fernandez-Campos F. The Efficacy and Biopharmaceutical Properties of a Fixed-Dose Combination of Disulfiram and Benzyl Benzoate. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 19;23(18):10969. Doi: 10.3390/ijms231810969. PMID: 36142878; PMCID: PMC9502479.

Presentación

La sarna y la pediculosis son enfermedades parasitarias que afectan a la piel y el cabello, respectivamente. La incidencia y la resistencia asociadas a estas infecciones está en considerable aumento. Actualmente, se han reportado numerosos casos de resistencia a permetrina, uno de los medicamentos utilizados como primera línea terapéutica.

Tenutex® (emulsión con 2 % de disulfiram y 22,5 % de bencil benzoato) es una alternativa a los insecticidas estándar, ya que su uso está restringido a unos pocos países (Suecia e Islandia) y contiene una combinación de dos principios activos diferentes, lo que podría resultar en una oportunidad para evitar o retrasar la resistencia al tratamiento.

Ahora bien, sus propiedades biofarmacéuticas, como es la absorción por la piel, y sus efectos *in vitro* sobre la sarna aún no se han descrito en la literatura. Además, los efectos *in vitro* descritos sobre los piojos se llevaron a cabo a principios de la década de 1980. Dado que esta información es esencial para poder plantear su uso en nuevos países, se propone evaluar la absorción transdérmica y la eficacia *in vitro* de la formulación frente a sarna y piojos tras diferentes tiempos de exposición.

Para ello, se desarrolló y validó un método de cromatografía líquida de alta resolución que permitiera cuantificar la absorción dérmica realizada en piel humana dermatomizada. Solo el bencil benzoato permeó a través de la piel, pero no mostró citotoxicidad en queratinocitos HEK001 en ninguna de las concentraciones testadas. La eficacia del producto se probó en *Psoroptes ovis* después del contacto directo y tras la administración en explantes de piel de oveja en diferentes tiempos de contacto. Cepas de adultos de *Pediculus humanis capitis* y de huevos resistentes a la permetrina y malatión se expusieron directamente a Tenutex® para evaluar la vitalidad y la incubabilidad, respectivamente.

El estudio contra sarna demostró que la exposición durante 6 o 24 h puede erradicar completamente el parásito. La actividad pediculicida de Tenutex® exhibió una eficacia superior a la del tratamiento estándar en piojos resistentes. Los resultados positivos obtenidos sugieren que Tenutex® es una buena opción de tratamiento, especialmente en situaciones de farmacorresistencia.

El manuscrito resultante de este trabajo se muestra a continuación.



Article

The Efficacy and Biopharmaceutical Properties of a Fixed-Dose Combination of Disulfiram and Benzyl Benzoate

Maria Lajarin-Reinares ^{1,2} , Elia Martinez-Esteve ², Eloy Pena-Rodríguez ² , Mariona Cañellas-Santos ³, Sanja Bulut ⁴, Kostas Karabelas ⁴, Adam Claus ⁴ , Carles Nieto ², Mireia Mallandrich ⁵ and Francisco Fernandez-Campos ^{2,*}

- ¹ Department of Genetics and Microbiology, Campus Microbiology Unit, Autonomous Barcelona University, 08193 Barcelona, Spain
² Topical & Oral Development, Research and Development Reig Jofre Laboratories, 08970 Barcelona, Spain
³ Biotechnology Department, Research and Development, Reig Jofre Laboratories, 08970 Barcelona, Spain
⁴ Department of Development, Bioglan AB, 21124 Malmö, Sweden
⁵ Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, School of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain
* Correspondence: ffernandez@reigjofre.com; Tel.: +34-935-507-718

Abstract: Scabies and hair lice are parasitic diseases that affect human skin and hair, respectively. The incidence and resistances of these infections are increasing. Tenutex[®] (disulfiram and benzyl benzoate emulsion) is an alternative to standard insecticides to avoid resistances. The aim of the work is to evaluate the transdermal absorption and the in vitro efficacy against scabies and hair lice after different exposition times. Dermatomed human skin was used to assess the dermal absorption using a validated High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method. HEK001 keratinocytes were used to evaluate the cytotoxicity of benzyl benzoate. Only benzyl benzoate was able to cross the skin, but it did not show cytotoxicity at any of the tested concentrations. The product efficacy was tested on *Psoroptes ovis* after direct contact and after administration on sheep skin explants at different contact times. Permethrin/malathion-resistant strains of *Pediculus humanis capitis* adults and eggs were directly exposed to Tenutex, and the vitality and hatchability, respectively, were evaluated. The anti-scabies study demonstrated that exposure for 6 or 24 h completely eradicated the parasite. The pediculicidal activity of Tenutex exhibited superior efficacy than standard treatment on resistant lice. The positive results obtained suggest that Tenutex[®] is a good treatment option, especially in drug resistance situations.

Keywords: disulfiram; benzyl benzoate; skin permeation; topical medication; antiparasitic agents; scabies; lice



Citation: Lajarin-Reinares, M.; Martinez-Esteve, E.; Pena-Rodríguez, E.; Cañellas-Santos, M.; Bulut, S.; Karabelas, K.; Claus, A.; Nieto, C.; Mallandrich, M.; Fernandez-Campos, F. The Efficacy and Biopharmaceutical Properties of a Fixed-Dose Combination of Disulfiram and Benzyl Benzoate. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10969. <https://doi.org/10.3390/ijms231810969>

Academic Editor: Dharmendra Kumar Yadav

Received: 18 July 2022

Accepted: 15 September 2022

Published: 19 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Scabies is a superficial skin disease caused by *Sarcoptes scabiei* mites. It is a world-wide infection, estimated to affect from 130 million [1] to 300 million [2] people per year. Other authors estimated the global prevalence at 0.2–70%, depending on the geographical location [3]. It spreads easily in crowded areas (including elderly care homes and military environment) and those with poor sanitation; due to migration pressure, cases are increasing in developed countries [4]. The parasites produce tunnels under the skin with erythematous and pruritic lesions, which could present as pustules, vesicles, and nodules. Furthermore, scratching of pruritic lesions can lead to bacterial infection (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*), which further worsens the pathology [3]. Skin symptoms usually appear four weeks after the primary infection, together with unspecific signs (discomfort, eruptions, eczema, etc.) common to other skin diseases. Furthermore, the frequent low number of adult parasites present on the skin makes diagnosis difficult; microscopic observation of parasite eggs and/or feces is usually required [5]. *Sarcoptes* are usually observed

in skin folds (i.e., fingers, arms, wrist, genital area, axillae) and around the trunk in general. The neck and face are not usually affected in adults but could be affected in infants [6]. The entire life cycle of the mite occurs in humans. Adult individuals mate on the skin surface and females lay their eggs in skin burrows within the stratum corneum. After 2–3 weeks, eggs hatch into larvae that after several days transform into nymphs (with two developmental stages, the protonymph and tritonymph) that will eventually become adults. The development time from egg to adult can be up to 21 days, and the adult life span ranges from 26 to 40 days [7].

Several hygiene measures should be considered to reduce the recurrence and spread of the infection, e.g., the treatment of sexual partners and washing clothes and bedsheets at high temperatures [6]. Apart from these precautions, there are several pharmacological treatments to eradicate mites, generally insecticides that are given either topically or orally. Recommended treatments, according to the European Academy of Dermatology and Venereology [8], include topical permethrin (5% cream) or benzyl benzoate lotion (10–25%), or oral treatment with ivermectin. As an alternative treatment, the topical administration of malathion, ivermectin, sulfur, or synergized pyrethrin has been suggested. Other remedies to treat scabies include topical treatment with crotamiton, monosulfiram, and lindane. The more severe form of infestation, crusted scabies, occurring mainly in immune-compromised patients, requires a combination of topical scabicides and oral ivermectin. The gold standard of pharmacological treatment of scabies is topical dosage forms with 5% permethrin. Treatment usually consists of a single dose, covering the entire body surface except the face. It is a multidose regimen, i.e., one dose per day for five days, or two single doses separated by one week, obtaining, in most cases, the complete eradication of the disease and very good tolerance [3].

Drug resistance has not been widely studied; however, it has been described in literature [7]. There is increasing evidence of drug resistance and several case studies report lower-than-expected topical permethrin effectiveness [9–13]. Thus, the availability of alternative treatments is of increasing concern.

Pediculus humanus var. *capitis*, commonly known as hair lice, is an ectoparasite that infests the human scalp. It feeds from blood from the infestation site. Female lice produce eggs that attach to the hair and hatch in approximately one week. Within 7–10 days after hatching, the nymph becomes an adult that can live up to approximately 30 days [14]. Pediculosis, or infestation by *Pediculus humanus*, usually affects up to 13% of children 5–13 years old. Although it is not a severe disease, it is bothersome and can cause irritation, itching, social rejection, school access limitations, and a secondary skin infection due to scratching for example, pyoderma by *Streptococcus* or *Staphylococcus* spp. [15]. The main principles for the treatment of head lice include the use of noninsecticide agents, insecticide agents, and wet combing. In many European countries, the use of noninsecticide agents has become the treatment of choice and has overtaken insecticide-based products, probably due to safety concerns and increasing drug resistance [16]. Noninsecticide pediculicides have a physical mode of action, coating the lice and causing them to die via suffocation and/or dehydration. Most noninsecticide products contain either synthetic silicon oils, such as dimeticones, or isopropyl myristate or 1,2-octanediol as active pharmaceutical ingredients (APIs) [17].

The heavy use of neurotoxic insecticides as pediculicides has led to the emergence and spread of drug resistance in many parts of the world [18]. For example, resistance to permethrin has been reported, and the success rate of permethrin as a pediculicide in some parts of the UK is only 30–40%. The reported frequency of permethrin-resistant head lice is extremely high in Denmark [19,20]. Resistance to malathion has been reported in Denmark, France, the UK, and Australia, although resistance to malathion seems to be less common compared to pyrethroids [20–23]. Double resistance to permethrin and malathion in head lice has also been documented among school children in the UK [22]. Resistance to lindane is well known from many countries and has been reported for many years [24,25]. Resistance to insecticides is linked to a reduction in the sensitivity to drugs due to genetic

mutations in the target genes, P-glycoprotein mediated efflux, and the increased metabolic activities of enzymes such as esterases, cytochrome P450, and glutathione S-transferase [26].

Tenutex[®] is a cutaneous emulsion consisting of a combination of benzyl benzoate (BB) (22.5%) and disulfiram (D) (2.0%) that has been registered in Sweden since 1982 and in Iceland since 1997 for the treatment of scabies and pediculosis (head lice, crab lice) in adults and children [27,28]. Thus, the use of this product is geographically restricted today. Both active substances in Tenutex[®], benzyl benzoate and disulfiram, have been used individually to treat lice and scabies. Benzyl benzoate is a well-known antiparasitic agent used in many countries to treat lice and scabies, and it is one of the recommended treatments in the European guidelines for the management of scabies [8]. Disulfiram was the active compound in Tenurid, a historical product that was registered in Sweden until 1957 for the treatment of lice and scabies [29]. Disulfiram has been classically used orally as an aldehyde dehydrogenase inhibitor to support alcoholism dishabituation because it produces an increase of acetaldehyde in the blood, leading to patient discomfort, known as the Antabuse reaction [30]. In addition, disulfiram exhibits another mechanism of action, as a chelating agent, with alteration of the cell redox profile and antiproliferative activity, and potential indications as an antimicrobial [31,32] or anticancer [33,34] agent.

The geographically restricted use of Tenutex[®] and the fact that the product contains two APIs may be opportunities to avoid or delay resistance to treatment [13]. Although Tenutex[®] is a well-established drug in Sweden, its biopharmaceutical properties such as skin absorption and its in vitro effects on scabies have yet to be described in the literature, while in vitro effects on human head lice were reported in the early 1980s [35].

The aim of this study is to characterize the skin absorption profile of Tenutex[®] cutaneous emulsion and to study its in vitro efficacy against scabies and human head lice resistant to common insecticides. Since human scabies mites are not easily accessed, tests were performed using sheep scabies (*Psoroptes ovis*) mites as proxy. In addition, the effect of emulsion exposure time on scabies was tested.

2. Results and Discussion

2.1. Analytical Method Validation

A high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous analysis of D and BB in samples from the in vitro permeation test was validated according to the ICH Q2 guideline [36]. Figure 1 is a representative chromatogram of an analytical standard in the receptor medium at a concentration of 31.7 µg/mL for D and 356.5 µg/mL for BB. The method's specificity was confirmed by the lack of an interfering peak at the retention times of both drug standards (diluted in mobile phase) after the injection of a receptor medium blank and excipients of BB/D emulsion (diluted in mobile phase and in the receptor medium). The stability of the drug solution in the HPLC injector was evaluated for 48 h at 25 °C, being the difference in peak area between the two time points; if it is below 2%, then samples are considered stable for this period.

Linearity was assured at the analytical range, with a regression coefficient (r^2) value higher than 0.990. An acceptable coefficient of variation (CV) of response factor (relationship between response and concentration) was obtained (<10%) considering the high concentration range (3–4 log between the lower and higher concentration). There was a lack of tendency in residual plots. Finally, a significant slope was found for the p -value of regression for both drugs (meaning the slope is significantly different from zero), with a nonsignificant p -value for the BB intercept (no statistical difference between zero and the intercept) but a significant one with a borderline value of D (Table 1).

Intermediate precision (Table 2 for D and Table 3 for BB) was used as a precision parameter since it had the highest variability (two different analyses on two different days), obtaining global mean values of 104.60% and 95.87% with variation coefficients of 2.61% and 4.01% for D and BB, respectively. Considering a threshold CV value of 6.71%, the method is deemed precise.

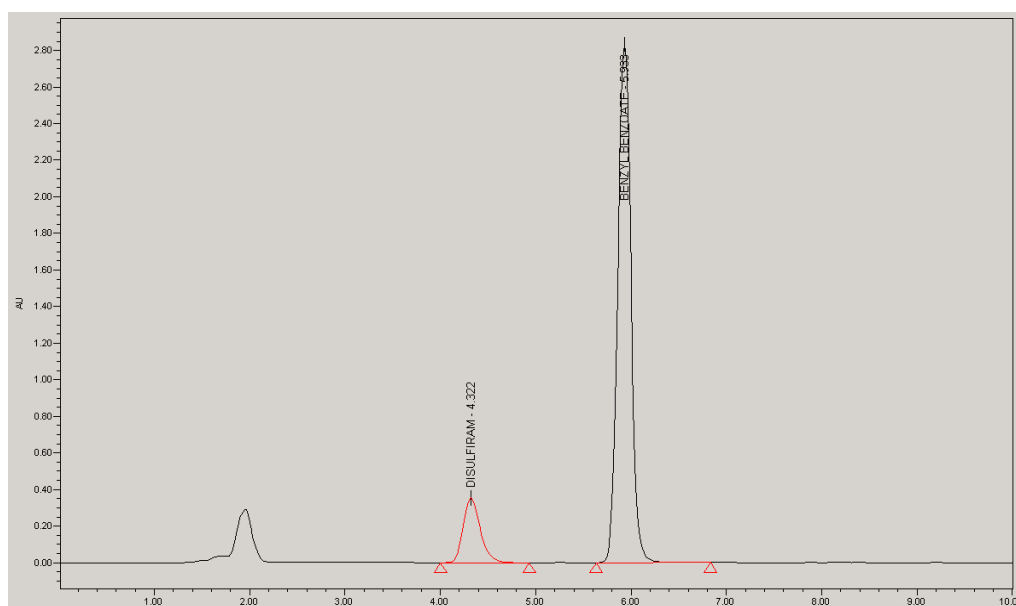


Figure 1. Chromatogram of an analytical standard in the receptor medium at a concentration of 31.7 µg/mL for D and 356.5 µg/mL for BB.

Table 1. Regression line for D and BB, range, slope, intercept, coefficient of variation (CV) of response factor, residual plot tendency, and regression coefficient. The distribution was assessed via an equal variance test, Levene’s test ($\alpha = 0.05$).

Parameter	D	BB	Specification
Range	0.08–15.70 µg/mL	0.90–182.70 µg/mL	-
Linearity	Slope 137,322.71 ($p < 0.05$)	84,127.02 ($p < 0.05$)	$p < 0.05$
	Intercept -7049.71 ($p = 0.04$)	-16,389.67 ($p > 0.05$)	$p > 0.05$
R^2	0.99980	0.99997	>0.990
CV response factor	8.71%	0.71%	<10%
Homoskedasticity (Levene’s test)	$p = 0.31$	$p = 0.83$	$p > 0.05$
Residual plot	No tendency	No tendency	No tendency

Table 2. Results of intermediate precision for disulfiram at three different concentration levels. Mean and CV values are reported.

Concentration Level	Sample ID	Disulfiram		
0.08 µg/mL	Analyst 1 day 1	Mean: 101.20%	Mean: 103.12%	
	Analyst 2 day 2	CV = 2.52%		
0.38 µg/mL	Analyst 1 day 1	Mean: 105.00%	Mean: 103.95%	Mean: 104.60%
	Analyst 2 day 2	CV = 2.54%		
6.35 µg/mL	Analyst 1 day 1	Mean: 104.20%	Mean: 106.62%	
	Analyst 2 day 2	CV = 0.94%		

Table 3. Results of intermediate precision for benzyl benzoate.

Concentration Level	Sample Id.	Benzyl Benzoate		
0.89 µg/mL	Analyst 1 day 1	Mean: 91.70%	Mean: 91.02%	
	Analyst 2 day 2	CV = 1.98%		
3.57 µg/mL	Analyst 1 day 1	Mean: 90.30%	Mean: 98.90%	Mean: 95.80%
	Analyst 2 day 2	CV = 1.81%		
71.42 µg/mL	Analyst 1 day 1	Mean: 96.30%	Mean: 100.10%	
	Analyst 2 day 2	CV = 0.37%		
	Analyst 1 day 1	Mean: 104.80%		
	Analyst 2 day 2	CV = 0.27%		

To calculate the accuracy, results from analysis 1 on day 1 were used (Tables 2 and 3). Global mean values of 103.40% for D and 95.60% for BB, with CV = 2.25% and 3.47% for D and BB, were obtained. Levene's test was carried out to confirm that no statistical differences were found between the concentration levels ($p > 0.05$ for D and BB), and the confidence interval of global percentage recovery was, in both cases, within the 90.0–110.0% range, showing that the method is accurate between the assayed concentration values.

Finally, the limit of quantification (LOQ) value was established at a concentration of 0.080 µg/mL for D and 0.8997 µg/mL for BB.

The analytical method could be considered successfully validated for the analysis of both drug substances in permeation experiments.

2.2. Human Skin Permeation

An *ex vivo* permeation experiment with dermatomed human skin (two different skin donors) was used to characterize the skin absorption profile of D and BB in vertical diffusion Franz cells. Before and after the experiment, the skin integrity was evaluated by measuring the transepidermal water loss (TEWL) value, in all samples and at both testing times; a value below 15 g/m²h indicates that the skin maintains integrity. The drug dose evaluated corresponds to the prescribed therapeutic dose (approximately 3.65 mg/cm²). According to the technical information available on Tenutex®, 60 g of the product should be applied to the entire body surface except the head, which is approximately 16,340 cm² [37]. The results are shown in Figure 2. Only BB was able to penetrate the skin; D was not detected in the chromatogram in any replicate at any time. The permeation parameters are listed in Table 4.

BB had a very good permeation profile, achieving steady state within the first hour after administration (lag time = 0.78 h). This skin absorption is probably caused by the favorable physicochemical properties of the compound, according to the Lipinski rule of five [38]: low molecular weight (212.24 Da), logP value 3.9, low melting point (21 °C), and fewer than five hydrogen bond donors and acceptors [39]. The high diffusion coefficient (Dif) revealed that drug diffusivity is the main absorption mechanism and confirmed the permeability of BB, probably due to its physicochemical properties. The partitioning parameter (P) of the API between the emulsion and the skin surface had a lower contribution to the skin absorption. As previously described, BB has been classically used as a scabicide and was reported to have a good safety profile in its clinical use [5]. In addition, BB is a common ingredient in fragrances, and its safety was previously evaluated [40] and confirmed. Two previous studies [41,42] studied the BB transdermal absorption (in a set of experiments to evaluate the transdermal absorption of compounds used in fragrances), but none of them studied the percutaneous kinetics or the transdermal flux. In addition, the different methodological approaches (dose applied, different vehicles, the use of occlusive material, *in vitro* or

in vivo studies, etc.) in each study make it difficult to compare the results. Although D had good potential permeability, a molecular weight of 296 Da, log P of 3.88, melting point under 200 °C (71.5 °C), and fewer than five hydrogen bond donors and acceptors [43], there was no peak observed in any of the permeation samples' chromatograms. This may be due to the relatively low concentration of D in the emulsion (2%) compared with 22.5% BB. Considering that D could cause several adverse effects if it is systemically available after oral administration (such as dermatological, neurological, hepatic, gastrointestinal, cardiac, and psychiatric events), mainly due to the inhibition of aldehyde dehydrogenase and dopamine beta hydroxylase [44], the lack of permeability is an advantageous property in terms of treatment safety. D would only be available on the outermost skin layer to develop its antiparasitic effect.

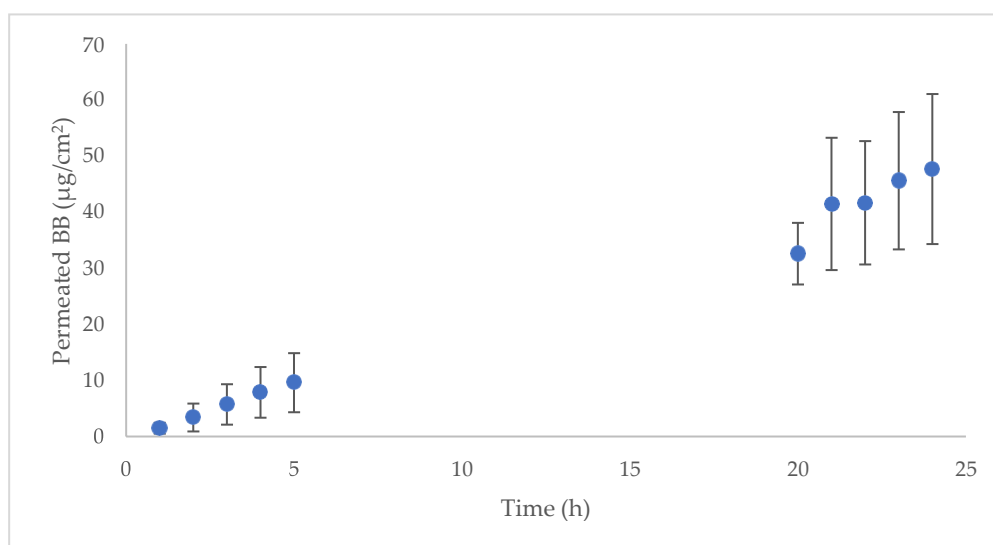


Figure 2. Permeation profile of BB in human skin ($n = 9$) after administration of 3.65 mg/cm² emulsion.

Table 4. Permeation parameters of benzyl benzoate in human skin.

	Mean	SD
Jsup (µg/hcm ²)	1.3014	0.3366
R ²	0.9963	0.0067
Kp (cm/h)	5.78×10^{-6}	1.50×10^{-6}
Tlag (h)	0.7755	0.7059
P (cm/h ²)	3.5978×10^{-5}	1.3657×10^{-5}
Dif (1/h)	0.1252	0.0183

2.3. In Vitro Cytotoxicity Evaluation

According to the human skin permeation results, BB was the only component that permeated. The first cells that would come into contact with BB would be skin keratinocytes, so cytotoxicity was tested in human-transformed keratinocyte (HEK001) cells. The concentration tested ranged between 0.305 and 5000 µM, which correspond to 0.647 and 1060 µg/mL, respectively. Seventy-two hours posttreatment, BB had no cytotoxic effect at any concentration (Figure 3).

In the range of concentrations tested, the cell viability was over 85%, with low variability (CV = 5.58%). Luminometric assay determined the number of viable cells in culture based on quantitation of the ATP present, which signals the presence of metabolically active cells [45].

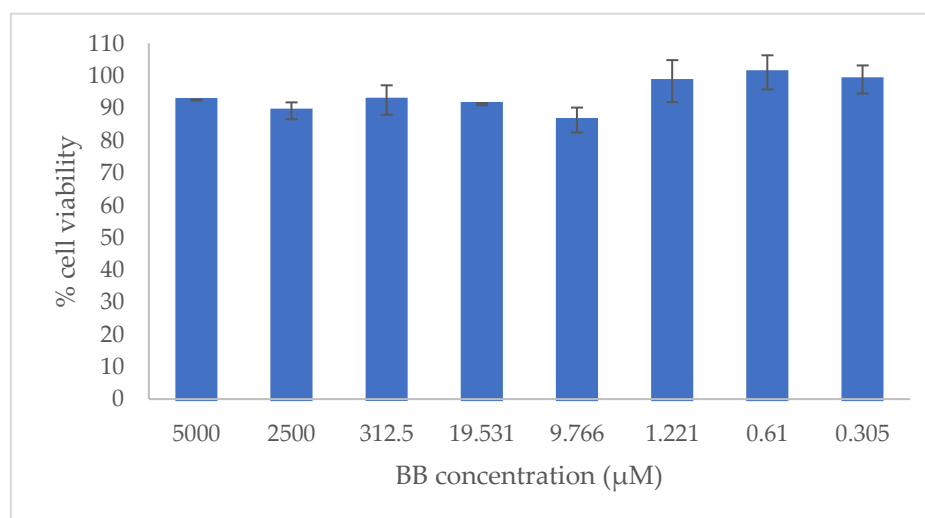


Figure 3. Cell viability 72 h posttreatment with BB. Results show the mean value \pm standard deviation (SE).

2.4. In Vitro and Ex Vivo Efficacy against Scabies

Tenutex[®], consisting of a BB/D emulsion (22.5% BB/2.0% D), was tested for acaricidal activity in sheep scabies mites in vitro, by exposing the mites directly to the drug emulsion, and via an indirect assay using skin sections excised from sheep. Thus, excised skin sections from sheep were exposed to the emulsion for different lengths of time and then washed off, followed by placing the mites on the skin sections; after incubation, the acaricidal activity was assessed. These dose schemes were chosen to test if shorter product application times were viable, as the summary of product characteristics (SmPC) for Tenutex[®] stated that the emulsion should be applied to the skin for 24 h before rising it off [27]. Historically, few studies describe in vitro tests carried out to evaluate the efficacy of scabicides, and those that do used the direct in vitro contact method to evaluate the sensitivity for antiparasitic drugs [46–49]. This method is relatively easy to perform but might not show the treatment efficacy on real application. In this case the product should be at an effective concentration in the most superficial skin layer for drug release and penetration into the skin horny layer. Therefore, the ex vivo assay described in this article was considered to better mimic exposure to the drug after treatment in humans than the direct in vitro test on scabies mites, and it was therefore used to compare with the current prescribed treatment of Tenutex[®].

It is not possible to culture mites; thus, it is necessary to obtain them from infected humans or animals (pigs are usually employed [48,49]).

In vitro study. The mites exposed to the negative control were unaffected, with a 100% survival rate 24 h postexposure. Mites exposed to the test product showed mortality rates of 100% at 1 h in both the thin- and thick-layer treatment. BB/D emulsion combination has not previously been studied using this model, but other authors described quick scabicide activity with 25% BB product following 3 h of direct contact [46]. In our case, the BB/D emulsion resulted in 100% mortality already after 1 h (Table 5).

Ex vivo study. The efficacy of the Tenutex[®] emulsion after a 24-h exposure was demonstrated based on clinical evidence [28]. This long period of time with no possibility of rinsing might be inconvenient for the patient. In addition, sweat could remove some of the product. To test if a reduced exposure time is sufficient to obtain the desired efficacy, the pharmaceutical product was washed from the ex vivo skin surface after 10 min, 60 min, or 6 h after application.

Table 5. Mean percentage mortality across three replicates following exposure to Tenutex[®] emulsion or placebo. With incubation at 28 °C with 75% relative humidity for 0, 1, 8, and 24 h.

Test Solution	Mean % Mortality			
	0 h	1 h	8 h	24 h
Placebo—thin layer (<i>n</i> = 91 mites)	0	0	0	0
Placebo—thick layer (<i>n</i> = 88 mites)	0	0	0	0
Tenutex emulsion—thin layer (<i>n</i> = 91 mites)	0	100	100	100
Tenutex emulsion—thick layer (<i>n</i> = 90 mites)	0	100	100	100

Skin mites exposed to the test product for 10 min before washing showed an initially high level of mean mortality/unresponsiveness of 93.6% 1 h postexposure. However, mites showed recovery at 8 h and 24 h postexposure (34.2% and 5.8% mean mortality/unresponsiveness, respectively). The final 24-h mean mite mortality for the 10-min treatment was not significantly different to the mean mite mortality of the negative control ($p = 1.000$). A similar trend was observed in mites that had been exposed to skin sections that were treated for 60 min before washing. A mean mortality/unresponsiveness of 89.9% was observed 1 h postexposure, followed by 40.6% and 14.7% mean mortality/unresponsiveness at 8 and 24 h, respectively. The final 24-h mean mite mortality for the 1-h treatment was not significantly different from the mean mite mortality of the negative control ($\chi^2 = 0.410$, $df = 1$, $p = 0.529$) (Figure 4).

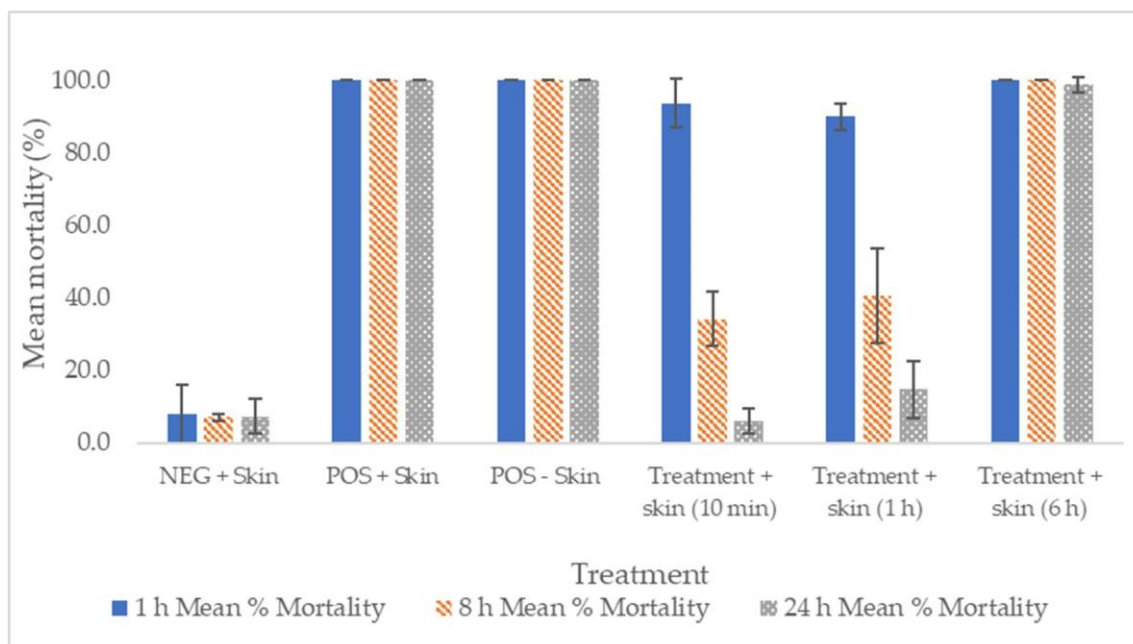


Figure 4. Mean (\pm S.E.) mortality/unresponsiveness of *P. ovis* mites exposed to the test compound in vitro ('-skin') or ex vivo ('+skin'), expressed as a percentage (%) of mites exposed ($n = 3$ replicates per treatment; $n = 2$ replicates per control). 'NEG + skin' = negative control on the skin section ($n = 47$ – 51 mites per replicate); 'POS + Skin' = positive control on skin section ($n = 50$ – 55 mites per replicate); 'POS - Skin' = positive control in Petri dish only ($n = 50$ – 53 mites per replicate); 'Treated + Skin (10 min)' = test compound on skin washed after 10 min ($n = 47$ – 52 mites per replicate); 'Treated + Skin (1 h)' = test compound on skin washed after 60 min ($n = 46$ – 52 mites per replicate); 'Treated + Skin (6 h)' = test compound on skin washed after 6 h ($n = 46$ – 56 mites per replicate).

Mites exposed to skin sections treated for 6 h prior to washing showed 100% mean mortality/unresponsiveness at 1 h and 8 h postexposure and 98.8% mean mortality/unresponsiveness

at 24 h postexposure. The final 24-h mean mite mortality for the 6-h treatment was significantly different from the mean mite mortality of the negative control ($\chi^2 = 77.687$, $df = 1$, $p < 0.001$) (Figure 4).

The negative control (on skin section) showed mean mortalities/levels of unresponsiveness of 7.9%, 7.0%, 7.3%, and 8.3% at 1 h, 8 h, 24 h and 30 h postexposure, respectively. The positive control on the skin showed 100% mean mortality/unresponsiveness at all time points (Figure 4).

Based on the results, it is hypothesized that after 6 h of contact, the APIs are absorbed from the emulsion to the skin surface. According to the skin permeation experiments, disulfiram did not cross the skin, and it probably would be restricted to the outermost skin layers, where mites usually reside. In this region, both APIs (disulfiram and benzyl benzoate) would arrive at concentrations that allow the complete mortality of the parasite. The proteomic profile of *Sarcoptes scabiei* was recently published [50], showing several enzymes that disulfiram could interact with, such as glutathione S-transferase [51], ABC transporters [52], and different dehydrogenases [53]. These enzymes are essential for the redox status and the mitochondrial respiratory activity. ABC transporters in addition have a crucial role in the detoxification of xenobiotics, and their inhibition could increase both drug concentrations inside the parasite. The enzymatic inhibitory activity of disulfiram together with the neurotoxic effect of benzyl benzoate are probably responsible for the strong anti-scabies activity of Tenutex[®]. Mites may need a minimum contact of 6 h with the product on the skin in order for us to obtain complete mortality. This potential new dosing scheme could possibly be evaluated in a future clinical trial, but it is a promising result and could facilitate patient compliance and improve patient comfort. For example, patients could apply the product at night before going to sleep, and the following morning, they could wash off the residual product by having a shower.

2.5. In Vitro Efficacy against Adults and Eggs of the Human BH-RL Strain of Lice, Resistant to Both Permethrin and Malathion

Adulticidal efficacy: Figures 5 and 6 show the vitality signs of adult head lice after incubation with Tenutex[®] (BB/D emulsion) and Nix[®] (1% permethrin emulsion) at different contact times. In both cases, a double resistant (malathion and permethrin) strain of *Pediculus humanis capitis* was used. Following an 8-h incubation, BB/D emulsion resulted in an average mortality response (Figure 5) of 74% 10 min after the rinsing procedure; after 15 h, the value increased to 86% but the difference was not significant (t -test, $p < 0.05$).

Regarding the reference product (1% permethrin emulsion,), the mortality is reduced compared to the test product from the first time points studied. Ten minutes post rinse, a 12% mortality response was obtained, and it remained the same for the following 7 h. After 10 h, there was a significant mortality increase, up to 55% ($p < 0.05$), and after 23 h, the mortality response was 60%—not significant compared to the 10-h response. The vitality result for the permethrin treatment showed a significantly lower pediculicidal effect compared to the BB/D treatment. Other studies have evaluated the activity of other 1% permethrin products on resistant strains of hair lice. Subahar et al. [54] showed a 36.7 % mortality rate after 1 h of direct contact with adult parasites. Gao et al. [55] evaluated lethal times of 95% and 50% for a BR-HL-resistant strain obtaining values of 34.6 and 25.8 h, respectively, similar to the 60% mortality found in our study at 23 h.

Finally, the negative control (distilled water) did not show mortality after 15 h, and the mortality response increased to 2% after 23 h. This was significantly different from the Tenutex[®] and Nix[®] results. Under the experimental conditions, the Tenutex[®] emulsion was significantly more toxic than Nix[®] in permethrin-resistant hair lice. Both permethrin and benzyl benzoate are considered neurotoxic agents against parasites. The higher efficacy of Tenutex[®] compared to Nix[®] could be attributed to the combination with disulfiram, giving a synergistic effect against permethrin-resistant mites. The exact mechanism of action of disulfiram against parasites has not been completely elucidated; however, it has been proposed, and as we hypothesized earlier, that it could inhibit several enzymes,

such as carbamate kinase, triosephosphate isomerase, ubiquitin-proteasome activity, and aldehyde dehydrogenase, which could mediate the toxicity for *Leishmania*, *Giardia*, and *Trypanosoma* spp., among other parasites [56].

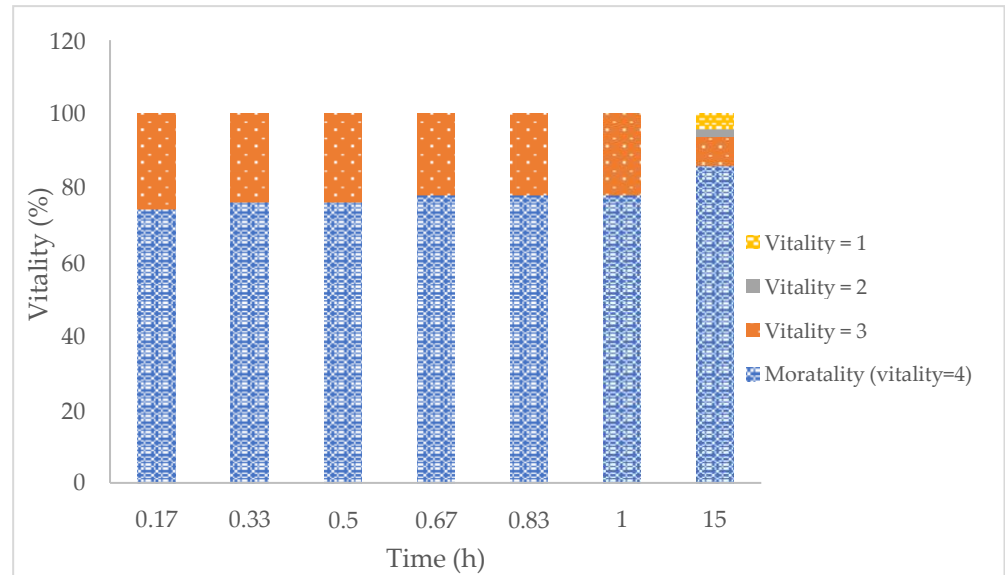


Figure 5. Percentage of young adults observed at a specific vitality classification after 8 h of incubation with Tenutex® emulsion. The treatment was replicated a total of five times, with five males and five females per replication ($n = 10$). Vitality was classified as: 1 (living lice with no change in activity or behavior), 2 (lice with minor changes in vital signs), 3 (lice with major changes in vital signs, i.e., not walking but gut, leg, and/or antennae movement present) and 4 (no vital signs at all).

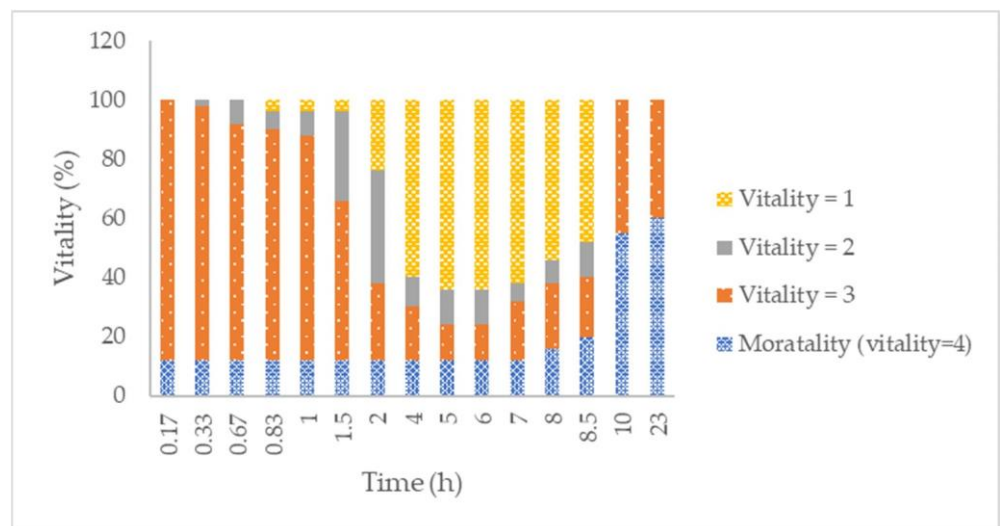


Figure 6. Percentage of young adults observed at specific vitality classification after 10 min of incubation with Nix®. Treatment was replicated a total of five times, with five males and five females per replicate ($n = 10$). Vitality was classified as: 1 (living lice with no change in activity or behavior), 2 (lice with minor changes in vital signs), 3 (lice with major changes in vital signs, i.e., not walking but gut, leg, and/or antennae movement present) and 4 (no vital signs at all).

Ovicidal efficacy: Table 6 shows the cumulative hatch rate after treatment with Tenutex® and the negative control (distilled water (ddH₂O)). Exposure to the test product for 1 h was not enough to obtain an adequate mortality rate (around 14–15% hatch after five days of follow-up). However, a single exposure to Tenutex® for 8 h produced a cumulative

hatch rate of 0.2% (corresponding to only one hatch). Finally, exposure to the test product for 24 h achieved complete egg eradication. The egg hatch of the negative control was higher than 98% after exposure to water for 1 or 8 h. The survival of the negative control exposed for 24 h was 87%. Kyong Sup Yoon et al. [57] also tested the hatchability of a BR-HL-resistant strain under normal conditions (not-treated) and found similar values (87.1%) compared to our control (Table 6). In addition, they tested 1% permethrin product over permethrin and DDT double-resistant head lice (SF-HL strain) observing a hatchability of 75%. Jorg Heukelbach et al. [58] found about 60% ovicidal activity of permethrin 1% shampoo for the BR-HL strain and about 95% activity with dimethicone product, similar to our findings with BB/D emulsion.

Table 6. Average % hatchability with standard deviation of eggs for three replicates following tuft submersion in either Tenutex[®] or distilled water (the negative control) for 1, 8, or 24.

	Average % Hatchability ± SD
Tenutex, 1 h	15 ± 18
ddH ₂ O, 1 h	96 ± 2
Tenutex, 8 h	0.2 ± 0.4
ddH ₂ O, 8 h	98 ± 1
Tenutex, 24 h	0 ± 0
ddH ₂ O, 24 h	87 ± 4

3. Materials and Methods

3.1. Materials

The Tenutex[®] emulsion, placebo, and drug substances (disulfiram and benzyl benzoate) were kindly gifted by Bioglan AB (Malmö, Sweden). Standard disulfiram and benzyl benzoate (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) were used for validation of the analytical method. Methanol and KH₂PO₄ (Scharlab, S.L., Sentmenat, Spain) were used for the mobile phase. Phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) and hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPCD) (Pracofar, S.L., Martorell, Spain) were used for the preparation of the receptor medium. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA), Gibco keratinocyte medium with L-glutamine, and epidermal growth factor (EGF) (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Spain) were used for the cytotoxic evaluation.

3.2. High-Performance Liquid Chromatography Quantification and Validation of Disulfiram and Benzyl Benzoate

The simultaneous quantification of disulfiram and benzyl benzoate was carried out with HPLC-UV equipment (Water Alliance 2695, Cerdanyola del Vallès, Spain). Mobile phase (KH₂PO₄ 1.7 mg/mL, pH 5.5: methanol (30:70 v/v)) flowed isocratically at 1.2 mL/min through a C18 column (4.6×150 mm, 3 μm, Thermo Scientific, Barcelona, Spain) kept at 30 °C. The injection volume was 40 μL. The method validation was carried out according to the ICH Q2 guidelines [36]. The analytical range was set from 0.080 to 15.85 μg/mL for D and from 0.0899 to 71.97 μg/mL for BB. The linearity, intermediate precision, and accuracy were studied within this range. In addition, the LOQ and solution stability in the HPLC autosampler were determined.

3.3. Ex Vivo Skin Absorption Experiment with Human Skin

Dermatomed human skin (approximately 0.5 mm thick), used in the ex vivo permeation test, was obtained from the abdominal region of two different woman during plastic surgery (Condalab, Madrid, Spain). Written consent was obtained from the skin donors. Permeation studies were performed in vertical Franz diffusion cells (VidraFoc, Barcelona, Spain) with a permeation area of 1.54 cm². BB/D emulsion (Tenutex[®]) was dosed in the donor compartment at an equivalent prescription dose (approximately 3.65 mg/cm²). Skin was kept frozen at -20 °C until use (six months maximum storage period). On the day

of the experiment, skin was thawed at room temperature and placed between the donor and receptor compartment of Franz cells. A 15% *w/w* HPCD solution in PBS (pH 5.5) was used as the receptor medium; to maintain sink conditions during the experiment, the temperature was kept at 32 ± 1 °C, with continuous stirring at 700 rpm. Skin integrity was evaluated at the beginning and end of the experiment via TEWL measurement (Delfin Technologies, Kuopio, Finland). Samples from the receptor compartment (300 µL) were taken at regular time intervals up to 24 h and replenished with the same volume of fresh receptor medium. Samples were analyzed and quantified using the method described in the previous section.

After drug quantification, the following permeation parameters were calculated: the transdermal flux (J , µg/cm²h) (Equation (1)), permeability coefficient (K_p , cm/h) (Equation (2)), lag time (t_{lag} , h) (obtained by linear extrapolation of the x-axis of the points at steady state), diffusion parameter (Dif , 1/h) (Equation (3)), and partitioning parameter (P , cm/h²) (Equation (4)).

$$J = \frac{dQ}{(dT \cdot S)} \quad (1)$$

where J is the transdermal flux, dQ is the permeated amount differential, dT is the time differential, and S is the membrane diffusion surface.

$$K_p = \frac{J}{C_d} \quad (2)$$

where C_d (µg/mL) is the concentration of the drug in the donor compartment.

$$Dif = \frac{1}{6T_{lag}} \quad (3)$$

$$P = \frac{K_p}{D} \quad (4)$$

3.4. In Vitro Cytotoxicity Evaluation

Cell treatments ($n = 6$): human-transformed keratinocyte (CRL2404, ATCC, Manassas, VA, USA) cells were seeded in 96-well plates at 10,000 cells/well in 50 µL of medium (keratinocyte serum-free medium, supplemented with 2 mM L-glutamine and 5 ng/mL Epidermal Growth Factor (hEGF)). The cells were incubated at 37 °C in a 5% CO₂, 95% air-humidified atmosphere for 24 h. After 24 h of incubation, the cells were treated with increasing doses of BB (0.305 to 5000 µM; a stock solution was prepared in DMSO and the final concentration of DMSO in the wells was below 1%). A medium with DMSO at 1%, sodium dodecyl sulfate at 10%, and a cell culture medium were used as the experimental control. The exposure period was 72 h.

At the end of the incubation time, cytotoxicity was evaluated using the CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD, USA). One hundred microliters of CellTiter-Glo[®] reagent were added directly to every well plate, cultured in serum-free medium, and incubated for 10 min. The luminescence was measured immediately using a Victor X3 luminometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

3.5. In Vitro and Ex Vivo Efficacy against Scabies

To evaluate the in vitro and ex vivo efficacy of BB/D emulsion against scabies, *Psoroptes ovis* mites (sheep scabies) were selected as the model, since the ethical sourcing of human scabies is almost impossible.

One-year-old Scotch Mule lambs ($n = 3$) were infested with *P. ovis* mites and housed indoors for a period of six weeks. After that time, animals were sacrificed via an anesthetic overdose. The study protocol (1258/CC1406) was approved by the London School of Hygiene and Tropical Medicine ethics committee (reference 2020-07A, approval date: 26 May 2020). Skin sections (5 cm × 5 cm) were taken with a scalpel and deposited in a Petri dish

at room temperature to harvest live mobile mites. Once obtained, mites were washed with purified water on a 63- μm filter and dried with blotting paper and stored in an Eppendorf tube until the study (within 2 h).

In vitro study. Petri dishes were coated with a thin or thick layer of BB/D emulsion or the placebo. Collected mites were placed on corresponding dishes (20–30 mites per replicate and three replicates per condition) and incubated at 28 °C/75% relative humidity (HR) for 1, 8, and 24 h. After this period, acaricidal activity was assessed via stereomicroscopic examination (mites were considered viable if any movement was observed).

Ex vivo study. Single sheep scab naïve was sacrificed and skin sections (4 cm \times 4 cm) were excised with a scalpel and placed in a Petri dish. Adult female mites were obtained from the collected mites previously described. Around 50 *P. ovis* mites were immediately applied to ex vivo skin sections (positive and negative control and test samples) and incubated at 28 °C/75% HR. Two positive controls were used: product in Petri dish (not washed off) with mites applied directly to the product, and product on skin (not washed off) with mites applied directly to the skin. The negative control was the skin with no product and mites applied directly to the skin. In the experimental condition, a thin layer of emulsion was applied to the skin and washed with purified water 10 min, 1 h, and 6 h after exposure. Acaricidal activity was assessed via microscopic examination after 1, 8, and 24 h.

3.6. In Vitro Efficacy against Permethrin-Resistant Head Lice and Its Eggs

To evaluate the efficacy of the BB/D emulsion against lice adults and eggs, permethrin- and malathion-resistant human head lice (*Pediculus humanis capitis*, BR-HL strain) were used [55,57].

Blood-fed adults, half or fully engorged ($n = 10$; 5 males and 5 females), were transferred to hair tufts. Five milliliters of BB/D emulsion or distilled water (used as a negative control) were gently rubbed for 60 s and incubated at room temperature for 8 h. Then, the tuft was washed with a commercial shampoo diluted at 5% (w/w) in distilled water for 60 s to remove the excess product and subsequently rinsed carefully with distilled water so as not to detach the adult lice. Finally, the hair was allowed to dry on filter paper and lice were examined for viability at different time points. A total of five replicates were carried out for each condition. Lice were classified as: 1 (living lice with no change in activity or behavior), 2 (lice with minor changes in vital signs), 3 (lice with major changes in vital signs, i.e., not walking but gut, leg, and/or antennae movement present) and 4 (no vital signs at all). To validate that the lice were resistant to permethrin, the same study was conducted with a permethrin 1% commercial product (Nix[®]) with observation for up to 23 h.

Eggs were obtained from female adults that were placed on a tuft of human hair and left until approximately 50 eggs were laid per hair tuft. Then the adults were removed. BB/D emulsion or distilled water (5 mL) was applied as previously described in the adult experiment. Incubation was carried out at room temperature in a dark fume hood for 1, 8, and 24 h. Then, the hair tuft with the eggs was washed and rinsed as previously described. Dried tufts with the eggs were placed in a Petri dish and incubated at 31 °C and 70–80% relative humidity. Egg viability (%hatchability) was evaluated for 11 days, according to Equation (5). A total of three replicates was carried out.

$$\% \text{ Hatchability} = \text{Number eggs hatched} / \text{total eggs oviposited} \times 100 \quad (5)$$

3.7. Statistical Analysis

To assess the in vitro efficacy against scabies, a survival curve analysis was performed on data using STATA (version 15.1) with a log rank (Mantel–Cox) test applied to compare survival curves.

To test ex vivo efficacy, a Chi-square test (or Fisher's exact test) was performed in R studio to compare the mean proportion of the negative control against each washing interval treatment after conducting a test of homogeneity between replicates.

4. Conclusions

An analytical method validation was successfully developed for the quantification of D and BB permeation studies. The permeation profiles on dermatomed human skin revealed fast permeation of BB and non-permeation of D. Moreover, the cytotoxicity assay showed the noncytotoxic effect of BB and confirmed the safe topical use of this compound, together with the low adverse effects reported in the literature for this treatment.

The results of in vitro and ex vivo efficacy demonstrated that Tenutex[®] had a strong knockdown effect on *P. ovis* within 1 h of exposure on all the skin sections treated. However, on the skin sections treated for the shortest periods of time, mite recovery was observed over time. In contrast, mites exposed to the skin sections treated for 6 h before washing showed almost 100% mean mortality/unresponsiveness at all time points. This fact could potentially improve patient compliance, reducing the exposure contact time, compared with the dose scheme described in the current SmPC (24 h of contact time).

The in vitro efficacy studies against the adults and eggs of human lice showed that Tenutex[®] was substantially adulticidal on the permethrin-resistant BR-HL strain following an 8-h exposure. Moreover, the product was 100% ovicidal following a 24-h exposure. The BB/D emulsion killed almost all of the lice eggs after an 8-h exposure (99.8%).

This study has provided more information on the efficacy and biopharmaceutical properties of Tenutex[®], a cutaneous emulsion containing a fixed-dose combination of the APIs benzyl benzoate and disulfiram and used for the topical treatment of human scabies and lice. The balance of properties of this unique combination makes Tenutex[®] a good treatment option, especially in situations where resistance to other drugs has been encountered.

Author Contributions: Conceptualization, K.K., C.N., S.B. and F.F.-C.; methodology, K.K., E.P.-R., F.F.-C. and M.L.-R.; formal analysis, E.P.-R. and M.L.-R.; investigation, M.C.-S., M.L.-R. and E.M.-E.; resources, S.B., K.K. and M.M.; data curation, C.N., A.C. and F.F.-C.; writing—original draft preparation, M.L.-R. and F.F.-C.; writing—review and editing, A.C., K.K. and C.N.; visualization, M.L.-R.; supervision, F.F.-C.; C.N. and K.K.; project administration, F.F.-C., C.N., K.K. and A.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol (1258/CC1406) was approved by the London School of Hygiene and Tropical Medicine ethics committee (reference 2020-07A, approval date: 26 May 2020).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to intellectual properties restrictions.

Acknowledgments: Assistance provided by Mari Carmen Moreno from Reig Jofre was greatly appreciated.

Conflicts of Interest: F.F.-C., E.P.-R., E.M.-E., M.C.-S., M.L.-R. and C.N. are employees of Reig Jofre. A.C., K.K., and S.B., are employees of Bioglan AB. The authors are not involved in any commercial or marketing activities of the developed product. The research was performed under Good Laboratory Practices. Other authors (M.M) declare no conflict of interest.

References

1. Dressler, C.; Rosumeck, S.; Sunderkötter, C.; Werner, R.N.; Nast, A. The Treatment of Scabies: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2016**, *113*, 757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Fitzgerald, D.; Grainger, R.J.; Reid, A. Interventions for Preventing the Spread of Infestation in Close Contacts of People with Scabies. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2014**, *2014*, CD009943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Rosumeck, S.; Nast, A.; Dressler, C. Ivermectin and Permethrin for Treating Scabies. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, *2018*, CD012994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kühne, A.; Gilsdorf, A. Infectious Disease Outbreaks in Centralized Homes for Asylum Seekers in Germany from 2004–2014. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforsch.-Gesundh.* **2016**, *59*, 570–577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Strong, M.; Johnstone, P.; Group, C.I.D. Interventions for Treating Scabies. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2007**, *2007*, CD000320. [[CrossRef](#)]
6. Gunning, K.; Colledge, U.; City, S.L. AAFP: Lice and Scabies. *Am. Fam. Physician* **2019**, *99*, 635–642.
7. Arlian, L.G.; Morgan, M.S. A Review of *Sarcoptes Scabiei*: Past, Present and Future. *Parasites Vectors* **2017**, *10*, 297. [[CrossRef](#)]
8. Salavastru, C.M.; Chosidow, O.; Boffa, M.J.; Janier, M.; Tiplica, G.S. European Guideline for the Management of Scabies. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2017**, *31*, 1248–1253. [[CrossRef](#)]
9. Mang, R.; Kremer, A.; Lehmann, P.; Assmann, T. Scabies-Clinical Resistance to Permethrin Therapy: Case Reports and a Critical Discussion of Current Treatment Recommendations. *Der Hautarzt* **2021**, *72*, 595–599. [[CrossRef](#)]
10. Meyersburg, D.; Kaiser, A.; Bauer, J.W. Loss of Efficacy of Topical 5% Permethrin for Treating Scabies: An Austrian Single-Center Study. *J. Dermatol. Treat.* **2022**, *33*, 774–777. [[CrossRef](#)]
11. Elsner, E.; Uhlmann, T.; Krause, S.; Hartmann, R. Increase of Scabies and Therapy Resistance among German Military Personnel: An 8-Year Follow-up Study in the Department of Dermatology of the Armed Forces Hospital Berlin, Germany (2012–2019). *Hautarzt* **2020**, *71*, 447–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zargari, O.; Aghazadeh, N.; Moeineddin, F. Clinical Applications of Topical Ivermectin in Dermatology. *Dermatol. Online J.* **2016**, *22*, 9. [[CrossRef](#)]
13. Soerensen, C.A.S.; Pallesen, K.A.U.; Munk, N.T.; Vestergaard, C. Eleven Danish Patients Diagnosed with Scabies and Treated with Tenutex®. *Clin. Case Rep.* **2021**, *9*, 1688–1690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. de Pablo Márquez, B. Actualización En Pediculosis Capitis. *Med. Fam. Semer.* **2019**, *45*, 128–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Leung, A.K.C.; Fong, J.H.S.; Pinto-Rojas, A. Pediculosis Capitis. *J. Pediatr. Health Care* **2005**, *19*, 369–373. [[CrossRef](#)]
16. Salavastru, C.M.; Chosidow, O.; Janier, M.; Tiplica, G.S. European Guideline for the Management of Pediculosis Pubis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2017**, *31*, 1425–1428. [[CrossRef](#)]
17. Leung, A.K.C.; Lam, J.M.; Leong, K.F.; Barankin, B.; Hon, K.L. Paediatrics: How to Manage Pediculosis Capitis. *Drugs Context* **2022**, *11*. [[CrossRef](#)]
18. Durand, R.; Bouvresse, S.; Berdjane, Z.; Izri, A.; Chosidow, O.; Clark, J.M. Insecticide Resistance in Head Lice: Clinical, Parasitological and Genetic Aspects. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 338–344. [[CrossRef](#)]
19. Burgess, I.F.; Kay, K.; Burgess, N.A.; Brunton, E.R. Soya Oil-Based Shampoo Superior to 0.5% Permethrin Lotion for Head Louse Infestation. *Med. Devices Evid. Res.* **2011**, *4*, 35–42. [[CrossRef](#)]
20. Kristensen, M.; Knorr, M.; Rasmussen, A.-M.; Jespersen, J.B. Survey of Permethrin and Malathion Resistance in Human Head Lice Populations from Denmark. *J. Med. Entomol.* **2006**, *43*, 533–538. [[CrossRef](#)]
21. Izri, M.A.; Brière, C. Premiers Cas de Résistance de *Pediculus Capitis* Linné 1758 Au Malathion En France. *Presse Med.* **1995**, *24*, 1444. [[PubMed](#)]
22. Downs, A.M.R.; Stafford, K.A.; Harvey, I.; Coles, G.C. Evidence for Double Resistance to Permethrin and Malathion in Head Lice. *Br. J. Dermatol.* **1999**, *141*, 508–511. [[CrossRef](#)]
23. Hunter, J.A.; Barker, S.C. Susceptibility of Head Lice (*Pediculus Humanus Capitis*) to Pediculicides in Australia. *Parasitol. Res.* **2003**, *90*, 476–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kucirka, S.A.; Parish, L.C.; Witkowski, J.A. The Story of Lindane Resistance and Head Lice. *Int. J. Dermatol.* **1983**, *22*, 551–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Burgess, I.F.; Brown, C.M.; Peock, S.; Kaufman, J. Head Lice Resistant to Pyrethroid Insecticides in Britain. *BMJ* **1995**, *311*, 752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Soderlund, D.M.; Knipple, D.C. The Molecular Biology of Knockdown Resistance to Pyrethroid Insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *33*, 563–577. [[CrossRef](#)]
27. Tenutex®-FASS Allmänhet. Available online: https://www.fass.se/LIF/product?userType=2&nplId=19821022000063&docType=6&focus=tab_produkteresume&autoScroll=true&scrollPosition=400 (accessed on 18 May 2022).
28. Landegren, J.; Borglund, E.; Storgards, K. Treatment of Scabies with Disulfiram and Benzyl Benzoate Emulsion: A Controlled Study. *Acta Derm. Venereol.* **1979**, *59*, 274–276.
29. Tenurid-FASS Allmänhet. Available online: https://www.fass.se/LIF/product?userType=2&nplId=AP_00003680 (accessed on 18 May 2022).
30. Karamanakos, P.N.; Pappas, P.; Boumba, V.A.; Thomas, C.; Malamas, M.; Vougiouklakis, T.; Marselos, M. Pharmaceutical Agents Known to Produce Disulfiram-like Reaction: Effects on Hepatic Ethanol Metabolism and Brain Monoamines. *Int. J. Toxicol.* **2007**, *26*, 423–432. [[CrossRef](#)]
31. Frazier, K.R.; Moore, J.A.; Long, T.E. Antibacterial Activity of Disulfiram and Its Metabolites. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *126*, 79–86. [[CrossRef](#)]
32. Das, S.; Garg, T.; Chopra, S.; Dasgupta, A. Repurposing Disulfiram to Target Infections Caused by Non-Tuberculous Mycobacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 1317–1322. [[CrossRef](#)]
33. Li, H.; Wang, J.; Wu, C.; Wang, L.; Chen, Z.S.; Cui, W. The Combination of Disulfiram and Copper for Cancer Treatment. *Drug Discov. Today* **2020**, *25*, 1099–1108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ekinci, E.; Rohondia, S.; Khan, R.; Dou, Q.P. Repurposing Disulfiram as An Anti-Cancer Agent: Updated Review on Literature and Patents. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* **2019**, *14*, 113–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Brinck-Lindroth, G.; Lundqvist, L.; Nilsson, A. Control of the Human Head Louse with Disulfiram and Benzyl Benzoate Emulsions. *Acta Derm. Venereol.* **1984**, *64*, 325–330. [[PubMed](#)]
36. Agency, E.M. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. *ICH Harmon. Tripart. Guidel.* **2011**, *20*, 278.
37. European Commission The SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and Their Safety Evaluation. *Scs* **2016**, *1564*, 151.
38. Lipinski, C.A. Drug-like Properties and the Causes of Poor Solubility and Poor Permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2000**, *44*, 235–249. [[CrossRef](#)]
39. National Center for Biotechnology Information Benzyl Benzoate. Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzyl-benzoate> (accessed on 18 May 2022).
40. Johnson, W.; Bergfeld, W.F.; Belsito, D.V.; Hill, R.A.; Klaassen, C.D.; Liebler, D.C.; Marks, J.G.; Shank, R.C.; Slaga, T.J.; Snyder, P.W.; et al. Safety Assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid and Its Salts, and Benzyl Benzoate. *Int. J. Toxicol.* **2017**, *36*, 5S–30S. [[CrossRef](#)]
41. Jimbo, Y. Penetration of Fragrance Compounds through Human Epidermis. *J. Dermatol.* **1983**, *10*, 229–239. [[CrossRef](#)]
42. Bronaugh, R.L.; Wester, R.C.; Bucks, D.; Maibach, H.I.; Sarason, R. In Vivo Percutaneous Absorption of Fragrance Ingredients in Rhesus Monkeys and Humans. *Food Chem. Toxicol.* **1990**, *28*, 369–373. [[CrossRef](#)]
43. National Center for Biotechnology Information Disulfiram: Chemical and Physical Properties. *PubChem Compd. Summ. CID 3117* 2022. Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Disulfiram> (accessed on 18 May 2022).
44. Qian, L.; Cantrell, F.L. Disulfiram. *Encycl. Toxicol. Third Ed.* **2021**, 208–209. [[CrossRef](#)]
45. Niles, A.L.; Moravec, R.A.; Riss, T.L. In Vitro Viability and Cytotoxicity Testing and Same-Well Multi-Parametric Combinations for High Throughput Screening. *Curr. Chem. Genom.* **2009**, *3*, 33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Walton, S.F.; Myerscough, M.R.; Currie, B.J. Studies in Vitro on the Relative Efficacy of Current Acaricides for *Sarcoptes Scabiei* Var. *Hominis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2000**, *94*, 92–96. [[CrossRef](#)]
47. Currie, B.J.; Harumal, P.; McKinnon, M.; Walton, S.F. First Documentation of in Vivo and in Vitro Ivermectin Resistance in *Sarcoptes Scabiei*. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, *39*, e8–e12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Fang, F.; Candy, K.; Melloul, E.; Bernigaud, C.; Chai, L.; Darmon, C.; Durand, R.; Botterel, F.; Chosidow, O.; Izri, A.; et al. In Vitro Activity of Ten Essential Oils against *Sarcoptes Scabiei*. *Parasites Vectors* **2016**, *9*, 594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Andriantsoanirina, V.; Guillot, J.; Ratsimbason, M.; Mekhloufi, G.; Randriamialinoro, F.; Ranarivelo, L.; Ariey, F.; Durand, R. In Vitro Efficacy of Essential Oils against *Sarcoptes Scabiei*. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 7176. [[CrossRef](#)]
50. Morgan, M.S.; Arlian, L.G.; Rider, S.D.; Grunwald, W.C.; Cool, D.R. A Proteomic Analysis of *Sarcoptes Scabiei* (Acari: Sarcoptidae). *J. Med. Entomol.* **2016**, *53*, 553–561. [[CrossRef](#)]
51. Ploemen, J.P.H.T.M.; Van Iersel, M.L.P.S.; Wormhoudt, L.W.; Commandeur, J.N.M.; Vermeulen, N.P.E.; Van Bladeren, P.J. In Vitro Inhibition of Rat and Human Glutathione S-Transferase Isoenzymes by Disulfiram and Diethylthiocarbamate. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52*, 197–204. [[CrossRef](#)]
52. Sauna, Z.E.; Peng, X.H.; Nandigama, K.; Tekle, S.; Ambudkar, S.V. The Molecular Basis of the Action of Disulfiram as a Modulator of the Multidrug Resistance-Linked ATP Binding Cassette Transporters MDR1 (ABCB1) and MRP1 (ABCC1). *Mol. Pharmacol.* **2004**, *65*, 675–684. [[CrossRef](#)]
53. Jay, D. Inhibition of Membrane-Bound Succinate Dehydrogenase by Disulfiram. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1991**, *23*, 335–343. [[CrossRef](#)]
54. Subahar, R.; Susanto, L.; Aidilla, R.; Aulia, A.P.; Yulhasri, Y.; Winita, R.; Lubis, N.S.; Sari, I.P. In Vitro Experiments of *Pediculus Humanus Capitis* (Phthiraptera: Pediculidae) Resistance to Permethrin and 6-Paradol in East Jakarta: Detoxification Enzyme Activity and Electron Microscopic Changes in Lice. *Vet. World* **2021**, *14*, 3065–3075. [[CrossRef](#)]
55. Gao, J.R.; Yoon, K.S.; Frisbie, R.K.; Coles, G.C.; Clark, J.M. Esterase-Mediated Malathion Resistance in the Human Head Louse, *Pediculus Capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* **2006**, *85*, 28–37. [[CrossRef](#)]
56. Shirley, D.A.; Sharma, I.; Warren, C.A.; Moonah, S. Drug Repurposing of the Alcohol Abuse Medication Disulfiram as an Anti-Parasitic Agent. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Yoon, K.S.; Strycharz, J.P.; Gao, J.R.; Takano-Lee, M.; Edman, J.D.; Clark, J.M. An Improved in Vitro Rearing System for the Human Head Louse Allows the Determination of Resistance to Formulated Pediculicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2006**, *86*, 195–202. [[CrossRef](#)]
58. Heukelbach, J.; Wolf, D.; Clark, J.M.; Dautel, H.; Roeschmann, K. High Efficacy of a Dimeticone-Based Pediculicide Following a Brief Application: In Vitro Assays and Randomized Controlled Investigator-Blinded Clinical Trial. *BMC Dermatol.* **2019**, *19*, 14. [[CrossRef](#)]

CAPÍTULO V: Reposicionamiento de D como agente antimicrobiano en infecciones tópicas

Repurposing Disulfiram as an Antimicrobial Agent in Topical Infections

Maria Lajarin-Reinares*, Eloy Pena-Rodríguez, Mariona Cañellas-Santos, Elisabet Rosell-Vives, Pilar Cortés, Montserrat Llagostera Casas, Maria Àngels Calvo and Francisco Fernandez-Campos*

* Corresponding authors

Antibiotics | MPDI | 2022

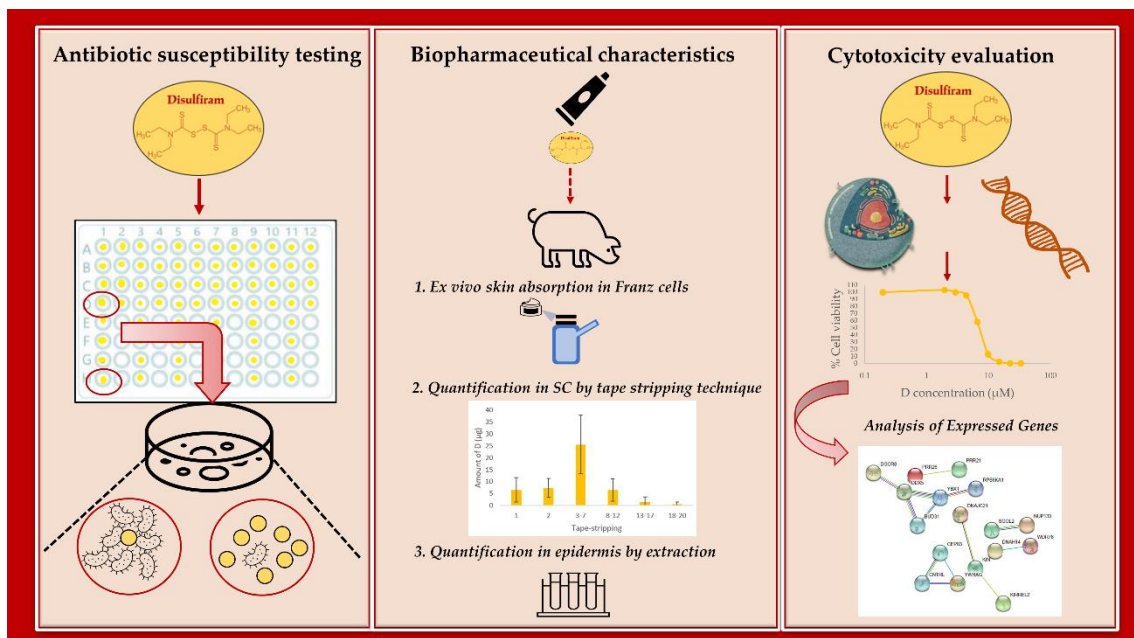


Figura 20: Resumen gráfico: Reposicionamiento de D como agente antimicrobiano en infecciones tópicas.

Lajarin-Reinares, M.; Pena-Rodríguez, E.; Cañellas-Santos, M.; Rosell-Vives, E.; Cortés, P.; Casas, M.L.; Calvo, M.À.; Fernandez-Campos, F. Repurposing Disulfiram as an Antimicrobial Agent in Topical Infections. *Antibiotics* 2022, *11*, 1752. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121752>

Presentación

Los trastornos infectivos de la piel son alteraciones con alta prevalencia a nivel mundial, en los que las bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Pseudomonas aeruginosa* son los patógenos más comúnmente involucrados. Generalmente estas infecciones se tratan con medicamentos antimicrobianos aplicados tópicamente, ya que la vía tópica presenta varias ventajas respecto la oral. Sin embargo, el uso generalizado de antibióticos ha llevado a un aumento de la resistencia a los antimicrobianos, complicando su tratamiento y el curso de la infección.

Dada la necesidad de encontrar nuevos principios activos con acción antimicrobiana, un enfoque interesante en el proceso de descubrimiento de fármacos es el reposicionamiento. En este sentido, el D, molécula que originalmente se aprobó como un fármaco contra el alcoholismo, puede ser una alternativa atractiva para tratar las bacterias tópicas resistentes a múltiples fármacos en las infecciones cutáneas. Por ello, este estudio tuvo como objetivo evaluar en detalle las características biofarmacéuticas de D y los efectos derivados de su aplicación tópica.

Para la evaluación se determinó la MIC frente a diferentes bacterias y se realizaron estudios de permeación y cuantificación de fármaco retenido en piel. Además, se realizaron estudios de seguridad a partir de ensayos de citotoxicidad y se analizó el transcriptoma de las células tratadas para una mejor comprensión del posible mecanismo de toxicidad del principio activo.

Las pruebas de susceptibilidad mostraron actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *S. pyogenes*. La absorción dérmica no reveló permeación en piel de cerdo y la cuantificación del fármaco retenido en piel demostró concentraciones en el estrato córneo y la epidermis suficientes para tratar infecciones cutáneas. El análisis de microarrays reveló la importancia del fármaco como quelante de iones metálicos. Los hallazgos encontrados sugieren que D tiene potencial para ser reutilizado como un antibiótico efectivo para tratar infecciones superficiales de la piel.

El manuscrito resultante de este trabajo se muestra a continuación.

Article

Repurposing Disulfiram as an Antimicrobial Agent in Topical Infections

Maria Lajarin-Reinares ^{1,2,*} , Eloy Pena-Rodríguez ¹ , Mariona Cañellas-Santos ³ , Elisabet Rosell-Vives ³,
Pilar Cortés ² , Montserrat Llagostera Casas ², Maria Àngels Calvo ⁴ and Francisco Fernandez-Campos ^{1,*} 

- ¹ Topical & Oral Development, Research and Development Reig Jofre Laboratories, 08970 Barcelona, Spain
² Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain
³ Biotechnology Department, Research and Development Reig Jofre Laboratories, 08970 Barcelona, Spain
⁴ Department of Animal Health and Anatomy, Faculty of Veterinary, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain
* Correspondence: mlajarin@reigjofre.com (M.L.-R.); mran82@gmail.com (F.F.-C.);
Tel.: +34-935-507-718 (M.L.-R.)

Abstract: Antimicrobial drugs applied topically offer several advantages. However, the widespread use of antibiotics has led to increasing antimicrobial resistance. One interesting approach in the drug discovery process is drug repurposing. Disulfiram, which was originally approved as an anti-alcoholism drug, offers an attractive alternative to treat topical multidrug resistance bacteria in skin human infections. This study aimed to evaluate the biopharmaceutical characteristics of the drug and the effects arising from its topical application in detail. Microdilution susceptibility testing showed antibacterial activity against Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. Dermal absorption revealed no permeation in pig skin. The quantification of the drug retained in pig skin demonstrated concentrations in the stratum corneum and epidermis, enough to treat skin infections. Moreover, *in vitro* cytotoxicity and micro-array analyses were performed to better understand the mechanism of action and revealed the importance of the drug as a metal ion chelator. Together, our findings suggest that disulfiram has the potential to be repurposed as an effective antibiotic to treat superficial human skin infections.

Keywords: disulfiram; skin; *Staphylococcus aureus*; repurposing; DNA arrays; antibiotics; antimicrobial resistance; *Streptococcus pyogenes*



Citation: Lajarin-Reinares, M.; Pena-Rodríguez, E.; Cañellas-Santos, M.; Rosell-Vives, E.; Cortés, P.; Casas, M.L.; Calvo, M.À.; Fernandez-Campos, F. Repurposing Disulfiram as an Antimicrobial Agent in Topical Infections. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1752. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121752>

Academic Editor: Filip Boyen

Received: 12 October 2022

Accepted: 2 December 2022

Published: 4 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Human skin is one of the first lines of defense against microbial invasion. Healthy skin harbors a diverse range of bacteria, collectively known as the skin microbiome, and depending on the host, bacterial, and environmental factors, this bacterial population may be protective or harmful [1]. *Staphylococcus aureus* and group A streptococci are the two most frequently encountered pathogens causing primary and secondary infections of the skin and skin wounds. Gram-negative organisms such as *Pseudomonas aeruginosa* are sometimes involved in cutaneous infections [2].

Antimicrobial drugs applied topically offer several advantages over systemic administration, including the avoidance of systemic toxicity and side effects, decreased induction of bacterial resistance, high local concentration of antibacterial agents in the infected site, low costs and they also allow the administration of molecules that cannot be given systemically [1,3,4]. However, the widespread use of topical antibiotics (particularly mupirocin and fusidic acid) has led to increasing antimicrobial resistance (AMR) in some settings, making their use extremely difficult and limiting the potential efficacy of such agents [3,4]. Thus, leading to the selection of more resistant *Staphylococcus aureus* strains. Studies conducted in order to better understand the impact of topical antimicrobial use on the development

of resistant *S. aureus* strains have demonstrated that exposing both MSSA (Methicillin-sensitive *S. aureus*) and MRSA (Methicillin-resistant *S. aureus*) to fusidic acid and mupirocin resulted not only in the rapid selection of MRSA over MSSA but also the emergence of MDR (Multi-drug resistant) isolates from the original culture [5].

One of the most important human streptococci pathogens of skin is *Streptococcus pyogenes*, which can produce superficial impetigo or more deep-seated cellulitis but also more severe invasive infections such as sepsis, necrotizing fasciitis, and streptococcal toxic shock syndrome [6]. In streptococcal infections, penicillin remains the antibiotic of choice. Importantly, clindamycin-resistant isolates have also been reported in Europe, including France and Finland, and Asian countries, with alarming rates of 94% in China [7]. Other species, such as *Pseudomonas aeruginosa*, are less common but they are a major problem leading to high mortality rates due to the appearance of drug-resistant strains, especially in critically ill and immunocompromised patients [8]. The spectrum of *P. aeruginosa* cutaneous diseases includes localized and often self-limited infections, such as hot-tub folliculitis, chloronychia, hot-foot syndrome and interdigital intertrigo. Ecthyma gangrenosum and sometimes subcutaneous nodules are manifestations in immunocompromised hosts and as such present a medical emergency [7].

Given global concerns regarding antibiotic resistance and relatively limited therapeutic options, especially for some species such as *S. aureus*, the appropriate use of topical agents and the prevention of further resistance are critical [1]. The development of a new antimicrobial is a very slow process and is frequently beset with numerous pitfalls. Repurposing approved drugs is a promising alternative strategy that reduces the time and cost of antibiotic development, as it takes advantage of existing toxicology and pharmacokinetic data from preclinical and clinical trials [9].

Disulfiram (D), first commercialized as Antabuse[®], is a dithiocarbamate that was approved by the US Food and Drug Administration (FDA) in 1951 as a drug to treat alcoholism. It has been widely used in clinics for over 70 years without severe side effects [10]. D is an inhibitor of aldehyde dehydrogenase (ALDH) and it inhibits all the currently identified cytosolic and mitochondrial ALDH isoforms. This fact results in the specific accumulation of acetaldehyde, causing discomfort in patients who drink alcohol as a strategy for their dishabituating [10,11].

A cutaneous emulsion consisting of 2% D has been registered in Sweden since 1982 and in Iceland since 1997 for the treatment of scabies and pediculosis in adults and children [12]. Different in vitro and in silico studies have shown that D may be an active substance against the hepatitis C virus, fungi, parasites, bacteria, and cancer [9,10,13–15]. A different mechanism of action was proposed to explain these antimicrobial and antiproliferative activities. D has been reported to induce apoptosis, show metal ion-dependent antineoplastic activity and arrest angiogenesis. It has also been shown to inhibit the activating transcription factor/cyclic-AMP-responsive element-binding protein. Moreover, recent studies have shown that D inhibits the activity of the ATPS-binding cassette (ABC) drug transport complex, which is responsible for the development of multiple drug resistance in cancer and fungal infection treatments [16]. D is an electrophile (Figure 1) that readily forms disulfides with thiol-bearing substances. Bacteria possess a diverse range of intracellular cofactors (e.g., coenzyme A), metabolites (e.g., glutathione, mycothiol, and bacillithiol), and enzymes (e.g., thioredoxin) containing thiophilic residues, which D can potentially modify via thiol–disulfide exchange to evoke antimicrobial effects [17]. The use of D as an antimicrobial agent with a different mechanism of action, in comparison with other classical antibiotics, offers an attractive alternative to treating topical, multiresistant bacteria.

In the context of limited-availability antibiotics and the increase in AMR to them, we focused on repurposing D as an alternative to conventional antimicrobial compounds for superficial human skin infections. Thus, in this study, we present a detailed evaluation of the biopharmaceutical characteristics of the disulfiram drug and the effects derived from topical application.

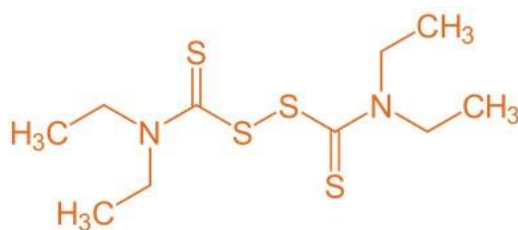


Figure 1. Chemical structure of disulfiram molecule (D).

2. Results and Discussion

2.1. Antibiotic Susceptibility Testing

S. aureus, *P. aeruginosa*, and *S. pyogenes* were selected for susceptibility testing as representative strains related to skin infection and frequently involved with AMR in humans. The minimum inhibitory concentrations (MICs) against these species are summarized in Table 1. As can be seen, D was effective against the Gram-positive bacteria tested, but it did not effectively inhibit *Pseudomonas* spp. growth, a Gram-negative bacterium. *S. aureus* exhibited the greatest susceptibility, with a MIC of 8 µg/mL. This result agreed with those of published reports, where it was found to exhibit a potent activity with the same MIC value [9,17]. In the case of *S. pyogenes*, D had a MIC of 32 µg/mL. This value differs from the previously published value, 16 µg/mL, which could be due to the different strain used, MGAS1882 [18]. Moreover, the MIC result in *P. aeruginosa* correlates well with published data, with a MIC value of more than 64 µg/mL [17]. Conventional antibiotics (clindamycin and gentamicin) were used as controls for the bacteria susceptibility method. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines suggest that comparing the MICs of different antibiotics should not be based solely on the numerical value but rather on how far the MIC is from the breakpoint [19]. The CLSI groups MIC values into three categories: susceptible, intermediate, and resistant, based on clinical data and research. Regarding D, there are no defined clinical breakpoints because there are no published data on natural mutants resistant to it, which could be due to the low solubility of disulfiram in aqueous media, preventing experiments from being performed at higher concentrations. Therefore, it was difficult to use the classical approach to compare D activity with other antibiotics.

Table 1. Antibacterial activity of disulfiram compared with gentamicin and clindamycin.

Species	MIC					
	Disulfiram		Clindamycin		Gentamicin	
	(µg/mL)	(µM)	(µg/mL)	(µM)	(µg/mL)	(µM)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	32	108	0.125	1	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	27	–	–	0.125	0.262
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>64	>216	–	–	0.250	0.523

The differential effect of D against Gram-positive and Gram-negative bacteria tested could be due to two possible mechanisms of action: Cu²⁺ chelation and compound affinity for the thiol group of cysteine. Proper protein targeting and maturation are fundamental to the homeostasis of all organisms. In Gram-negative bacteria, secreted proteins mature in an oxidative periplasm. Gram-positive bacteria lack this protected compartment due to the absence of an outer membrane. Thus, their secreted proteins must mature in an unregulated environment. Furthermore, cysteine residues perform a variety of essential functions in protein, such as metal binding and enzyme catalysis. However, the reactive thiol groups can also negatively impact the function of a protein by forming incorrect disulfide bonds [20]. The greater exposure of Gram-positive bacteria to D could increase the reactivity of cysteine thiols and, consequently, not allow the correct maturation of the protein, leading to the death of the bacteria. Additionally, the non-effectiveness detected in Gram-negative bacteria can be explained since *P. aeruginosa* is endowed with several mechanisms in the periplasmic space to adapt to copper fluctuations [21].

Moreover, *P. aeruginosa* is a pathogen characterized by the secretion of virulent factors such as the zinc metalloprotease pseudolysin, also known as LasB or pseudomonas elastase. This virulence factor is highly toxic, causing tissue damage and invasion, processing components of the immune system to cause immunomodulation, and acting intracellularly to initiate bacterial biofilm growth. The inhibition of bacterial virulence factors has gained attention recently as an antimicrobial strategy that is non-destructive to the bacteria. It has been proposed as a second-generation class of antibiotics. By attenuating virulence mechanisms without challenging bacterial cell viability directly, these antibiotic agents would potentially place little or no pressure on the bacterial cell for the emergence of resistant strains [22]. Although disulfiram does not directly reduce the bacterial cell viability, it may reduce virulence factors. Additional studies should be carried out to check this possible effect.

2.2. Ex Vivo Skin Absorption Experiment

To evaluate the permeation profile of D, Franz diffusion cells were used. The use of human skin is usually preferred in these kinds of experiments; however, due to ethical and economic reasons, this tissue is frequently unavailable. In this case, porcine skin is a good surrogate due to its structural similarity to human skin in terms of hair growth density (~20 hairs/cm²) and the presence of structures such as Langerhans cells and rete ridges; stratum corneum thickness and contents such as glycosphingolipids and ceramides; stratified, multilayered, keratinizing epithelium; thickness of the viable epidermis (~70 µm); and collagen fiber arrangement in the dermis [23]. Therefore, an ex vivo permeated study with pig skin was used to characterize the absorption of D. In this case, D concentrations were not detected in the chromatogram in any replicate ($n = 11$) at any time in the tested concentration (3.65 mg/cm²). This lack of permeability of D in pig skin has also been described in human skin [24]. It is an advantageous property because D can cause adverse effects when it is systemically available due to the inhibition of aldehyde dehydrogenase and dopamine beta-hydroxylase [25].

2.3. Quantification of Disulfiram in Skin

Disulfiram, as shown by permeation studies in Section 2.2, was not able to permeate the dermis (D was not detected in the receptor medium in any replicate). However, D could penetrate and be retained in the first layers of the skin (stratum corneum and epidermis). The concentration of the active ingredient in these layers is important to determine whether there are effective concentrations to combat superficial infections. Therefore, the amount of disulfiram retained in pig skin (SC and total skin) was determined. Before the experiment, the density of the skin was calculated. The mean densities of the non-dermatomized and dermatomized pig skins were very similar: 1.05 g/mL and 1.04 g/mL, respectively.

2.3.1. Quantification of D in SC Using the Tape-Stripping Technique

Before HPLC analysis, we checked the selectivity of the method and the adhesive of the tape used did not produce interferences during the test. The mean amount of D obtained on each strip of the five replicates is shown in Figure 2. A concentration of 48 µg in the SC was obtained (corresponding to 38% of the dose applied in the permeation experiment: 110 µg).

Before calculating the concentration of D in SC, the amount of extracted skin was calculated in each strip group (Table 2) by weighing the strips before and after each extraction. The mean skin retained was 2.20 mg, and the final concentration of D was 20 mg/mL. The concentration obtained was superior to the MIC values found for *S. aureus* and *S. pyogenes*. These results are interesting because superficial skin infections take place in the stratum corneum and epidermis, and this concentration is sufficient to ensure effectiveness.

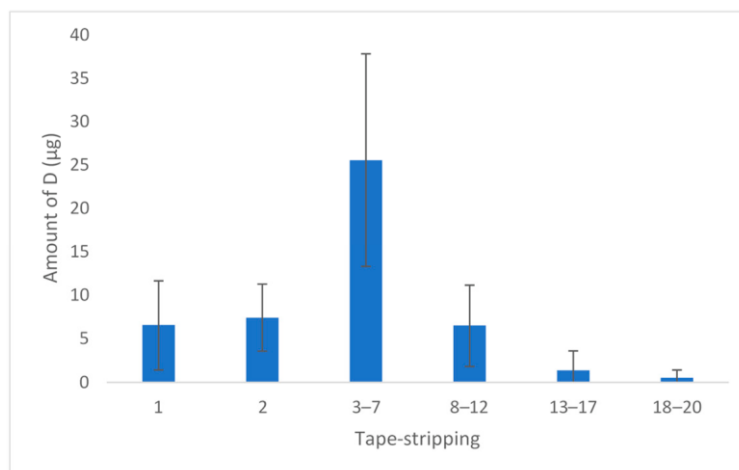


Figure 2. Amount of D per strip ($n = 5$). The results show the mean and standard deviation.

Table 2. Amount of skin retired (mg) for each group strip ($n = 3$) with its standard deviation.

Strip	Mean (mg)	SD
1	0.43	0.26
2	0.39	0.20
3-7	0.68	0.18
8-12	0.39	0.16
13-17	0.23	0.06
18-20	0.07	0.00

2.3.2. Disulfiram Concentration Retained in the Dermatized Skin

Over the years, the literature has documented different methodologies for quantifying drug amounts within the skin. The techniques include skin extraction measurements, horizontal stripping and sectioning, the removal of hair follicles, quantitative autoradiography, and spectroscopic methods [26]. Given that our target is the SC and epidermis, the drug content in the epidermis layer was obtained. After tape-stripping the skin, as described in Section 2.3.1, the rest of the skin tissue was cut into pieces of 10 mg, and these were homogenized with mobile phase using the MagNa Lyser instrument. After HPLC analysis, the mean amount detected was $4.32 \pm 4.83 \mu\text{g}$. Considering the previously obtained skin density (1.04 g/mL), the mean D concentration obtained was $450 \mu\text{g/mL}$. This concentration is still higher compared with the MIC value of both microorganisms, confirming the suitability of D for treating skin infections, even if the infection applies to deeper skin layers.

2.4. In Vitro Cytotoxicity Evaluation

Cytotoxicity was tested in human-transformed keratinocyte (HEK001) cells with the cell proliferation measured by an adenosine triphosphate (ATP) luminescent assay, which is directly related to the presence of metabolically active cells [27]. This method was preferred to other standard methods to determine cell viability, such as the MTT (tetrazolium salt) assay. In this case, MTT was not used because the colorimetric assay is based on the reduction of tetrazolium dye mediated by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH). D is an aldehyde dehydrogenase inhibitor and it affects NADPH levels. The results with MTT could be inconclusive; therefore, this method was discarded.

The topical application of active ingredients may cause skin irritation and it is necessary to develop rapid assays to assess potentially damaging effects. An evaluation of the potential for an ingredient or product to cause skin irritation is one of the various studies undertaken in the overall safety assessment process. However, due to increasing concern over animal experimentation, in vitro alternatives must now be developed. Cell cytotoxicity

assays are among the most common in vitro bioassay methods used to predict the toxicity of substances in various tissues [28,29]. In this case, we have investigated the cytotoxic effect of D on human keratinocytes for its evaluation potential to cause skin irritation.

After 72 h of treatment, in a testing range from 0.20 to 33.36 μM , which corresponds from 0.06 to 9.89 $\mu\text{g/mL}$, the D resulted in a cytotoxic compound with an IC_{50} value of 6.97 μM (2.31 $\mu\text{g/mL}$) (95% confidence interval (CI), 6.76 to 7.18) (Figure 3).

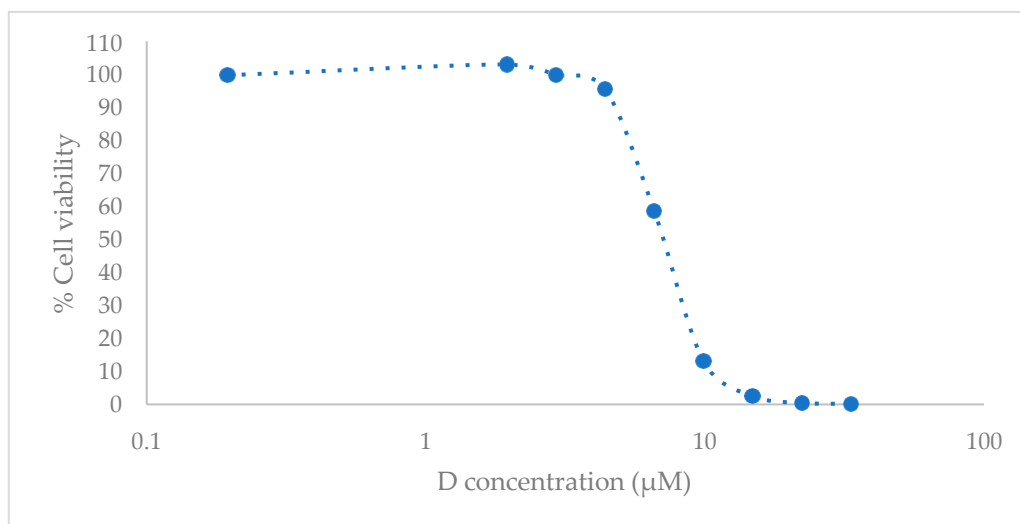


Figure 3. In vitro cell culture studies. HEK001 cell viability with luminometric assay after 72 h post treatment with D. Data are represented as the mean ($n = 3$) of the cell viability percentage, referring to the untreated cell (negative control) and positive control with 1% of sodium dodecyl sulfate (SDS).

We found differences in the cell's viability compared with other authors. R. Thakare et al. [9] reported an IC_{50} of 250 $\mu\text{g/mL}$ for D using Vero cells and MTT assay. Others such as J. Zha et al. [30] who used Raji and Molt4 cell lines and MTT assay reported an IC_{50} of $0.793 \pm 0.08 \mu\text{M}$ and $1.314 \pm 0.229 \mu\text{M}$, respectively. The sensitivity of the cytotoxicity assay used differs depending on the different mechanisms, which leads to cell death [31]. Further, as commented before, the aldehyde dehydrogenase inhibition caused by D may interfere with the results of the MTT assay, which could explain these observed differences. E. Pena et al. [32], who tested the same compound (dexamethasone) in two different cell lines HEK001 and HaCaT, reported lower cytotoxicity concentrations for the first cell line but not for the second one. They related these results to the immortalization procedure to obtain the HaCaT, which can modify their cell sensibility to xenobiotics. HEK001 cells are metabolically less active than HaCaT cells and this could mean that they have fewer defense mechanisms against D. Therefore, these considerations could explain the differences detected with R. Thakare. Moreover, Raji and Molt4 are tumor lines and so they have the signaling system altered and their sensibility to xenobiotics is different from other cells' sensibility. For this reason, it is important to consider what effect is expected in relation to the predicted cell death mechanism.

To better understand the cytotoxicity effect in HEK001 cells, a microarray analysis was performed.

Even though D was cytotoxic in low concentrations in HEK001 cells, it is important to consider that cytotoxicity tests are useful in screening chemicals for their intrinsic and relative toxicities, but it is impossible to tell whether predictions based on cytotoxicity data alone are sufficiently accurate for labeling and classifying a new chemical according to its likely acute toxicity in vivo [33]. There are difficulties in carrying out a direct extrapolation from the in vitro cell studies to the in vivo topical administration, for example, because cell culture lacks some of the properties of intact skin, such as the presence of stratum corneum and lipids, which limits the permeation of xenobiotics. In a cytotoxicity assay, cells are exposed directly to the active substances. The solubility of D is 4.09 mg/L and

it has a log P of 3.88 [34], which gives it poor water solubility; it tends to remain retained between the lipids of the skin, so the D exposed to keratinocytes would be considerably lower than the in vitro concentrations. Further, D has been used for years in humans after oral and topical administration and it is considered a safe product [24]. Thus, although a cytotoxic assay was used as a prescreening tool for skin irritation, due to D characteristics, the cytotoxicity results may be overestimated in comparison with the in vivo possible effect. Further studies are needed to evaluate the consistency and magnitude of possible irritant effects on the skin.

2.5. Functional Analysis of Expressed Genes

An expression profile of HEK001 cells after a 48 h treatment with 6.59 μ M of D was performed. This concentration was a little bit lower than the D's IC₅₀ and the contact time was a little bit lower than the one used in the cytotoxicity studies so as not to induce significant cell death, which could hide the effect on gene expression. With this concentration, an effect on the cell gene expression was ensured and total cellular mortality was prevented.

Forty-nine genes presented with a differential expression after treatment with D versus cells without treatment. The differentially expressed genes were further classified into two groups: upregulated genes (Table 3) and downregulated genes (Table 4). The main association between the altered genes is represented in Figure 4.

Table 3. Upregulated genes. Target prediction was performed using Affymetrix software. A list of differentially expressed (more than 1.5-fold, *t*-test *p*-value < 0.05) putative targets was obtained. The ratio column corresponds to the fold change in expression for each gene relative to the control, calculated from the normalized values.

Gen Symbol	Gen Description	(D) Raw	(Control) Raw	Ratio
CLU MIR6843	clusterin microRNA6843	312.08	106.16	3.08
CCDC138	Coiled-coil domain-containing protein 138	82.23	48.90	1.75
MT1F	Metallothionein-1F	3379.27	2011.00	1.75
DNAH14	Dynein axonemal heavy chain 14	60.23	35.91	1.69
ZNF483	Zinc finger protein 483	77.93	46.19	1.69
WDR78	Dynein axonemal intermediate chain 4	80.69	53.16	1.71
BVES-AS1	BVESantisenseRNA1	59.32	35.94	1.66
ALG6	Dolichyl pyrophosphate Man9GlcNAc2 alpha-1,3-glucosyltransferase	85.31	49.07	1.65
RASSF6	Ras association domain-containing protein 6	52.74	33.33	1.64
DOCK11	Dedicator of cytokinesis protein 11	161.39	107.55	1.64
MNS1	Meiosis-specific nuclear structural protein 1	129.81	88.17	1.61
PAIP2 CTB-43P18.1	Poly(A)bindingproteininteractingprotein2	128.98	84.64	1.57
CNTRL	Centriolin	78.00	48.35	1.59
SGOL2	Shugoshin 2	186.99	117.74	1.59
NUP133	Nuclear pore complex protein Nup133	161.03	99.01	1.57
ZNF780A	Zinc finger protein 780A	105.86	67.45	1.57
CCDC66	Coiled-coil domain-containing protein 66	91.98	57.60	1.59
GLMN	Glomulin	36.51	22.98	1.58
KDM4D	Lysine-specific demethylase 4D	49.39	32.68	1.53
SNX25	Sorting nexin-25	127.76	89.91	1.57
ARHGEF26	Rho guanine nucleotide exchange factor 26	47.67	35.02	1.57
CMC1	COX assembly mitochondrial protein homolog	97.74	62.22	1.53
FASTKD1	FAST kinase domain-containing protein 1	259.25	172.60	1.52
DNAJC21	DnaJ homolog subfamily C member 21	497.80	327.50	1.52
DDX5	ATP-dependent RNA helicase DDX5	142.99	101.83	1.56
CEP83	Coiled-coil domain-containing protein 41	86.58	56.97	1.52
BUD31	Protein BUD31 homolog	29.50	19.38	1.51
KIN	DNA/RNA-binding protein KIN17	131.16	84.77	1.50

Table 4. Downregulated genes. Target prediction was performed using Affymetrix software. A list of differentially expressed (more than 1.5-fold, *t*-test *p*-value < 0.05) putative targets was obtained. The ratio column corresponds to the fold change in expression for each gene relative to the control, calculated from the normalized values.

Gen Symbol	Gen Description	(D) Raw	(Control) Raw	Ratio
ANKRD36	Ankyrin repeat domain-containing protein 36A	38.41	67.57	2.28
YWHAG	14-3-3 protein gam	25.03	46.32	1.87
EXT1 hunera	Jeck2013ALT	88.64	147.16	1.98
QRICH2	Glutamine-rich protein 2	33.80	65.17	1.82
YBX1	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	47.70	69.96	1.68
DGCR8	Microprocessor complex subunit DGCR8	74.69	118.81	1.60
C1orf198	Chromosome1openreadingframe198	43.49	66.29	1.64
FHAD1	Forkhead-associated domain-containing protein 1	46.94	71.21	1.60
PLXNB3	Plexin-B3	56.35	83.87	1.56
CYGB	Cytoglobin	62.20	98.36	1.58
CCDC84	Coiled-coil domain-containing protein 84	167.37	242.60	1.60
F10	Coagulation factor X	70.55	101.19	1.56
PRR21	Proline rich 21	19.56	28.10	1.57
	Polypeptide	29.99	44.42	
GALNT14	N-acetylgalactosaminyltransferase 14			1.55
ADCY2	Adenylate cyclase type 2	31.16	46.58	1.55
KIRREL2	Kin of IRRE-like protein 2	27.16	39.19	1.54
RPS6KA1	Ribosomal protein S6 kinase alpha-1	34.27	48.01	1.52
AP1M1	AP-1 complex subunit mu-1	142.99	204.18	1.53
PRR26	Proline-rich protein 26	40.47	60.82	1.50
CRYM	Thiomorpholine-carboxylate dehydrogenase	34.46	52.06	1.51
WNT8B	Wingless-type mmtv integration site family	20.00	26.53	1.50

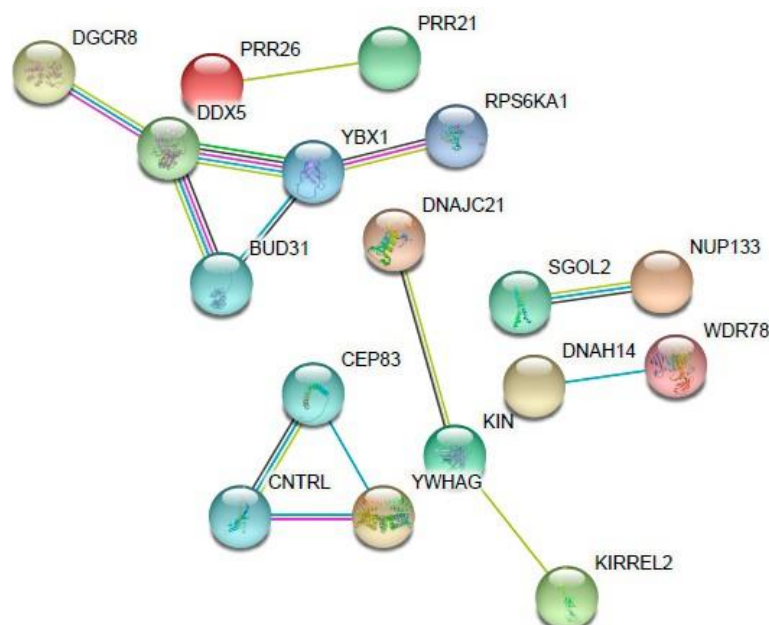


Figure 4. Interaction network of the main altered genes (upregulated and downregulated) for their response to disulfiram. Each gene is represented as a node and each line represents the number of interactions between genes. Image was created using the STRING Database.

As seen in Table 3, there was an upregulated expression of several genes in the samples (28 genes) from the treated cells (HEK001 6.59 μ M D after 48 h) in comparison with the non-treated cells (control). Considering that the expression came from cells that have

survived the drug exposure, multiple genes related to cell division were overexpressed; they are involved in cell cycle arrest after the detection of DNA damage to ensure its correct repair and they activate signaling pathways as a mechanism of resistance to D. These genes were SGOL2, KDM4D, DNAJC21, MNS1, DOCK11, and DDX5. Additionally, again related to cell division, there was an overexpression of genes such as KIN, which is involved in DNA replication and the cellular response to DNA damage.

The gene whose expression was most affected was the microRNA (miRNA) CLU | MIR6843. miRNAs were recently discovered to be regulatory expression molecules. Consisting of ≈ 22 non-coding nucleotides that regulate gene expression via hybridization with messenger RNAs (mRNAs), mRNA degradation and the translational inhibition of targeted transcripts are consequences of this process [35]. In this case, it affected the clusterin (CLU) gene, which has been independently identified as being involved with various fields without clear relationships between them. It is associated with many biological functions, including tissue differentiation and remodeling, membrane recycling, lipid transportation, cell–cell or cell–substratum interaction, cell motility, cell proliferation, and cell death [36]. The affectation in this multifunctional gene could play an important role in the cytotoxicity of D.

It is important to mention the alteration of the MT1F gene. Metallothioneins (MTs) have a high cysteine residue content, which binds various heavy metals. They are one of the most important biological mechanisms used to protect against toxic metal exposure. Increasing levels of cellular zinc ions activate transcription factor 1 (MTF-1), the major transcriptional regulator [37]. D is a chelator of ions, especially divalent ions such as zinc and copper. D acts as a Cu/Zn ionophore, facilitating cellular accumulation [38]. Therefore, it can alter the cellular levels of these ions and, consequently, produce cell death. Possible mechanisms of MT1F activation of D include induction of zinc influx, generation of reactive oxygen species that induce the release of zinc from MTs, or direct binding to MTF-1 or another protein necessary for MTF-1 transcriptional activation [37]. Moreover, two additional genes related to zinc were altered: ZNF483 and ZNF780A. Both are zinc finger proteins, implicated in transcriptional regulation.

Another important upregulated gene is RASSF6. It is involved in the induction of apoptosis; it may act as a Ras effector protein or suppress the serum-induced basal levels of NF- κ B. This result is consistent with the results of other authors, who reported the inhibition of NF- κ B and the apoptosis by disulfiram and other carbamates [39,40].

Out of the 49 genes affected, 21 were downregulated (Table 4). An alteration of the expression of genes related to the expression of transmembrane protein, adhesion, and cell migration, such as PLXNB3, KIRREL2, and PLXNB3, was observed. These alterations could decrease the cell's protection mechanisms and make it more vulnerable to death. Moreover, signaling genes such as RPS6KA1, YWHAG, and ADCY2 also decreased. The chelating effect of D could explain the interruption of signal pathways where divalent ions participate. These results are also in agreement with other authors, who reported the cytotoxicity effect induced by the sequestration and alteration of intracellular and extracellular levels of zinc [41].

D has been shown to affect cell ion levels, producing alterations in signaling pathways and cell division. Other authors reported additional pathway alterations such as the inhibition of proteasome signaling [42,43]. Therefore, cytotoxicity was not caused by a single mechanism but by different mechanisms that induce the final apoptosis of the cell. Concerning the mechanism of resistance, metallothioneins may have an important role.

These results suggest that the chelating character of D could be related to its antibacterial effect. For example, Nabil M. Abraham et al. reported that a metal ion chelator can inhibit *S. aureus* biofilm formation and viability and that metallic cations, such as Ca^{2+} and Mg^{2+} , play a role in bacterial growth [44]. Nevertheless, additional studies are needed to determine the mechanism of action of D as an antimicrobial.

3. Materials and Methods

3.1. Materials

Disulfiram, cocoa butter, stearic acid, and cetostearyl alcohol were kindly gifted by Bioglan AB (Malmö, Sweden). Methanol and KH_2PO_4 (Scharlab, S.L., Sentmenat, Spain) were used as mobile phases. Phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HPCD) (Pracofar, S.L., Martorell, Spain) were used as receptor media in skin permeation experiments. For cytotoxic evaluation, dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, Burlington, MO, USA), keratinocyte serum-free medium, L-glutamine, and epidermal growth factor (hEGF) (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) were used. Mueller–Hinton broth (MHB) and chocolate agar were purchased from Condalab (Madrid, Spain). Gentamicin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), clindamycin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), and lysed horse blood (Thermo Fisher, Landsmeer, The Netherlands) were used for antibacterial studies.

3.2. Antibiotic Susceptibility Testing

The strains used in the study were from American Type Culture Collection and were purchased through LGC Standards, S.L.U (Barcelona, Spain). Disulfiram was studied against *S. aureus* (ATCC[®] 25923), *S. pyogenes* (ATCC[®] 12344), and *P. aeruginosa* (ATCC[®] 27853).

The MIC of D was determined using a broth microdilution assay in 96-well microplates in accordance with method described in CLSI guidelines [19]. MIC was defined as the lowest drug concentration that inhibited visual growth. The overnight culture was adjusted to a 0.5 McFarland and diluted to 1:100 in media; MHB, in the case of *S. aureus* and *P. aeruginosa*, and MHB with 5% LHB for *S. pyogenes*, were treated with serial dilutions of each antibiotic. Gentamicin was used as a positive antibiotic effect control for *S. aureus* and *P. aeruginosa*, and clindamycin was used for *S. pyogenes*. Stock solutions of D (10 mg/mL) were prepared in ethanol. Gentamicin and clindamycin were prepared in the same concentration in each growth medium. D was tested in amounts ranging from 64 to 0.125 $\mu\text{g/mL}$ due to solubility limitations. The final ethanol concentration of these dilutions was below 0.5% to not alter the bacterial growth. Negative controls were used with the respective media and the same ethanol concentration as the samples with D was used. Positive controls were performed with bacteria with the respective media and without D. Gentamicin and clindamycin were tested in ranges from 512 to 0.125 $\mu\text{g/mL}$. The plates were sealed with adhesive film and incubated at 37 °C for 18–24 h and then the MIC was determined. For each test compound, MIC determination was carried out independently three times.

3.3. Production of Disulfiram Emulsion

The oil phase was a mixture of cocoa butter (7% w/w), stearic acid (6% w/w), cetostearyl acid (1% w/w), and D (2% w/w). Fats were melted at 75 °C and the water phase (water q.s 100% with preservative) was heated at the same temperature in a water bath. Then, both phases were mixed and homogenized at 11.000 rpm with an Ultra-Turrax (IKA T-25, Staufen im Breisgau, Germany) for 10 min.

3.4. Ex Vivo Skin Absorption Experiment

Abdominal pig skin ($n = 11$) was obtained from a local slaughterhouse (Barcelona, Spain). Permeation studies were accomplished in vertical Franz diffusion cells (VidraFoc, Barcelona, Spain) with a permeation area of 1.54 cm^2 . The skin was cut with a thickness of approximately 0.5 mm using a dermatome CG1371 (Nouvag AG, Goldach, Switzerland). Then, 15% HPCD on PBS at pH 5.5 was used as a receptor medium to maintain sink conditions throughout the experiment, and it was kept at 32 °C and stirred at 500 rpm. A transepidermal water loss (TEWL) measurement device (Delfin technologies, Kuopio, Finland) was used to evaluate skin integrity. Samples from a receptor compartment (300 μL) were taken at fixed times and replaced by an equivalent volume of fresh receptor medium at the same temperature, and they were analyzed using the HPLC method (Waters 2695, Milford, MA, USA) [24]. Sampling times were 1, 2, 3, 4, 5, 20, 21, 22, 23, and 24 h.

The disulfiram emulsion was dosed in a compartment in the equivalent human pre-prescription dose (3.65 mg/cm²) [24] to study skin absorption. Placebo formulation was tested as a negative control of permeation and to check the lack of analytical interferences due to the presence of excipients.

3.5. Quantification of Disulfiram in Skin after Permeation Experiments

3.5.1. Determination of Pig Skin Density

Three replicates of each skin were used. The density (ρ) of a solid is the ratio between the mass and the volume it occupies. The volume occupied by the skin was determined using Equation (1):

$$\text{Volume} = \frac{M_1 + M_2 - M_3}{\rho} \quad (1)$$

where M_1 is the weight of the skin, M_2 is the weight of the flask filled with water, M_3 is the weight of the flask filled with water and the skin, and ρ is the density of the water (1 g/cm³).

3.5.2. Tape-Stripping Study

After the permeation experiment, five of the eleven Franz cells with the pig skin were used to study the disulfiram retained in the stratum corneum. Prior to tape-stripping, the emulsion residue was removed with a swab soaked in PBS.

After 24 h, the strips (Tesa[®] 4101 PV2, Shanghai, China) were carefully adhered to the diffusional skin area and a constant weight (345 g) was used to press the tape onto the skin surface for 10 s. The following tape strip groups were carried out: strip 1, strip 2, strips 3–7, strips 8–12, strips 13–17, and strips 18–20. The tape strips were placed in 50 mL Falcon tubes and we added 4 mL of mobile phase. Then, the samples were sonicated for 15 min in an ultrasonic bath (JP Selecta[™], Abrera, Spain) and analyzed using the same HPLC method in Section 3.4.

3.5.3. Determination of the Concentration Retained in the Dermatized Skin

After tape-stripping, the skin sections were used to extract the retained D. In total, 10 mg of the area of each replicate per duplicate was cut and introduced into the MagNa Lysor instrument (Roche, Sant Cugat del Valles, Spain) with 600 μ L of mobile phase. The homogenization of the tissue was carried out with 5 cycles of 90 s at 6500 rpm. Finally, the samples were analyzed using the HPLC method.

3.6. In Vitro Cytotoxicity Evaluation

HEK001 (CRL2404, ATCC, Manassas, VA, USA) cells were seeded in 96-well plates ($n = 6$) at 10,000 cells/well in 50 μ L of medium (keratinocyte serum-free medium, supplemented with 2 mM L-glutamine and 5 ng/mL of hEGF). The cells were incubated at 37 °C in 5% CO₂ and a 95% air-humidified atmosphere for 24 h. After 24 h of incubation, the cells were treated with 100 μ L of D solution in cell media at different concentrations (33.36 to 0.20 μ M). A stock solution was prepared in DMSO. The DMSO concentration in the well was below 1% and a DMSO control was carried out. Negative control of cytotoxicity was performed with cells in the same media and positive control of mortality with 1% of SDS (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). The exposure period was 72 h.

At the end of the incubation time, a CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD, USA) was used to evaluate cytotoxicity. CellTiter-Glo[®] reagent was added (100 μ L) directly to every well plate cultured in serum-free medium and incubated for 10 min. Luminescence was measured with a Luminometer Victor X3 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Cytotoxicity plots and IC₅₀ values were obtained. Cell survival was calculated considering the 100% viability of the untreated

control cells (negative control) and 100% of mortality positive control. The percentage of cell viability was calculated using the following equation:

$$(L_{\text{Negative control}} - L_{\text{Experimental value}}) / (L_{\text{Negative control}} - L_{\text{Positive control}}) \times 100 \quad (2)$$

where $L_{\text{Experimental value}}$ is the luminescence of the sample, $L_{\text{Negative control}}$ is the mean luminescence of cells in media control, and $L_{\text{Positive control}}$ is the absorbance with 1% SDS control.

3.7. Microarrays and Data Analysis

HEK001 cells were seeded in 6-well plates at 250,000 cells/well in 2 mL of medium (keratinocyte serum-free medium and L-glutamine (99:1)). The cells were incubated at 37 °C in 5% CO₂ and a 95% air-humidified atmosphere for 24 hr. After 24 h of incubation, the cells were treated with 6.59 μM of D. The compound was tested in duplicate and cells with medium without D were used as a control ($n = 3$). The exposure period was 24 h.

After the incubation time, the total RNA from each sample was extracted and purified from HEK001 cells using a RNeasy[®] Plus Mini isolation Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the instructions provided by the manufacturer. Total RNA concentration and quality were spectrophotometrically measured using the absorbance ratio 260:280 nm with NanoDrop[™] Lite (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Once the RNA was obtained, cDNA was synthesized with PxE Thermal Cycler (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's recommendations. For microarray analysis, GeneChip[®] Clariom S Human Array (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used. Data were generated and processed with Affymetrix software (Santa Clara, CA, USA). Gene expression data from the samples were compared using a one-way t-test using stringent transcript cut-off criteria with fold change (FC) > 1.5 and p -value ≤ 0.05.

4. Conclusions

Disulfiram is effective against *S. aureus* and *S. pyogenes* and is a potential alternative to classic antibiotics in the treatment of skin infections. Skin permeation studies showed no permeation in pig skin confirming the suitable topical use in superficial human infections. The drug concentration in pig skin tissue was higher than the MIC value of both microorganisms, being potentially effective in the treatment of cutaneous infections. Disulfiram showed cytotoxicity in transformed human keratinocyte cells and several upregulated and downregulated genes after its incubation. The main affected genes were related to cell proliferation signaling and the metabolism of cell ions, which is in agreement with the potential mechanism of action of the drug as a metal ion chelator, essential for cell homeostasis. However, the implementation of D in clinical use has encountered some challenges and further research should be carried out, for example, to evaluate the local tolerance in vivo after D topical administration. Further exploration of the molecular mechanism of disulfiram as an antibacterial agent is needed. Taken together with these results, disulfiram could be a good candidate as an alternative treatment for skin infections, considering the global concern of limited therapeutic options.

Author Contributions: Conceptualization, F.F.-C., M.L.C., M.À.C., P.C. and E.R.-V.; methodology, M.L.-R., M.C.-S., E.P.-R., F.F.-C., P.C., M.L.C. and E.R.-V.; validation, M.L.-R., M.C.-S. and E.P.-R.; formal analysis, M.L.-R. and M.C.-S.; investigation, M.L.-R. and M.C.-S.; resources, F.F.-C., M.L.C. and E.R.-V.; data curation, M.L.-R., M.C.-S., E.P.-R., F.F.-C., P.C., M.L.C. and E.R.-V.; writing—original draft preparation, M.L.-R.; writing—review and editing, M.L.-R., M.C.-S., E.P.-R., F.F.-C., P.C., M.L.C., M.À.C. and E.R.-V.; visualization, M.L.-R. and M.C.-S.; supervision, F.F.-C., M.L.C. and M.À.C.; project administration, F.F.-C., M.L.C. and M.À.C.; funding acquisition, E.R.-V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Generalitat of Catalonia, Industrial Doctorate Program, grant number 2020 DI 97.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available upon request due to intellectual property.

Acknowledgments: We thank the valuable contribution of our technical assistants: Mari Carmen Moreno (Laboratory Reig Jofre, Sant Joan Despí, Barcelona, Spain) and Carles Ciutat (Molecular Biology department, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Spain).

Conflicts of Interest: M.L.-R., E.P.-R., M.C.-S., E.R.-V., and F.F.-C. are employees of Laboratory Reig Jofre. They belong to the R&D department and do not participate in marketing or commercial activities. The data presented were conducted under general good laboratory practices. The other authors do not declare any conflicts of interest.

References

1. Williamson, D.A.; Carter, G.P.; Howden, B.P. Current and emerging topical antibacterials and antiseptics: Agents, action, and resistance patterns. *Clin. Microbiol. Rev.* **2017**, *30*, 827–860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Bandyopadhyay, D. Topical Antibacterials in Dermatology. *Indian J. Dermatol.* **2021**, *66*, 117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Bessa, G.R.; Machado, D.C.; Weber, M.B.; D’Azevedo, P.A.; Quinto, V.P.; Lipnharski, C.; Bonamigo, R.R. Staphylococcus aureus resistance to topical antimicrobials in atopic dermatitis. *An. Bras. Dermatol.* **2016**, *91*, 604–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Bonamonte, D.; De Marco, A.; Giuffrida, R.; Conforti, C.; Barlusconi, C.; Foti, C.; Romita, P. Topical antibiotics in the dermatological clinical practice: Indications, efficacy, and adverse effects. *Dermatol. Ther.* **2020**, *33*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Carter, G.P.; Schultz, M.B.; Baines, S.L.; Heffernan, H.; Tiong, A.; Pham, P.H.; Monk, I.R.; Stinear, T.P.; Howden, B.P.; Williamson, D.A. Topical Antibiotic Use Coselects for the Carriage of Mobile Antimicrobials in Staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, 1–9. [[CrossRef](#)]
6. Hirose, Y.; Yamaguchi, M.; Sumitomo, T.; Nakata, M.; Hanada, T.; Okuzaki, D.; Motooka, D.; Mori, Y.; Kawasaki, H.; Coady, A.; et al. Streptococcus pyogenes upregulates arginine catabolism to exert its pathogenesis on the skin surface. *Cell Rep.* **2021**, *34*, 108924. [[CrossRef](#)]
7. Muhaj, F.F.; George, S.J.; Tyring, S.K. Bacterial antimicrobial resistance and dermatological ramifications*. *Br. J. Dermatol.* **2022**, *187*, 12–20. [[CrossRef](#)]
8. Bassetti, M.; Vena, A.; Croxatto, A.; Righi, E.; Guery, B. How to manage Pseudomonas aeruginosa infections. *Drugs Context* **2018**, *7*, 1–18. [[CrossRef](#)]
9. Thakare, R.; Shukla, M.; Kaul, G.; Dasgupta, A.; Chopra, S. Repurposing disulfiram for treatment of Staphylococcus aureus infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2019**, *53*, 709–715. [[CrossRef](#)]
10. Lu, C.; Li, X.; Ren, Y.; Zhang, X. Disulfiram: A novel repurposed drug for cancer therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2021**, *87*, 159–172. [[CrossRef](#)]
11. Karamanakos, P.N.; Pappas, P.; Boumba, V.A.; Thomas, C.; Malamas, M.; Vougiouklakis, T.; Marselos, M.; Weiner, H. Pharmaceutical Agents Known to Produce Disulfiram-Like Reaction: Effects on Hepatic Ethanol Metabolism and Brain Monoamines. *Int. J. Toxicol.* **2007**, *26*, 423–432. [[CrossRef](#)]
12. Landegren, J.; Borglund, E.; Storgards, K. Treatment of scabies with disulfiram and benzyl benzoate emulsion: A controlled study. *Acta Derm. Venereol.* **1979**, *59*, 274–276. [[PubMed](#)]
13. Meneguello, J.E.; Murase, L.S.; de Souza, J.V.P.; de Oliveira, C.G.; Ghiraldi-Lopes, L.D.; Teixeira, J.J.V.; de Lima Scodro, R.B.; Ferracioli, K.R.C.; Siqueira, V.L.D.; Campanerut-Sá, P.A.Z.; et al. Systematic review of disulfiram as an antibacterial agent: What is the evidence? *Int. J. Antimicrob. Agents* **2022**, *59*, 106578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Li, H.; Wang, J.; Wu, C.; Wang, L.; Chen, Z.S.; Cui, W. The combination of disulfiram and copper for cancer treatment. *Drug Discov. Today* **2020**, *25*, 1099–1108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Das, S.; Garg, T.; Chopra, S.; Dasgupta, A. Repurposing disulfiram to target infections caused by non-tuberculous mycobacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 1317–1322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Sauna, Z.E.; Shukla, S.; Ambudkar, S.V. Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. *Mol. Biosyst.* **2005**, *1*, 127. [[CrossRef](#)]
17. Long, T.E. Repurposing thiram and disulfiram as antibacterial agents for multidrug-resistant staphylococcus aureus infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*. [[CrossRef](#)]
18. Frazier, K.R.; Moore, J.A.; Long, T.E. Antibacterial activity of disulfiram and its metabolites. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *126*, 79–86. [[CrossRef](#)]
19. Weinstein, M.P.; Patel, J.B.; Bobenchik, A.M.; Campeau, S.; Cullen, S.K.; Galas, M.F.; Gold, H.; Humphries, R.M.; Kirn, T.J.; Lewis Ii, J.S.; et al. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing A CLSI supplement for global application. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2020. Available online: <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf> (accessed on 25 January 2022).
20. Daniels, R.; Mellroth, P.; Bernsel, A.; Neiers, F.; Normark, S.; Von Heijne, G.; Henriques-Normark, B. Disulfide bond formation and cysteine exclusion in gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 3300–3309. [[CrossRef](#)]
21. Argüello, J.M.; Raimunda, D.; Padilla-Benavides, T. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2013**, *4*, 73. [[CrossRef](#)]

22. Cathcart, G.R.A.; Quinn, D.; Greer, B.; Harriott, P.; Lynas, J.F.; Gilmore, B.F.; Walker, B. Novel inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor LasB: A potential therapeutic approach for the attenuation of virulence mechanisms in pseudomonal infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 2670–2678. [CrossRef]
23. Neupane, R.; Boddu, S.H.S.; Renukuntla, J.; Babu, R.J.; Tiwari, A.K. Alternatives to Biological Skin in Permeation Studies: Current Trends and Possibilities. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 152. [CrossRef] [PubMed]
24. Lajarin-reinares, M.; Martinez-esteve, E.; Pena-rodr, E.; Cañellas-santos, M.; Fernandez-campos, F. The Efficacy and Biopharmaceutical Properties of a Fixed-Dose Combination of Disulfiram and Benzyl Benzoate. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10969. [CrossRef] [PubMed]
25. Qian, L.; Cantrell, F.L. Disulfiram. *Encycl. Toxicol. Third Ed.* **2014**, 208–209. [CrossRef]
26. Touitou, E.; Meidan, V.M.; Horwitz, E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. *J. Control. Release* **1998**, *56*, 7–21. [CrossRef] [PubMed]
27. Niles, A.L.; Moravec, R.A.; Riss, T.L. In Vitro Viability and Cytotoxicity Testing and Same-Well Multi-Parametric Combinations for High Throughput Screening. *Curr. Chem. Genomics* **2009**, *3*, 33. [CrossRef] [PubMed]
28. Sanchez, L.; Mitjans, M.; Infante, M.R.; Vinardell, M.P. Assessment of the Potential Skin Irritation of Lysine-Derivative Anionic Surfactants Using Mouse Fibroblasts and Human Keratinocytes as an Alternative to Animal Testing. *Pharm. Res.* **2004**, *1*, 1637–1641. [CrossRef]
29. Lee, J.K.; Kim, D.B.; Kim, J.I.; Kim, P.Y. In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. *Toxicol. Vitro.* **2000**, *14*, 345–349. [CrossRef]
30. Zha, J.; Chen, F.; Dong, H.; Shi, P.; Yao, Y.; Zhang, Y.; Li, R.; Wang, S.; Li, P.; Wang, W.; et al. Disulfiram targeting lymphoid malignant cell lines via ROS-JNK activation as well as Nrf2 and NF- κ B pathway inhibition. *J. Transl. Med.* **2014**, *12*, 1–9. [CrossRef]
31. Weyermann, J.; Lochmann, D.; Zimmer, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int. J. Pharm.* **2005**, *288*, 369–376. [CrossRef]
32. Pena-Rodríguez, E.; Mata-Ventosa, A.; Garcia-Vega, L.; Pérez-Torras, S.; Fernández-Campos, F. The physicochemical, biopharmaceutical, and in vitro efficacy properties of freeze-dried dexamethasone-loaded lipomers. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1322. [CrossRef]
33. Garle, M.J.; Fentem, J.H.; Fry, J.R. In vitro cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity in vivo. *Toxicol. Vitro.* **1994**, *8*, 1303–1312. [CrossRef] [PubMed]
34. National Center for Biotechnology Information Disulfiram: Chemical and physical properties. PubChem Compound Summary. CID 3117. Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Disulfiram>. (accessed on 24 July 2022).
35. Thum, T.; Galuppo, P.; Wolf, C.; Fiedler, J.; Kneitz, S.; Van Laake, L.W.; Doevendans, P.A.; Mummery, C.L.; Borlak, J.; Haverich, A.; et al. MicroRNAs in the human heart: A clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* **2007**, *116*, 258–267. [CrossRef] [PubMed]
36. Rizzi, F.; Coletta, M.; Bettuzzi, S. Chapter 2-Clusterin (CLU): From One Gene and Two Transcripts to Many Proteins. *Clusterin* **2009**, *104*, 9–23. [CrossRef]
37. Jackson, A.C.; Liu, J.; Vallanat, B.; Jones, C.; Nelms, M.D.; Patlewicz, G.; Corton, J.C. Identification of novel activators of the metal responsive transcription factor (MTF-1) using a gene expression biomarker in a microarray compendium. *Metallomics* **2020**, *12*, 1400–1415. [CrossRef] [PubMed]
38. Allensworth, J.L.; Evans, M.K.; Bertucci, F.; Aldrich, A.J.; Festa, R.A.; Finetti, P.; Ueno, N.T.; Safi, R.; McDonnell, D.P.; Thiele, D.J.; et al. Disulfiram (DSF) acts as a copper ionophore to induce copper-dependent oxidative stress and mediate anti-tumor efficacy in inflammatory breast cancer. *Mol. Oncol.* **2015**, *9*, 1155–1168. [CrossRef] [PubMed]
39. Chen, J.; Du, C.; Kang, J.; Wang, J. Cu²⁺ is required for pyrrolidine dithiocarbamate to inhibit histone acetylation and induce human leukemia cell apoptosis. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *171*, 26–36. [CrossRef]
40. Guo, X.; Xu, B.; Pandey, S.; Goessl, E.; Brown, J.; Armesilla, A.L.; Darling, J.L.; Wang, W. Disulfiram/copper complex inhibiting NF κ B activity and potentiating cytotoxic effect of gemcitabine on colon and breast cancer cell lines. *Cancer Lett.* **2010**, *290*, 104–113. [CrossRef]
41. Wiggins, H.L.; Wymant, J.M.; Solfa, F.; Hiscox, S.E.; Taylor, K.M.; Westwell, A.D.; Jones, A.T. Disulfiram-induced cytotoxicity and endo-lysosomal sequestration of zinc in breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, *93*, 332. [CrossRef]
42. Chen, D.; Peng, F.; Cui, Q.C.; Daniel, K.G.; Orlu, S.; Liu, J.; Dou, Q.P. Inhibition of prostate cancer cellular proteasome activity by a pyrrolidine dithiocarbamate-copper complex is associated with suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Front. Biosci.* **2005**, *10*, 2932–2939. [CrossRef]
43. Wickström, M.; Danielsson, K.; Rickardson, L.; Gullbo, J.; Nygren, P.; Isaksson, A.; Larsson, R.; Lövborg, H. Pharmacological profiling of disulfiram using human tumor cell lines and human tumor cells from patients. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 25–33. [CrossRef]
44. Abraham, N.M.; Lamlerthson, S.; Fowler, V.G.; Jefferson, K.K. Chelating agents exert distinct effects on biofilm formation in *Staphylococcus aureus* depending on strain background: Role for clumping factor B. *J. Med. Microbiol.* **2012**, *61*, 1062. [CrossRef] [PubMed]

CAPÍTULO VI: Reposicionamiento de D como agente antifúngico. Desarrollo de un nuevo gel mucoadhesivo vaginal de D

Repurposing Disulfiram as an Antifungal Agent: Development of a New Disulfiram Vaginal Mucoadhesive Gel

Maria Lajarin-Reinares*, Iria Naveira-Souto, Mireia Mallandrich, Joaquim Suñer-Carbó, Montserrat Llagostera Casas, Maria Angels Calvo and Francisco Fernandez-Campos

* Corresponding author

Pharmaceutics | MPDI | 2023

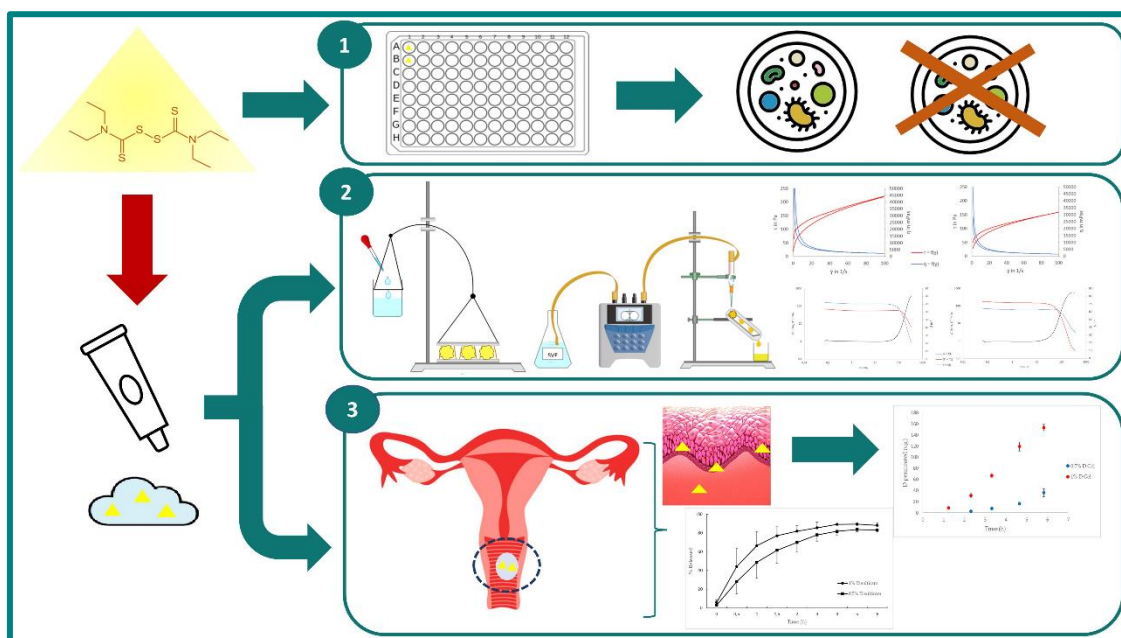


Figura 21: Resumen gráfico. Reposicionamiento del disulfiram como agente antifúngico: desarrollo de un nuevo gel mucoadhesivo vaginal de disulfiram

Lajarin-Reinares, M.; Naveira-Souto, I.; Mallandrich, M.; Suñer-Carbó, J.; Llagostera Casas, M.; Calvo, M.A.; Fernandez-Campos, F. Repurposing Disulfiram as an Antifungal Agent: Development of a New Disulfiram Vaginal Mucoadhesive Gel. *Pharmaceutics* 2023, 15, 1436. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051436>

Presentación

El 75 % de las mujeres sufren al menos una vez en la vida candidiasis vaginal, infección producida por diferentes especies del género *Candida*. Además, se estima que entre el 40 % y el 50 % de ellas, experimentan recurrencias y un 8 % tienden a cronificar la enfermedad. Los principales retos a los que se enfrenta su tratamiento son; el incremento de cepas resistentes a los azoles, fármacos utilizados como primera línea terapéutica, y limitaciones en cuanto a las formulaciones existentes, tales como la baja permeabilidad en el epitelio subyacente que permita eliminar posibles reservorios y el bajo tiempo de residencia debido a la acción de autolimpieza del tracto vaginal.






Frente a esta situación, se propuso una alternativa a los tratamientos habituales, no solo por la novedosa formulación presentada sino por el fármaco activo seleccionado. Este estudio tuvo como objetivo desarrollar y optimizar geles mucoadhesivos para la administración local de D en la mucosa vaginal. Dichas formulaciones están compuestas por la combinación de dos polímeros con mecanismo de adhesión diferentes, polietilenglicol y carragenato, y así poder mejorar las propiedades mucoadhesivas y mecánicas de las formulaciones, además de prolongar el tiempo de residencia en la cavidad vaginal.

El activo D fue testado frente *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Nakaseomyces glabratus*, comúnmente conocido como *Candida glabrata*, mediante pruebas de susceptibilidad por el método de microdilución en placa. Se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas de los geles y se estudiaron los perfiles de liberación y permeación *in vitro* mediante celdas de Franz. Tras la cuantificación del tejido expuesto, se determinó que la concentración de fármaco retenida en el epitelio vaginal de cerdo era suficiente para tratar la infección. El conjunto de los resultados obtenidos sugiere que los geles desarrollados con D tienen potencial para ser un tratamiento alternativo eficaz en candidiasis vaginal.

El manuscrito resultante de este trabajo se muestra a continuación.

Article

Repurposing Disulfiram as an Antifungal Agent: Development of a New Disulfiram Vaginal Mucoadhesive Gel

Maria Lajarin-Reinares ^{1,2,*} , Iria Naveira-Souto ² , Mireia Mallandrich ³ , Joaquim Suñer-Carbó ³ 
Montserrat Llagostera Casas ¹, Maria Angels Calvo ⁴ and Francisco Fernandez-Campos ⁵ 

¹ Department of Genetics and Microbiology, Campus Microbiology Unit, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain; montserrat.llagostera@uab.cat

² R & D Development, Reig Jofre Laboratories, 08970 Sant Joan Despí, Spain; inaveira@reigjofre.com

³ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, School of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; mireia.mallandrich@ub.edu (M.M.); jsuner@ub.edu (J.S.-C.)

⁴ Department of Animal Health and Anatomy, Faculty of Veterinary, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain; mariangels.calvo@uab.cat

⁵ R & D Department, Labiana Pharmaceuticals, 08757 Corbera Llobregat, Spain; francisco.fernandez@labiana.com

* Correspondence: mlajarin@reigjofre.com; Tel.: +34-935-507-718

Abstract: Alternative formulations need to be developed to improve the efficacy of treatments administered via the vaginal route. Mucoadhesive gels with disulfiram, a molecule that was originally approved as an antialcoholism drug, offer an attractive alternative to treat vaginal candidiasis. The aim of the current study was to develop and optimize a mucoadhesive drug delivery system for the local administration of disulfiram. Such formulations were composed of polyethylene glycol and carrageenan to improve the mucoadhesive and mechanical properties and to prolong the residence time in the vaginal cavity. Microdilution susceptibility testing showed that these gels had antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, and *Nakaseomyces glabratus*. The physicochemical properties of the gels were characterized, and the in vitro release and permeation profiles were investigated with vertical diffusion Franz cells. After quantification, it was determined that the amount of the drug retained in the pig vaginal epithelium was sufficient to treat candidiasis infection. Together, our findings suggest that mucoadhesive disulfiram gels have the potential to be an effective alternative treatment for vaginal candidiasis.

Keywords: disulfiram; *Candida* spp.; mucoadhesion; ATP-binding cassette; resistant; vaginitis

Citation: Lajarin-Reinares, M.; Naveira-Souto, I.; Mallandrich, M.; Suñer-Carbó, J.; Llagostera Casas, M.; Calvo, M.A.; Fernandez-Campos, F. Repurposing Disulfiram as an Antifungal Agent: Development of a New Disulfiram Vaginal Mucoadhesive Gel. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 1436. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051436>

Academic Editor: Natasa Skalko-Basnet

Received: 21 March 2023

Revised: 2 May 2023

Accepted: 3 May 2023

Published: 8 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Vaginal candidiasis (VC), often referred to as vulvovaginal candidiasis, is mainly caused by the *Candida* species and is the second most prevalent infection of the vaginal mucosa after bacterial vaginosis [1]. VC affects approximately 75% of women of reproductive age at least once during their lives, and it is estimated that 40–50% will experience recurrence and 8% will develop chronic VC [2–4].

Candida spp. are commensal fungi in the human microflora that are found in the lower genital tract in 10–20% of healthy women. Although part of the normal microflora, *Candida* can become opportunistic agents with a tendency to overgrow [2]. The most common *Candida* species involved in VC is *C. albicans* (85–90%), followed by *Nakaseomyces glabratus* (*C. glabrata*), *C. tropicalis*, *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*), and *C. parapsilosis* [5]. Approximately 25 to 40% of women who are culture-positive for *Candida* are asymptomatic. The natural evolution of asymptomatic colonization to symptomatic infection is not clear. There are multiple mechanisms that contribute to the colonization of *Candida* and its symptomatic infection, such as genetic host factors (polymorphisms in the blood group), hormones,

the use of antibacterial agents, age, sexual activity, certain pathologies (diabetes mellitus and immunodepression), idiopathic causes, pregnancy, and an imbalance in the vaginal microbiota [4,6,7]. The most common clinical manifestations of VC are pruritus, hyperemia, vaginal discomfort, leucorrhea, burning, soreness, dyspareunia, and vaginal erythema [7]. Furthermore, colonization of the vaginal epithelium contributes to the deterioration of mucosal surfaces, facilitates the formation of yeast reservoirs, or becomes a source for future infections, leading to chronic infections and serious consequences (i.e., infertility and sterility) [8].

The treatment of noncomplicated VC involves the use of short-term local therapy (up to 3–7 days) or single-dose oral antimycotics, mainly those in the azole family, which is effective in 90% of cases. The most common locally applied azoles are clotrimazole, butoconazole, and miconazole. Fluconazole is usually given orally between 1 and 3 days [9]. Topical azoles may provide more immediate relief; however, some patients experience hypersensitivity, local itching, or burning [10]. For vaginal drug delivery, several pharmaceutical formulations are available for consumers, including creams, ovules, tablets, and gels [8,11,12]. These treatments exhibit some drawbacks, such as low permeation in the underlying epithelium (to remove reservoirs) and low residence time owing to the self-cleaning action of the vaginal tract. (It is recommended to be administered at night before lying in bed.) These factors could lead to low drug exposure and the development of resistance. Many studies have documented the ability of *Candida* to develop high-level resistance to antifungal therapy [13–16]. Resistance mechanisms include overexpression of or mutations to the target enzyme of azoles, lanosterol 14a-demethylase, and overexpression of ATP-binding cassette (ABC) efflux proteins [17]. Among ABC transporters, Cdr1p plays a key role in azole resistance in *C. albicans* [18].

Disulfiram (D) is a dithiocarbamate used to treat alcoholism that was approved by the US Food and Drug Administration (FDA) in 1951. D produces discomfort in patients who drink alcohol as a strategy for their dishabituation, inhibiting aldehyde dehydrogenase (ALDH), which results in the specific accumulation of acetaldehyde [19]. In addition, D is characterized by a low molecular weight (296 Da), logP value of 3.88, melting point under 200 °C (71.5 °C), and fewer than five hydrogen bond donors and acceptors with a strong ability to chelate metals [20]. In accordance with its physicochemical properties, a good permeation profile is expected. Different in vitro and in vivo studies have shown that D could be an active substance against scabies, lice, and bacteria [21,22]. Furthermore, the effectiveness of D against fungi and cancer was reported [23,24]. Different mechanisms of action have been proposed to explain the antimicrobial activity of D: metal ion chelation, which affects cell homeostasis, and the presence of reactive thiol groups, which can impact the functions of proteins by forming incorrect disulfide bonds [22]. D was found to be potentially useful by inhibiting the function of glycoprotein P (P-gp) and has also been shown to act as a modulator of other multidrug transporters, such as MRP1 and MRP4 [25]. Because of the functional similarities between Cdr1p and human P-gp, D is a potent modulator of Cdr1p [17]. Therefore, D is an attractive agent to develop for candidiasis treatment.

The aim of this work is to develop and optimize a mucoadhesive drug delivery system for the local administration of D. The in vitro antifungal efficacy of D was studied with different *Candida* species, and the mucoadhesion of the formulation was enhanced using polymers with different adhesive mechanisms. The proposed formulation represents an alternative to the commercially available treatments for VC due to the selected novel drug and mucoadhesive polymers that would increase the residence time of the treatment and yeast drug exposure.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Sodium chloride (0.35% w/v) (Quimivita, Barcelona, Spain), potassium hydroxide (0.14% w/v), calcium hydroxide (0.02% w/v), acetic acid (0.1% w/v) (Scharlab, S.L.,

Sentmenat, Spain), bovine serum albumin 0.002% (w/v) (Merck Life Science, S.L.U., Madrid, Spain), lactic acid (0.2% w/v) (Escuder, S.L., Rubi, Spain), glycerol 0.02% (w/v) (Caila & Pares, S.A., Barcelona, Spain), urea (0.04% w/v) (Quality Chemicals, S.L., Esparraguera, Spain) and glucose (0.5% w/v) (Quimidroga, S.A., Barcelona, Spain) were used to prepare simulated vaginal fluid (SVF) [26].

Mucoadhesive gels were produced with polyethylene glycol (PEG-90M) (Colorcon Limited, Kent, UK) and carrageenan (DuPont, Wilmington, DE, USA); benzylic alcohol (Scharlab, S.L., Sentmenat, Spain) was chosen as a preservative; and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HPCD) (Pracofar, Martorelles, Spain) was used as an active solubilizing agent. D (Farchemia S.r.l., Treviglio, Italy) was the active pharmaceutical ingredient, and the selected solvent was water purified in-house. Sodium fluorescein (Scharlau, Barcelona, Spain) was used in the mucoadhesive study as a marker.

2.2 Antifungal Susceptibility Testing

The fungal strains used in this study were purchased from the Spanish Collection of Type Cultures (CECT). *C. albicans* CECT 1002 (which corresponds to ATCC 18804), *C. parapsilosis* CECT 10434 (MCYC 2031), and *C. glabrata* CECT 1448 (ATCC 2001) were used for the antifungal susceptibility test.

The minimum inhibitory concentration (MIC) of D was determined by the broth microdilution method in 96-well microplates according to guidelines M27-A3 of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standard [27]. A 24 h culture of *Candida* adjusted to a 0.5 McFarland was used to prepare the initial inoculum. A working suspension was generated by making a 1:100 dilution followed by a 1:20 dilution of the stock suspension with RPMI 1640 broth medium buffered with MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at pH 7.0. Stock solutions (10 mg/mL) of D were prepared in ethanol, and D was tested from 64 (the highest soluble concentration) to 0.125 µg/mL. The final ethanol concentration was below 0.5% to not alter yeast growth. The negative control was the respective medium, and a control with the same ethanol concentration as that in the samples with D was evaluated. Furthermore, each fungal strain in medium was used as a positive control, and amphotericin B was used as a positive control of inhibition. The plates were incubated at 35 °C for 48 h, and then, the MIC values were determined. The M27 methodology gave reproducible results when testing *Candida*, and the establishment of interpretive breakpoints has begun. However, it is becoming clear that the M27 methodology may be inadequate for certain organisms and antifungal agents. For example, determining the susceptibility of *Candida* isolates to amphotericin B may be a concern [28]. D is not described in these guidelines, and the suitability of the M27 method is not known. To resolve the inherent possible variability of MIC determination, MICs were also determined in an alternative medium (Sabouraud dextrose broth).

2.3 Preparation and Optimization of the Mucoadhesive Gel

For the mucoadhesive placebo gel preparation, purified water (q.s., 100% w/w) was heated to 50 °C with HPCD (20% w/w). PEG-90M was added, it was stirred at 750 rpm with a mixing paddle, and then stirring was reduced to 150 rpm until complete dissolution. Finally, carrageenan was added with stirring at 75 rpm until complete homogenization. Disulfiram gels were produced in the same way by adding D (0.5% or 1% w/w) to purified water with HPCD. Fluorescein (0.01% w/w) mucoadhesive gels were produced to study the in vitro mucoadhesive properties.

The properties of formulations were influenced by different experimental variables, such as the amounts of the polymers. To obtain the most suitable mucoadhesive gel for vaginal application, the influence of the concentrations of PEG-90M and carrageenan on the dependent variables (mucoadhesion, fluorescein adhesion, and viscosity) was studied (Table 1) with placebo formulations. Central composite design was employed to analyze the main and combined effects of these variables on the responses. For this, 5 central points were selected, and a default α value of 1.41 was used to determine the axial points. A

significance level (α) of 0.05 was established. The choice of the model was made based on the values of R^2 , adjusted R^2 , and AIC (Akaike information criterion). In addition, the production order of the formulations was randomized to reduce the chances of external design factors affecting our results.

Table 1. Levels studied for surface response design.

Factor	Lower Level	Higher Level
% PEG-90M (<i>w/w</i>)	0.5	1.5
% Carrageenan (<i>w/w</i>)	1.0	2.0

Statistical analysis of the variables studied was carried out using Minitab 17 statistical software (Minitab, Inc., 2010, State College, PA, USA) to obtain mathematical equations for each model. Then, optimization of each model was performed (Section 2.7).

2.4 Adhesive Strength of the Gels

The adhesive strengths of the placebo gels were evaluated by modifying the devices from Mei et al. [11] (Figure 1). To simulate the vaginal epithelium, agar hydrogels (4% *w/w*) (Scharlab, Barcelona, Spain) were prepared with type II pig mucin (0.34% *w/w*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) [29]. This gel was attached to two planks, as shown in Figure 1. The formulation (0.5 g) was placed on the bottom plank, and to evaluate the effect of vaginal fluid on the formulations, SVF (0.25 mL) was applied to the formulation before the upper plank was pressed onto the bottom plank and the formulation.

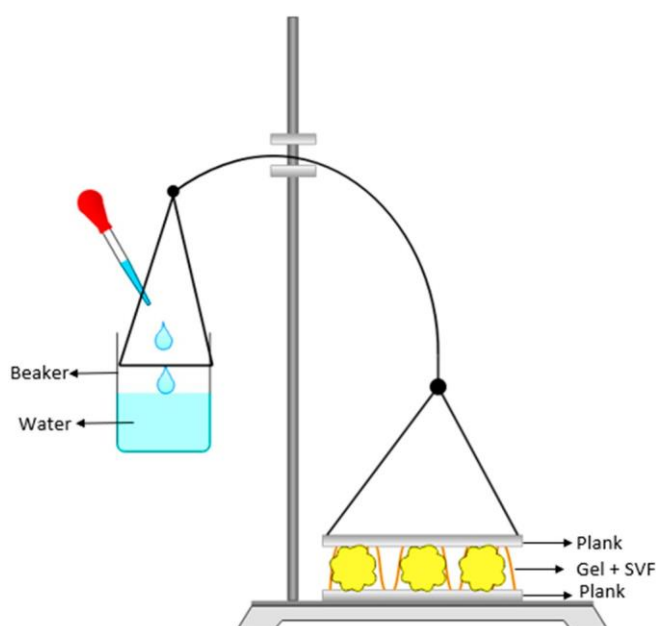


Figure 1. Schematic illustration of the device for evaluating adhesive strength.

One milliliter of water was added every 15 s to a tared beaker fixed on the opposite side of the balance. Once the two planks were separated, the weight of the water (W_1) was used to calculate the tensile stress (σ ; mN/cm^2) according to Equation (1):

$$\sigma = (W_1 \times g)/s \quad (1)$$

where g is gravity (m/s^2), and s is the agar surface (cm^2).

2.5 Viscosity of the Mucoadhesive Gels

As a screening step in the selection of the final formulation composition, the viscosities of the mucoadhesive gels were evaluated using a rotatory viscosimeter (Brookfield, Manassas, VA, USA). The viscosities of the samples were measured 24 h after production of each formulation. Moreover, viscosities of the same samples with SVF in a ratio of 1:6.67 (SVF:gel) were measured after mixing and resting for 48 h. Ten milliliters of each sample was applied to the sample container at 25.0 ± 0.5 °C. Viscosity measurements were conducted for 30 min at 10 rpm (spindle SC4-29). The ratio of SVF to gel used was considered to allow approximately 0.5–0.75 mL of SVF to be present at any one time [30].

2.6 Mucoadhesive Properties

For the mucoadhesive studies, a vagina and its physiological conditions were simulated using a tube with a portion of agar (8×2 cm) with 0.34% *w/w* mucin, on which 1 g of mucoadhesive gel with fluorescein (0.01% *w/w*) was placed on top of the tube. The tubes were mounted at an approximate angle of 70° under physiological conditions. SVF at 1 rpm was passed through the tube using a peristaltic pump (Shenchen Pump YZ1515x, Hebei, China) at 0.0133 mL/s, the lowest flow of the peristaltic pump. Friedl et al. used a total of 6 mL of SVF over 24 h ($v = 0.00006944$ mL/s), taking samples at 4 h, 8 h, 12 h, and 24 h [31]. Extrapolating these sampling times to the flow of our system, the determined sampling times were as follows: 1.15 min, 2.30 min, 3.45 min, and 7.30 min. The whole experimental setup is illustrated in Figure 2.

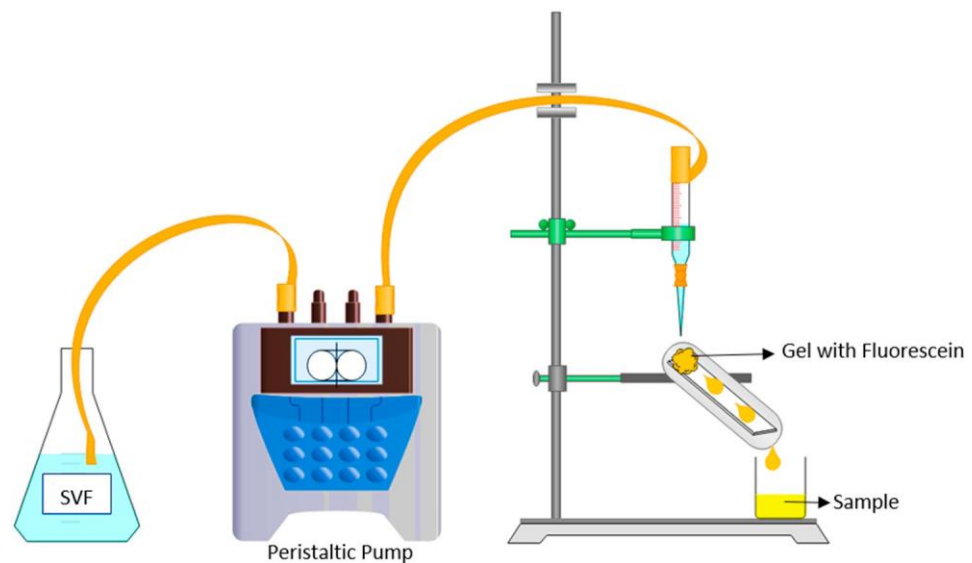


Figure 2. Schematic of the device used to measure the mucoadhesive properties.

At the end of the study, the concentration of fluorescein released (F_2) at each time point was determined by measuring the fluorescence at a wavelength of 485 nm using a Victor Nivo multimode plate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Before sample measurement, a fluorescein calibration curve was prepared by measuring the fluorescence of fluorescein solutions in water from 7.6×10^{-4} $\mu\text{g/mL}$ to 2×10^{-5} $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0.999928$).

Once the samples were quantified, the fluorescent dose remaining in the agar (F_3) was determined by calculating the difference from the fluorescein dose initially seeded (F_1) following the equation

$$F_3 = F_2 - F_1$$

The F_3 value was used as an indirect parameter of the mucoadhesion of the formulation.

2.7 Optimization of the Mucoadhesive Gels

Once the mathematical models for each variable were obtained, the two factors (PEG-90M and carrageenan concentration) were examined to optimize the mucoadhesive properties and viscosity of the formulation. The concentration of polymers giving the formulation the highest mucoadhesion and lowest viscosity was determined.

The mucoadhesive properties and viscosity of the optimized final formulation placebo and the formulations with 0.5 and 1% D (w/w) were studied. Furthermore, from the mathematical model obtained during the statistical study, the bias was calculated (Equation (2)) to determine the predictive capacity of the model.

$$\% \text{Bias} = \frac{|Ref - Z_1|}{Ref} \times 100 \quad (2)$$

where *Ref* is the theoretical reference value of the model, and *Z*₁ is the mean of the experimental value obtained.

Additionally, the rheological properties (Section 2.8) and syringeability (Section 2.9) of the placebo-optimized formulation and the release (Section 2.10) and permeation (Section 2.11) profile of the final D formulation were characterized.

2.8 Final Rheological Properties

Placebo-optimized formulation rheology, thixotropy, and viscoelasticity measurements were made by performing rotational and oscillatory tests using a Haake RheoStress[®] 1 rheometer (Thermo Fisher, Karlsruhe, Germany).

Rotational measurements. Steady-state measurements were made with a parallel plate and plate geometry (P35Ti L: 60 mm diameter, 2° angle). The shear stress (τ) was measured as a function of the shear rate ($\dot{\gamma}$). Viscosity curves ($\eta = f(\dot{\gamma})$) and flow curves ($\tau = f(\dot{\gamma})$) were recorded at 37 ± 0.1 °C. The shear rate ramp program included a 3 min ramp-up period from 0 to 100 s^{-1} , a 1 min constant shear rate period at 100 s^{-1} , and a 3 min ramp-down period from 100 to 0 s^{-1} . Representative mathematical models were fit to the flow curves to search for the best descriptive model (Table 2) [32]. Selection of the best-fitting model was based on the correlation coefficient (observed vs. predicted) and Chi-square value. The apparent thixotropy (Pa/s) was estimated as the area of the hysteresis loop. Steady-state viscosity (η , Pa s) was determined from the constant shear section at 100 s^{-1} .

Table 2. Rheological equations used to evaluate the prepared formulations.

Rheological Model	Equation
Newton	$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma}$
Bingham	$\tau = \tau_0 + (\eta_0 \cdot \dot{\gamma})$
Ostwald–de Waele	$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$
Herschel–Bulkley	$\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n$
Casson	$\tau = \sqrt{(\tau_0^n + (\eta_0 \cdot \dot{\gamma})^n)}$
Cross	$\tau = \dot{\gamma} \cdot (\eta_\infty + (\eta_0 - \eta_\infty)/(1 + (\dot{\gamma}/\dot{\gamma}_0)^n))$

τ : Shear stress (Pa), η : viscosity (cP or Pa-s), $\dot{\gamma}$: shear rate (s^{-1}), τ_0 : minimum yield stress (Pa), η_0 : zero shear viscosity (cP or Pa-s), K : consistency factor (Pa s^n), η_∞ : infinite shear viscosity (cP or Pa-s), $\dot{\gamma}_0$: zero shear rate (s^{-1}).

Oscillatory test. The oscillatory test was performed with parallel plate–plate geometry (P35Ti L: 60 mm diameter, 2° angle). A strain sweep test was performed with a strain range of 0.01 to 500 Pa and an oscillation rate of 1 s^{-1} to determine the linear viscoelastic region (LVR) of the samples. During each sweep stress test, the changes in the storage and loss moduli and the phase angle (G' , G'' , and δ , respectively) were plotted as a function of shear stress. Afterward, a frequency sweep test was carried out between 0.1 and 10 s^{-1} at a constant shear rate within the LVR to determine the related variations in the G' , G'' , and complex viscosity (η^*), which were used for sample characterization.

All obtained data were analyzed with HAAKE RheoWin® Data Manager v. 4.88.

2.9 Syringeability of the Formulations

Syringeability was determined by calculating the time needed for 5 g of the product to fall from a cannula with the application of a constant force of 9.688 N (applied weight of 987.6 g) [33].

2.10 In Vitro Release Tests of the Disulfiram Gel

The in vitro release of D from the mucoadhesive gels was studied using vertical Franz cells (Vidrafoc, Barcelona, Spain) with a 12 mL receptor compartment and an effective diffusion area of 1.54 cm². A 15% w/w HPCD solution in PBS (pH 5.5) was used as the receptor medium (RM) at 37 °C with stirring at 500 rpm to maintain sink conditions throughout the experiment due to the poor water solubility of D (4.09 mg/L) [20] and according to previous studies reported [21,22]. A total of 0.0545 g/cm² gel was applied in the donor compartment, corresponding to 420 µg of D for the 0.5% formulation ($n = 5$) and 840 µg of D for the 1% formulation ($n = 5$). A membrane with a 0.45 µm pore diameter was used (Supor PES membrane, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Aliquots of 300 µL were taken at certain times (0, 0.5, 1, 1.5, 3, 4, 5, and 6 h). The samples were analyzed using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) with a method previously reported for similar studies [21] to quantify the amount of D that had diffused through the membrane.

Kinetic modeling of the release data was carried out with the DD-solver Excel Add-on [34]. The mean values of the release curve were adjusted to nonlinear models, i.e., first-order, Higuchi, Korsmeyer–Peppas, and Weibull (Table 3), to select the population behavior. Then, individual data were adjusted according to the selected population model. Model selection was based on the AIC, which reflected the lowest deviation of the model with respect to the empirical data [35]. The mean and standard deviation of the parameters were reported.

Table 3. Different kinetic models and equations tested.

Kinetic Model	Equation	Parameter(s)
First-Order	$F = F_{max} (1 - e^{(-K_1 t)})$	F_{max}, k_1
Higuchi	$F = K_H \cdot t^{1/2}$	K_H
Korsmeyer–Peppas	$F = K_{KP} \cdot t^n$	K_{KP}, n
Weibull	$F = F_{max} \cdot 1 - e^{(-t/T_d)^\beta}$	F_{max}, α, β

F : Fraction of drug released, t : time, F_{max} : maximum fraction of drug released, K_1 : first-order constant, K_H : Higuchi constant, K_{KP} : Korsmeyer–Peppas constant, n : diffusional exponent, T_d : the time at which 63.2% of the drug had been released, β : Weibull shape parameter.

In Table 3, if n is between 0.43 and 0.85, then the release mechanism follows an anomalous transport mechanism. In the case of β , for values lower than 0.75, the release follows Fickian diffusion, either in Euclidian ($0.69 < \beta < 0.75$) or fractal ($\beta < 0.69$) spaces. Values (β) in the range of 0.75–1.0 indicate a combined mechanism, which is frequently encountered in release studies [36].

2.11 Pig Vagina Permeation

Pig vaginas were obtained at the time of sacrifice from a local abattoir (Barcelona, Spain). The full thickness vaginal mucosa (approximately 6.2 mm) was carefully debrided, cleaned with sterile saline solution, and transported to the laboratory at 4 °C in saline solution. For this study, tissues were frozen by placing them in containers with a PBS mixture containing 4% albumin and 10% DMSO (as cryoprotective agents) and stored (for a maximum of 1 month) at -80 °C in a mechanical freezer. DMSO produces adverse effects at room temperature; therefore, the addition of DMSO prior to freezing was performed at 4 °C, whilst thawing involved immersion in a water bath filled with PBS at 37 ± 1 °C and gentle shaking for 30 min, until total elimination of DMSO was achieved [37]. On the day

of the experiment, the vaginal pieces were thawed and mounted on Franz cells ($n = 4$ for each dose) with an effective diffusion area of 0.64 cm^2 and approximately 5 mL of receptor volume capacity (HPCD 15% in PBS, pH = 5.5 with stirring at 600 rpm). A total of 0.0545 g/cm^2 gel (0.5% or 1%) was administered in infinite doses under nonoccluded conditions. Samples from the receptor compartment (300 μL) were taken at regular time intervals of 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, and 6 h. Samples were analyzed and quantified using the HPLC method described in the previous section.

After drug quantification, the following permeation parameters were calculated: transmucosal flux (J , $\mu\text{g/cm}^2 \text{ h}$) (Equation (3)), permeability coefficient (Kp , cm/h) (Equation (4)), lag time (T_{lag} , h) (obtained by linear extrapolation of the x -axis of the points at steady state), diffusion parameter (Dif , $1/\text{h}$) (Equation (5)), and partition parameter (P , cm/h^2) (Equation (6)).

$$J = \frac{dQ}{dT \cdot S'} \quad (1)$$

where J is the transdermal flux, dQ is the difference in the amount permeated, dT is the time differential, and S is the membrane diffusion surface.

$$Kp = \frac{J}{C_d'} \quad (2)$$

where C_d ($\mu\text{g/mL}$) is the concentration of the drug in the donor compartment.

$$Dif = \frac{1}{6T_{lag}} \quad (3)$$

$$P = \frac{Kp}{Dif} \quad (4)$$

2.12 Determination of the Concentration Retained in the Pig Vagina

After the permeation studies, the retained D was extracted from the mucosal sections. The mucosa that had come in contact with the formulation was cut into 4 equal pieces (approximately 50 mg each) per Franz cell for introduction into the MagNa Lyser instrument (Roche, Sant Cugat del Valles, Spain) with 1 mL of mobile phase. Homogenization of the tissue was carried out with 5 cycles of 90 s each at 6500 rpm. Finally, the samples were analyzed using the HPLC method [21].

3. Results and Discussion

3.1 Antifungal Susceptibility Testing

The susceptibility of different species of *Candida* to D was determined in vitro by the microdilution broth method after 48 h of treatment in two different media. The results are presented in Table 4.

Table 4. Summary of the MICs ($n = 3$) for disulfiram with three different species of *Candida* using two different test media.

<i>Candida</i> spp.	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
	Test Media	
	RPMI 1640	Sabouraud Dextrose
<i>C. albicans</i>	2	2
<i>C. glabrata</i>	4	2
<i>C. parapsilosis</i>	8	8

RPMI 1640 with MOPS is the medium proposed by CLSI, but the suitability of this medium for D is not well known. To determine if RPMI is adequate, we compared the results with this medium with the results with Sabouraud dextrose, a medium classically

used for yeast testing [38,39]. In general, good agreement was obtained between the MIC values with the two different media, confirming the suitability of RPMI 1640.

Regarding the MIC values obtained with RPMI 1640, D was effective against the three species tested at concentrations ranging from 2 to 8 µg/mL. These results correlate well with published data, reporting MIC values ranging from 2 to 8 µg/mL for *C. albicans* (ATCC 90028 and 36082), 16 µg/mL for *C. parapsilosis* (ATCC 22019), and 4 µg/mL for *N. glabrata* (ATCC 90030) [40,41]. The differences in the results could be due to the different strains used from different isolation sources. Furthermore, conventional antifungal (amphotericin B) was used as the control for the yeast susceptibility method. CLSI guidelines suggest that comparing the MICs of different antifungals should not be based solely on the numerical value but rather on how far the MIC is from the breakpoint [27]. Regarding D, there are no defined clinical breakpoints because there are no published data on natural mutants resistant to it. Therefore, it was difficult to use the classical approach to compare D activity with other antifungals.

The key aspects of the disulfiram mode of action that could explain its antifungal activity can be understood by two effects. First, disulfiram is a chelator agent that can sequester copper and consequently alter various metabolic pathways in cells; and second, D has an affinity for the thiol groups of cysteine residues in several cellular targets [21,22]. D may be considered a potential agent for the treatment of candidiasis. Moreover, it has been noted that D inhibits the activities of ABC drug transport proteins that are associated with antifungal resistance [17]. Therefore, its synergism with other antifungals could be an option, and inhibition of ATP pumps would probably result in an increase in the intracellular concentration of the second drug, thus making the second drug, such as an azole, more effective in candidiasis therapy. Additional studies should be carried out to examine this possible effect in clinically relevant strains.

3.2 Preparation and Statistical Design to Evaluate the Effect of Experimental Variables on the Mucoadhesive Gel Properties

Once the interesting antifungal properties of D were examined, a novel vaginal placebo formulation was developed to increase mucoadhesion with the vaginal epithelium. Mucoadhesion is defined as the interaction between a synthetic or natural polymer and a mucin surface. It can be affected by different factors, including molecular weight, hydrophilicity, crosslinking, swelling, pH, and polymer concentration [42]. Polymer concentration is an important factor, as there is an optimal concentration at which mucoadhesion reaches a maximum [43]. Additionally, polymers affect the mechanical and rheological properties of the formulation; therefore, controlling the concentration of the polymer combination is important to allow the formulation to adapt to its site of application and ensure appropriate efficacy [44].

PEG-90M was selected as the polymer because of its mucoadhesive properties, its biocompatibility, and its approval by different pharmacopoeias. In addition, PEG-90M presents controlled release properties, especially when used in solid oral dosage formulations [45]. Carrageenan is an anionic polymer with sulfate functional groups that can crosslink with monovalent cations (i.e., sodium and potassium) [46,47]. Carrageenan was selected because it can interact with these ions in the vaginal fluid and increase the hydrogel strength and the residence time in situ, avoiding possible loss of the formulation. Both components have been widely used for vaginal administration of other antimicrobial agents [48–52], including antimicrobial properties for carrageenan [53,54]. This combination has not been described and is of great interest due to the different and complementary mucoadhesion mechanisms of both polymers. Furthermore, due to the hydrophobic nature of D, 20% w/w HPCD was added to the formulation.

To study the effects of the polymers on the formulation properties (viscosity and mucoadhesion), the percentages of PEG-90M and carrageenan were modified between 0.50% w/w and 1.50% w/w and 1.00% w/w and 2.00% w/w, respectively. As shown in Table 5, thirteen formulation batches were produced, and the viscosity, mucoadhesion,

and amount of adhered fluorescein were characterized for each of them. Fluorescein was selected as the model drug, representing the opposite case compared with D because fluorescein is a hydrophilic compound that would be more easily removed from the formulation when SVF passes over. The viscosity and mucoadhesion were measured with and without SVF to evaluate the effect of carrageenan crosslinking.

Table 5. Influences of PEG-90M and carrageenan on the physicochemical parameters.

Batch	PEG-90M (% w/w)	Carrageenan (% w/w)	Viscosity (cP)	Viscosity with SVF (cP)	Mucoadhesion (mN/cm ²)	Mucoadhesion with SVF (mN/cm ²)	Adhered Fluorescein (%)
LP-83	0.50	1.50	19,910	16,170	50.6	60.5	91.40
LP-84	2.00	1.50	61,660	39,350	65.3	79.3	99.64
LP-86	1.25	2.00	52,840	31,360	71.9	80.9	99.50
LP-87	1.25	1.50	38,000	27,070	67.3	70.8	99.52
LP-88	1.25	1.50	33,170	22,210	57.4	58.1	99.60
LP-89	1.25	1.50	27,890	21,730	59.4	61.8	99.59
LP-90	1.25	1.50	33,370	25,070	65.5	68.2	99.43
LP-91	1.25	1.50	32,260	23,250	53.6	63.3	99.60
LP-92	1.78	1.14	29,750	26,180	47.9	50.3	97.33
LP-93	0.72	1.85	20,100	16,790	48.3	51.9	98.10
LP-94	0.72	1.14	4720	10,490	34.9	38.8	90.28
LP-95	1.78	1.85	87,280	40,590	64.8	74.9	99.54
LP-96	1.25	1.00	10,000	13,690	38.4	47.8	92.42

As shown in Table 5, the addition of SVF reduced the formulation viscosity in most cases, probably due to a dilution effect, and the effect of the crosslinking effect was now observed. In contrast, the addition of SVF increased the mucoadhesion of the formulation, although the dilution effect (seen with viscosity), mucoadhesion, and viscosity under simulated physiological conditions (in the presence of vaginal fluid) were not correlated.

First, the relationships among the different variables were studied by means of a correlation matrix (Figure 3). This study also tried to reduce the variables in the experimental design and remove highly correlated variables to avoid statistical redundancy.

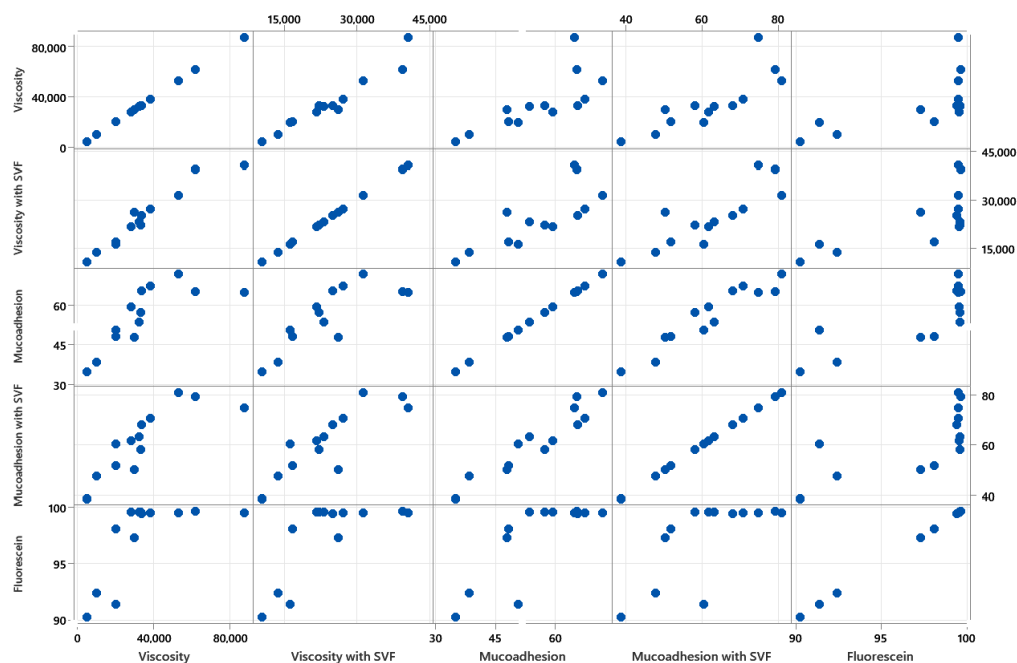


Figure 3. Matrix plots explaining the relationships between the different variables.

As Figure 3 shows, mucoadhesion and mucoadhesion with SVF presented a linear relationship. Therefore, because the formulation was applied to the vaginal epithelium, which contains vaginal fluid, the mucoadhesion data without SVF were discarded. The same effect was observed with viscosity, but in this case, viscosity without SVF was

chosen because viscosity is related to the administration device (syringe or canula), and as previously seen, there was no relationship between the viscosity and mucoadhesion of the formulation. Finally, fluorescein adhesion did not present a linear relationship.

Surface response methodology was applied using Minitab software (with a significance level of $\alpha = 0.05$ for the level terms) to evaluate the effects of the tested experimental variables (mucoadhesion with SVF, viscosity, and fluorescein adhesion). The fitted response surface model equations are shown in Table 6. Model selection was based on the adjusted R^2 , which takes into account the different parameters of the nested models. The high R^2 value of the final equation indicates that it described most of the experimental variability [55].

Table 6. Response surface model equations for monitoring the effect of polymer concentration on the properties of mucoadhesive gels.

Quadratic Polynomial Model Equation	R^2	Adj R^2
$Y_1 = -0.8 + 14.40 X_1 + 29.88 X_2$	0.702	0.642
$Y_2 = 24,704 - 48,649 X_1 - 23,052 X_2 + 56,200 X_1 X_2$	0.945	0.927
$Y_3 = 28.85 + 32.60 X_1 + 56.06 X_2 - 6.652 X_{12} - 13.21 X_{22} - 7.48 X_1 X_2$	0.987	0.978

X_1 : Concentration (% *w/w*) of PEG-90M; X_2 : concentration (% *w/w*) of carrageenan. Y_1 : mucoadhesion with SVF (mN/cm^2), Y_2 : Viscosity (cPs), Y_3 : fluorescein adhered (%).

The amounts of PEG-90M and carrageenan were significant with respect to mucoadhesion with SVF ($p = 0.017$ and $p = 0.003$, respectively). By increasing the amount of polymer, the mucoadhesion increased (Figure 4), as expected. As more polymer was included in the formulation, there were more interactions with mucin, probably due to the formation of hydrogen bonds. The coefficient X_2 is higher than X_1 , as shown in Table 6, so the effect of carrageenan on mucoadhesion is more important than that of PEG, probably due to the crosslinking effect with monovalent ions in SVF.

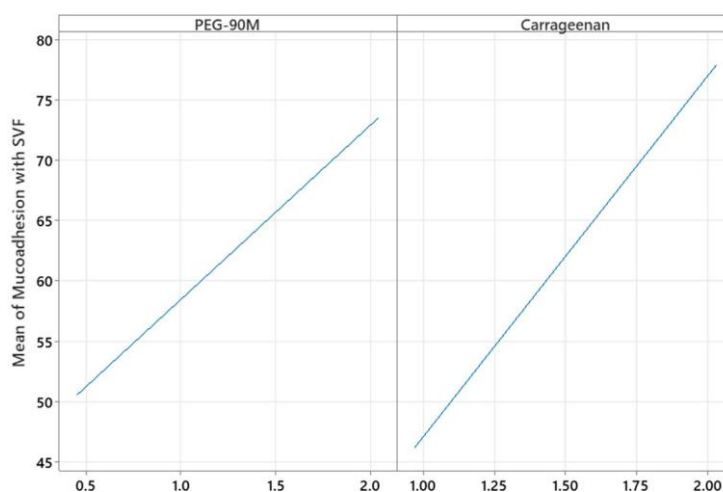


Figure 4. Plots of the main effects of PEG-90M and carrageenan on the mucoadhesive properties of the gels.

Regarding viscosity, a similar effect was observed. The levels of PEG-90M and carrageenan and the interaction between the two variables were significant ($p = 0.000$, $p = 0.000$, and $p = 0.006$, respectively). By increasing the polymer concentrations, the viscosity increased (Figure 5A). In this case, the concentration of PEG-90M had a more significant effect on the viscosity values. Both PEG-90M and carrageenan can form hydrogen bonds; so, the interaction between them influences viscosity. As Figure 5B shows, even though the interaction between the polymers is significant, the viscosity is proportional to the range of polymer concentrations used.

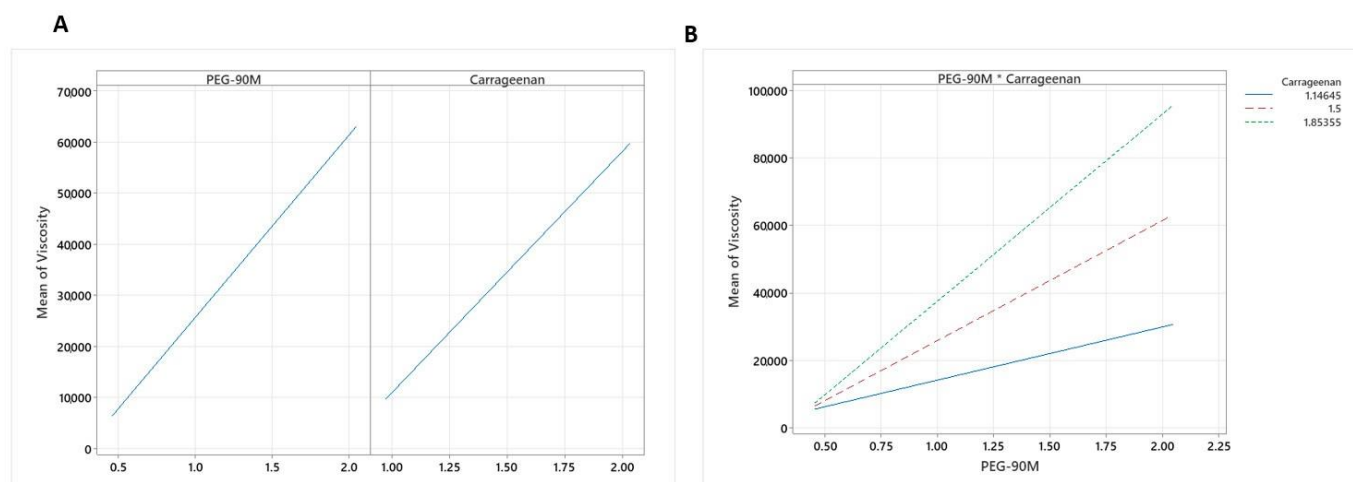


Figure 5. (A) Plots of the main effects of PEG-90M and carrageenan on the viscosity (mPa·s) of the gels. (B) Viscosity interaction point.

In the case of fluorescein adhesion, a quadratic relationship was obtained (Figure 6A), and a significant interaction between the studied variables was found (Figure 6B). There is a maximum level of adherence (expressed as the fluorescein remaining in the formulation) that decreases at high concentrations of polymer. There is an optimal concentration at which mucoadhesion is maximized. This observed effect may be due to diffusion theory; when the concentration of polymer is high (especially carrageenan because it has a larger spatial conformation than PEG-90M), the interpenetration of the polymeric chains with mucin is hindered, establishing weaker mucoadhesion.

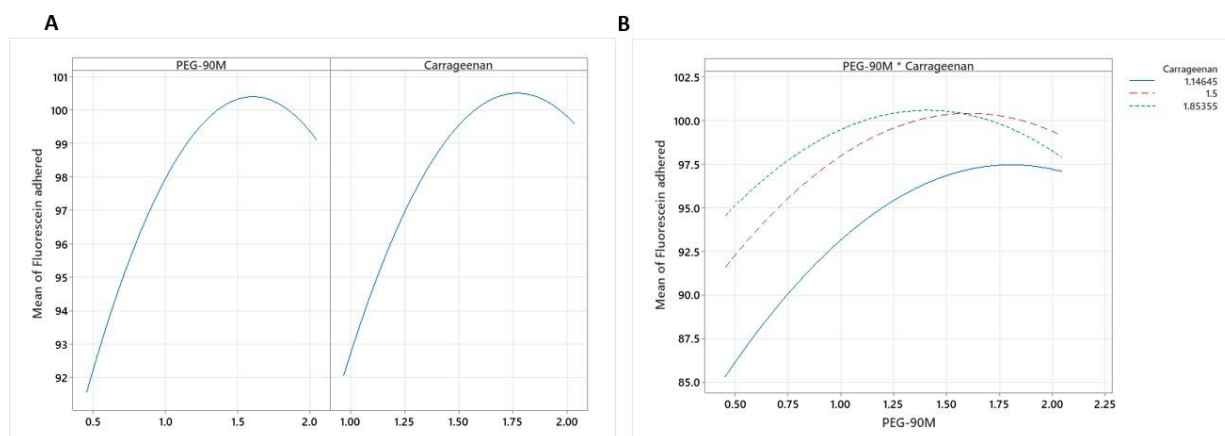


Figure 6. (A) Plots of the main effects of PEG-90M and carrageenan on fluorescein adhesion. (B) Fluorescein adhesion interaction plot.

3.3 Optimization of the Mucoadhesive Gels

Considering the high R^2 values from the obtained model, statistical optimization of the formulation was carried out to obtain maximum mucoadhesion and fluorescein adhesion effect and minimal viscosity (to facilitate administration). To obtain maximum mucoadhesion and minimum viscosity (to facilitate syringeability), within the design space limits, the independent variables were optimized. As shown in Table 7, to obtain a mucoadhesion value of >70 mN/cm², viscosity of 33,824 cP, and fluorescein adherence of 98.42%, it is necessary to use 0.866% PEG-90M and 2% carrageenan.

Table 7. Prediction of polymer concentrations for a formulation with maximum mucoadhesion and fluorescein adhesion and minimal viscosity.

PEG-90M	Carrageenan	Fluorescein Adhesion Fit	Mucoadhesion with SVF Fit	Viscosity Fit	Composite Desirability
0.866	2	98.42	71.46	33,824	0.76

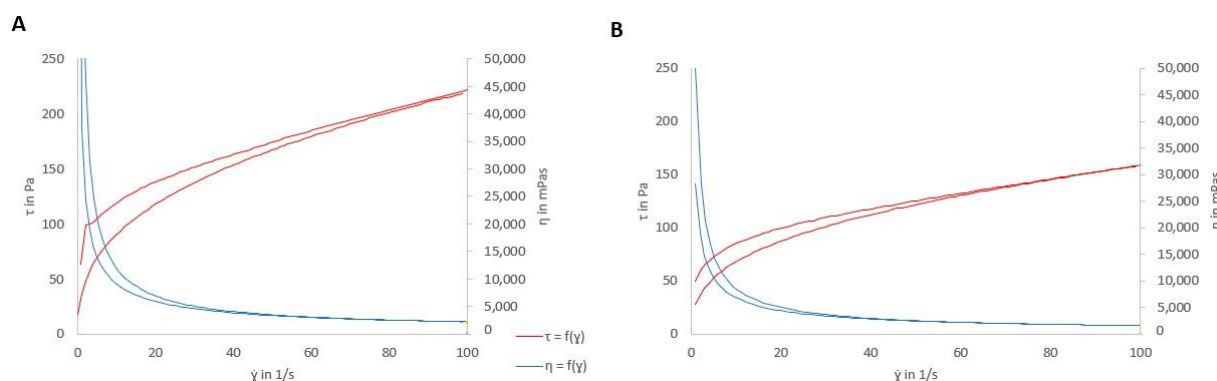
The quality by design study was carried out with the placebo. To check if the inclusion of the drug affected the dependent variables, three additional batches (placebo, 0.5%, and 1% D gel) were produced with the optimized formula (0.866% PEG-90M and 2% carrageenan). The results, as well as model predictability and bias from the theoretical predictions, are reported in Table 8. All obtained results were in the 95% confidence interval (CI), and the bias was <10% in all cases.

Table 8. Results after characterization of the final formulations with bias with respect to the theoretical value.

Property	Theoretical Value (95% CI)	Placebo Gel	0.5% D Gel	1% D Gel	Bias (%)
Mucoadhesion (mN/cm ²)	71.5 (60.85; 82.07)	72.9	68.2	69.4	1.86
Viscosity (cP)	33,824 (22,885; 44,763)	29,835	30,400	32,780	8.30
Fluorescein adhered (%)	98.42 (97.23; 99.62)	98.67	98.58	98.81	0.27

3.4 Rheological Properties

As there are small differences in viscosity between the optimized placebo formula and the formulations with D, the following characterization was carried out with the placebo. The rheological behavior was studied with and without SVF (Figure 7).

**Figure 7.** (A) Shear stress vs. shear rate (red) and viscosity vs. shear rate (blue) curves of the placebo formulation. (B) Shear stress vs. shear rate (red) and viscosity vs. shear rate (blue) curves of the placebo formulation with SVF.

As Figure 7 shows, the formulation presented thixotropy (area of 29.56 Pa/s), and thus the system required more time to recover its original internal structure. The same characteristics were observed for the placebo gel with SVF but with a lower thixotropic area (17.95 Pa/s). Additionally, the viscosity values under the experimental conditions were 2212 ± 10.22 mPa·s and 1586 ± 2.75 mPa·s with and without SVF, respectively. The reduction in viscosity and apparent thixotropy were probably due to the dilution effect of SVF.

Figure 7 shows the possible pseudoplastic behavior of the tested formulation (with and without SVF) due to the apparent viscosity decrease with an increasing shear rate. To

confirm the rheological behavior, the experimental data were fit to different equations, as shown in Table 9. A lower Chi^2 and a higher correlation factor represent the best fit. The model that best fits the experimental data is the Cross equation, which is usually employed to describe the rheological behavior of pseudoplastic materials with yield stress values [56].

Table 9. Rheological models with Chi^2 and r values for the placebo gel and placebo gel with SVF.

Rheological Model	Placebo Gel		Placebo Gel with SVF	
	Chi^2	r	Chi^2	r
Newton	1.773×10^5	0.326	1.004×10^5	-0.137
Bingham	1.147×10^4	0.970	6127	0.968
Ostwald–de Waele	8.997	1.000	13.18	0.999
Herschel–Bulkley	7.020	1.000	12.900	0.999
Casson	9.220	0.988	1791	0.991
Cross	1.164	1.000	1.359	1.000

The Cross equation is a versatile equation that can estimate different models that converge into simpler models based on different assumptions. Table 10 shows the Cross equation parameters, where for shear-thinning materials, the value of n is between zero and one. In this case, the n values of the gels with and without SVF were lower than one, which confirms the pseudoplastic profile [56]. The placebo gel without SVF showed a higher viscosity at zero shear than with SVF due to the dilution effect of SVF. In contrast, the η_∞ in both cases were very similar, indicating that the gels converged toward similar viscosities at high flow rates with extremely small values compared to the viscosities described previously (2212 and 1586 $\text{mPa} \times \text{s}$). According to γ value, the placebo gels without SVF were less shear-thinning than they were with SVF. The rheological flow properties of polymers depend on the structural parameters; in this case, SVF crosslinks with carrageenan, affecting the rheological behavior of the gel.

Table 10. Rheological model fitting of the placebo gels with and without SVF.

Cross Equation Parameter	Placebo Gel	Placebo Gel with SVF
η_0	318.7	141.9
η_∞	0.1517	0.1600
$\dot{\gamma}$	0.0422	0.1235
N	0.6488	0.6853

In addition, a viscoelasticity study was carried out to evaluate the internal structure of the formulation and the effect of SVF on it. Figure 8 and Table 11 show the viscoelasticity parameters (storage modulus G' and loss modulus G'').

The formulations behaved as solid-like products ($G' > G''$), and this value was confirmed by $\tan(\delta) < 1$. The loss tangent ($\tan \delta$) is a measure of the energy lost to stored energy during cyclic deformation ($\tan \delta = G''/G'$). A value of $\tan \delta < 1$ indicates prevalent elastic behavior [57]. In this case, the same value of $\tan \delta$ was obtained for both formulations, and it was < 1 . The values of both the storage and complex moduli increased in the presence of SVF. When SVF was added to the gel, G'' remained essentially the same as that without SVF, but G' increased. Carrageenan crosslinking with the monovalent ions of SVF forms a more rigid structure, and therefore, the storage modulus is higher than that without SVF. Despite the increasing values with SVF, the proportion was maintained, and therefore, the value of δ was the same in both cases.

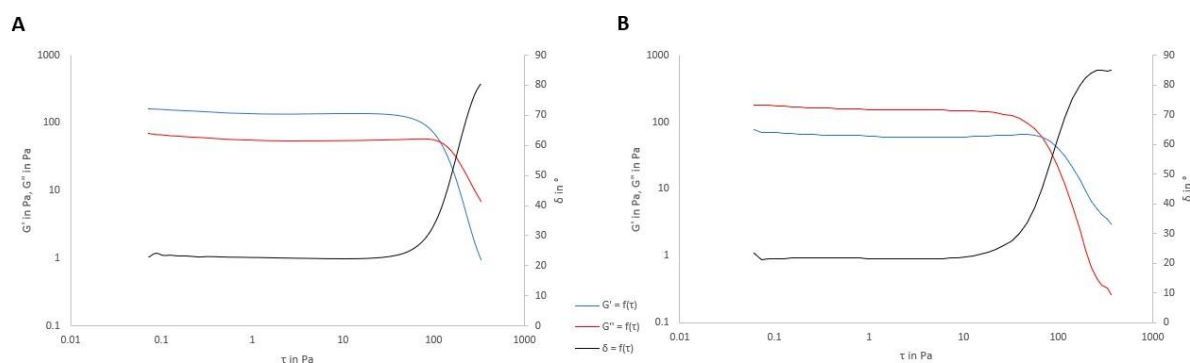


Figure 8. Storage modulus, loss modulus, and phase angle during the sweep stress test on the mucoadhesive gel 24 h after preparation at a frequency of 1 s^{-1} . **(A)** Placebo Gel. **(B)** Placebo Gel with SVF.

Table 11. Viscoelasticity parameters of the Placebo Gel and Placebo Gel with SVF (mean \pm standard deviation (SD)).

Parameter	Formulation	Mean \pm SD
G'	Placebo gel	$129.92 \pm 25.20 \text{ Pa}$
	Placebo gel with SVF	$149.66 \pm 25.33 \text{ Pa}$
G''	Placebo gel	$57.90 \pm 4.60 \text{ Pa}$
	Placebo gel with SVF	$63.67 \pm 4.01 \text{ Pa}$
η^*	Placebo gel	$22,709 \pm 3657 \text{ mPa}$
	Placebo gel with SVF	$25,947 \pm 3649 \text{ mPa}$
δ	Placebo gel	$24.20 \pm 4.46^\circ$
	Placebo gel with SVF	$23.67 \pm 5.07^\circ$
$\tan(\delta)$	Placebo gel	0.45 ± 0.11
	Placebo gel with SVF	0.44 ± 0.08

Under an external force, molecular chain orientation is caused by internal friction. When the molecular weight is lower than a certain value, there is a crossover point between the G' and G'' curves, which means that there is a balance between the states of internal friction and disorientation. With an increase in molecular weight, the crossover point moves to a lower frequency because of restricted disorientation. This lower frequency allows sufficient time for molecular orientation. Therefore, the higher molecular weight molecules need more time for molecular orientation. In summary, the crossover point data demonstrate that the molecular weight decreases with an increase in frequency and polydispersity increases with a decrease in frequency [58]. In this case, as Figure 8 shows, the crossing point is higher without SVF (approximately $\tau = 140 \text{ Pa}$) than with SVF (approximately 75 Pa). With SVF, sodium ions intercalated into the carrageenan chains, increasing their rigidity and producing a more restricted orientation, so the value of τ was lower.

3.5 Syringeability of the Formulations

Syringeability (the force required to extrude a formulation through a syringe) is another important parameter for practical administration with a syringe [50]. In this case, the time needed to empty the syringe was determined with the placebo formulation, which was $3.04 \pm 0.0058 \text{ s}$.

The time and force needed to empty the syringe were acceptable and would allow for the easy application of the product to the vaginal area.

3.6 In Vitro Release of Disulfiram from the Gel

The release of disulfiram from the 0.5% and 1% mucoadhesive gels is depicted in Figure 9. After 6 h, 80% of D was released from the 0.5% gel, while more than 90% was released from the 1% gel.

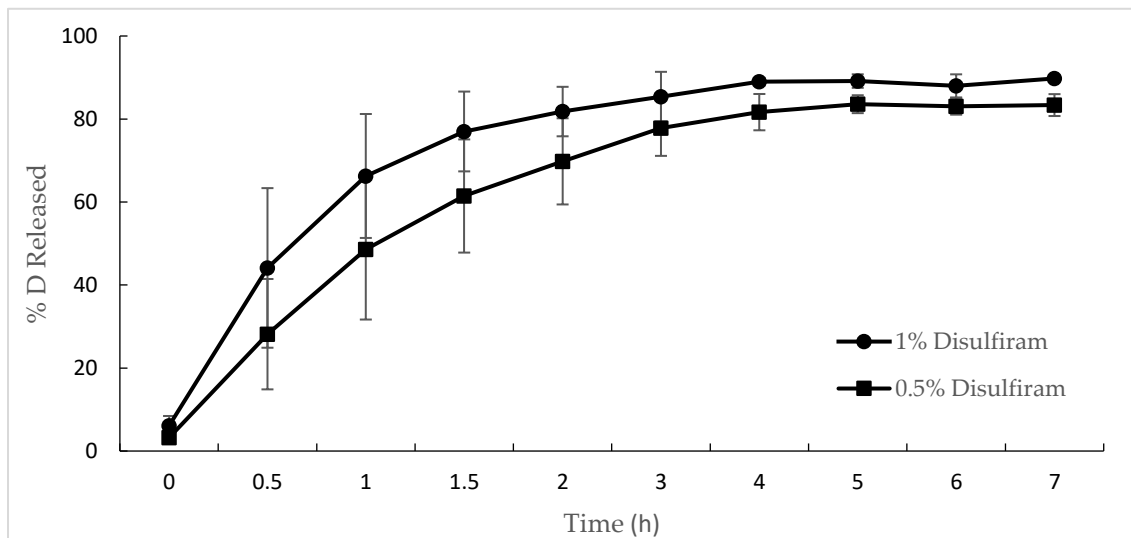


Figure 9. Release of disulfiram from the 0.5% gel and from the 1% gel. Mean of the quantities released of D expressed as a percentage respect total amount seeded from the 0.5% gel and from the 1% gel after 6 h in vitro.

After fitting the mean release data to the different mathematical models (Table 12), it was observed that the first-order model provided the best fit (AIC 30.16, adj R^2 99.78%) of the experimental data in the case of the 0.5% (w/w) gel formulation, whereas the Weibull model best fit the data from the 1% (w/w) D gel (AIC 55.19, adj R^2 97.33%).

Table 12. Individual models and parameters for the release of D from the 0.5 and 1% gels.

Formulation	Model	Parameters	Value
0.5% D gel	First-Order	K_1 (h^{-1})	0.95 ± 0.48
		F_{max} (%)	85.79 ± 2.13
1% D gel	Weibull	α	0.88 ± 0.43
		β	0.73 ± 0.23
		F_{max} (%)	93.42 ± 3.21

Once the mean release kinetic behaviors were determined, the means and standard deviations of the individual release data for both gels were calculated, as reported in Table 12.

The first-order model confirmed that the D release mechanism from the 0.5% (w/w) gel was diffusion, according to Fick's Law [33,51]. However, the Weibull model was a nonmechanistic equation. Papadopoulou et al. [51] determined a relationship between the shape parameter β and the release mechanism. In the case of the 1% (w/w) D gel, the value of β was 0.73, which corresponds to the Fick diffusion release mechanism ($\beta < 0.75$). The release from both formulations, despite being explained by different models, present the same release mechanism.

3.7 Pig Vagina Permeation

In vivo permeation tests were performed with pig vagina and the 0.5% (w/w) and 1% (w/w) D gels ($n = 4$). Figure 10 shows the permeation profiles of the tested formulations, and the permeation parameters are listed in Table 13.

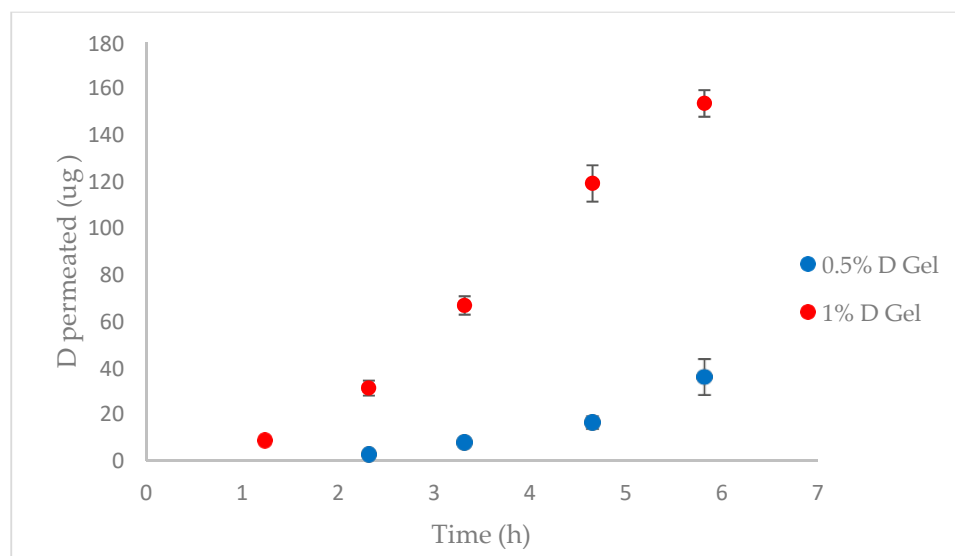


Figure 10. Pig vagina permeation profiles after administration of the 0.5% and 1% D gels ($n = 4$).

Table 13. Mean parameters of D permeation after gel application to pig vagina.

Formulation	Parameter	Mean	SD
0.5% D gel	J_{sup} ($\mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{cm}^2$)	9.0106	0.6562
	R^2	0.9113	0.0445
	K_p (cm/h)	0.2481	0.0181
	T_{lag} (h)	2.2834	0.6721
	P (cm/h ²)	3.4376	1.2485
	Dif (1/h)	0.0763	0.0225
1% D gel	J_{sup} ($\mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{cm}^2$)	32.9769	1.1737
	R^2	0.9913	0.0001
	K_p (cm/h)	0.4542	0.0162
	t_{lag} (h)	1.1698	0.0514
	P (cm/h ²)	3.1851	0.0265
	Dif (1/h)	0.1426	0.0063

D had a good permeation profile, achieving a steady state within the first hour after administration of the 1% D gel ($T_{lag} = 1.17$ h) and within the second hour for the 0.5% D gel ($T_{lag} = 2.28$ h). The observed mucosal absorption was probably caused by the favorable physicochemical properties of the compound according to Lipinski's rule of five [59]: low molecular weight (296 Da), $\log p$ value of 3.88, melting point under 200 °C (71.5 °C), and fewer than five hydrogen bond donors and acceptors [20]. The partition parameter (P) of the API between the gel and the vaginal mucosa revealed that this is the factor that affects the vaginal permeation of both formulations the most. The p value obtained was very similar for the 0.5 and 1% gels because it is an independent factor of the D concentration. In this case, the diffusion coefficient had a low contribution to D permeability, and the concentration effect was more noticeable for the 1% formulation according to Fick's Law. Even though D permeates, as previously noted, D has classically been used orally as a treatment for alcoholism and has been reported to have a good safety profile during clinical use.

In other permeation studies involving human and pig skin, D showed a lack of permeability [21,22]. These differences are due to the nonkeratinization of the vaginal epithelium, and the increase in surface area provided by the transversal rugae of the mucosa would also increase drug absorption across this tissue [60]. Generally, porcine vaginal tissue seems to be a good in vivo permeability model for extrapolation to human

vaginal tissue due to substantial histological similarities (stratified squamous epithelium supported by connective tissue) [61–63].

3.8 Disulfiram Concentration Retained in the Pig Vagina

Candida affects the vaginal epithelium and has the capacity to adhere to epithelial cells and penetrate into the tissue. Especially important, in recurrent candidiasis, vaginal relapse following incomplete organism eradication after treatment is a mechanism by which chronification occurs. Furthermore, colonization of the vaginal epithelium facilitates the formation of a yeast reservoir or a source for future infections [8]. Given that our target is the vaginal epithelium, the drug content in the vagina was determined. After permeation studies, the tissue was cut into 50 mg pieces, and these pieces were homogenized with mobile phase using a MagNa Lyser instrument. After HPLC analysis, the mean amount of drug detected in the tissue after administration of the 0.5% D gel was $36.48 \pm 2.50 \mu\text{g}$ and was $87.73 \pm 3.12 \mu\text{g}$ for the 1% D gel. Considering the vaginal density (1 g/mL due to the high water content), the mean D concentrations obtained were 138.17 $\mu\text{g/mL}$ and 268.67 $\mu\text{g/mL}$, respectively. These concentrations are still higher than the MIC values (2–8 $\mu\text{g/mL}$), confirming the suitability of D for treating vaginal infections, including those in the deeper mucosal layers or recurrent cases.

4. Conclusions

Disulfiram was revealed to be effective against different *Candida* species and is a potential alternative to classic antifungals for the treatment of fungal infections. In this study, disulfiram mucoadhesive gels were prepared successfully for the treatment of vaginal candidiasis. Formula optimization has allowed the development of gels with suitable physicochemical characteristics that facilitate vaginal administration, improving the residence time, patient compliance, appearance of resistance, and typical limitations of conventional vaginal drug delivery systems and traditional antifungals. Furthermore, after gel characterization, the optimized formulation was shown to have appropriate adhesiveness, syringeability, and mucoadhesiveness. Additionally, the rheological behavior revealed the pseudoplastic flow of the gels. The developed gel showed promising in vitro release, with more than 70% release of it in the first 5 h. According to in vitro distribution studies, the drug concentration in vaginal tissue was higher than the MIC value, making D potentially effective for the treatment of candidiasis. However, the clinical implementation of D has encountered some challenges. Further research should be carried out, and an exploration of the molecular mechanism of disulfiram as an antifungal agent is needed. Taken together, these results suggest that disulfiram mucoadhesive gels could be a good option as an alternative treatment for vaginal candidiasis.

Author Contributions: Conceptualization, F.F.-C., M.L.C. and M.A.C.; methodology, M.L.-R., I.N.-S., F.F.-C., M.L.C., J.S.-C. and M.M.; validation, M.L.-R. and I.N.-S.; formal analysis, M.L.-R. and I.N.-S.; investigation, M.L.-R.; resources, F.F.-C., M.L.C. and M.M.; data curation, M.L.-R., F.F.-C., M.L.C. and M.A.C.; writing—original draft preparation, M.L.-R.; writing—review and editing, M.L.-R., F.F.-C., M.L.C. and M.A.C.; visualization, M.L.-R. and M.A.C.; supervision, F.F.-C., M.L.C. and M.A.C.; project administration, F.F.-C., M.L.C. and M.A.C.; funding acquisition, F.F.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Generalitat of Catalonia, Industrial Doctorate Program, grant number 2020 DI 97.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available upon request due to intellectual property.

Acknowledgments: We thank the valuable contribution of Mari Carmen Moreno (Laboratory Reig Jofre, Sant Joan Despí, Barcelona, Spain).

Conflicts of Interest: M.L.-R. and I.N.-S. are employees of Laboratory Reig Jofre. They belong to the R&D department and do not participate in marketing or commercial activities. The data presented were conducted under general good laboratory practices. The other authors do not declare any conflicts of interest.

References

- Johal, H.S.; Garg, T.; Rath, G.; Goyal, A.K. Advanced topical drug delivery system for the management of vaginal candidiasis. *Drug Deliv.* **2016**, *23*, 550–563. [CrossRef] [PubMed]
- Ceccarani, C.; Foschi, C.; Parolin, C.; D’antuono, A.; Gaspari, V.; Consolandi, C.; Laghi, L.; Camboni, T.; Vitali, B.; Severgnini, M.; et al. Diversity of vaginal microbiome and metabolome during genital infections. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 14095. [CrossRef] [PubMed]
- Pérez-González, N.; Febrer, N.B.-D.; Calpena-Campmany, A.C.; Nardi-Ricart, A.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Morales-Molina, J.A.; Soriano-Ruiz, J.L.; Fernández-Campos, F.; Clares-Naveros, B. New formulations loading caspofungin for topical therapy of vulvovaginal candidiasis. *Gels* **2021**, *7*, 259. [CrossRef] [PubMed]
- Rodríguez-Cerdeira, C.; Gregorio, M.C.; Molares-Vila, A.; López-Barcenas, A.; Fabbrocini, G.; Bardhi, B.; Sinani, A.; Sánchez-Blanco, E.; Arenas-Guzmán, R.; Hernandez-Castro, R. Biofilms and vulvovaginal candidiasis. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *174*, 110–125. [CrossRef]
- Felix, T.C.; de Brito Röder, D.V.D.; dos Santos Pedroso, R. Alternative and complementary therapies for vulvovaginal candidiasis. *Folia Microbiol.* **2018**, *64*, 133–141. [CrossRef]
- Gonçalves, B.; Ferreira, C.; Alves, C.T.; Henriques, M.; Azeredo, J.; Silva, S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Crit. Rev. Microbiol.* **2015**, *42*, 905–927. [CrossRef]
- Mtibia, L.; Fakhfakh, N.; Kallel, A.; Belhadj, S.; Salah, N.B.; Bada, N.; Kallel, K. Les candidoses vulvovaginales: Étiologies, symptômes et facteurs de risque. *J. Mycol. Med.* **2017**, *27*, 153–158. [CrossRef]
- Ravani, L.; Esposito, E.; Bories, C.; Moal, V.L.-L.; Loiseau, P.M.; Djabourov, M.; Cortesi, R.; Bouchemal, K. Clotrimazole-loaded nanostructured lipid carrier hydrogels: Thermal analysis and in vitro studies. *Int. J. Pharm.* **2013**, *454*, 695–702. [CrossRef]
- Sobel, J. Current treatment options for vulvovaginal candidiasis. *Women’s Health* **2005**, *1*, 253–261. [CrossRef]
- Azie, N.; Angulo, D.; Dehn, B.; Sobel, J.D. Oral Ibrexafungerp: An investigational agent for the treatment of vulvovaginal candidiasis. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **2020**, *29*, 893–900. [CrossRef]
- Mei, L.; Chen, J.; Yu, S.; Huang, Y.; Xie, Y.; Wang, H.; Pan, X.; Wu, C. Expandable thermal gelling foam aerosol for vaginal drug delivery. *Drug Deliv.* **2017**, *24*, 1325–1337. [CrossRef] [PubMed]
- Sauna, Z.E.; Shukla, S.; Ambudkar, S.V. Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. *Mol. Biosyst.* **2005**, *1*, 127–134. [CrossRef] [PubMed]
- Sobel, J.D.; Sobel, R. Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant *Candida* species. *Expert Opin. Pharmacother.* **2018**, *19*, 971–977. [CrossRef] [PubMed]
- Prasad, R.; Nair, R.; Banerjee, A. Multidrug transporters of *Candida* species in clinical azole resistance. *Fungal Genet. Biol.* **2019**, *132*, 103252. [CrossRef] [PubMed]
- Bhattacharya, S.; Sae-Tia, S.; Fries, B.C. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. *Antibiotics* **2020**, *9*, 312. [CrossRef]
- Pristov, K.E.; Ghannoum, M.A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin. Microbiol. Infect.* **2019**, *25*, 792–798. [CrossRef]
- Shukla, S.; Sauna, Z.E.; Prasad, R.; Ambudkar, S.V. Disulfiram is a potent modulator of multidrug transporter Cdr1p of *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *322*, 520–525. [CrossRef]
- Sanglard, D.; Ischer, F.; Monod, M.; Bille, J. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 2300–2305. [CrossRef]
- Lu, C.; Li, X.; Ren, Y.; Zhang, X. Disulfiram: A Novel Repurposed Drug for Cancer Therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2021**, *87*, 159–172. [CrossRef]
- National Center for Biotechnology Information. Disulfiram: Chemical and Physical Properties. PubChem Compound Summary CID 3117. Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Disulfiram#section=Chemical-and-Physical-Properties> (accessed on 20 March 2023).
- Lajarin-Reinares, M.; Martínez-Esteve, E.; Pena-Rodr, E.; Cañellas-Santos, M.; Fernández-Campos, F. The Efficacy and Biopharmaceutical Properties of a Fixed-Dose Combination of Disulfiram and Benzyl Benzoate. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10969. [CrossRef]
- Lajarin-Reinares, M.; Pena-Rodríguez, E.; Cañellas-Santos, M.; Rosell-Vives, E.; Cortés, P.; Casas, M.L.; Calvo, M.À.; Fernández-Campos, F. Repurposing Disulfiram as an Antimicrobial Agent in Topical Infections. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1752. [CrossRef] [PubMed]
- Li, H.; Wang, J.; Wu, C.; Wang, L.; Chen, Z.S.; Cui, W. The combination of disulfiram and copper for cancer treatment. *Drug Discov. Today* **2020**, *25*, 1099–1108. [CrossRef] [PubMed]
- Das, S.; Garg, T.; Chopra, S.; Dasgupta, A. Repurposing disulfiram to target infections caused by non-tuberculous mycobacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 1317–1322. [CrossRef] [PubMed]

25. Sauna, Z.E.; Peng, X.H.; Nandigama, K.; Tekle, S.; Ambudkar, S.V. The Molecular Basis of the Action of Disulfiram as a Modulator of the Multidrug Resistance-Linked ATP Binding Cassette Transporters MDR1 (ABCB1) and MRP1 (ABCC1). *Mol. Pharmacol.* **2004**, *65*, 675–684. [[CrossRef](#)]
26. Owen, D.H.; Katz, D.F. A vaginal fluid simulant. *Contraception* **1999**, *59*, 91–95. [[CrossRef](#)]
27. M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition. Published online 2008. Available online: www.clsi.org (accessed on 7 September 2022).
28. Rex, J.H.; Cooper, C.R.; Merz, W.G.; Galgiani, J.N.; Anaissie, E.J. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 906–909. [[CrossRef](#)]
29. Villegas, I.; Rosillo, M.; Alarcón-De-La-Lastra, C.; Vázquez-Román, V.; Llorente, M.; Sánchez, S.; Gil, A.G.; Alcalde, P.; González, E.; Rosell, E.; et al. Amoxicillin and clarithromycin mucoadhesive delivery system for helicobacter pylori infection in a mouse model: Characterization, pharmacokinetics, and efficacy. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 153. [[CrossRef](#)]
30. Geonntti, A.R.; Katz, D.F. Compartmental transport model of microbicide delivery by an intravaginal ring. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 3514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Friedl, H.E.; Dünnhaupt, S.; Waldner, C.; Bernkop-Schnürch, A. Preactivated thiomers for vaginal drug delivery vehicles. *Biomaterials* **2013**, *34*, 7811–7818. [[CrossRef](#)]
32. Park, E.K.; Song, K.W. Rheological evaluation of petroleum jelly as a base material in ointment and cream formulations: Steady shear flow behavior. *Arch. Pharmacol. Res.* **2010**, *33*, 141–150. [[CrossRef](#)]
33. Venkatesh, M.P.; Kumar, T.P.; Pai, D.R. Targeted drug delivery of Methotrexate in situ gels for the treatment of Rheumatoid Arthritis. *Saudi Pharm. J.* **2020**, *28*, 1548–1557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zhang, Y.; Huo, M.; Zhou, J.; Zou, A.; Li, W.; Yao, C.; Xie, S. DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *AAPS J.* **2010**, *12*, 263–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Monica, L.L.; Jordi, G.; Francisco, F.C. In situ bioadhesive film-forming system for topical delivery of mometasone furoate: Characterization and biopharmaceutical properties. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *59*, 101852. [[CrossRef](#)]
36. Pena-Rodríguez, E.; Lajarin-Reinares, M.; Mata-Ventosa, A.; Pérez-Torras, S.; Fernández-Campos, F. Dexamethasone-loaded lipomers: Development, characterization, and skin biodistribution studies. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Amores, S.; Domenech, J.; Colom, H.; Calpena, A.C.; Clares, B.; Gimeno, Á.; Lauroba, J. An improved cryopreservation method for porcine buccal mucosa in ex vivo drug permeation studies using Franz diffusion cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *60*, 49–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kaomongkolgit, R.; Jamdee, K.; Wongnoi, S.; Chimnoi, N.; Techasakul, S. Antifungal activity of coronarin D against *Candida albicans*. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **2012**, *114*, 61–66. [[CrossRef](#)]
39. Radetsky, M.; Wheeler, R.C.; Roe, M.H.; Todd, J.K. Microtiter broth dilution method for yeast susceptibility testing with validation by clinical outcome. *J. Clin. Microbiol.* **1986**, *24*, 600–606. [[CrossRef](#)]
40. Khan, S.; Singhal, S.; Mathur, T.; Upadhyay, D.J.; Rattan, A. Antifungal potential of disulfiram. *Jpn. J. Med. Mycol.* **2007**, *48*, 109–113. [[CrossRef](#)]
41. Hao, W.; Qiao, D.; Han, Y.; Du, N.; Li, X.; Fan, Y.; Ge, X.; Zhang, H. Identification of disulfiram as a potential antifungal drug by screening small molecular libraries. *J. Infect. Chemother.* **2020**, *27*, 696–701. [[CrossRef](#)]
42. Shaikh, R.; Raj Singh, T.; Garland, M.; Woolfson, A.; Donnelly, R. Mucoadhesive drug delivery systems. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* **2011**, *3*, 89–100. [[CrossRef](#)]
43. Ahuja, A.; Khar, R.K.; Ali, J. Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* **1997**, *23*, 489–515. [[CrossRef](#)]
44. De Souza Ferreira, S.B.; Da Silva, J.B.; Volpato Junqueira, M.; Belincanta Borghi-Pangoni, F.; Gutterres Gomes, R.; Luciano Bruschi, M. The importance of the relationship between mechanical analyses and rheometry of mucoadhesive thermoresponsive polymeric materials for biomedical applications. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2017**, *74*, 142–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Resins, W. POLYOX® Water-Soluble Resins. *Chem. Eng. News Arch.* **1995**, *73*, 40. [[CrossRef](#)]
46. Da Silva, J.B.; de Ferreira, S.B.S.; Reis, A.V.; Cook, M.T.; Bruschi, M.L. Assessing Mucoadhesion in Polymer Gels: The Effect of Method Type and Instrument Variables. *Polymers* **2018**, *10*, 254. [[CrossRef](#)]
47. Vigani, B.; Rossi, S.; Gentile, M.; Sandri, G.; Bonferoni, M.C.; Cavalloro, V.; Martino, E.; Collina, S.; Ferrari, F. Development of a Mucoadhesive and an in Situ Gelling Formulation Based on κ -Carrageenan for Application on Oral Mucosa and Esophagus Walls. I.I. Loading of a Bioactive Hydroalcoholic Extract. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 153. [[CrossRef](#)]
48. Khazaeli, P.; Mehrabani, M.; Mosadegh, A.; Bios, S.; Zarehahi, R.; Hasan Moshafi, M. Formulation, Physicochemical, and Microbial Assay of Henna Oil Vaginal Suppository Formulated with Polyethylene Glycol Bases. *Iran. J. Med. Sci.* **2020**, *45*, 207. [[CrossRef](#)]
49. Kaewnopparat, S.; Kaewnopparat, N. Formulation and Evaluation of Vaginal Suppositories Containing *Lactobacillus*. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* **2009**, *55*, 117–120.
50. Pacheco-Quito, E.M.; Ruiz-Caro, R.; Rubio, J.; Tamayo, A.; Veiga, M.D. Carrageenan-Based Acyclovir Mucoadhesive Vaginal Tablets for Prevention of Genital Herpes. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 249. [[CrossRef](#)]
51. Elias, C.J.; Coggins, C.; Alvarez, F.; Brache, V.; Fraser, I.S.; Lacarra, M.; Lähteenmäki, P.; Massai, R.; Mishell, D.R.; Phillips, D.M.; et al. Colposcopic evaluation of a vaginal gel formulation of iota-carrageenan. *Contraception* **1997**, *56*, 387–389. [[CrossRef](#)]
52. Valenta, C.; Schultz, K. Influence of carrageenan on the rheology and skin permeation of microemulsion formulations. *J. Control. Release* **2004**, *95*, 257–265. [[CrossRef](#)]

53. Cha, D.S.; Choi, J.H.; Chinnan, M.S.; Park, H.J. Antimicrobial Films Based on Na-alginate and κ -carrageenan. *LWT* **2002**, *35*, 715–719. [[CrossRef](#)]
54. Seol, K.H.; Lim, D.G.; Jang, A.; Jo, C.; Lee, M. Antimicrobial effect of κ -carrageenan-based edible film containing ovotransferrin in fresh chicken breast stored at 5 °C. *Meat Sci.* **2009**, *83*, 479–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Kim, S.; Jeong, C.; Cho, S.; Kim, S.B. Effects of thermal treatment on the physical properties of edible calcium alginate gel beads: Response surface methodological approach. *Foods* **2019**, *8*, 578. [[CrossRef](#)]
56. Osswald, T.A.; Book, N.R. *Polymer Rheology Fundamentals and Applications*; Hanser Publications: Munich, Germany, 2015.
57. Madsen, F.; Eberth, K.; Smart, J.D. A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: The effect of mucoadhesive type and concentration. *J. Control Release.* **1998**, *50*, 167–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Gao, T.; Xie, R.; Zhang, L.; Gui, H.; Huang, M. Use of Rubber Process Analyzer for Characterizing the Molecular Weight Parameters of Natural Rubber. *Int. J. Polym. Sci.* **2015**, *2015*, 517260. [[CrossRef](#)]
59. Lipinski, C.A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2000**, *44*, 235–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Mohammed, Y.; Holmes, A.; Kwok, P.C.L.; Kumeria, T.; Namjoshi, S.; Imran, M.; Matteucci, L.; Ali, M.; Tai, W.; Benson, H.A.; et al. Advances and future perspectives in epithelial drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2022**, *186*, 1–38. [[CrossRef](#)]
61. Machado, R.M.; Palmeira-de-Oliveira, A.; Gaspar, C.; Martinez-de-Oliveira, J.; Palmeira-de-Oliveira, R. Studies and methodologies on vaginal drug permeation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *92*, 14–26. [[CrossRef](#)]
62. Squier, C.A.; Mantz, M.J.; Schlievert, P.M.; Davis, C.C. Porcine vagina Ex Vivo as a model for studying permeability and pathogenesis in mucosa. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 9–21. [[CrossRef](#)]
63. Van Eyk, A.D.; Van Der Bijl, P. Porcine vaginal mucosa as an in vitro permeability model for human vaginal mucosa. *Int. J. Pharm.* **2005**, *305*, 105–111. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN GENERAL

La resistencia a los antibióticos aumenta de forma notable y los avances en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos es lenta, costosa y, en muchas ocasiones, fallida, especialmente para las moléculas de síntesis (Berdigaliyev and Aljofan 2020). Por lo que el hallazgo de nuevas moléculas o la mejora de los antimicrobianos disponibles actuales es de suma importancia para combatir la nueva amenaza mundial. Ahora bien, la búsqueda de alternativas siempre debe ir acompañada de herramientas sociosanitarias complementarias, para poder asegurar que la eficacia se mantiene a lo largo del tiempo y del uso.

Como ya se ha indicado en el Capítulo I, la prevalencia y morbilidad de los trastornos infecciosos de piel y mucosas, junto con la creciente aparición de cepas resistentes en los principales patógenos de estas vías, hacen urgente la necesidad de buscar nuevas estrategias para combatir estas infecciones (Khan et al. 2007; Wong, Dhanawat, and Rathbone 2014).

Tradicionalmente, la administración sistémica de antimicrobianos ha sido la base de las terapias clínicas para abordar una infección. Desafortunadamente, la mala penetración en algunos tejidos, los patrones de prescripción inadecuados, la toxicidad sistémica y el escaso cumplimiento por parte del paciente han limitado la utilidad de ciertos antimicrobianos. Además, la administración sistémica a menudo no es eficaz, ya que no proporciona concentraciones tisulares locales suficientes para matar a los microorganismos antes de sufrir efectos secundarios graves, como daño renal y/o hepático. Ahora bien, el uso extendido e irracional de estos medicamentos es lo que ha incrementado, entre otras razones, la prevalencia de resistencias y ha originado la necesidad de buscar nuevas alternativas. Además, las concentraciones de antibióticos subterapéuticas o subinhibitorias exacerbaban las complicaciones infecciosas y promueven la aparición más rápida de resistencias. Por ello, la administración local de antimicrobianos es una buena alternativa que puede preservar y ampliar su eficacia (Brooks and Brooks 2014; Wu and Grainger 2006). El uso de antimicrobianos tópicos tiene un rol especialmente importante en dermatología y en ginecología, constituyendo una alternativa útil y segura en infecciones localizadas.

A través de los años, la industria farmacéutica se ha dedicado a la búsqueda de nuevas moléculas antimicrobianas seguras y eficaces con pocos efectos adversos para los pacientes. Pero la WHO afirma que los 60 productos que están en desarrollo brindan pocos beneficios respecto a los tratamientos existentes y pocos de ellos van dirigidos a los microorganismos actualmente más críticos (bacterias gramnegativas y hongos) (WHO 2017). La mayoría de estas alternativas son fármacos de tipo biológico como los péptidos antimicrobianos o los bacteriófagos, los cuales suelen ser más selectivos frente a la diana pero que presentan grandes retos en cuanto a la estabilidad, fabricación, seguridad, almacenamiento, variabilidad entre lotes y coste, dificultando así su llegada al mercado. Además de ser alternativas mucho más dirigidas a la administración

sistémica (Morrow and Felcone 2004).

En base a los antecedentes anteriormente expuesto, pensamos que el uso de moléculas como el D y el BB junto con el desarrollo de nuevas formulaciones tópicas, supondría, en primer lugar, una novedad en cuanto al modo de acción respecto a los antimicrobianos clásicos descritos; en segundo lugar, la posibilidad de superar limitaciones o inconvenientes de la propia vía de administración que no se hubieran tenido en cuenta en los desarrollos iniciales (absorción, degradación, tiempo de residencia, aplicación, mala adherencia...) y; por último, una gran ventaja en cuanto al coste del tratamiento comparado con los nuevos medicamentos que pudieran aprobarse. Además, al ser moléculas que se han empleado durante décadas, se conoce en detalle el perfil de seguridad de ellas y los posibles efectos adversos derivados de su uso.

En este trabajo se han evaluado y caracterizado tres formulaciones que contienen disulfiram como agente antimicrobiano para las principales infecciones de piel y mucosas como posible estrategia para solventar el problema global de la resistencia antimicrobiana.

1. Reevaluación del producto comercial Tenutex®

Una de las estrategias planteadas en esta tesis para afrontar la resistencia antimicrobiana fue reevaluar el producto comercial Tenutex®, emulsión que contiene D y BB, frente a sarna y a pediculosis humana resistente a insecticidas comunes. En el caso de las infecciones por *Pediculus humanus capitis* y *Sarcoptes scabiei* están producidas por ectoparásitos ubicuos, pero con una mayor prevalencia en países en vías de desarrollo y en zonas cálidas. Además, debido a los movimientos migratorios su prevalencia ha aumentado en países desarrollados y junto a ellos, la resistencia al tratamiento de primera línea, la permetrina (Downs et al. 1999; Burgess et al. 1995; Kucirka, Parish, and Witkowski 1983).

La principal ventaja de Tenutex®, es el uso geográficamente restringido que presenta. Actualmente la combinación solo está aprobada en Islandia y Suecia para la indicación de pediculosis y sarna (Soerensen et al. 2021). En monoterapia por vía tópica, encontramos que no existen formulaciones solo con D en el mercado y en el caso de BB, existen otras formulaciones, pero su uso contra ectoparásitos no está definido como primera línea terapéutica en la mayoría de los países comercializados. Los tratamientos recomendados como primera opción son productos tópicos con un 5 % de permetrina o la ivermectina oral (Salavastru, Chosidow, Janier, et al. 2017). Con lo cual, la posible resistencia que puedan presentar los diferentes parásitos contra este producto es baja o nula. De hecho, todavía no se han reportado casos que describan fenómenos relacionados.

En ese sentido, el uso geográficamente limitado de Tenutex® junto con los resultados de eficacia y seguridad obtenidos en el Capítulo IV, confirman que podría ser especialmente interesante ampliar nuevos mercados con este producto y ser propuesto como un tratamiento alternativo en casos resistentes. Además, puesto que los países en vías de desarrollo son especialmente vulnerables a estas infecciones, el bajo coste del producto y su fácil aplicación son ventajas adicionales en su reposicionamiento de mercado.

Por otra parte, la reevaluación de Tenutex® ofrece resultados actualizados del comportamiento biofarmacéutico del producto, algunos de los cuales no estaban descritos o eran de inicios de 1980 (Gunvor Brinck-Lindroth et al. 1984). Muchos de los medicamentos actualmente aprobados, se descubrieron en el siglo XIX y XX y se presentaron a las agencias con los criterios específicos de cada época y país. La regulación farmacéutica se actualiza constantemente y añade nuevos criterios de evaluación, muchas veces más exigentes, a fin de garantizar la seguridad de los pacientes (Powers 2004). A modo de ejemplo, tenemos las directrices ICH, las cuales nacieron en 1990 con el objetivo de armonizar los criterios científicos y técnicos del registro de productos farmacéuticos en diferentes países. Los ámbitos de aplicación que abarcan estas directrices se dividen en 4 grandes grupos: calidad, eficacia, seguridad y multidisciplinar, los cuales, a su vez, se van actualizando frecuentemente ('ICH Official Web Site : ICH' 2023). Por lo que, reevaluar productos antiguos, no solo permite conocer nuevas aplicaciones potenciales o ampliar mercado del producto, sino que también ofrece la oportunidad de profundizar en aspectos del producto que se desconocían hasta el momento aportando nuevos conocimientos a la comunidad científica, y lo más importante, proporcionando nuevos datos de seguridad que permiten asegurar el bienestar de los pacientes.

2. Reposicionamiento de D como agente antibacteriano y antifúngico

2.1 Selección de D como candidato final

Tras la reevaluación del producto comercial Tenutex® a la dosis de prescripción aprobada y obtener buenos resultados en cuanto al perfil de permeación en piel humana, citotoxicidad y eficacia frente a pediculosis y sarna, se disponía de dos posibles moléculas candidatas a reposicionamiento, D y BB. Finalmente, solo se seleccionó una de ellas, D, por las diferentes razones que se exponen a continuación.

En primer lugar, la caracterización del perfil de absorción transdérmico de Tenutex®, mostró que el D no es capaz de llegar a circulación sistémica, no se detectó concentración del activo en el medio receptor en ninguna de las réplicas ni tiempos. El hecho de que no llegue a la dermis y por lo tanto a circulación sistémica, es una gran

ventaja ya que se evita cualquier efecto sistémico derivado de su aplicación y hace que quede disponible mayor concentración de fármaco en el tejido diana (estrato córneo y/o epidermis). Esto es especialmente interesante dado que las infecciones bacterianas y parasitarias superficiales de la piel cursan principalmente en estas dos capas (Moffarah et al. 2016), por lo que, en este caso D es capaz de concentrarse en la diana de interés.

Además, en el caso de D había estudios publicados que verificaba la acción antibiótica del compuesto y que demostraban sus múltiples mecanismos de acción (Lanz et al. 2023; Meneguello et al. 2022; Horita et al. 2012; Khan et al. 2007; Frazier, Moore, and Long 2019). Por lo que, parte de la actividad era ya conocida, pero quedaba pendiente comprobar esa actividad frente a los principales patógenos involucrados en patología de piel y mucosas y aportar nuevos datos en cuanto a la aplicabilidad del producto y los posibles efectos derivados de su potencial uso por vía tópica.

Por otra parte, cabe destacar la particular estructura química de D, la cual presenta varios grupos funcionales con azufres (S), el S del enlace disulfuro y el S del resto tiocarbonilo ('Disulfiram | C₁₀H₂₀N₂S₄ - PubChem' 2023). Estos dos grupos son fácilmente susceptibles de ser atacados por grupos nucleófilos, tales como la cisteína. Los grupos sulfhidrilo de la cisteína son los que interaccionarían con los centros activos del D mediante un mecanismo de sustitución nucleófila tipo 2, cinética y termodinámicamente favorable (Nogara et al. 2022). Este punto la hace especialmente interesante, dado que la cisteína es un aminoácido esencial y está presente en la mayoría de las proteínas, por lo que, potencialmente, podría interaccionar con diferentes dianas biológicas de los microorganismos.

Aunque la propuesta inicial era considerar también al BB para el reposicionamiento, finalmente se descartó esta molécula por varios motivos, entre ellos destacan los siguientes:

- El uso de BB está ligeramente más extendido, no por su aplicación en productos farmacéuticos, sino porque se encuentra en muchos de los productos cosméticos, tales como las fragancias (Johnson et al. 2017). Por lo que el uso de esta molécula en monoterapia frente a infecciones bacterianas o fúngicas podría llevar a la aparición de resistencias con mayor facilidad que con D.
- Por lo que al mecanismo de acción respecta, en el caso de *Pediculus humanus capitis* y *Sarcoptes scabiei* es debido a un efecto neurotóxico sobre estos microorganismos (Karthikeyan 2005). Los mecanismos de neurotoxicidad se asocian con formas de vida más complejas, por lo que suponer el mismo mecanismo de acción para bacterias, organismos procariotas unicelulares, resulta complicado y difícilmente extrapolable.
- Como se menciona en el Capítulo I sección 7, hay algún estudio que relaciona la

actividad antibacteriana del aceite esencial de *Kaempferia rotunda*, entre otros, con su contenido en BB (Diastuti, Chasani, and Suwandri 2019). Sin embargo, en este estudio no se comprueba la actividad antibacteriana de cada uno de los componentes por separado, por lo que su actividad podría ser debida a compuestos que se encuentran en menor proporción en el aceite y no directamente con BB. En general, hay pocas evidencias publicadas de que realmente esta molécula pueda tener actividad antibacteriana.

- El BB es un hidrocarburo cíclico cuya estructura química no presenta ningún grupo funcional que pudiera actuar como nucleófilo o electrófilo frente a posibles dianas biológicas ('Benzyl Benzoate | C14H12O2 - PubChem' 2023). Este hecho, limita posibles mecanismos de acción antibacterianos o antifúngicos.

Adicionalmente, para descartar definitivamente el reposicionamiento de BB, se hizo un cribado inicial mediante estudios de MIC frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomona aeruginosa* y diferentes especies de *Candida*. El rango de concentraciones testado fue de 256 a 0,06 µg/ml y los resultados de MIC obtenidos fueron >256 µg/ml. Por lo que el BB quedó finalmente descartado para el reposicionamiento. Los resultados obtenidos en estas pruebas no se publicaron.

2.2 Eficacia antimicrobiana

Para evaluar la eficacia antibacteriana y antifúngica *in vitro* de D se determinó cual era la concentración mínima inhibitoria del compuesto, es decir la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento microbiano. Para ello, se seleccionaron los principales microorganismos involucrados en patologías de piel y mucosas, siendo estos: *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* como los principales representantes de patógenos bacterianos y, tres especies diferentes de *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*) como patógenos fúngicos.

Los resultados de los ensayos muestran que D inhibe el crecimiento de las bacterias grampositivas *Staphylococcus aureus* (8 µg/ml) y *Streptococcus pyogenes* (32 µg/ml) y de las levaduras *C. albicans* (2 µg/ml), *C. parapsilosis* (8 µg/ml) y *C. glabrata* (4 µg/ml), por lo que, la molécula presenta actividad antibacteriana y antifúngica frente a las cepas testadas.

Las bacterias *S. aureus* y *S. pyogenes* están muy ligadas a las patologías comunes de la piel tales como forúnculos, impétigo, y dermatitis (Chiller, Selkin, and Murakawa 2001). Dichas enfermedades, son tratadas principalmente vía tópica con mupirocina o ácido fusídico, pero la resistencia a estos tratamientos está en considerable aumento (Hajikhani et al. 2020; McNeil et al. 2011; Williamson, Carter, and Howden 2017). Estas enfermedades suelen ser afectaciones autolimitadas que se tratan eficazmente de manera tópica. Ahora bien, debido a la creciente apariciones de resistencias, disponer

de una alternativa es importante, en particular, en el caso de *Staphylococcus aureus*, bacteria con cepas multirresistentes a diferentes antibióticos (MRSA) y también, en estreptococos resistentes a macrólidos y a mupirocina. Ambos casos podrían acabar originando infecciones sistémicas graves si no se controlan (Perera and Hay 2005; Stefani et al. 2012)). Además, al disponer de una nueva alternativa vía tópica permite reservar los antibióticos sistémicos para las infecciones más graves o que no responden a ninguno de los tratamientos tópicos disponibles retrasando así la aparición de posibles resistencias.

Adicionalmente, la actividad antibacteriana del D tiene un valor añadido para la combinación Tenutex®, en pacientes infectados por sarna y pediculosis. Estas patologías cursan con un intenso picor, el cual lleva a los pacientes a rascarse de forma continua y producirse lesiones en la piel que muchas veces pueden infectarse por bacterias como *S. aureus* o *S. pyogenes* (Watkins 2010; Ständer and Ständer 2021). Por lo que, el producto además de combatir la infección primaria podría tener un efecto beneficioso en evitar complicaciones de estas lesiones. De la misma manera, la sarna es la causa principal de impétigo secundario. En entornos altamente endémicos, al menos el 40 % de las lesiones de impétigo pueden atribuirse a la sarna, y esta proporción es aún mayor entre los niños más pequeños (hasta del 71 %). La infección bacteriana por *S. aureus* y *S. pyogenes* del impétigo se produce debido a brechas en la barrera cutánea como resultado de las madrigueras de los ácaros y el rascado asociado, así como a los efectos directos de los ácaros de la sarna al regular negativamente la inmunidad del huésped y optimizar las condiciones para el crecimiento bacteriano (Hartman-Adams, Banvard, and Juckett 2014; Engelman and Steer 2018). Por lo que, la utilización de Tenutex® no solo estaría combatiendo la infección primaria por sarna, sino que podría ayudar a la prevención de impétigo secundario por la acción antibacteriana de D sobre esas dos bacterias. La sarna y el impétigo asociado son problemas comunes en muchos países en desarrollo, que afectan particularmente a niños y comunidades en áreas desfavorecidas y países tropicales, con una prevalencia muy alta en la región del Pacífico (Romani et al. 2015). Por ello, comercializar este producto en esas áreas podría ser de especial interés y de gran ayuda.

Por otra parte, D no mostró actividad frente a la bacteria gramnegativa *P. aeruginosa* (>64 µg/ml). Esta bacteria se caracteriza por presentar resistencia natural a ciertos antibióticos y por disponer de mecanismos en el periplasma para adaptarse a las fluctuaciones ambientales de cobre, por lo que esto le podría dar cierta protección adicional sobre el carácter quelante de D (Argüello, Raimunda, and Padilla-Benavides 2013). Además, su membrana externa podría dificultar la permeabilidad de la pared celular a este compuesto. Esta bacteria también puede disponer de diversas bombas de eflujo, las cuales, podrían expulsar el fármaco fuera de la célula, en el caso de que pudiera alcanzar el citoplasma celular (Pang et al. 2019).

Aunque D no tiene carácter inhibitorio sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* y, por lo tanto, no sería útil en monoterapia, puede ser un buen candidato para ser administrado juntamente con otros antimicrobianos clásicos, potenciando su acción, retrasando la aparición de la resistencia a ellos o reduciendo los factores de virulencia. De hecho, una de las estrategias más propuesta en bibliografía para *P. aeruginosa*, a diferencia de otras bacterias gramnegativas, es la combinación de varios antibacterianos, dado que es una bacteria con una alta resistencia intrínseca (Pang et al. 2019; Poole 2011). En el caso de D, la combinación podría ser interesante porque *P. aeruginosa* se caracteriza por la secreción de factores virulentos como la pseudolisina metaloproteasa de zinc, también conocida como LasB o elastasa de *Pseudomonas*. Este factor de virulencia es altamente tóxico, causa daño e invasión tisular, altera el sistema inmunológico y actúa intracelularmente para iniciar el crecimiento de biopelículas bacterianas, las cuales empiezan a ser realmente preocupantes en ambientes hospitalarios. Ahora bien, para su funcionamiento necesita de la presencia de zinc, por lo que D podría secuestrar este metal y afectar al correcto funcionamiento de las LasB (Cathcart et al. 2011; Azam and Khan 2019; Pang et al. 2019; Jorge et al. 2019). Los inhibidores de los factores de virulencia han ganado impulso en los últimos años y, además, no ejercen selección positiva sobre la resistencia, por lo que sería interesante considerar a D en futuros estudios experimentales en combinación con los antibióticos convencionales.

En cuanto al carácter antifúngico de D frente a *Candida*, los resultados fueron muy positivos, incluso se obtuvieron valores de MIC inferiores a los hallados en bacterias. Dada la situación de alto nivel de resistencias a los azoles de estas levaduras (Ben-Ami and Kontoyiannis 2021; Pristov and Ghannoum 2019), los resultados ofrecen un posible tratamiento alternativo prometedor para la candidiasis vaginal. Se ha visto que el transportador ABC, Cdr1p, desempeña un papel importante en esta resistencia, favoreciendo la expulsión del azol al exterior de la célula microbiana a través de la bomba de eflujo. Hay estudios que revelan la capacidad de D de inhibir la unión del ATP a Cdr1p, formando un enlace disulfuro intramolecular con las cisteínas presentes cerca del centro activo de la proteína. Dada esta inhibición, D puede utilizarse como un modulador potencial de la resistencia a los antifúngicos (S. Shukla et al. 2004; Sanglard et al. 1996). Además, D es una molécula utilizada vía oral durante más de 50 años para el tratamiento del alcoholismo con un buen perfil de seguridad, sería interesante estudiar su actividad frente a *C. auris*, patógeno emergente que se ha asociado con brotes nosocomiales, con alta tasa de resistencia a antifúngicos y mortalidad (Jeffery-Smith et al. 2018) como una posible alternativa.

Finalmente, es importante destacar que D tiene acción *in vitro* tanto sobre diferentes especies de *Candida* como de *Staphylococcus aureus*. Este hecho es especialmente interesante porque a pesar de que estos patógenos causan diferentes infecciones de forma independiente, *C. albicans* y *S. aureus* también pueden aislarse conjuntamente de varias enfermedades como la fibrosis quística, la sobreinfección de quemaduras,

infecciones del tracto urinario y heridas del pie diabético y también, de las superficies de diversos biomateriales (sondas, catéteres, prótesis...). Además, *S. aureus* y *C. albicans* a menudo se aíslan simultáneamente de biopelículas mixtas de bacterias y hongos que se asocian a infecciones más graves. Los microorganismos incrustados en biopelículas son extremadamente resistentes tanto a los mecanismos de eliminación del huésped como a los agentes antimicrobianos (Harriott and Noverr 2009; Nair et al. 2014). Por lo que disponer de una molécula activa frente a estos dos patógenos, podría suponer una herramienta adicional para tratar este problema emergente.

En cuanto al global de los estudios de eficacia *in vitro* y *ex vivo* frente a los diferentes microorganismos, han sido de gran utilidad para evaluar las potenciales nuevas actividades de D, demostrar la actividad conocida de Tenutex® incluso en cepas resistentes a los tratamientos habituales, como en el caso de los piojos a la permetrina, y evaluar los tiempos de exposición necesarios para erradicar los parásitos *Pediculus humanus capitis* y *Sarcoptes scabiei*.

2.3 Caracterización de las fórmulas propuestas

La caracterización fisicoquímica (aspecto, viscosidad, riqueza, impurezas...) de Tenutex®, al tratarse de una fórmula comercial, ya estaba realizada y detallada en su respectivo dossier de registro. Para la emulsión con D, como el objetivo era un producto de aplicación en la piel en el que el activo pudiera actuar en el SC y la epidermis, se escogió una combinación de excipientes muy similar a Tenutex®, dado que son combinaciones de las cuales se conoce sus características fisicoquímicas en detalle, su estabilidad y que ya han sido testadas en clínica con buena tolerabilidad en la piel. Se escogió una fórmula conocida para optimizar recursos, reducir el número de ensayos de caracterización a realizar y obtener un perfil de permeación de D similar al hallado para Tenutex®.

En el caso del uso de D como antifúngico, no solo se propuso el reposicionamiento de la molécula, sino que además se intentó hacer frente a los inconvenientes habituales que presentan las formulaciones de administración vaginal. Actualmente, las cremas, pomadas, geles y óvulos que existen en el mercado, tienen la desventaja de que deben ser administrados durante la noche, una vez la paciente está estirada para evitar la salida del producto por efecto de la gravedad y el movimiento, además de los posibles malestares asociados (Hussain and Ahsan 2005). Por ello, desarrollar formulaciones alternativas tales como geles mucoadhesivos era también una necesidad clínica.

Se realizó una evaluación de la bibliografía relacionada con geles mucoadhesivos existentes para las diferentes mucosas (vaginal, bucal y rectal) y se identificó que la combinación propuesta de carragenato con polietilenglicol no se había probado antes. Los carragenatos pueden interactuar con la mucina presente en la pared vaginal mediante enlaces secundarios, principalmente enlaces de hidrógeno y entrelazamientos físicos y, tiene la capacidad de, en presencia de un catión apropiado (K^+ , Ca^{2+}), cambiar

su estructura de espiral a hélice y gelificar por reticulación iónica, incrementando así la viscosidad (Yermak, Davydova, and Volod'ko 2022). En cambio, el polietilenglicol es una cadena lineal de alto peso molecular, con capacidad de retener agua y con varios hidrógenos funcionales que pueden interactuar mediante fuerzas electrostáticas con el moco que recubre el epitelio vaginal (Shah, Chaudhary, and Mehta 2014). Por lo tanto, la combinación presenta diferentes mecanismos de adhesión, lo cual crea sinergias entre los polímeros que permiten hacer frente al problema del tiempo de residencia en la vagina.

Dado que se trata del desarrollo de una fórmula novedosa, se llevó a cabo una caracterización detallada de los geles. Fue especialmente importante determinar el comportamiento reológico del producto y la mucoadhesión para escoger la fórmula final más idónea, ya que ambas propiedades son especialmente importantes para su correcta funcionabilidad y aplicabilidad (Siska et al. 2018; Ahuja, Khar, and Ali 1997). En este sentido, la herramienta de diseño de experimento fue de gran ayuda, ya que permitió generar el máximo de información con el mínimo número de experimentos posibles, reduciendo el tiempo y coste en la obtención de un posible prototipo. En nuestro caso se realizaron 13 combinaciones diferentes modificando las concentraciones de ambos polímeros. Tras evaluar como afectaba la concentración de polímero a la mucoadhesión directa e indirecta (fuerza adhesiva y fluoresceína adherida, respectivamente) y la viscosidad, se seleccionó como candidato final el que contenía 2 % de carragenato y 0,9 % PEG-90M, ya que es el que presenta mayor mucoadhesión con mínima viscosidad y, por lo tanto, el que mayor tiempo de residencia en la cavidad vaginal y menor problemas de aplicación tendría, dado que una formulación muy viscosa podría dificultar la administración. Todas las pruebas de cribado se realizaron con y sin flujo vaginal, porque uno de los polímeros, el carragenato, como se ha comentado anteriormente puede cambiar sus propiedades en presencia de iones. Por lo que era importante ver cómo podría afectar la reticulación de dicho polímero a las principales propiedades del producto.

Tras la selección de la fórmula final, el comportamiento reológico de esta se determinó. Las pruebas rotatorias y oscilatorias mostraron el carácter pseudoplástico y elástico de la fórmula. La pseudoplasticidad ofrece una reducción de la viscosidad inducida por el estrés y, por tanto, garantiza la facilidad de aplicación del producto. Ahora bien, también es importante mencionar que, se puede esperar que se produzca una mayor dispersión del producto a velocidades de cizallamiento más altas (durante el coito) o después de la dilución con fluidos vaginales o semen. Esto tiene la importante desventaja de aumentar la probabilidad de fuga del producto en esas situaciones. Pero como también se trata de geles con carácter elástico ($\tan \delta < 1$), la elasticidad controla las propiedades de liberación y fuga del fármaco, por lo que el gel ofrecería mayor resistencia a la dilución y a las tensiones durante el coito (Yu et al. 2011). Teniendo en cuenta ambos aspectos, el candidato final presenta un cuidadoso equilibrio entre sus propiedades reológicas que

permitiría lograr un rendimiento clínico óptimo, proporcionando un producto de fácil aplicación y con menor riesgo de fuga.

2.4 Estudios en celdas de Franz

Las celdas de Franz se emplearon para evaluar la capacidad de penetración de las tres formulaciones con D en piel y/o mucosa vaginal, cuantificar las cantidades de D retenidas en el tejido y estudiar la liberación del nuevo gel mucoadhesivo desarrollado, información biofarmacéutica de D que no se había evaluado hasta el momento. Previamente a la realización de estos ensayos, se probaron diferentes medios receptores. Finalmente, se escogió un medio acuoso, 15 % de HPCD en PBS, dado que era el que permitía cumplir condiciones *sink* durante todo el experimento. D es una molécula muy insoluble en agua, 4,09 mg/l a 25°C (National Center for Biotechnology Information 2022), por ello se añadió HPCD en el medio receptor. Las ciclodextrinas tienen la capacidad de formar complejos de inclusión dinámicos no covalentes en solución, la cavidad central de los cuales proporciona un microambiente lipófilo en el que pueden entrar e incluirse moléculas de fármaco hidrofóbicos como es el caso del D (Brewster and Loftsson 2007).

2.4.1 Estudios de liberación *in vitro*

En cuanto al estudio de liberación de los geles mucoadhesivos, se emplearon membranas de 0,45 μm para permitir el paso de D (296,5 Da). El objetivo del estudio era determinar el mecanismo de liberación del fármaco en la formulación mediante el ajuste de las cantidades liberadas a lo largo del tiempo a varios modelos cinéticos. Estos modelos son útiles para evaluar el efecto de los excipientes, simular situaciones no ensayadas previamente, como control de calidad de la fórmula y del proceso de fabricación, siendo un importante recurso que acelera el desarrollo del fármaco (Siepmann and Siepmann 2013). En este caso, se empleó para ver el efecto de la matriz de excipientes sobre la liberación de D.

La cinética de liberación de ambas concentraciones de D (0,5 y 1 %) está basada en la primera ley de Fick, donde la cantidad de D liberado es directamente proporcional a la cantidad de fármaco remanente en la fórmula farmacéutica (Bartosova and Bajgar 2012), pero cada concentración está explicada por diferentes modelos cinético, orden uno para la fórmula al 0,5 % y Weibull para la del 1 %. En ambas concentraciones, la matriz de excipientes permitió la liberación del 80-90 % de D en las primeras 6 horas, dejando la mayor parte del fármaco disponible para interactuar con la mucosa vaginal y no limitar la biodisponibilidad en el tejido.

2.4.2 Ensayos de permeación *in vitro*

Se caracterizaron los perfiles de permeación de las 3 formulaciones. Para Tenutex® y la

emulsión con D se realizó el ensayo en piel humana y cerdo, respectivamente; y para los geles mucoadhesivos se empleó vaginas de cerdo.

En el caso de la permeación en piel, se obtuvieron los mismos resultados en cerdo que humana. En ambos ensayos, no se observó permeación de D en ninguno de las réplicas ni tiempos. La similitud entre los resultados se debe a que la piel porcina y humana presentan una estructura muy parecida en cuanto al grosor y la composición de las capas del tejido (Neupane et al. 2020) y; también al hecho de que la composición de excipientes era muy similar entre ambas formulaciones. Además, en el caso de la emulsión con D, se empleó la misma dosis de prescripción que para Tenutex® por lo que los resultados obtenidos serían extrapolables a una aplicación real, con concentraciones retenidas en el tejido superiores a la MIC obtenida para *S. aureus* (8 µg/ml) y *S. pyogenes* (32 µg/ml). En este caso, como no hubo permeación de D no se pudo calcular el flujo transdérmico ni ningún otro parámetro cinético.

Los estudios de permeación de los geles mucoadhesivos en vaginas de cerdo indicaron resultados muy diferentes a los hallados en piel. En este caso, D mostró un buen perfil de permeación. Estas diferencias respecto a la piel pueden ser debidas a varios motivos, (1) la mucosa vaginal no es un tejido liso, a diferencia de la piel presenta rugosidades que hacen aumentar la superficie de absorción, (2) la mucosa es un tejido no queratinizado, no tiene SC como la piel, por lo que presenta mayor permeabilidad, especialmente a moléculas pequeñas como puede ser D, (3) la composición de los geles difiera mucho de las fórmulas utilizadas en piel. En este caso los geles son formulaciones de tipo acuoso que contenían 20 % HPCD. Las ciclodextrinas son capaces de penetrar en las mucosas y pueden actuar como potenciadores de la absorción si el vehículo de la fórmula o las barreras de difusión son acuosas (Loftsson et al. 2005), como ese este caso. Por lo que, la combinación de todos estos factores es lo que explicaría las diferencias detectadas.

Aunque la penetración en la mucosa vaginal es positiva porque nos ha permitido obtener concentraciones en el tejido superiores a la MIC para *Candida* y esto podría ayudar a hacer frente a posibles reservorios de levaduras en el tejido y a evitar que la infección se cronifique (Ravani et al. 2013), podría ser interesante reducir la dosis de D aplicada a la mucosa. Para la concentración del 0,5 %, se hallaron concentraciones retenidas 20 veces superior a la MIC. Reducir la dosis de D a la mitad podría permitir seguir teniendo un producto efectivo frente a *Candida*, pero ayudaría a disminuir la absorción sistémica y con ello la probabilidad de aparición de efectos adversos. En todo caso, dado que hay absorción sistémica, la utilización de D para el tratamiento de candidiasis, requeriría de la abstinencia de alcohol para reducir la aparición de efectos adversos.

Los estudios realizados en celdas de Franz han sido de gran importancia en las primeras

etapas para poder evaluar la idoneidad de la formulación en la vía de administración propuesta, en este caso, la cutánea y vaginal. La disponibilidad de un método de HPLC validado con linealidad, precisión, exactitud y especificidad ha sido esencial para la cuantificación de los activos en los diferentes ensayos y poder confirmar que las concentraciones retenidas en piel y vagina son suficientes para garantizar concentraciones eficaces contra los diferentes microorganismos testados, con resultados fiables y reproducibles.

2.5 Ensayos celulares

Los ensayos basados en células son una excelente herramienta para la comprensión de la actividad biológica de un producto farmacéutico reduciendo la experimentación animal. La evaluación de la viabilidad celular es una técnica clave para determinar la citotoxicidad *in vitro* de un producto y su biocompatibilidad.

Las pruebas de biocompatibilidad *in vitro* fueron desarrolladas originalmente para predecir reacciones biológicas de fármacos, biomateriales o tratamiento de técnicas. Generalmente se utiliza una amplia variedad de líneas celulares como, fibroblastos de piel humana, mucosa bucal, membrana periodontal o pulmón embrionario, cultivos de queratinocitos humanos y células HaCaT, diferentes líneas celulares murinas, linfocitos T de ganglios linfáticos y macrófagos (Wiegand and Hipler 2009). Dónde, los fibroblastos y los queratinocitos epidérmicos se consideran líneas celulares apropiadas para probar la compatibilidad local de activos en la piel. En este caso, se utilizaron ensayos de citotoxicidad *in vitro* en queratinocitos HEK001.

Tras comparar los resultados de citotoxicidad obtenidos para D (IC₅₀: 6,97 μM) con otras publicaciones, se detectó gran variabilidad en la citotoxicidad reportada (IC₅₀: 754 μM-0,793 μM) según la técnica utilizada o las células empleadas en el estudio (Zha et al. 2014; Weyermann, Lochmann, and Zimmer 2005; Thakare et al. 2019). La medición de células viables es un aspecto crítico en estos ensayos, siendo la medición de ATP fundamental para el estudio. Ahora bien, hay una gran variedad de kits y métodos para su detección (bioluminiscencia, ensayo colorimétrico con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), etc.) por lo que la comparación de resultados se hace complicada. Existe la necesidad de mejorar y unificar los criterios de selección y evaluación de los diferentes modelos para una mejor comprensión y comparación de los resultados obtenidos.

La citotoxicidad obtenida podrían relacionarse con cierta irritación del producto tras su aplicación tópica, dado que los queratinocitos son células que juegan un papel importante en la iniciación, modulación y regulación de las irritación cutánea (Praça et al. 2018). Ahora bien, tras la variabilidad de resultados comentados en la bibliografía y al hecho de haber utilizado cultivos monocapa, los cuales carecen del entorno del tejido y en los que no hay interacción y comunicación celular (Wiegand and Hipler 2009), se

hace difícil la extrapolación al comportamiento que tendría *D in vivo*. Además, dada la complejidad estructural de la piel y su gran efecto barrera, sería interesante plantearse el uso de modelos tridimensionales para futuros estudios.

Por otra parte, con el objetivo de comprender mejor los posibles mecanismos de citotoxicidad, se realizó el análisis de la expresión génica de las células expuestas al fármaco. Gracias a este análisis se pudo evidenciar que la muerte celular no es debido a un único mecanismo, sino que intervienen varios factores en él, aportando datos de cambios en la expresión génica que podrían ser interesante incluso en áreas como la oncología.

Una de las alteraciones más destacadas fue sobre el gen *MT1F*, el cual codifica para metalotioneínas, un tipo de metaloproteína. Esta misma afectación sobre metaloproteínas se ha visto en células bacterianas como en el caso de las *P. aeruginosa* y los factores de virulencia *LasB*, discutido anteriormente. También, los resultados de expresión genética revelaron la importancia del papel quelante de *D*, con varias vías de señalización afectadas. Esa actividad quelante de *D* también se ha descrito que tiene afectación sobre los microorganismos (Abraham et al. 2012). Por lo que existe mecanismos de toxicidad similares entre eucariotas y procariotas sobre estructuras evolutivamente conservadas. Si el mecanismo de citotoxicidad para las bacterias y levaduras fuese también una combinación de varios mecanismos a la vez, esto supondría una gran ventaja. Cuando se combina varios mecanismos de acción es más complejo para los microorganismos poder desarrollar resistencia para cada uno de ellos. Con lo que la aparición de resistencia global sería más compleja y tardía, hecho que favorece a su posible reposicionamiento.

3. Técnicas para la caracterización de un producto farmacéutico

Para la generación de nuevos productos farmacéuticos, tanto con principios activos nuevos como con moléculas ya conocidas y comercializadas, es fundamental establecer técnicas en las diferentes etapas del proceso de desarrollo para detectar a tiempo si un candidato no es adecuado para la finalidad prevista. Además, puesto que las autoridades reguladoras han incrementado los requisitos para la comercialización de nuevos productos ('ICH Official Web Site: ICH' 2023), es necesario mejorar las técnicas existentes o añadir nuevas a fin de caracterizar al máximo posible el producto, más allá de las pruebas fisicoquímicas tradicionales, para de esta manera, poder dar respuesta a las nuevas exigencias regulatorias. En este sentido, la metodología empleada ha sido una relevante herramienta para obtener información tanto de los principios como de los productos finales propuestos.

Como se ejemplifica en esta tesis, la ejecución de métodos adecuados para la determinación del potencial de un producto durante la fase de desarrollo es un complejo

proceso que se requiere para su correcta caracterización, optimización, evaluación de la eficacia, además de para probar su idoneidad en la vía de administración y comprobar su seguridad. Todo ello, mediante la generación de resultados documentados con una mejor inversión de recursos que puedan avalar la comercialización del producto en nuevos mercados y dar respuesta a las nuevas exigencias regulatorias. Además, la información generada con los productos ya comercializados abre una ventana de posibilidades, la cual, en este caso, será útil para discutir en el futuro la extensión del uso de D para otras patologías.

En resumen, todos los ensayos realizados son una herramienta fundamental para las empresas farmacéuticas, no solo durante el descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos, sino también, para la realización de estudios adicionales una vez el producto está en el mercado. Este hecho es especialmente importante, para poder, entre otros, encontrar nuevas actividades a moléculas ya existentes, disminuyendo el coste del lanzamiento de nuevos medicamentos y aportando soluciones más rápidas a las nuevas necesidades de la población (Berdigaliyev and Aljofan 2020).

4. Perspectivas de futuro

Los resultados reportados en los Capítulos IV, V y VI muestran una primera aproximación de las etapas iniciales del desarrollo de un producto farmacéutico. En el caso del Capítulo IV, puesto que la combinación ya está aprobada para la indicación estudiada (sarna y pediculosis), el posible reposicionamiento de mercado tiene mucho ganado y los resultados obtenidos son un valor añadido para actualizar el dossier y presentarlo a las agencias reguladoras de nuevos mercados.

En cuanto al reposicionamiento de D para las nuevas indicaciones (Capítulo V y VI), los resultados son realmente positivos y abren una ventana de posibilidades frente a la nueva amenaza global. Ahora bien, tanto en el caso de la actividad antibacteriana como antifúngica, sería interesante probar el activo D frente a cepas clínicas para tener más datos de la eficacia que pudieran extrapolarse a un uso clínico real. Si los resultados de estos nuevos ensayos fueran positivos, en el caso de la emulsión con D, puesto que la dosis establecida es igual que la aprobada y comercializada para Tenutex® y los excipientes son muy similares, se conocen la toxicidad y la farmacocinética del producto, se podrían evitar los ensayos preclínicos y emprender la fase clínica 2 para probar la eficacia del fármaco con la nueva indicación (Pacios et al. 2020).

En el caso de los geles mucoadhesivos, sería interesante plantear los estudios con una dosis más baja para reducir al máximo la posible absorción sistémica por vía vaginal. Además, puesto que la fórmula y la vía de aplicación del D son diferentes a lo que hay aprobado, en este caso sí que se requeriría de la realización de ensayos preclínicos y de fase 1 para la comercialización del producto. Por lo que, en ambos casos es necesario

seguir invirtiendo en ensayos y así poder comprender la viabilidad final de estos dos productos.

Ahora bien, es importante resaltar que siguen existiendo dificultadas en cuanto a los incentivos para que la industria farmacéutica siga invirtiendo en este tipo de desarrollos. En el caso de los antibióticos, el descubrimiento y desarrollo es aún más difícil, con una tasa de falla estimada del 95 % y que cuestan millones de euros a la industria farmacéutica. Aunque el desarrollo de nuevos medicamentos en otras áreas terapéuticas son igualmente procesos riesgosos y costoso, en el caso de los antibióticos además existe el gran desafío de la rentabilidad. Como los antibióticos más antiguos siguen siendo eficaces para tratar la mayoría de las infecciones, el valor principal de los nuevos antibióticos es tratar infecciones multirresistentes y que proporcionen protección contra patógenos emergentes. Como el desarrollo de resistencia es acelerada por el uso de los propios antibióticos, los nuevos se administran como último recurso, lo que se traduce en bajas ventas de unidades y, por lo tanto, en un limitado atractivo comercial para la industria. Es el único caso, en el que el fármaco más innovador se queda encerrado para mantener las ventas tan bajas como sea posible. Además, la rentabilidad aún es menor por la corta duración del tratamiento inherente a la terapia con antimicrobianos, ya que suelen ser afecciones agudas de muy corta duración (Piddock 2012; Spellberg 2014; Årdal et al. 2020).

Las grandes empresas están tomando la decisión de dejar de investigar, desarrollar y producir nuevos antimicrobianos, por lo que se está destruyendo una herramienta esencial que contribuye a la seguridad sanitaria. Aunque en este caso, D es una molécula ya comercializada y con un coste de desarrollo menor a una molécula activa totalmente nueva, su nuevo uso como antimicrobiano solo se limitaría a casos de resistencia y por la tanto podría no ser rentable seguir la inversión en esta línea. Se necesitan con urgencia modelos de ingresos que permitan que los desarrolladores de antibióticos obtengan ganancias que se alinea más estrechamente con el valor que entregan a la sociedad (Norrby, Nord, and Finch 2005).

Finalmente, se necesitan medidas para incentivar la reutilización de medicamentos, particularmente para abordar las barreras normativas y de patentes que restringen la exclusividad de mercado para la nueva indicación puesto que, en la mayoría de las veces, estas nuevas indicaciones no son novedosas ni inventivas y por lo tanto no pueden protegerse por una patente. Tales medidas podrían incluir mejores períodos de exclusividad de datos para indicaciones reutilizadas u otros cambios legislativos para garantizar que haya suficientes oportunidades para recuperar la inversión (Renwick and Mossialos 2018; Pushpakom et al. 2018).

Todavía siguen existiendo barreras externas sustanciales para la reutilización de medicamentos y para el desarrollo de nuevos antimicrobianos que no son fáciles de superar y que perpetúan un mercado de antimicrobianos disfuncional.

CAPÍTULO VIII: CONCLUSIONES

Se ha evaluado y estudiado con éxito tres formulaciones con disulfiram para el tratamiento de infecciones tópicas causadas por microorganismos de diferente naturaleza. Las conclusiones obtenidas son las siguientes:

1. El método de cromatografía líquida desarrollado para la determinación de la concentración de ambos principios activos durante los diferentes ensayos, demostró ser lineal, preciso, exacto y selectivo y, por lo tanto, es un método validado con éxito que permite obtener resultados fiables y repetitivos.
2. La evaluación biofarmacéutica del producto Tenutex® reveló la no permeación de D y la permeación de BB en piel humana. Tras realizar el estudio de citotoxicidad se comprobó que BB es un compuesto no citotóxico confirmando el uso seguro del producto tal como se cita en la bibliografía. La emulsión con D tampoco mostró absorción dérmica del activo. En cambio, en el caso de la mucosa vaginal sí se detectó permeación de D.
3. Los estudios *in vitro* y *ex vivo* sobre sarna, mostraron un gran efecto de Tenutex® en la primera hora de exposición y un 100 % de mortalidad irreversible a partir de las 6 horas de exposición, reduciendo así el tiempo de 24 horas que se describe en el prospecto. Tenutex® mostró también actividad frente a piojos adultos y sus huevos en cepas resistentes a permetrina y malatión. Mostrando mortalidad del 100 % en adultos tras 24 horas de exposición y en huevo tras 8 horas.
4. Disulfiram resultó ser activo frente a *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, pero no mostró actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Además, se demostró que la concentración de fármaco en piel era superior al valor de MIC obtenido y sin permeación en la dermis, mostrando así su idoneidad para ser administrado tópicamente en el tratamiento de infecciones bacterianas superficiales de la piel.
5. Los estudios celulares mostraron citotoxicidad de D sobre queratinocitos y revelaron alteraciones en diferentes genes relacionados con la señalización celular y el metabolismo de iones. Posibles mecanismos también implicados en la acción antibacteriana del compuesto.
6. Se reveló la eficacia de D frente a diferentes especies de *Candida*: *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *Nakaseomyces glabratus* (*C. glabrata*), con valores de MIC inferiores a los hallados en los ensayos bacterianos.
7. Se caracterizaron los prototipos de geles mucoadhesivos en cuanto a comportamiento reológico y a mucoadhesión y se obtuvieron los modelos matemáticos que explican la variación de las propiedades fisicoquímicas de las

formulaciones. Se optimizaron los prototipos y se hallaron los valores de concentración de carragenato (2,0 %) y polietilenglicol (0,9 %) para obtener el candidato final más idónea para la administración vaginal y hacer frente a las principales limitaciones de esta vía, obteniendo una fórmula final con la máxima mucoadhesión y la mínima viscosidad posible.

8. La fórmula optimizada fue caracterizada tanto en viscosidad, jeringabilidad como mucoadherencia, mostrando valores apropiados. El estudio de reología reveló el comportamiento pseudoplástico y elástico del gel. Además, el perfil de liberación fue prometedor, con más de un 70 % de liberación en las primeras 5 horas. Las concentraciones de D retenidas en tejido fueron superiores al valor de MIC obtenido. Por lo que, los geles mucoadhesivos con D resultaron ser una buena alternativa para el tratamiento de la candidiasis vaginal.
9. Con el conjunto de los estudios, se mostró que D es un gran candidato para el reposicionamiento en enfermedades infecciosas de piel y mucosa vaginal. Aunque los resultados son positivos en ambos casos, son necesarios más estudios de la tolerancia *in vivo* tras su administración local, de la eficacia en cepas clínicas y de los mecanismos de acción como agente antiinfeccioso para una completa evaluación del producto y poder ser considerado en el futuro como un tratamiento alternativo.

CAPÍTULO IX: REFERENCIAS

- Abraham, Nabil M., Supaporn Lamlerthton, Vance G. Fowler, and Kimberly K. Jefferson. 2012. 'Chelating Agents Exert Distinct Effects on Biofilm Formation in Staphylococcus Aureus Depending on Strain Background: Role for Clumping Factor B'. *Journal of Medical Microbiology* 61 (Pt 8): 1062. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.040758-0>.
- Adachi, H. Akamatsu, and T. Horio. 2002. 'The Effect of Antibiotics on the Production of Superantigen from Staphylococcus Aureus Isolated from Atopic Dermatitis'. *Journal of Dermatological Science* 28 (1): 76–83. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(01\)00143-8](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(01)00143-8).
- Adisasmitho, Wiku B., Salama Almuhaire, Casey Barton Behravesh, P  p   Bilivogui, Salome A. Bukachi, Natalia Casas, Natalia Cediell Becerra, et al. 2022. 'One Health: A New Definition for a Sustainable and Healthy Future'. *PLoS Pathogens* 18 (6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1010537>.
- Afoakwa, Emmanuel Ohene, Alistair Paterson, Mark Fowler, and Joselio Vieira. 2009. 'Comparison of Rheological Models for Determining Dark Chocolate Viscosity'. *International Journal of Food Science & Technology* 44 (1): 162–67. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2008.01710.X>.
- Agut, H. 2022. 'Antivirales (a Excepci  n Del Virus de La Inmunodeficiencia Humana Y La Hepatitis)'. *EMC - Tratado de Medicina* 26 (2): 1. [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(22\)46453-1](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(22)46453-1).
- Aho, Johanna, S  ren Hvidt, and Stefania Baldursdottir. 2016. *Rheology in Pharmaceutical Sciences*. New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-4029-5_23.
- Ahuja, Alka, Roop K Khar, and Javed Ali. 1997. 'Mucoadhesive Drug Delivery Systems'. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 23 (5): 489–515. <https://doi.org/10.3109/03639049709148498>.
- Alexander, Nancy J., Edward Baker, Marc Kaptein, Ulrich Karck, Leslie Miller, and Edio Zampaglione. 2004. 'Why Consider Vaginal Drug Administration?' *Fertility and Sterility* 82 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2004.01.025>.
- Aminov, Rustam I. 2010. 'A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future'. *Article* 1 (1). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>.
- An, W. Frank, and Nicola Tolliday. 2010. 'Cell-Based Assays for High-Throughput Screening'. *Molecular Biotechnology* 45 (2): 180–86. <https://doi.org/10.1007/S12033-010-9251-Z/METRICS>.
- 'Análisis DOE - Minitab Engage'. 2023. <https://support.minitab.com/es-mx/engage/help-and-how-to/tools/forms/form-tools/statistical-analysis/doe-analysis/>.
- Aparicio, Pilar, Esperanza Rodríguez, Teresa G  rate, Ricardo Molina, Alicia Soto, and Jorge Alvar. 2003. 'Terap  utica Antiparasitaria', 1–16.
-   rdal, Christine, Manica Balasegaram, Ramanan Laxminarayan, David McAdams, Kevin

- Outterson, John H. Rex, and Nithima Sumpradit. 2020. 'Antibiotic Development - Economic, Regulatory and Societal Challenges'. *Nature Reviews. Microbiology* 18 (5): 267–74. <https://doi.org/10.1038/S41579-019-0293-3>.
- Argüello, José M., Daniel Raimunda, and Teresita Padilla-Benavides. 2013. 'Mechanisms of Copper Homeostasis in Bacteria'. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4 (NOV): 73. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2013.00073/BIBTEX>.
- Aslam, Bilal, Mohsin Khurshid, Muhammad Imran Arshad, Saima Muzammil, Maria Rasool, Nafeesa Yasmeen, Taif Shah, et al. 2021. 'Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook'. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11 (November). <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.771510>.
- Auld, Douglas S, Mark W. Farmen, Steven D. Kahl, Aidas Kriauciunas, Kevin L. McKnight, Chahrzad Montrose, and Jeffrey R. Weidner. 2018. 'Receptor Binding Assays for HTS and Drug Discovery'. *Assay Guidance Manual*, July. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK91992/>.
- Azam, Mohd W., and Asad U. Khan. 2019. 'Updates on the Pathogenicity Status of Pseudomonas Aeruginosa'. *Drug Discovery Today* 24 (1): 350–59. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2018.07.003>.
- Baker, Jennifer R., Peter Jatlow, and Elinore F. McCance-Katz. 2007. 'Disulfiram Effects on Responses to Intravenous Cocaine Administration'. *Drug and Alcohol Dependence* 87 (2–3): 202–9. <https://doi.org/10.1016/J.DRUGALCDEP.2006.08.016>.
- Baker, Joseph T., Robert P. Borris, Brad Carté, Geoffrey A. Cordell, Djaja D. Soejarto, Gordon M. Cragg, Mahabir P. Gupta, Maurice M. Iwu, Domingo R. Madulid, and Varro E. Tyler. 1995. 'Natural Product Drug Discovery and Development: New Perspectives on International Collaboration'. *Journal of Natural Products* 58 (9): 1325–57. https://doi.org/10.1021/NP50123A003/ASSET/NP50123A003.FP.PNG_V03.
- Bartosova, L., and J. Bajgar. 2012. 'Transdermal Drug Delivery In Vitro Using Diffusion Cells'. *Current Medicinal Chemistry* 19 (27): 4671–77. <https://doi.org/10.2174/092986712803306358>.
- Basketter, David A., Michael York, John P. McFadden, and Michael K. Robinson. 2004. 'Determination of Skin Irritation Potential in the Human 4-H Patch Test'. *Contact Dermatitis* 51 (1): 1–4. <https://doi.org/10.1111/J.0105-1873.2004.00385.X>.
- Bayer. 2020. 'Gine-Canestén® 20 Mg/g Crema Vaginal | Ginecanes®'. 2020. <https://www.ginecanes.es/productos/gine-canesten-20mg-crema-vaginal>.
- Ben-Ami, Ronen, and Dimitrios P. Kontoyiannis. 2021. 'Resistance to Antifungal Drugs'. *Infectious Disease Clinics of North America* 35 (2): 279–311. <https://doi.org/10.1016/J.IDC.2021.03.003>.
- 'Benzyl Benzoate | C14H12O2 - PubChem'. 2023. National Center for Biotechnology Information. 2023. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzylbenzoate>.

- Berdigaliyev, Nurken, and Mohamad Aljofan. 2020. 'An Overview of Drug Discovery and Development'. *Future Medicinal Chemistry* 12 (10): 939–47. <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0307>.
- Bonnel, David, Raphaël Legouffe, André H. Eriksson, Rasmus W. Mortensen, Fabien Pamelard, Jonathan Stauber, and Kim T. Nielsen. 2018. 'MALDI Imaging Facilitates New Topical Drug Development Process by Determining Quantitative Skin Distribution Profiles'. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410 (11): 2815–28. <https://doi.org/10.1007/S00216-018-0964-3>.
- Brewster, Marcus E., and Thorsteinn Loftsson. 2007. 'Cyclodextrins as Pharmaceutical Solubilizers'. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (7): 645–66. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2007.05.012>.
- Brinck-Lindroth, G., L. Lundqvist, and A. Nilsson. 1984. 'Control of the Human Head Louse with Disulfiram and Benzyl Benzoate Emulsions'. *Acta Dermato-Venereologica* 64 (4): 325–30.
- Brooks, Benjamin D., and Amanda E. Brooks. 2014. 'Therapeutic Strategies to Combat Antibiotic Resistance'. *Advanced Drug Delivery Reviews* 78 (November): 14–27. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2014.10.027>.
- Brown, Thomas M., and Karthik Krishnamurthy. 2022. 'Histology, Dermis'. *StatPearls*, November. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535346/>.
- Burgess, Ian F., Christine M. Brown, Susan Peock, and Judith Kaufman. 1995. 'Head Lice Resistant to Pyrethroid Insecticides in Britain'. *BMJ*. BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmj.311.7007.752>.
- Byarugaba, D K. 2004. 'A View on Antimicrobial Resistance in Developing Countries and Responsible Risk Factors'. *International Journal of Antimicrobial Agents* 24: 105–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.02.015>.
- Byrd, Allyson L., Yasmine Belkaid, and Julia A. Segre. 2018. 'The Human Skin Microbiome'. *Nature Reviews Microbiology* 16 (3): 143–55. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO.2017.157>.
- Calderón, Cassandra, and Beulah Perdue Sabundayo. 2007. 'Antimicrobial Classifications: Drugs for Bugs'. *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*, May, 7–52. <https://doi.org/10.1201/9781420014495.CH2>.
- Campoy, Sonia, and José L. Adrio. 2017. 'Antifungals'. *Biochemical Pharmacology* 133 (June): 86–96. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2016.11.019>.
- Cardoso, José Carlos, Ophelia Veraitch, Raffaele Gianotti, Gerardo Ferrara, Carlo F. Tomasini, Manuraj Singh, Iris Zalaudek, and Catherine M. Stefanato. 2017. "'Hints" in the Horn: Diagnostic Clues in the Stratum Corneum'. *Journal of Cutaneous Pathology* 44 (3): 256–78. <https://doi.org/10.1111/CUP.12839>.
- Carmona-Cruz, Silvia, Luz Orozco-Covarrubias, and Marimar Sáez-de-Ocariz. 2022. 'The Human Skin Microbiome in Selected Cutaneous Diseases'. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 (March): 834135. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.834135/BIBTEX>.

- Castro-Sánchez, Enrique, Luke S P Moore, Fran Husson, and Alison H Holmes. 2016. 'What Are the Factors Driving Antimicrobial Resistance? Perspectives from a Public Event in London, England'. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1810-x>.
- Cathcart, George R.A., Derek Quinn, Brett Greer, Pat Harriott, John F. Lynas, Brendan F. Gilmore, and Brian Walker. 2011. 'Novel Inhibitors of the Pseudomonas Aeruginosa Virulence Factor LasB: A Potential Therapeutic Approach for the Attenuation of Virulence Mechanisms in Pseudomonas Infection'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (6): 2670–78. <https://doi.org/10.1128/AAC.00776-10/FORMAT/EPUB>.
- Chaplin, Steve. 2016. 'Topical Antibacterial and Antiviral Agents: Prescribing and Resistance'. *Prescriber* 27 (7): 29–36. <https://doi.org/10.1002/PSB.1480>.
- Chee, Wallace Jeng Yang, Shu Yih Chew, and Leslie Thian Lung Than. 2020. 'Vaginal Microbiota and the Potential of Lactobacillus Derivatives in Maintaining Vaginal Health'. *Microbial Cell Factories* 19 (1): 1–24. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01464-4>.
- Chhabra, Seema, Ranjana Walker Minz, and Biman Saikia. 2012. 'Immunofluorescence in Dermatology'. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology* 78 (6): 677–91. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.102355>.
- Chiller, Katarina, Bryan A. Selkin, and George J. Murakawa. 2001. 'Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin'. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 6 (3): 170–74. <https://doi.org/10.1046/J.0022-202X.2001.00043.X>.
- Chin, Young-Won, Marcy J Balunas, Hee Byung Chai, and A Douglas Kinghorn. 2006. 'Drug Discovery From Natural Sources'. *AAPS Journal* 14 (8(2)): E239-53. <https://doi.org/10.1007/BF02854894>.
- Christaki, Eirini, Markella Marcou, and Andreas Tofarides. 2019. 'Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence'. *Journal of Molecular Evolution* 2019 88:1 88 (1): 26–40. <https://doi.org/10.1007/S00239-019-09914-3>.
- Cox Gad, Shayne. 2007. 'Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes'.
- Cui, Xiangyi, Lanlin Wang, Yuhong Lü, and Changwu Yue. 2022. 'Development and Research Progress of Anti-Drug Resistant Fungal Drugs'. *Journal of Infection and Public Health* 15 (9): 986–1000. <https://doi.org/10.1016/J.JIPH.2022.08.004>.
- Dadgostar, Porooshat. 2019. 'Antimicrobial Resistance: Implications and Costs'. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>.
- Dawson, Annelise L., Robert P. Dellavalle, and Dirk M. Elston. 2012. 'Infectious Skin Diseases: A Review and Needs Assessment'. *Dermatologic Clinics* 30 (1): 141–51. <https://doi.org/10.1016/J.DET.2011.08.003>.
- Debandi, María V, Nora J François, and Marta E Daraio. 2011. 'Evaluation of Different Membranes for in Vitro Release of Anticellulitic Actives'. *ACI* 2 (2): 97–105.
- Diastuti, Hartiwi, Mochammad Chasani, and Suwandri. 2019. 'Antibacterial Activity of

- Benzyl Benzoate and Crotepoide from *Kaempferia Rotunda* L. Rhizome'. *Indonesian Journal of Chemistry* 20 (1): 9–15. <https://doi.org/10.22146/IJC.37526>.
- 'Disulfiram | C10H20N2S4 - PubChem'. 2023. National Center for Biotechnology Information. 2023. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Disulfiram>.
- Downs, A. M.R., K. A. Stafford, I. Harvey, and G. C. Coles. 1999. 'Evidence for Double Resistance to Permethrin and Malathion in Head Lice'. *British Journal of Dermatology* 141 (3): 508–11. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1999.03046.x>.
- Dragicevic-curic, Nina, and Howard I Maibach. 2015. *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement. Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-47039-8>.
- Ehrie, Jarrod, Emily E. Hartwell, Paige E. Morris, Tami L. Mark, and Henry R. Kranzler. 2020. 'Survey of Addiction Specialists' Use of Medications to Treat Alcohol Use Disorder'. *Frontiers in Psychiatry* 11 (February): 504812. <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2020.00047/BIBTEX>.
- Elmas, Aykut, Güliz Akyüz, Ayhan Bergal, Müberra Andaç, and Ömer Andaç. 2020. 'Mathematical Modelling of Drug Release'. *Res. Eng. Struct. Mat* 6 (4): 327–50. <https://doi.org/10.17515/resm2020.178na0122>.
- EMA. 1995. 'ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology'. *CPMP/ICH/381/95*. <http://www.emea.eu.int>.
- EMA. 2000. 'ICH Topic Q 6 A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances'. *European Medicine Agency*. <http://www.emea.eu.int>.
- EMA. 2018. 'Draft Guideline on Quality and Equivalence of Topical Products'. *Ema/Chmp/Qwp/708282/2018* 44 (October): 1–36. www.ema.europa.eu/contact.
- Engelman, Daniel, and Andrew C Steer. 2018. 'Tropical Medicine and Infectious Disease Control Strategies for Scabies'. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed3030098>.
- EP. 2005. 'Rectal Capsules Rectal Solutions , Emulsions and Suspensions Semi-Solid Preparations for Cutaneous Application'. *European Pharmacopoeia*, no. 1: 623–24.
- Escobar-Chávez, J J, V Merino-Sanjuán, M López-Cervantes, Z Urban-Morlan, E Piñón-Segundo, D Quintanar-Guerrero, and A Ganem-Quintanar. 2008. 'The Tape-Stripping Technique as a Method for Drug Quantification in Skin'. *J Pharm Pharmaceut Sci (Www. cspsCanada.org)* 11 (1): 104–30.
- Etebu, Ebimieowei, and Ibemologi Arikekpar. 2016. 'Antibiotics: Classification and Mechanisms of Action with Emphasis on Molecular Perspectives'. *IJAMBR* 4: 90–101.
- European Commission. 2017. 'A European One Health Action Plan Against Antimicrobial Resistance (Amr)'. 2017.
- Faiman, Morris D., J. Chris Jensen, and Roy B. Lacoursiere. 1984. 'Elimination Kinetics of Disulfiram in Alcoholics after Single and Repeated Doses'. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 36 (4): 520–26. <https://doi.org/10.1038/CLPT.1984.213>.

- FDA. 2018. 'The Drug Development Process | FDA'. 2018. <https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process>.
- Feldmeier, Hermann. 2014. 'Treatment of Parasitic Skin Diseases with Dimeticones A New Family of Compounds with a Purely Physical Mode of Action'. *Tropical Medicine and Health* 42 (2 Suppl): 15. <https://doi.org/10.2149/TMH.2014-S02>.
- Franzen, Lutz, Dominik Selzer, Joachim W. Fluhr, Ulrich F. Schaefer, and Maike Windbergs. 2013. 'Towards Drug Quantification in Human Skin with Confocal Raman Microscopy'. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 84 (2): 437–44. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2012.11.017>.
- Frazier, K. R., J. A. Moore, and T. E. Long. 2019. 'Antibacterial Activity of Disulfiram and Its Metabolites'. *Journal of Applied Microbiology* 126 (1): 79–86. <https://doi.org/10.1111/JAM.14094>.
- Frey Tirri, Brigitte. 2011. 'Antimicrobial Topical Agents Used in the Vagina'. *Current Problems in Dermatology* 40 (February): 36–47. <https://doi.org/10.1159/000321047>.
- G Lawson, Alastair D. 2012. 'Antibody-Enabled Small-Molecule Drug Discovery'. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd3756>.
- Gao, Jiachen, Zhaodi Gong, Dawn Montesano, Erica Glazer, and Kenneth Liegner. 2020. "Repurposing" Disulfiram in the Treatment of Lyme Disease and Babesiosis: Retrospective Review of First 3 Years' Experience in One Medical Practice'. *Antibiotics* 2020, Vol. 9, Page 868 9 (12): 868. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9120868>.
- Gaval-Cruz, Meriem, and David Weinshenker. 2009. 'Mechanisms of Disulfiram-Induced Cocaine Abstinence: Antabuse and Cocaine Relapse'. *Molecular Interventions* 9 (4): 175–87. <https://doi.org/10.1124/MI.9.4.6>.
- Geonnotti, Anthony R., and David F. Katz. 2010. 'Compartmental Transport Model of Microbicide Delivery by an Intravaginal Ring'. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99 (8): 3514. <https://doi.org/10.1002/JPS.22120>.
- Gil-Gil, Teresa, Pablo Laborda, Fernando Sanz-García, Sara Hernando-Amado, Paula Blanco, and José Luis Martínez. 2019. 'Antimicrobial Resistance: A Multifaceted Problem with Multipronged Solutions'. *MicrobiologyOpen* 8 (11). <https://doi.org/10.1002/MBO3.945>.
- Gipson, Ilene K. 2001. 'Frontiers in Bioscience 6 - MUCINS OF THE HUMAN ENDOCERVIX'. *[Frontiers in Bioscience* 6: 1245–55. <http://www.bioscience.org/u37153137/gaDTRQo7632rgysaGWQYT64356/2001/v6/d/gipson/gipson.pdf>.
- Gold, Joann M., and Isha Shrimanker. 2022. 'Physiology, Vaginal'. *StatPearls*, July. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545147/>.
- Goyal, Ritu, Lauren K Macri, Hilton M Kaplan, MbBCh Fcssa, and Joachim Kohn. 2015. 'Nanoparticles and Nanofibers for Topical Drug Delivery'.

- <http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>.
- Graziottin, Alessandra, and Dania Gambini. 2015. 'Anatomy and Physiology of Genital Organs-Women'. *American Family Physician* 99 (10): 635–42. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2019/0515/p635.html>.
- Gunning, Karen, Bernadette Kiraly, and Karly Pippitt. 2019. 'Lice and Scabies: Treatment Update'. *American Family Physician* 99 (10): 635–42. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2019/0515/p635.html>.
- Gupta, Aditya K, and Maanasa Venkataraman. 2022. 'Antifungal Resistance in Superficial Mycoses'. *Journal of Dermatological Treatment* 33 (4): 1888–95. <https://doi.org/10.1080/09546634.2021.1942421>.
- Hajikhani, Bahareh, Mehdi Goudarzi, Sareh Kakavandi, Sana Amini, Samira Zamani, Alex van Belkum, Hossein Goudarzi, and Masoud Dadashi. 2020. 'The Global Prevalence of Fusidic Acid Resistance in Clinical Isolates of Staphylococcus Aureus: A Systematic Review and Meta-Analysis'. <https://doi.org/10.1186/s13756-021-00943-6>.
- Hao, Weifeng, Dan Qiao, Ying Han, Ning Du, Xuefen Li, Yufeng Fan, Xuejun Ge, and Heyu Zhang. 2021. 'Identification of Disulfiram as a Potential Antifungal Drug by Screening Small Molecular Libraries'. *Journal of Infection and Chemotherapy* 27 (5): 696–701. <https://doi.org/10.1016/J.JIAC.2020.12.012>.
- Harriott, Melphine M., and Mairi C. Noverr. 2009. 'Candida Albicans and Staphylococcus Aureus Form Polymicrobial Biofilms: Effects on Antimicrobial Resistance'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (9): 3914–22. <https://doi.org/10.1128/AAC.00657-09/ASSET/10BCDD06-77D7-440F-9D7E-A80367BF7F7D/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0090983730006.JPEG>.
- Hartman-Adams, Holly, Christine Banvard, and Gregory Juckett. 2014. 'Impetigo: Diagnosis and Treatment'. *American Family Physician* 90 (4): 229–35. <https://doi.org/10.36290/der.2018.042>.
- Hatlen, Timothy J, and Loren G Miller. 2021. 'Staphylococcal Skin and Soft Tissue Infections'. *Infect Dis Clin N Am* 35: 81–105. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2020.10.003>.
- Hay, Roderick J. 2000. 'Dermatophytoses and Other Superficial Mycoses'. *Atlas of Infectious Diseases*, 191–203. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9313-0_13.
- Hayden, Frederick G., and Menno D. De Jong. 2011. 'Emerging Influenza Antiviral Resistance Threats'. *Journal of Infectious Diseases* 203 (1): 6–10. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq012>.
- Haylen, Bernard T., Dzung Vu, Audris Wong, and Sarah Livingstone. 2022. 'Surgical Anatomy of the Mid-vagina'. *Neurourology and Urodynamics* 41 (6): 1293. <https://doi.org/10.1002/NAU.24994>.
- Hopf, N. B., C. Champmartin, L. Schenk, A. Berthet, L. Chedik, J. L. Du Plessis, A. Franken, et al. 2020. 'Reflections on the OECD Guidelines for in Vitro Skin Absorption Studies'. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 117 (November): 104752. <https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2020.104752>.

- Horita, Yasuhiro, Takemasa Takii, Tetsuya Yagi, Kenji Ogawa, Nagatoshi Fujiwara, Emi Inagaki, Laurent Kremer, et al. 2012. 'Antitubercular Activity of Disulfiram, an Antialcoholism Drug, against Multidrug- and Extensively Drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis Isolates'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (8): 4140–45. https://doi.org/10.1128/AAC.06445-11/SUPPL_FILE/ZAC999101081SO1.PDF.
- Hussain, Alamdar, and Fakhrul Ahsan. 2005. 'The Vagina as a Route for Systemic Drug Delivery'. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society* 103 (2): 301–13. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2004.11.034>.
- 'ICH Official Web Site : ICH'. 2023. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. 2023. <https://www.ich.org/>.
- J. H. Draize, G. Woodard and H. O. Calvery. 1944. 'Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes'. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1944. [https://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455qlt3d2q\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=677786](https://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=677786).
- J. Larsen, Martha, Scott D. Larsen, Andrew Fribley, Jolanta Grembecka, Kristoff Homan, Anna Mapp, Andrew Haak, et al. 2014. 'The Role of HTS in Drug Discovery at the University of Michigan'. *Comb Chem High Throughput Screen* 17 (3): 210–30.
- Jeffery-Smith, Anna, Surabhi K. Taori, Silke Schelenz, Katie Jeffery, Elizabeth M. Johnson, Andrew Borman, Rohini Manuel, and Colin S. Brown. 2018. 'Candida Auris: A Review of the Literature'. *Clinical Microbiology Reviews* 31 (1). <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-17/ASSET/A4EF16DA-232A-403D-AE90-E90B9247DB73/ASSETS/GRAPHIC/ZCM0011826100009.JPEG>.
- Johansson, B. 1992. 'A Review of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Disulfiram and Its Metabolites'. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 86 (S369): 15–26. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0447.1992.TB03310.X>.
- Johnson, Wilbur, Wilma F. Bergfeld, Donald V. Belsito, Ronald A. Hill, Curtis D. Klaassen, Daniel C. Liebler, James G. Marks, et al. 2017. 'Safety Assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid and Its Salts, and Benzyl Benzoate'. *International Journal of Toxicology* 36 (3_suppl): 5S–30S. <https://doi.org/10.1177/1091581817728996>.
- Jorge, Paula, Andreia Patrícia Magalhães, Tânia Grainha, Diana Alves, Ana Margarida Sousa, Susana Patrícia Lopes, and Maria Olívia Pereira. 2019. 'Antimicrobial Resistance Three Ways: Healthcare Crisis, Major Concepts and the Relevance of Biofilms'. *FEMS Microbiology Ecology* 95 (8): 115. <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIZ115>.
- Joy Macalino, Stephani Y, Vijayakumar Gosu, Sunhye Hong, and Sun Choi. 2015. 'Role of Computer-Aided Drug Design in Modern Drug Discovery'. *Archives of Pharmacal Research* 38: 1686–1701. <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0640-5>.
- Joyner, Helen S., and Christopher R. Daubert. 2017. 'Rheological Principles for Food

- Analysis'. *Food Analysis*, no. 29: 511–27. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_29.
- Karthikeyan, Kaliaperumal. 2005. 'Treatment of Scabies: Newer Perspectives'. *Postgraduate Medical Journal* 81 (951): 7–11. <https://doi.org/10.1136/PGMJ.2003.018390>.
- Khan, Seema, Smita Singhal, Tarun Mathur, Dilip J. Upadhyay, and Ashok Rattan. 2007. 'Antifungal Potential of Disulfiram'. *Japanese Journal of Medical Mycology* 48 (3): 109–13. <https://doi.org/10.3314/jjmm.48.109>.
- Kimberlin, David W., Donald M. Coen, Karen K. Biron, Jeffrey I. Cohen, Robert A. Lamb, Mark McKinlay, Emilio A. Emini, and Richard J. Whitley. 1995. 'Molecular Mechanisms of Antiviral Resistance'. *Antiviral Research* 26 (4): 369–401. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(95\)00027-J](https://doi.org/10.1016/0166-3542(95)00027-J).
- Knights, Harry D J. 2017. 'A Critical Review of the Evidence Concerning the HIV Latency Reversing Effect of Disulfiram, the Possible Explanations for Its Inability to Reduce the Size of the Latent Reservoir In Vivo, and the Caveats Associated with Its Use in Practice'. <https://doi.org/10.1155/2017/8239428>.
- Kucirka, Susan A., Lawrence Charles Parish, and Joseph A. Witkowski. 1983. 'The Story of Lindane Resistance and Head Lice'. *International Journal of Dermatology* 22 (10): 551–55. <https://doi.org/10.1111/J.1365-4362.1983.TB02123.X>.
- Kumar Bhardwaj, Santosh. 2015. 'A Review: HPLC Method Development and Validation'. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry* 5 (4): 76–81. <http://www.urpjournals.com>.
- Lanz, Jenna, Nicholas Biniáz-Harris, Mara Kuvaldina, Samta Jain, Kim Lewis, and Brian A. Fallon. 2023. 'Disulfiram: Mechanisms, Applications, and Challenges'. *Antibiotics* 12 (3). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12030524/S1>.
- Lara Bohórquez, Concepción, Virginia Porras Hidalgo, Pilar Jurado Escámez, and M. Luz López Hidalgo. 2011. 'Carcinoma Verrugoso de Vagina. Presentación de Un Caso'. *Progresos de Obstetricia Y Ginecología* 54 (12): 640–42. <https://doi.org/10.1016/J.POG.2011.07.002>.
- Lee, Joon Hee. 2019. 'Perspectives towards Antibiotic Resistance: From Molecules to Population'. *Journal of Microbiology* 57 (3): 181–84. <https://doi.org/10.1007/S12275-019-0718-8/METRICS>.
- Lee, Yu Ming, Yulander Duh, Shih Ting Wang, Michael M.C. Lai, Hanna S. Yuan, and Carmay Lim. 2016. 'Using an Old Drug to Target a New Drug Site: Application of Disulfiram to Target the Zn-Site in HCV NS5A Protein'. *Journal of the American Chemical Society* 138 (11): 3856–62. https://doi.org/10.1021/JACS.6B00299/ASSET/IMAGES/LARGE/JA-2016-002997_0008.JPEG.
- Leelananda, Sumudu P., and Steffen Lindert. 2016. 'Computational Methods in Drug Discovery'. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 12:267 12 (1): 2694–2718. <https://doi.org/10.3762/BJOC.12.267>.

- Lewis, David J, Parikshit Deshmukh, Aleksander A Tedstone, Floriana Tuna, and Paul O'Brien. 2014. 'On the Interaction of copper(II) with Disulfiram †'. *Chem. Commun* 50: 13334. <https://doi.org/10.1039/c4cc04767b>.
- Li, Hong, Jingyu Wang, Chunfu Wu, Lihui Wang, Zhe Sheng Chen, and Wei Cui. 2020. 'The Combination of Disulfiram and Copper for Cancer Treatment'. *Drug Discovery Today* 25 (6): 1099–1108. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.04.003>.
- Liebana, Ernesto, Alessandra Carattoli, Teresa M. Coque, Henrik Hasman, Anna Pelagia Magiorakos, Dik Mevius, Luisa Peixe, et al. 2013. 'Public Health Risks of Enterobacterial Isolates Producing Extended-Spectrum β -Lactamases or AmpC β -Lactamases in Food and Food-Producing Animals: An EU Perspective of Epidemiology, Analytical Methods, Risk Factors, and Control Options'. *Clinical Infectious Diseases* 56 (7): 1030–37. <https://doi.org/10.1093/cid/cis1043>.
- Lin, Min Han, David C. Moses, Chih Hua Hsieh, Shu Chun Cheng, Yau Hung Chen, Chiao Yin Sun, and Chi Yuan Chou. 2018. 'Disulfiram Can Inhibit MERS and SARS Coronavirus Papain-like Proteases via Different Modes'. *Antiviral Research* 150 (February): 155–63. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2017.12.015>.
- Lio, Peter A., and Elaine T. Kaye. 2009. 'Topical Antibacterial Agents'. *Infectious Disease Clinics of North America* 23 (4): 945–63. <https://doi.org/10.1016/J.IDC.2009.06.006>.
- Liu, P., S. Brown, T. Goktug, P. Channathodiyil, V. Kannappan, J. P. Hugnot, P. O. Guichet, et al. 2012. 'Cytotoxic Effect of Disulfiram/copper on Human Glioblastoma Cell Lines and ALDH-Positive Cancer-Stem-like Cells'. *British Journal of Cancer* 107 (9): 1488. <https://doi.org/10.1038/BJC.2012.442>.
- Loftsson, Thorsteinn, Pekka Jarho, Már Másson, and Tomi Järvinen. 2005. 'Cyclodextrins in Drug Delivery'. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2 (2): 335–51. <https://doi.org/10.1517/17425247.2.1.335>.
- Long, Timothy E. 2017. 'Repurposing Thiram and Disulfiram as Antibacterial Agents for Multidrug-Resistant Staphylococcus Aureus Infections'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (9). <https://doi.org/10.1128/AAC.00898-17>.
- Lu, Chen, Xinyan Li, Yongya Ren, and Xiao Zhang. 2021. 'Disulfiram: A Novel Repurposed Drug for Cancer Therapy'. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 87 (2): 159–72. <https://doi.org/10.1007/S00280-020-04216-8/FIGURES/2>.
- Luo, Jiajia, Cornelia Betschart, James A. Ashton-Miller, and John O.L. DeLancey. 2016. 'Quantitative Analyses of Variability in Normal Vaginal Shape and Dimension on MR Images'. *International Urogynecology Journal* 27 (7): 1087. <https://doi.org/10.1007/S00192-016-2949-0>.
- Maciej Serda, Fernando Gertum Becker, Michelle Cleary, R M Team, Helge Holtermann, Disclaimer The, National Agenda, et al. 2000. 'Therapeutic Patents for Topical and Transdermal Drug Delivery Systems'. Edited by G. Balint, B. Antala, C. Carty, J-M. A. Mabieme, I. B. Amar, and A. Kaplanova. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 10 (7): 1035–43. <https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>.

- Makurvet, Favour Danladi. 2020. 'Biologics vs. Small Molecules: Drug Costs and Patient Access'. *Medicine in Drug Discovery* 9 (March): 100075. <https://doi.org/10.1016/J.MEDIDD.2020.100075>.
- Marquez, Lewis, and Cassandra L. Quave. 2020. 'Prevalence and Therapeutic Challenges of Fungal Drug Resistance: Role for Plants in Drug Discovery'. *Antibiotics* 2020, Vol. 9, Page 150 9 (4): 150. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9040150>.
- Marson, Breno M., Victor Concentino, Allan M. Junkert, Mariana M. Fachi, Raquel O. Vilhena, and Roberto Pontarolo. 2020. 'Validation of Analytical Methods in a Pharmaceutical Quality System: An Overview Focused on HPLC Methods'. *Química Nova* 43 (8): 1190–1203. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170589>.
- Martino, Patrick Di. 2022. 'Antimicrobial Agents and Microbial Ecology'. *AIMS Microbiology* 8 (1): 1. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2022001>.
- McNeil, J. Chase, Kristina G. Hulten, Sheldon L. Kaplan, and Edward O. Mason. 2011. 'Mupirocin Resistance in Staphylococcus Aureus Causing Recurrent Skin and Soft Tissue Infections in Children'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (5): 2431–33. <https://doi.org/10.1128/AAC.01587-10/FORMAT/EPUB>.
- Mei, Liling, Jintian Chen, Siqin Yu, Ying Huang, Yecheng Xie, Hui Wang, Xin Pan, and Chuanbin Wu. 2017. 'Expansible Thermal Gelling Foam Aerosol for Vaginal Drug Delivery'. *Drug Delivery* 24 (1): 1325–37. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1375575>.
- Meneguello, Jean Eduardo, Letícia Sayuri Murase, João Vitor Perez de Souza, Cheila Guimarães de Oliveira, Luciana Dias Ghiraldi-Lopes, Jorge Juarez Vieira Teixeira, Regiane Bertin de Lima Scodro, et al. 2022. 'Systematic Review of Disulfiram as an Antibacterial Agent: What Is the Evidence?' *International Journal of Antimicrobial Agents* 59 (5): 106578. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2022.106578>.
- Mezger, Thomas. 2020. 'The Rheology Handbook'. *The Rheology Handbook*, November, 33–125. <https://doi.org/10.1515/9783748603702/HTML>.
- Michael, Carolyn Anne, Dale Dominey-Howes, and Maurizio Labbate. 2014. 'The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management'. *Frontiers in Public Health* 2 (SEP). <https://doi.org/10.3389/FPUBH.2014.00145>.
- Moffarah, Anne Spichler, Mayar Al Mohajer, Bonnie L. Hurwitz, and David G. Armstrong. 2016. 'Skin and Soft Tissue Infections'. Edited by Randall T. Hayden, Donna M. Wolk, Karen C. Carroll, and Yi-Wei Tang. *Microbiology Spectrum* 4 (4). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.DMIH2-0014-2015>.
- Mohammed, Yousuf, Amy Holmes, Philip Chi Lip Kwok, Tushar Kumeria, Sarika Namjoshi, Mohammad Imran, Lana Matteucci, et al. 2022. 'Advances and Future Perspectives in Epithelial Drug Delivery'. *Advanced Drug Delivery Reviews* 186 (July): 1–38. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2022.114293>.
- Morrow, Thomas, and Linda Hull Felcone. 2004. 'Defining the Difference: What Makes Biologics Unique'. *Biotechnology Healthcare* 1 (4): 24. [/pmc/articles/PMC3564302/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1613564302/).

- Muhaj, Fiorinda F., Saira J. George, Celine D. Nguyen, and Stephen K. Tyring. 2022. 'Antimicrobials and Resistance Part II: Antifungals, Antivirals, and Antiparasitics'. *Journal of the American Academy of Dermatology* 86 (6): 1207–26. <https://doi.org/10.1016/J.JAAD.2021.11.065>.
- Nair, Nisha, Raja Biswas, Friedrich Götz, and Lalitha Biswas. 2014. 'Impact of Staphylococcus Aureus on Pathogenesis in Polymicrobial Infections'. *Infection and Immunity* 82 (6): 2162–69. <https://doi.org/10.1128/IAI.00059-14/FORMAT/EPUB>.
- Narayan, Padma. 2011. 'Overview of Drug Product Development'. *Current Protocols in Pharmacology* 55 (1): 7.3.1-7.3.29. <https://doi.org/10.1002/0471141755.PH0703S55>.
- National Center for Biotechnology Information. 2022. 'Disulfiram: Chemical and Physical Properties'. *PubChem Compound Summary for CID 3117*.
- Netzloff, Frank, C. M. Lehr, P. W. Wertz, and U. F. Schaefer. 2005. 'The Human Epidermis Models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An Evaluation of Morphology and Their Suitability for Testing Phototoxicity, Irritancy, Corrosivity, and Substance Transport'. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60 (2): 167–78. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2005.03.004>.
- Neupane, Rabin, Sai H.S. Boddu, Jwala Renukuntla, R. Jayachandra Babu, and Amit K. Tiwari. 2020. 'Alternatives to Biological Skin in Permeation Studies: Current Trends and Possibilities'. *Pharmaceutics* 2020, Vol. 12, Page 152 12 (2): 152. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12020152>.
- Nicol, Noreen Heer. 2005. 'Anatomy and Physiology of the Skin.' *Dermatology Nursing / Dermatology Nurses' Association* 17 (1): 62. https://doi.org/10.4324/9780203450505_chapter_1.
- Nogara, Pablo Andrei, Folorunsho Bright Omage, Gustavo Roni Bolzan, Cássia Pereira Delgado, Laura Orian, and João Batista Teixeira Rocha. 2022. 'Reactivity and Binding Mode of Disulfiram, Its Metabolites, and Derivatives in SARS-CoV-2 PLpro: Insights from Computational Chemistry Studies'. *Journal of Molecular Modeling* 28 (11): 1–12. <https://doi.org/10.1007/S00894-022-05341-2/FIGURES/5>.
- Norrby, S. Ragnar, Carl Erik Nord, and Roger Finch. 2005. 'Lack of Development of New Antimicrobial Drugs: A Potential Serious Threat to Public Health'. *Lancet Infectious Diseases* 5 (2): 115–19. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70086-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70086-4).
- O'Neill, JIM. 2016. 'Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations the Review on Antimicrobial Resistance Chaired'.
- Odell, Ian D, and Deborah Cook. 2013. 'Immunofluorescence Techniques'. *Journal of Investigative Dermatology*, 4. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.455>.
- Owen, Derek H., and David F. Katz. 1999. 'A Vaginal Fluid Simulant'. *Contraception* 59 (2): 91–95. [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(99\)00010-4](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(99)00010-4).
- Pacios, Olga, Lucia Blasco, Inès Bleriot, Laura Fernandez-Garcia, Mónica González Bardanca, Antón Ambroa, María López, German Bou, and Maria Tomás. 2020. 'Strategies to Combat Multidrug-Resistant and Persistent Infectious Diseases'.

- Antibiotics* 9 (2): 65. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020065>.
- Pai, Varadraj, Ajantha Ganavalli, and Naveen Narayanshetty Kikkeri. 2018. 'Antifungal Resistance in Dermatology'. *Indian Journal of Dermatology* 63 (5): 361. https://doi.org/10.4103/IJD.IJD_131_17.
- Pang, Zheng, Renee Raudonis, Bernard R. Glick, Tong Jun Lin, and Zhenyu Cheng. 2019. 'Antibiotic Resistance in Pseudomonas Aeruginosa: Mechanisms and Alternative Therapeutic Strategies'. *Biotechnology Advances* 37 (1): 177–92. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2018.11.013>.
- Pangli, Harpreet, and Anthony Papp. 2019. 'The Relation between Positive Screening Results and MRSA Infections in Burn Patients'. *Burns* 45 (7): 1585–92. <https://doi.org/10.1016/J.BURNS.2019.02.023>.
- Papadopoulou, Vasiliki, Kosmas Kosmidis, Marilena Vlachou, and Panos Macheras. 2006. 'On the Use of the Weibull Function for the Discernment of Drug Release Mechanisms'. *International Journal of Pharmaceutics* 309: 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.044>.
- Parvathaneni, Vineela, Nishant S Kulkarni, Aaron Muth, and Vivek Gupta. 2019. 'Drug Repurposing: A Promising Tool to Accelerate the Drug Discovery Process'. *Drug Discovery Today* 24 (10). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.06.014>.
- Peniche, Alex G., Adam R. Renslo, Peter C. Melby, and Bruno L. Travi. 2015. 'Antileishmanial Activity of Disulfiram and Thiuram Disulfide Analogs in an Ex Vivo Model System Is Selectively Enhanced by the Addition of Divalent Metal Ions'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (10): 6463–70. <https://doi.org/10.1128/AAC.05131-14/ASSET/7C9130A5-8419-4A6E-82A9-CF2179595891/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0101544540002.JPEG>.
- Perera, G, and † R Hay. 2005. 'A Guide to Antibiotic Resistance in Bacterial Skin Infections'. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2005.01296.x>.
- Pérez, JL, C Carranza, and F Mateos. 2009. 'Antiparasitarios. Revisión de Los Fármacos Útiles En El Tratamiento de Parasitosis Clásicas Y Emergentes'. *Rev. Esp. Quimioter* 22 (2): 93–105.
- Piddock, Laura J.V. 2012. 'The Crisis of No New Antibiotics-What Is the Way Forward?' *The Lancet Infectious Diseases* 12 (3): 249–53. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70316-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70316-4).
- Planta, Margaret B. 2007. 'The Role of Poverty in Antimicrobial Resistance'. *Journal of the American Board of Family Medicine: JABFM* 20 (6): 533–39. <https://doi.org/10.3122/JABFM.2007.06.070019>.
- Pokrovskaya, Varvara, and Timor Baasov. 2010. 'Dual-Acting Hybrid Antibiotics: A Promising Strategy to Combat Bacterial Resistance'. *Expert Opinion on Drug Discovery* 5 (9): 883–902. <https://doi.org/10.1517/17460441.2010.508069>.
- Poole, Keith. 2011. 'Pseudomonas Aeruginosa: Resistance to the Max'. *Frontiers in Microbiology* 2 (APR): 9831. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2011.00065/BIBTEX>.
- Potula, Hari Hara S.K., Jahanbanoo Shahryari, Mohammed Inayathullah, Andrey

- Victorovich Malkovskiy, Kwang Min Kim, and Jayakumar Rajadas. 2020. 'Repurposing Disulfiram (Tetraethylthiuram Disulfide) as a Potential Drug Candidate against *Borrelia Burgdorferi* In Vitro and In Vivo'. *Antibiotics* 2020, Vol. 9, Page 633 9 (9): 633. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9090633>.
- Powers, J. H. 2004. 'Antimicrobial Drug Development - The Past, the Present, and the Future'. *Clinical Microbiology and Infection, Supplement* 10 (4): 23–31. <https://doi.org/10.1111/j.1465-0691.2004.1007.x>.
- Praça, Fabíola Silva Garcia, Wanessa Silva Garcia Medina, Josimar O. Eloy, Raquel Petrilli, Patrícia Mazureki Campos, Andreia Ascenso, and Maria Vitória L.B. Bentley. 2018. 'Evaluation of Critical Parameters for in Vitro Skin Permeation and Penetration Studies Using Animal Skin Models'. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 111 (September 2017): 121–32. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.034>.
- Pristov, K. E., and M. A. Ghannoum. 2019. 'Resistance of *Candida* to Azoles and Echinocandins Worldwide'. *Clinical Microbiology and Infection* 25 (7): 792–98. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2019.03.028>.
- Pushpakom, Sudeep, Francesco Iorio, Patrick A Eyers, K Jane Escott, Shirley Hopper, Andrew Wells, Andrew Doig, et al. 2018. 'Drug Repurposing: Progress, Challenges and Recommendations'. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>.
- Qian, L., and F. L. Cantrell. 2017. 'Disulfiram'. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, October, 208–9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00725-9>.
- R. Kona, F., D. Buac, and A. M. Burger. 2011. 'Disulfiram, and Disulfiram Derivatives as Novel Potential Anticancer Drugs Targeting the Ubiquitin Proteasome System in Both Preclinical and Clinical Studies'. *Current Cancer Drug Targets* 11 (3): 338–346(9).
- R, Kharat A. 2014. 'Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review'. *Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP)* 3 (5): 388–96. www.saspublisher.com.
- Raney, Sam. 2016. 'Draft Guidance on Acyclovir'. *Food and Drug Administration*, 1–26.
- Raos, Nenad, Dean F Martin, Barbara B Martin, Robert Alldredge, Seth C Rasmussen, Alexander Kraft, M John Plater, Gregory L Côté, and Victoria L Finkenstadt. 2008. 'From Disulfiram to Antabuse: The Invention of a Drug'. *Hist. Chem* 33 (2).
- Ravani, Laura, Elisabetta Esposito, Christian Bories, Vanessa Lievin Le Moal, Philippe M. Loiseau, Madeleine Djabourov, Rita Cortesi, and Kawthar Bouchemal. 2013. 'Clotrimazole-Loaded Nanostructured Lipid Carrier Hydrogels: Thermal Analysis and in Vitro Studies'. *International Journal of Pharmaceutics* 454 (2): 695–702. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.015>.
- Rawat, Amit, Simerdeep Singh Gupta, Haripriya Kalluri, Michael Lowenborg, Kuljit Bhatia, and Kevin Warner. 2019. 'Rheological Characterization in the Development of Topical Drug Products'. *AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series* 36: 3–45. https://doi.org/10.1007/978-3-030-17355-5_1.
- Ray, Paul D., Bo Wen Huang, and Yoshiaki Tsuji. 2012. 'Reactive Oxygen Species (ROS)

- Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signaling'. *Cellular Signalling* 24 (5): 981–90. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2012.01.008>.
- Renwick, Mathew, and Elias Mossialos. 2018. 'What Are the Economic Barriers of Antibiotic R&D and How Can We Overcome Them?' *Expert Opinion on Drug Discovery* 13 (10): 889–92. <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1515908>.
- Rha, Chokyun. 1975. 'Theories and Principles of Viscosity'. *Theory, Determination and Control of Physical Properties of Food Materials*, 7–24. https://doi.org/10.1007/978-94-010-1731-2_3.
- Rhodes, L.E., and B.L. Diffey. 1997. 'Fluorescence Spectroscopy: A Rapid, Noninvasive Method for Measurement of Skin Surface Thickness of Topical Agents'. *British Journal of Dermatology* 136 (1): 12–17. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2133.1997.D01-1135.X>.
- Romani, Lucia, Andrew C. Steer, Margot J. Whitfeld, and John M. Kaldor. 2015. 'Prevalence of Scabies and Impetigo Worldwide: A Systematic Review'. *The Lancet Infectious Diseases* 15 (8): 960–67. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00132-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00132-2).
- Rudrapal, Mithun, Shubham J. Khairnar, and Anil G. Jadhav. 2020. 'Drug Repurposing (DR): An Emerging Approach in Drug Discovery'. *Drug Repurposing - Hypothesis, Molecular Aspects and Therapeutic Applications*, December. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.93193>.
- Salavastru, C. M., O. Chosidow, M. J. Boffa, M. Janier, and G. S. Tiplica. 2017. 'European Guideline for the Management of Scabies'. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 31 (8): 1248–53. <https://doi.org/10.1111/jdv.14351>.
- Salavastru, C M, O Chosidow, M Janier, and G S Tiplica. 2017. 'European Guideline for the Management of Pediculosis Pubis'. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. <https://doi.org/10.1111/jdv.14420>.
- Saldívar-González, Fernanda, Fernando D. Prieto-Martínez, and José L. Medina-Franco. 2017. 'Descubrimiento Y Desarrollo de Fármacos: Un Enfoque Computacional'. *Educacion Quimica* 28 (1): 51–58. <https://doi.org/10.1016/J.EQ.2016.06.002>.
- Sanglard, Dominique, Françoise Ischer, Michel Monod, and Jacques Bille. 1996. 'Susceptibilities of Candida Albicans Multidrug Transporter Mutants to Various Antifungal Agents and Other Metabolic Inhibitors'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40 (10): 2300–2305. <https://doi.org/10.1128/aac.40.10.2300>.
- SCCS/1602/18 EM. 2018. 'The SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and Their Safety Evaluation 10th Revision'. *Scientific Committee on Consumer Safety*.
- Secor, W. E., and Phuc Nguyen Dinh. 2006. 'Mechanisms of Resistance to Antiparasitic Agents.' *Manual of Clinical Microbiology: Volume 2*, no. Ed.9: 2240–49.
- Semisolid, Nonsterile. 1997. 'Office of Training and Communications Division of Communications Management The Drug Information Branch' 20857: 301–827.

- <http://www.fda.gov/cder/guidance.htm>.
- Shah, Kinjal R, Sunita A Chaudhary, and Tejal A Mehta. 2014. 'Polyox (Polyethylene Oxide) Multifunctional Polymer in Novel Drug Delivery System'. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 6 (2): 95–101. www.ijpsdr.com.
- Shaikh, Rahamatullah, Thakur Raj Singh, Martin Garland, A. Woolfson, and Ryan Donnelly. 2011. 'Mucoadhesive Drug Delivery Systems'. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 3 (1): 89–100. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.76478>.
- Shukla, Rahul, Mayank Handa, and Vishwas P. Pardhi. 2020. 'Introduction to Pharmaceutical Product Development'. *Pharmaceutical Drug Product Development and Process Optimization*, May, 1–32. <https://doi.org/10.1201/9780367821678-1>.
- Shukla, Suneet, Zuben E. Sauna, Rajendra Prasad, and Suresh V. Ambudkar. 2004. 'Disulfiram Is a Potent Modulator of Multidrug Transporter Cdr1p of *Candida Albicans*'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322 (2): 520–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.151>.
- Siepmann, J., and N. A. Peppas. 2001. 'Modeling of Drug Release from Delivery Systems Based on Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC)'. *Advanced Drug Delivery Reviews* 48 (2–3): 139–57. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00112-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00112-0).
- Siepmann, J, and F Siepmann. 2013. 'Mathematical Modeling of Drug Dissolution'. *International Journal of Pharmaceutics* 453: 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.044>.
- Silva Dantas, Alessandra da. 2022. 'Antimicrobial Resistance'. *Molecular Microbiology* 117 (5): 959–60. <https://doi.org/10.1111/MMI.14912>.
- Singh Malik, Deepinder, Neeraj Mital, and Gurpreet Kaur. 2016. 'Topical Drug Delivery Systems: A Patent Review'. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 26 (2): 213–28. <https://doi.org/10.1517/13543776.2016.1131267>.
- Sinha, Shivani, Gloria Lin, and Katalin Ferenczi. 2021. 'The Skin Microbiome and the Gut-Skin Axis'. *Clinics in Dermatology* 39 (5): 829–39. <https://doi.org/10.1016/J.CLINDERMATOL.2021.08.021>.
- Siska, B., E. Snejdrova, I. Machac, P. Dolecek, and J. Martiska. 2018. 'Contribution to the Rheological Testing of Pharmaceutical Semisolids'. <https://doi.org/are.uab.cat/10.1080/10837450.2018.1425432> 24 (1): 80–88. <https://doi.org/10.1080/10837450.2018.1425432>.
- Skinner, Marilyn D., Pierre Lahmek, Héloïse Pham, and Henri Jean Aubin. 2014. 'Disulfiram Efficacy in the Treatment of Alcohol Dependence: A Meta-Analysis'. *PLOS ONE* 9 (2): e87366. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0087366>.
- Soerensen, Christian A.S., Kristine Appel Uldall Pallesen, Nadja Trier Munk, and Christian Vestergaard. 2021. 'Eleven Danish Patients Diagnosed with Scabies and Treated with Tenutex®'. *Clinical Case Reports* 9 (3): 1688–90. <https://doi.org/10.1002/CCR3.3880>.
- Spann, Candace Thornton, Susan C. Taylor, and Jeffrey M. Weinberg. 2004. 'Topical

- Antimicrobial Agents in Dermatology'. *Disease-a-Month* 50 (7): 407–21. <https://doi.org/10.1016/J.DISAMONTH.2004.05.011>.
- Spellberg, Brad. 2014. 'The Future of Antibiotics'. *Critical Care* 18 (3): 1–7. <https://doi.org/10.1186/cc13948>.
- Ständer, Sascha, and Sonja Ständer. 2021. 'Itch in Scabies—What Do We Know?' *Frontiers in Medicine* 8 (February): 628392. <https://doi.org/10.3389/FMED.2021.628392>.
- Stefani, Stefania, Doo Ryeon Chung, Jodi A Lindsay, Alex W Friedrich, Angela M Kearns, Henrik Westh, and Fiona M Mackenzie. 2012. 'Meticillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA): Global Epidemiology and Harmonisation of Typing Methods'. *International Journal of Antimicrobial Agents* 39: 273–82. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.030>.
- Stylianou, Marios, Evgeny Kuleskiy, José Pedro Lopes, Margareta Granlund, Krister Wennerberg, and Constantin F. Urban. 2014. 'Antifungal Application of Nonantifungal Drugs'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (2): 1055–62. <https://doi.org/10.1128/AAC.01087-13/ASSET/89C12A2B-3CDC-4DAF-AF55-4C19A596A7F6/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0021425870001.JPEG>.
- Suh, Jesse J., Helen M. Pettinati, Kyle M. Kampman, and Charles P. O'Brien. 2006. 'The Status of Disulfiram: A Half of a Century Later'. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 26 (3): 290–302. <https://doi.org/10.1097/01.JCP.0000222512.25649.08>.
- Supe, Shibani, and Pooja Takudage. 2021. 'Methods for Evaluating Penetration of Drug into the Skin: A Review'. *Skin Research and Technology* 27 (3): 299–308. <https://doi.org/10.1111/SRT.12968>.
- Tadros, Th F. 1994. 'Fundamental Principles of Emulsion Rheology and Their Applications'. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 91 (C): 39–55. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(93\)02709-N](https://doi.org/10.1016/0927-7757(93)02709-N).
- Tan, Siang Yong, and Yvonne Tatsumura. 2015. 'Alexander Fleming (1881-1955): Discoverer of Penicillin'. *Singapore Medical Journal* 56 (7): 366–67. <https://doi.org/10.11622/SMEDJ.2015105>.
- Thakare, Ritesh, Manjulika Shukla, Grace Kaul, Arunava Dasgupta, and Sidharth Chopra. 2019. 'Repurposing Disulfiram for Treatment of Staphylococcus Aureus Infections'. *International Journal of Antimicrobial Agents* 53 (6): 709–15. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2019.03.024>.
- Torin Huzil, J., Siv Sivaloganathan, Mohammad Kohandel, and Marianna Foldvari. 2011. 'Drug Delivery through the Skin: Molecular Simulations of Barrier Lipids to Design More Effective Noninvasive Dermal and Transdermal Delivery Systems for Small Molecules, Biologics, and Cosmetics'. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 3 (5): 449–62. <https://doi.org/10.1002/WNAN.147>.
- Toutou, Elka, Victor M Meidan, and Ehud Horwitz. 1998. 'Methods for Quantitative

- Determination of Drug Localized in the Skin'. *Journal of Controlled Release* 56: 7–21.
- USP. 2013. 'Interim Revision Announcement 2 (3) Topical and Transdermal Drug Products Official'. *United States Pharmacopeial Convention*.
- Vestita, Michelangelo, Pasquale Tedeschi, and Domenico Bonamonte. 2022. 'Anatomy and Physiology of the Skin'. *Textbook of Plastic and Reconstructive Surgery*, 3–13. https://doi.org/10.1007/978-3-030-82335-1_1.
- Watkins, Jean. 2010. 'Pruritis, Part 4: Infestations'. *Practice Nursing* 21 (5): 247–52. <https://doi.org/10.12968/PNUR.2010.21.5.47921>.
- Welss, Thomas, David A Basketter, and Klaus R Schröder. 2004. 'In Vitro Skin Irritation: Facts and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models'. *Toxicology in Vitro* 18 18: 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2003.09.009>.
- Weyermann, Jörg, Dirk Lochmann, and Andreas Zimmer. 2005. 'A Practical Note on the Use of Cytotoxicity Assays'. *International Journal of Pharmaceutics* 288: 369–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.09.018>.
- WHO. 2017. 'Global Action Plan on Antimicrobial Resistance'. *World Health Organization* 10 (9): 1–28. www.paprika-annecy.com.
- Wiegand, C., and U. C. Hipler. 2009. 'Evaluation of Biocompatibility and Cytotoxicity Using Keratinocyte and Fibroblast Cultures'. *Skin Pharmacology and Physiology* 22 (2): 74–82. <https://doi.org/10.1159/000178866>.
- Williamson, Deborah A., Glen P. Carter, and Benjamin P. Howden. 2017. 'Current and Emerging Topical Antibacterials and Antiseptics: Agents, Action, and Resistance Patterns'. *Clinical Microbiology Reviews* 30 (3): 827–60. <https://doi.org/10.1128/CMR.00112-16/FORMAT/EPUB>.
- Wong, Tin Wui, Meenakshi Dhanawat, and Michael John Rathbone. 2014. 'Vaginal Drug Delivery: Strategies and Concerns in Polymeric Nanoparticle Development'. <http://dx.doi.org/10.1517/17425247.2014.924499> 11 (9): 1419–34. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.924499>.
- Wright, Curtis, and Richard D. Moore. 1990. 'Disulfiram Treatment of Alcoholism'. *The American Journal of Medicine* 88 (6): 647–55. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(90\)90534-K](https://doi.org/10.1016/0002-9343(90)90534-K).
- Wu, Peng, and David W. Grainger. 2006. 'Drug/device Combinations for Local Drug Therapies and Infection Prophylaxis'. *Biomaterials* 27 (11): 2450–67. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2005.11.031>.
- Xu, Zhihong, Barrett Eichler, Eytan A. Klausner, Jetty Duffy-Matzner, and Weifan Zheng. 2022. 'Lead/Drug Discovery from Natural Resources'. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 8280 27 (23): 8280. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27238280>.
- Yermak, Irina M., Viktoriya N. Davydova, and Aleksandra V. Volod'ko. 2022. 'Mucoadhesive Marine Polysaccharides'. *Marine Drugs* 2022, Vol. 20, Page 522 20 (8): 522. <https://doi.org/10.3390/MD20080522>.
- Yu, Tao, Karl Malcolm, David Woolfson, David S. Jones, and Gavin P. Andrews. 2011.

- 'Vaginal Gel Drug Delivery Systems: Understanding Rheological Characteristics and Performance'. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.600119> 8 (10): 1309–22. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.600119>.
- Zaidi, Zohra, and Sean W. Lanigan. 2010. 'Skin: Structure and Function'. *Dermatology in Clinical Practice*, 1–15. https://doi.org/10.1007/978-1-84882-862-9_1.
- Zang, Ru, Ding Li, I-Ching Tang, Jufang Wang, and Shang-Tian Yang. 2012. 'Cell-Based Assays in High-Throughput Screening for Drug Discovery'. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* 1: 31–51.
- Zha, Jie, Feili Chen, Huijuan Dong, Pengcheng Shi, Yao Yao, Yanyan Zhang, Rongwei Li, et al. 2014. 'Disulfiram Targeting Lymphoid Malignant Cell Lines via ROS-JNK Activation as Well as Nrf2 and NF- κ B Pathway Inhibition'. *Journal of Translational Medicine* 12 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-163/FIGURES/7>.
- Zhang, Shuxing. 2011. 'Computer-Aided Drug Discovery and Development'. *Methods in Molecular Biology* 716: 23–38. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-012-6_2/COVER.
- Zhang, Yong, Meirong Huo, Jianping Zhou, Aifeng Zou, Weize Li, Chengli Yao, and Shaofei Xie. 2010. 'DSSolver: An Add-in Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles'. *AAPS Journal* 12 (3): 263–71. <https://doi.org/10.1208/S12248-010-9185-1>.
- Zou, Ying, and Howard I. Maibach. 2018. 'Dermal–epidermal Separation Methods: Research Implications'. *Archives of Dermatological Research* 310 (1). <https://doi.org/10.1007/s00403-017-1774-8>.
- Zsikó, Stella, Erzsébet Csányi, Anita Kovács, Mária Budai-Szűcs, Attila Gácsi, and Szilvia Berkó. 2019. 'Methods to Evaluate Skin Penetration In Vitro'. *Scientia Pharmaceutica* 2019, Vol. 87, Page 19–87 (3): 19. <https://doi.org/10.3390/SCIPHARM87030019>.